

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ  
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

**Камышный А.М., Топол И.А.,  
Полищук Н.Н., Деген А.С., Букина Ю.В.**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ  
ИНОСТРАННЫХ СТУДЕНТОВ ПРИ ПОДГОТОВКЕ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Часть I

Модуль №1. Морфология, физиология и генетика микроорганизмов. Антибиотики

Запорожье - 2019

**Авторы:** Камышный А.М. - профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ, доцент Полищук Н.Н., старший преподаватель Топол И.А., ассистент Деген А.С., ассистент Букина Ю.В.

**Под редакцией** заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожского государственного медицинского университета, профессора **Камышного А.М.**

Методические указания для самостоятельной работы студентов при подготовке к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии одобрены цикловой методической комиссией по медико-биологическим дисциплинам Запорожского государственного медицинского университета от \_\_\_\_ \_\_\_\_\_ 2019 года, протокол № \_\_\_\_\_.

## Содержание

1. Практическое занятие №1. Организация бактериологической лаборатории. Красители и простые методы окраски микроорганизмов. Микроскопия. Окраска бактерий по Граму .....
2. Практическое занятие №2. Морфология и структура бактерий. Сложные методы окраски (по Ожешко, Нейсеру, Бурри-Гинсу, Цилю-Нильсену). Морфология и структура спирохет, актиномицетов, грибов .....
3. Практическое занятие №3. Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Стерилизация .....
4. Практическое занятие №4. Рост и размножение микроорганизмов. Выделение чистых культур бактерий .....
5. Практическое занятие №5. Генетика микроорганизмов. Методы биотехнологии и генной инженерии .....
6. Практическое занятие №6. Химиотерапевтические препараты. Антибиотики .....
7. Практическое занятие №7. Субмодуль по теме: «Морфология и физиология микроорганизмов».....

## Практическое занятие №1

### Тема: "Организация бактериологической лаборатории. Красители и простые методы окраски микроорганизмов. Микроскопия"

Микроорганизмы являются возбудителями инфекционных болезней, которые часто встречаются в практике врача. Для того чтобы правильно поставить диагноз инфекционного заболевания, необходимо хорошо знать морфологию микроорганизмов, их основные формы, уметь различать их под микроскопом. Каждый врач должен владеть методом микроскопии, для чего необходимо знать устройство микроскопа и правила работы с ним.

Бактериологическая лаборатория - это важнейшая структура в системе микробиологической диагностической службы практических лечебных и диагностических учреждений здравоохранения. Поэтому на первом занятии важно изучить структуру бактериологической лаборатории, ее оснащение, организацию рабочего места врача-бактериолога.

#### Цель самоподготовки

После самостоятельного изучения темы студент должен знать:

- предмет и задачи микробиологии; - основные этапы исторического развития микробиологии;
- положение микроорганизмов среди других живых существ, принципы их классификации, основные группы микроорганизмов; основные формы бактерий,
- принцип и правила микроскопии с иммерсионным объективом;
- усвоить принцип тёмнопольной, фазово-контрастной, люминесцентной и электронной микроскопии;
- принципы организации и назначение бактериологической, вирусологической, серологической лабораторий,
- оснащение лаборатории и рабочего места бактериолога,
- правила работы на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии.

#### Исходный уровень знаний

Для усвоения материала темы необходимо знать:

- устройство оптического микроскопа, принцип его работы, разрешающую способность;
- преломление света, показатель преломления среды,
- устройство и принцип работы тёмнопольного и фазово-контрастного микроскопов;
- устройство и принцип работы люминесцентного микроскопа;
- устройство и принцип работы электронного микроскопа;
- принципы разделения живых существ на эукариоты и прокариоты.

#### Цель занятия

1. Ознакомиться с принципами организации и оборудования бактериологической, вирусологической и серологической лабораторий.
2. Приобрести навыки соблюдения правил противоэпидемического режима и техники безопасности в бактериологической лаборатории.

3. Ознакомиться с основными типами микроскопии, их значением. Овладеть микроскопическим методом исследования.
4. Ознакомиться с основными формами бактерий.
5. Получить чёткое представление о положении микробов среди живых организмов и принципах их классификации.
6. Научится готовить микропрепараты бактерий и окрашивать их простым методом.

### **План изучения темы**

1. Микробиология: определение предмета, отрасли микробиологии, методы исследования, задачи медицинской микробиологии, связь с другими науками, основные разделы.
2. Место бактерий среди других микроорганизмов, размеры, основные формы.
3. Методы изучения морфологии бактерий, простые методы окраски, основные красители.
4. Специальные методы микроскопии.

### **После изучения темы студент должен уметь**

1. Готовить фиксированные препараты из культур микроорганизмов, растущих на плотных питательных средах.
2. Окрашивать препараты простыми методами.
3. Проводить микроскопию с иммерсионной системой микроскопа.
4. Дифференцировать микроорганизмы по морфологическим, тинкториальным свойствам и интерпретировать полученные результаты.

Микробиологическая лаборатория, оборудование и правила работы. Строение биологического светового микроскопа и правила работы с ним. Микроскопия готовых препаратов. Морфология микроорганизмов. Приготовление и окрашивание препаратов для микроскопии. Простые и сложные методы окраски бактерий (окрашивание по Граму).

### **Задания для самостоятельной работы во время подготовки к занятию.**

1. Дайте характеристику простым и сложным методам окраски. Приведите примеры.
2. Опишите этапы приготовления препарата-мазка из культуры микроорганизмов, выращенных на плотной питательной среде.
3. Дайте характеристику физическим и химическим методам фиксации. Приведите примеры.
4. Опишите процедуру окраски препарата-мазка по методу Грама (указать последовательность нанесения красителей и время экспозиции).
5. В какой цвет при окраске по методу Грама окрашиваются грамположительные микроорганизмы, почему? Приведите примеры грамположительных микроорганизмов.
6. В какой цвет при окраске по методу Грама окрашиваются грамотрицательные микроорганизмы, почему? Приведите примеры грамотрицательных микроорганизмов.

**Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:**

Термин	Определение
Медицинская микробиология, вирусология и иммунология	Медицинская микробиология, вирусология и иммунология - это учебная дисциплина, совокупность наук о происхождении, эволюции и свойствах патогенных для человека микроорганизмов, нормальной микрофлоры тела человека, закономерностях взаимодействия микроорганизмов с макроорганизмом, иммунной системе и механизмах противоинфекционного иммунитета, методах диагностики, принципах лечения и специфической профилактики инфекционных заболеваний.
Бактериологическая лаборатория	Бактериологическая лаборатория - это первичное подразделение в системе бактериологической службы практических лечебных и диагностических учреждений здравоохранения.
Материал	Материал - это субстраты, ткани (гной, мокрота, кровь, моча, фекалии, биоптаты тканей и тому подобное), которые берут у больного или из объектов внешней среды для исследования с целью выявления возбудителей заболеваний или антител к ним (в сыворотке крови), то есть для постановки диагноза инфекционной патологии, или выявления возбудителей в окружающей среде.
Препарат-мазок	Препарат-мазок готовят на предметном стекле из материала или чистых культур микроорганизмов и исследуют в микроскопе с целью выявления возбудителей заболеваний или исследования их морфологических и тинкториальных свойств. Препарат-мазок из бактерий еще называют бактериальным препаратом.
Анилиновые красители	Анилиновые красители - это производные анилина, которые используют для окрашивания микроорганизмов с целью увеличения их контрастности и дальнейшей микроскопии.
Иммерсионная система	Иммерсионная система состоит из иммерсионного объектива (x90) и иммерсионного масла, которое обеспечивает концентрацию лучей, проходящих через микроскопический объект в объектив и, таким образом, обеспечивает лучшие условия для исследования микроорганизмов.

### Теоретические вопросы к занятию:

- Структура бактериологической лаборатории, назначение отдельных подразделений.
- Организация и оснащение рабочего места врача-бактериолога.
- Методика изготовления бактериального препарата-мазка.
- Анилиновые красители и приготовление красящих растворов для окраски микроорганизмов.
- Простые и сложные методы окраски микроорганизмов.

- Световой микроскоп, строение, назначение отдельных частей.
- Определение увеличения и разрешающей способности микроскопа. Иммерсионная система.

### **Практические задания, которые выполняются на занятии:**

- Ознакомиться с принципами организации бактериологической лаборатории и правилами работы в ней.
- Изучить красители и красящие растворы, которые используются в микробиологии.
- Усвоить методику изготовления бактериологического препарата и окрашивания простыми методами.
- Овладеть методами микроскопического исследования бактериологических препаратов с использованием иммерсионного объектива.

### **Содержание темы:**

На практическом занятии студенты изучают структуру бактериологической лаборатории, правила работы в ней, организацию рабочего места врача-бактериолога, готовят мазки из чистых культур стафилококка и кишечной палочки, красят мазки простыми методами (метиленовым синим и фуксином), изучают методику микроскопии бактериальных препаратов с использованием иммерсионного объектива. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

### **Рекомендации по оформлению протокола.**

#### **Правила работы в учебной микробиологической лаборатории**

Работа в микробиологической лаборатории на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии и требует строгого соблюдения специальных правил, так как исследования проводятся с использованием культур патогенных микроорганизмов и заразного материала от больных и экспериментальных животных. Соблюдение этих правил необходимо для обеспечения, как личной безопасности, так и безопасности окружающих.

1. Студенты должны приходить на кафедру в халатах, шапочках, иметь сменную обувь. **Категорически запрещается работать в учебных лабораториях** без халатов и шапочек, выпускать из-под спецодежды волосы, воротнички, курить, принимать напитки и пищу, пользоваться мобильной связью.

2. Каждый студент имеет постоянное рабочее место в лаборатории. Из личных вещей студента на рабочем месте допускается наличие только рабочей тетради, в которой делаются записи и зарисовки. Ничего лишнего (в том числе учебников и других книг) на рабочем столе не должно быть.

3. С собой нужно иметь: тетрадь для ведения дневника работы, тетрадь для тестовых заданий, цветные карандаши. Не разрешается вести записи красными чернилами или пастой.

4. До начала работы необходимо проверить рабочее место, состояние микроскопа, о недостатках сообщить дежурным студентам и преподавателю.

5. Работать аккуратно, экономно расходовать материалы и реактивы, по окончании работы гасить спиртовку. Необходимо проявлять максимальное внимание ко всем этапам

работы с культурами и заражёнными микробами животными. Во время проведения посевов и приготовления мазков не разговаривать и не ходить по лаборатории. Все пробирки и чашки с посевами должны быть промаркированы. В случае загрязнения заразным материалом поверхности стола и других предметов, кожи рук и лица - обработать дезинфицирующим раствором и немедленно сообщить о случившемся преподавателю. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны необходимо помещать в сосуды с дезинфицирующим раствором (пипетки – при полном погружении). Пинцеты, бактериальные петли, иглы после работы с исследуемым материалом необходимо прожигать в пламени горелки.

6. В конце занятия привести в порядок рабочее место. Все предметы на рабочем столе разместить в том порядке, в каком они были до работы. Отработанный материал (культуры, микробный материал и др.) поместить в бикс для обеззараживания путём автоклавирования. Микроскоп привести в порядок и поместить в шкаф. Вылить в специальную ёмкость воду из лотков, обработать при необходимости руки дезинфицирующим раствором и вымыть их с мылом.

### **Обязанности дежурного:**

1. Дежурные получают от лаборанта всё необходимое для работы, проверяют, всё ли в порядке.

2. Устраняют все недостатки, возникающие в процессе работы.

3. Собирают у студентов посевы, ставят в термостат; использованные посевы сдают лаборанту для обеззараживания путём автоклавирования.

4. По окончании работы следят за тем, чтобы все рабочие места были приведены в порядок, микроскопы протерты и поставлены на место.

5. Сдают лабораторию лаборанту.

### **Методы обеззараживания отработанного материала и контаминированных патогенными микробами объектов внешней среды**

Использованные в работе предметные стекла, пипетки, стеклянные шпатели и металлические инструменты немедленно после работы помещают в стеклянные банки с дезинфицирующим раствором (3% раствор хлорамина), которые должны находиться на рабочем столе. Посуда, в которой выращивались микроорганизмы (чашки, пробирки, флаконы), складываются в биксы для обеззараживания путём автоклавирования. Рабочее место по окончании работы подлежит уборке с применением дезинфицирующих средств. Используют более концентрированные растворы, чем для обработки рук, - 5% раствор хлорамина. Пинцетом берут кусочек ваты, смоченной дезинфицирующим раствором, и протирают поверхность стола на рабочем месте.

### **Мероприятия при возникновении аварии**

Объём мероприятий по ликвидации аварии зависит от характера выполняемой работы, вида и свойств возбудителя, масштабов аварии:

- авария с разбрызгиванием патогенных биологических агентов (ПБА), т.е. с образованием аэрозоля (бой пробирок, флаконов или колб с жидкой культурой; бой чашек и пробирок с культурами на агаре с конденсатом; разбрызгивание бактериальной



суспензии из пипетки или шприца; разбрызгивание тканевой жидкости при вскрытии трупов заражённых животных, а также другие аварии, ведущие к контаминации воздуха или окружающих предметов, например, авария при транспортировании ПБА в автоклавную и между подразделениями);

- авария без разбрызгивания ПБА (касание петлей с инфицированным материалом края чашки, пробирки, флакона, кристаллизатора, трещина на чашке Петри, пробирке, флаконе с биологическим материалом, падение на стол твёрдой частицы при обжигании петли после посева, касание поверхности посева на твёрдой питательной среде и т.п.);

- авария, связанная с нарушением целостности кожных покровов. В подразделении, проводящем работу с ПБА, в специально отведённом месте хранят гидропульт (автомакс), комплекты рабочей (для переодевания пострадавших) и защитной (для сотрудников, ликвидирующих последствия аварии) одежды, аварийную аптечку.

В состав аварийной аптечки входит: спирт этиловый 70% (два флакона по 100 мл), 2 - 3 навески перманганата калия для приготовления 0,05% раствора (0,0125 г перманганата калия + 25 мл воды), стерильная дистиллированная вода, 5% настойка йода, ножницы с закруглёнными браншами, перевязочные средства (вата, бинты и пр.), жгут и нашатырный спирт. Кроме вышеперечисленного, в аптечке подразделений, проводящих вирусологические исследования, должны быть 1% раствор борной кислоты, интерферон или индуктор интерферона; в аптечке подразделения, проводящего микологические исследования - 1% раствор борной кислоты или навески для приготовления раствора (0,25 г борной кислоты + 25 мл воды).

### **Порядок действий при возникновении аварийной ситуации.**

#### ***При аварии с разбрызгиванием ПБА:***

- все находящиеся в помещении лица немедленно прекращают работу и, задержав дыхание, выходят из заразного помещения в предбокс, плотно закрывают дверь, включают аварийную сигнализацию и сообщают о случившемся руководителю подразделения;

- руки обрабатывают дезинфицирующим раствором или спиртом; если лицо не было защищено, то его обильно обрабатывают 700 этиловым спиртом;

- слизистые глаз, носа и рта обрабатывают препаратами из аварийной аптечки; рот и горло прополаскивают 700 этиловым спиртом, в нос закапывают раствор марганцовокислого калия 1:100000 или 1% раствор борной кислоты, а при аварии с вирусами затем закапывают интерферон или индуктор интерферона;

- защитную одежду снимают, погружают в дезинфицирующий раствор или помещают в бикс (бак) для автоклавирования;

- открытые части тела протирают 700 этиловым спиртом;

- в глаза (можно и в нос) закапывают растворы антибиотиков или других средств, к которым чувствителен возбудитель; - принимают гигиенический душ;

- надевают чистую рабочую одежду. Порядок проведения дезинфекционных мероприятий:

- сотрудники, участвующие в ликвидации аварии, должны быть одеты в хирургический халат, косынку, пластиковые бахилы;

- при проведении дезинфекции способом орошения в качестве СИЗ органов дыхания используются респираторы марки РУ-60 М или РПГ-68 с патроном, соответствующим применяемому дезинфектанту, или противогаз типа ГП-5;
- для обработки используют дезинфицирующий раствор, эффективный в отношении соответствующего инфекционного агента;
- дезинфекцию помещения проводят, разбрызгивая из гидропульта (автомакса) дезинфицирующий раствор от входной двери и далее, продвигаясь по обработанной территории и орошая перед собой все предметы (пол, стены, потолок) и воздушную среду;
- через 2 часа после первичной обработки собирают тампонами, смоченными дезинфицирующим раствором, осколки разбитой посуды, погружая их в ёмкость с дезинфицирующим раствором; лабораторную посуду с посевами, находившуюся в момент аварии на рабочих поверхностях, погружают в ёмкость с дезинфицирующим раствором или обтирают салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором, и помещают в ёмкость для автоклавирования;
- по окончании дезинфекции воздух и поверхности в помещении обеззараживают бактерицидными лампами по режимам согласно нормативным документам;
- сотрудник, проводивший дезинфекционную обработку, выходит в предбокс или коридор, снимает защитную одежду, погружая её в дезинфицирующий раствор;
- спустя два часа проводят уборку помещения, после чего работа может быть возобновлена. Методы антисептической обработки рук лабораторных работников, контаминированных исследуемым материалом, культурами патогенных микробов

По окончании работы руки обрабатывают дезинфицирующим раствором. Используют ватные тампоны или марлевые салфетки, смоченные в 70% этиловом спирте (1% хлорамин, 3% раствор лизола). Последовательность обработки: тыл кисти, ладонная поверхность, межпальцевые пространства и ногтевые ложа, т.е. с учётом первоначальной обработки менее, а потом наиболее загрязнённых мест. Вначале обрабатывают левую, а потом правую кисть руки. При загрязнении рук культурой патогенного микроба или патологическим материалом сразу же обрабатывают данный участок кожи, покрывая его на 3-5 минут ватой, смоченной в дезинфицирующем растворе. После обработки рук дезинфицирующим раствором их моют водой с мылом.

### **В структуру микробиологической лаборатории входят:**

1. лабораторные комнаты и боксы с предбоксником для работы в асептических условиях;
2. оборудованное помещение для приготовления и стерилизации питательных сред, посуды;
3. помещение для обеззараживания отработанного инфицированного материала (автоклавная);
4. моечная; термостатная, препаратная;
5. комната для забора или приема исследуемого материала и его регистрации;
6. виварий – помещение для содержания лабораторных животных.

**Современная лаборатория должна быть оснащена:** микроскопами, автоклавами, термостатами, сушильными шкапами, центрифугами, дистиллятором, аппаратом для

свертывания сыворотки, рН-метром, холодильником, лабораторными весами, фотоэлектроколориметром, аппаратом для автоматического подсчета колоний, бактериальными фильтрами, компьютером, бактерицидными лампами.

### **Организация рабочего места врача-бактериолога**

1. Бактериологическая петля.
2. Микроскоп с осветителем.
3. Штатив для пробирок.
4. Пробирка со стерильным физиологическим раствором.
5. Пастеровская пипетка.
6. Анилиновые красители.
7. Иммерсионное масло.
8. Лоток с мостиком для окрашивания мазков.
9. Покровные, предметные стекла.
10. Стерильные мерные пипетки.
11. Фильтровальная бумага.
12. Стеклограф.
13. Спиртовка.
14. Стакан с дезинфицирующим раствором.
15. Газовая горелка.
16. Стерильные пробирки, чашки Петри.
17. Дозаторы и наборы стерильных наконечников.

### **Методы лабораторных исследований:**

1. Микроскопический (бактериоскопический, вирусоскопический, протозооскопический) – приготовление и окраска мазков из исследуемого материала от больного и изучение его под микроскопом.
2. Бактериологический метод сводится к посеву материала от больного на соответствующие питательные среды, выделению чистой культуры возбудителя и определения его видовой принадлежности, а, следовательно, окончательной постановке диагноза.
3. Серологический метод базируется на выявлении специфических антител в сыворотке крови больных к определенному возбудителю.
4. Биологический (экспериментальный) заключается в заражении чувствительных лабораторных животных выделенной чистой культурой возбудителя, исследуемым материалом или введении бактериальных токсинов и воспроизведении типичной картины инфекционного заболевания.
5. Аллергический метод дает возможность поставить диагноз при помощи внутрикожных аллергических проб, которые выявляют состояние повышенной чувствительности к возбудителю или его продуктам жизнедеятельности (аллергенов).

### **Приготовление фиксированных препаратов из культур микроорганизмов**

Приготовление окрашенного препарата из культуры микроорганизмов включает:

- 1) приготовление мазка,
- 2) высушивание мазка,

- 3) фиксацию,
- 4) окраску.

**Приготовление мазка.** При приготовлении мазка из культуры микроорганизмов, выросшей на поверхности плотной питательной среды, на обезжиренное предметное стекло наносят петлёй небольшую каплю физиологического раствора, располагая её в центре круга, нарисованного с обратной стороны карандашом по стеклу. При работе спиртовка должна находиться прямо перед вами, на удобном для работы расстоянии. Предметное стекло должно находиться в чашке Петри или лотке: **категорически запрещается готовить мазки на предметном стекле, лежащем на столе!** В правую руку берут бактериологическую петлю, в левую - пробирку с культурой. Петлю стерилизуют, внося её в пламя горелки в вертикальном положении. После того как петля накалится докрасна, проводят конец петледержателя через пламя. После этого из пробирки вынимают пробку, удерживая её мизинцем правой руки. После обжигания на спиртовке края пробирки в неё вносят петлю, которую охлаждают, прикасаясь к стенкам пробирки. Затем петлей с поверхности среды снимают небольшое количество культуры. Не касаясь стенок пробирки, вынимают петлю и закрывают пробирку пробкой над спиртовкой. После этого пробирку с культурой помещают в штатив, а культуру на петле вносят в приготовленную заранее каплю физиологического раствора, хорошо размешивают и равномерно распределяют по стеклу в виде небольшого круга или овала 1–1,5 см в диаметре. По окончании приготовления мазка петлю вновь стерилизуют в пламени спиртовки. Для приготовления мазка из бульонной культуры на предметное стекло наносят 1–2 петли исследуемого материала, стерилизуя петлю перед каждым погружением в бульонную культуру микроорганизма, как описано выше, и равномерно распределяют по стеклу (в этом случае не требуется предварительного нанесения на стекло физиологического раствора).

**Высушивание мазка.** Высушивание мазка производится на воздухе. Для ускорения высушивания предметное стекло с мазком, обращенным кверху, можно подержать в струе тёплого воздуха высоко над пламенем спиртовки, не внося препарат в пламя.

**Фиксация мазка.** Для этого используют физический и химический методы. **Физический метод** заключается в фиксации мазка над пламенем спиртовки (горелки) в течение нескольких секунд мазком вверх (тремякратно по 1 секунде). Эту операцию проводят достаточно быстро, стараясь не перегреть мазок, так как при перегревании могут произойти необратимые изменения в клетке. **Химический метод** фиксации является более мягким по сравнению с фиксацией на пламени. В качестве фиксаторов используют этанол, ацетон, смесь Никифорова (эквивалентное соотношение этанола и эфира), метанол, формалин. После фиксации мазок можно окрашивать.

**Окраска мазка.** Для окраски мазка следуют предписаниям для каждой методики окраски. При окраске простым способом на мазок наносят несколько капель раствора красителя так, чтобы весь мазок был покрыт им. Краситель оставляют на определённое время. Затем препарат промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

### **Анилиновые красители**

Для окраски микроорганизмов используют анилиновые красители. Это, в основном, производные органических соединений (анилина и других). Это порошки,

которые не растворяются в воде, но хорошо растворяются в органических растворителях (спирт, ацетон). Для окрашивания микроорганизмов используют спиртово-водные растворы.

Анилиновые красители бывают: основные, кислые и нейтральные. Для окрашивания бактерий используют основные красители. Методы окрашивания микроорганизмов делятся на простые и сложные. Простые методы используют 1 краситель. Сложные используют 2 и больше красителей, или 1 краситель и вещества, которые не окрашивают микробы, но принимают участие в процессе окрашивания.

Цвет	Основные	Кислые
Красный	Нейтральный красный Фуксин Сафранин Пиронин	Кислый фуксин Эозин
Фиолетовый	Генцианвиолет Кристалвиолет	
Синий	Метиленовый синий	
Зеленый	Малахитовый зеленый Бриллиантовый зеленый	
Черный	Инулин	Нигрозин
Желтый		Конго Аурантил
Коричневый	Хризоидин	

## Методы микроскопии

### I. Световая микроскопия.

Для световой микроскопии применяют искусственное освещение объекта, которое создают специальными осветителями.

Увеличение микроскопа = увеличение объектива × увеличение окуляра.

Увеличение светового микроскопа 900-1000 раз.

Разрешающая способность микроскопа - это минимальное расстояние между двумя точками, которые видны раздельно.

Разрешающая способность светового микроскопа 0,2 мкм.

### Движение лучей в сухой и иммерсионной системах светового микроскопа

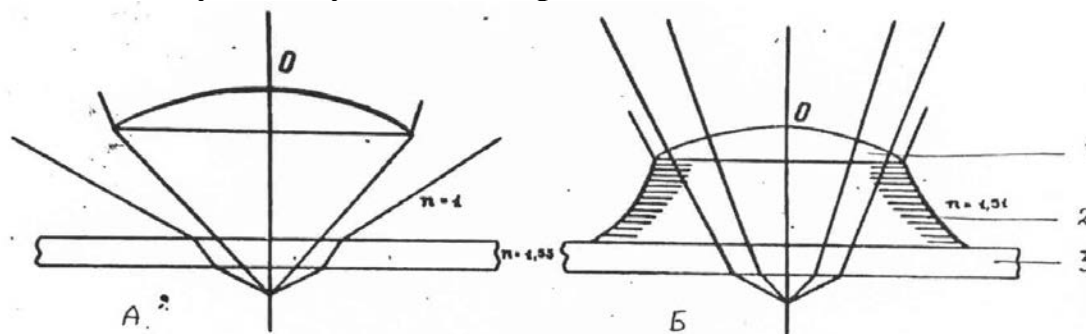


Схема лучей при сухой (А) и масляной (Б) системах;

1-фронтальная линза объектива; 2-иммерсионное масло ( $n = 1,515$ ); 3-предметное стекло ( $n = 1,52$ ).

### **1. Светлопольная микроскопия.**

Этот метод наиболее распространен. Чтобы увидеть микроорганизмы, необходимо повысить их контрастность. Для этого применяют разные методы окраски. В процессе приготовления препарата-мазка микроорганизмы погибают. В светлопольном микроскопе объект виден в поле зрения на светлом фоне.

### **2. Темнопольная микроскопия.**

Светлые объекты (микроорганизмы) видны в поле зрения на черном фоне. Применяется специальный конденсор темного поля. Объект освещается не снизу (как в светлопольном микроскопе), а сбоку. В объектив попадают отоброженные от объекта лучи.

Метод позволяет исследовать живые микроорганизмы, их окраска не нужна.

### **3. Фазово-контрастная микроскопия.**

Световая волна, проходя через объект, изменяет фазу (отстает по фазе от соседних волн). Глаз человека не замечает отличия по фазе, а выявляет только отличия в длине волны (цвет) и в амплитуде (контрастность). Фазово-контрастное устройство позволяет превращать отличия по фазе в изменения амплитуды, в результате чего прозрачные объекты становятся контрастными и хорошо видимыми. Микроорганизмы видны в виде темных (черных) объектов на светлом фоне.

Метод позволяет исследовать живые микроорганизмы.

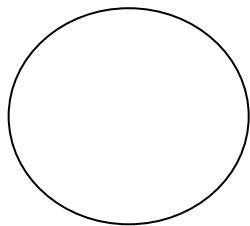
### **4. Люминесцентная микроскопия.**

Некоторые вещества способны светиться под воздействием падающего на них света. Это явление называется люминесценция (флюоресценция). Микроорганизмы имеют очень слабую собственную (или первичную) люминесценцию. Поэтому их окрашивают специальными красителями - **флюорохромами** (акридин оранжевый, берберин, ауорофосфин и др.). Они окрашивают не только микробную клетку, но и избирательно определенные структуры, вызывая их свечение. Для микроскопии применяют люминесцентный микроскоп, в котором объект освещается коротковолновой частью видимого спектра, - сине-фиолетовые лучи с длиной волны 460 нм.

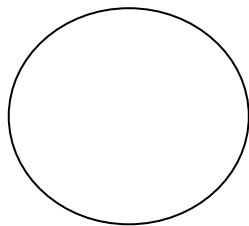
## **II. Электронная микроскопия**

Электронный микроскоп предназначен для изучения клеточных структур, размеры которых отвечают нанометрам (нм) и ангстрем ( $\text{\AA}$ ). Электронный микроскоп дает увеличение от нескольких тысяч до 100 и больше тысяч раз, разрешающая способность до  $5\text{\AA}$ . Существует несколько видов электронной микроскопии: просвечивающая, сканирующая (растровая), теневая и др. Принцип электронной микроскопии основан на использовании электронных лучей. Часть электронов задерживается объектом, другие проходят через него. Попадая на флюоресцирующий экран, электроны формируют изображение объекта. Электронная микроскопия позволяет изучать как внутриклеточные структуры, так и поверхность клеток.

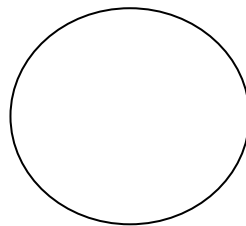
**Задание №1.** Приготовить препараты-мазки: а) из культуры стафилококка; б) кишечной палочки; в) смеси стафилококка и кишечной палочки, и окрасить по методу Грама. Провести микроскопию в иммерсионной системе и зарисовать в протокол.



Стафилококк  
Гр+



Кишечная палочка  
Гр-



Смесь стафилококка и кишечной  
палочки

### Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы

**Актуальность темы.** По своей структуре бактерии (прокариоты) существенно отличаются от эукариотической клетки. **Прокариоты** - гаплоидные организмы, содержащие один геном, не имеют ядра и большинства органоидов. Состоят из нуклеоида, цитоплазмы и оболочки. В цитоплазме могут находиться **плазмиды** - генетические структуры в виде небольших молекул ДНК, рибосомы и включения. Включения могут быть в виде волютина, гликогена, гранулезы, пигментов, капель серы, кальция гидрокарбоната. Изучение морфологии бактерий осуществляется при микроскопии окрашенных микроскопических препаратов. Основным методом окрашивания бактерий является окрашивание по методу Грама.

Метод окраски бактерий по Граму относится к сложным методам. Сложные методы применяют для подробного изучения структуры бактериальных клеток, а также для дифференциации одних микроорганизмов от других. Следовательно, они имеют важное дифференциально-диагностическое значение в микробиологии. Среди сложных методов окраски метод Грама является наиболее распространенным. При окраске бактерий этим методом их можно разделить на две группы: **грамотрицательные** и **грамположительные**. Особенности окраски по Граму учитываются, вместе с другими свойствами, при определении вида бактерий в современной таксономии.

**Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:**

Термин	Определение
Сложные методы окраски бактерий	Сложные методы позволяют дифференцировать одни микроорганизмы от других, а также изучить особенности строения микробных клеток. К сложным методам относят окраску по Граму, по Романовскому-Гимзе, методом Циля-Нильсена, Нейсера, Ожешко, Бури-Гинса, Лефлера и др.
Метод Грама	Метод разработал Кристиан Грам в 1884 г. Среди сложных методов окраски он является наиболее распространенным. Он имеет важное дифференциально-диагностическое значение, поскольку помогает определить таксономическое положение бактерий
Тинкториальные свойства бактерий	Особенности окраски бактерий теми или другими методами.

Грамположительные бактерии	Грамположительные бактерии – окрашиваются по методу Грама в темно-фиолетовый цвет (способны образовывать прочное соединение генцианвиолета с йодом (раствор Люголя)).
Грамотрицательные бактерии	Грамотрицательные бактерии – окрашиваются по методу Грама в красный цвет (соединение генцианвиолета с йодом вымывается спиртом, поэтому при дополнительном окрашивании фуксином они становятся красными или розовыми).

### Теоретические вопросы к занятию:

- Морфология бактерий.
- Ультраструктура бактериальной клетки.
- Сложные методы окраски бактерий.
- Строение клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий.
- Окраска по Граму (механизм метода, техника).
- Тинкториальные свойства отдельных групп микроорганизмов.

### Практические задания, которые выполняются на занятии:

- Микроскопия и зарисовка демонстрационных препаратов-мазков в протокол.
- Приготовление препаратов-мазков из чистых культур и смеси бактерий.
- Окраска микропрепаратов по методу Грама.
- Микроскопия препаратов-мазков из чистых культур бактерий, изучение их морфологических и тинкториальных свойств и зарисовка в протокол.
- Оформление протокола.

### Содержание темы:

На практическом занятии студенты изучают методику окрашивания по Граму, готовят мазки из чистых культур стафилококка и кишечной палочки, красят мазки по методу Грама, изучают изготовленные препараты с использованием иммерсионного объектива, знакомятся с особенностями грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, тинкториальными свойствами отдельных групп микроорганизмов. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

### Рекомендации по оформлению протокола.

#### Свойства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов

Грамположительные	Грамотрицательные
Нечувствительны к действию пепсина, трипсина, панкреатина.	Перевариваются ферментами желудочно-кишечного тракта.
Чувствительны к лизоциму, пенициллину.	Мало чувствительны.
Слабо выражены иммуногенные свойства.	Хорошо выражены иммуногенные свойства.



Могут быть кислотостойкими.	Чувствительны к действию кислот.
Могут образовывать эндоспоры.	Эндоспор не образуют.
Ресничек не образуют.	Могут образовывать реснички.
Могут образовывать экзотоксин.	Редко продуцируют экзотоксин. При разрушении клеток выделяется эндотоксин.

### Тинкториальные свойства некоторых микроорганизмов

<i>Грамположительные</i>	<i>Грамотрицательные</i>
1. Стафилококк.	1. Менингококки.
2. Стрептококк.	2. Гонококки.
3. Коринебактерии дифтерии.	3. Кишечная палочка.
4. Микобактерии туберкулеза.	4. Сальмонеллы.
5. Возбудитель столбняка.	5. Шигеллы.
6. Возбудитель газовой гангрены.	6. Возбудитель чумы.
7. Возбудитель ботулизма.	7. Возбудитель туляремии.
8. Актиномицеты.	8. Холерный вибрион.

### Факторы, влияющие на окрашивание бактерий по Граму

1. Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит до 90% основного вещества – **пептидогликана** (гликопептида, муреина), связанного с липопротеидами, фосфолипидами, липополисахаридами, содержит тейхоевые кислоты, обуславливающие стабильность ферментов клетки. Муреин многослоен. У грамположительных бактерий, проницаемость клеточной стенки ниже, чем у грамотрицательных бактерий. Комплекс генцианвиолет-йод задерживается в стенке после действия спирта, поскольку при этом уменьшается диаметр пор в гликопептиде. При окраске по Граму, такое строение клеточной стенки грамположительных бактерий приводит к образованию устойчивого соединения ее с генцианвиолетом и раствором Люголя, и бактерии даже после обработки спиртом остаются сине-фиолетового цвета. Стенка грамотрицательных бактерий содержит гликопептида гораздо меньше, его молекула "сшита" слабее сравнительно со стенкой грамположительных бактерий. Считают, что после обработки этиловым спиртом поры в молекуле гликопептида грамотрицательных бактерий остаются широкими, что позволяет экстрагировать комплекс генцианвиолет-йод.

2. У грамположительных бактерий выявлено большое количество рибонуклеината магния (соотношение РНК : ДНК у грамположительных бактерий равняется 8:1, а у грамотрицательных бактерий 1:1). Считается, что рибонуклеинат магния образует большие стойкие комплексы с красителем и йодом, которые не вымывает спирт.

3. Отличие в кислотности белков цитоплазмы у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Изоэлектрическая точка белков цитоплазмы грамположительных бактерий находится в пределах рН 4-5, у грамотрицательных бактерий - в пределах рН 5-6. Кислые белки грамположительных бактерий имеют сродство к основным анилиновым красителям, образуют с йодом и генцианвиолетом более стойкие к действию спирта комплексы.

## Структурные особенности клеточных стенок

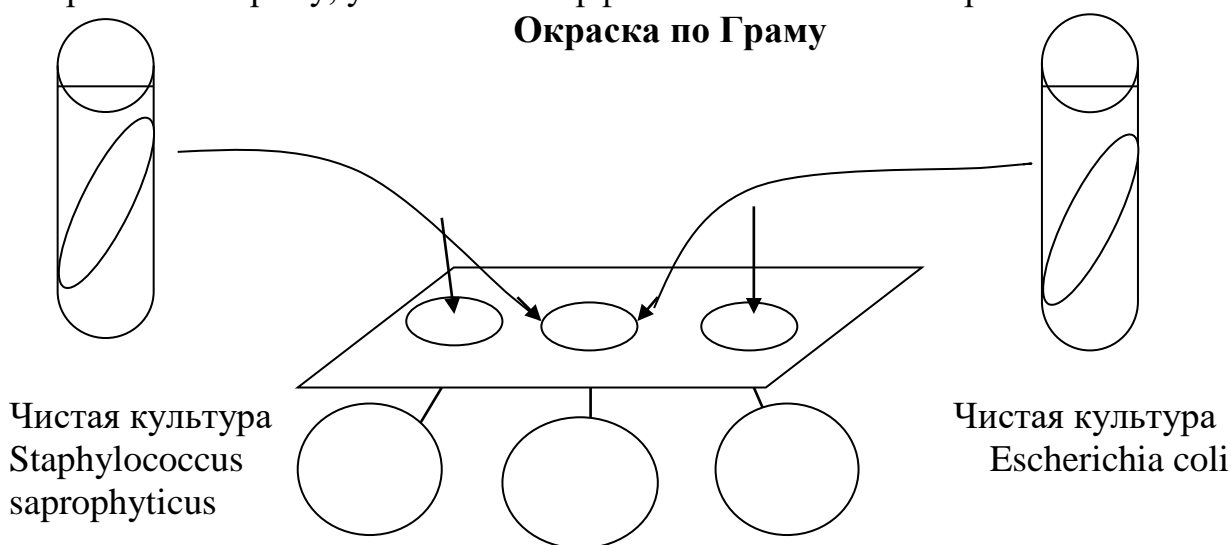
Грамположительные	Грамотрицательные
1. Клеточная стенка имеет простое строение (мало белков, а пептиды однообразны по составу аминокислот).	1. Клеточная стенка имеет сложную структуру (содержит все аминокислоты, содержит белки).
2. Клеточная стенка состоит из пептидогликана (до 90%). Толщина клеточной стенки 100-500А.	2. Клеточная стенка многослойная: внутренний - гликопептид; средний - фосфолипиды, липопротеин, белки; внешний - липополисахариды. Пептидогликана мало (5-9%)
3. Многослойный пептидогликан	3. Один слой муреина.
4. Матрикс представлен полисахаридами (в том числе тейхоевые кислоты)	4. На пептидогликановом каркасе снаружи размещаются липопротеиды, липополисахариды, фосфолипиды. Тейхоевые кислоты не выявлены.

### Методика окрашивания по Граму.

1. На фиксированный мазок наносят раствор генцианвиолета на 1-2 мин., после чего раствор сливают, не промывая препарат водой.
2. Наносят на мазок раствор Люголя на 1-2 мин. до почернения. Сливают раствор Люголя, окрашенный мазок обесцвечивают 96% спиртом в течение 15-20 с (препарат несколько раз помещают в стакан со спиртом до прекращения отхождения фиолетовых струек).
3. Промывают водой.
4. Наносят на мазок раствор фуксина на 1-2 мин.
5. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумажкой и микроскопируют с иммерсионной системой. **Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый.**

**Задание № 1.** Приготовить бактериальные препараты из кокков, палочек и их смеси, покрасить по Граму, установить морфологические и тинкториальные свойства.

### Окраска по Граму



Вывод:

**Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля - Нильсена** отражает особенности некоторых микобактерий и нокардий. Эти бактерии не окрашиваются обычными методами, однако если при окрашивании используются фенол, детергенты или нагревание, то окрашенные клетки получить удастся. В этом случае окраска клеток сохраняется даже при последующем обесцвечивании в смеси кислота-спирт.

Кислотоустойчивость обусловлена большим содержанием в клетке сложных липидов, в частности, миколовых кислот.

**Техника:**

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги и на него наносят карболовый раствор фуксина, приготовленный по Цилю.

2. Мазок с красителем 2 – 3 раза подогревают до появления паров, держа его в пламени спиртовки.

3. Препарату дают остыть, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и промывают водой.

4. Окрашенный мазок обесцвечивают 5 % раствором серной кислоты (препарат помещают 2 – 3 раза в стаканчик с кислотой, не задерживая в ней).

5. Препарат промывают водой и докрасивают на протяжении 3 – 5 мин метиленовым синим по Леффлеру.

6. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

**Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, некислотоустойчивые – в синий.**

**Химическая структура, биохимические свойства бактерий.**

Клетка - универсальная единица живой материи. По химическому составу существенных отличий прокариотических и эукариотических клеток нет.

Химические элементы, входящие в состав живой материи, можно разделить на три основные группы.

1. Биогенные химические элементы (С, О, N, H). На их долю приходится 95% сухого остатка, в т.ч. 50%- С, 20%- О, 15%- N, 10%- H).

2. Макроэлементы- P, S, Cl, K, Mg, Ca, Na. На них приходится около 5 %.

3. Микроэлементы- Fe, Cu, I, Co, Mo и др. На них приходятся доли процента, однако они имеют важное значение в обменных процессах.

Химические элементы входят в состав различных веществ - воды, белков, липидов, нейтральных жиров, углеводов, нуклеиновых кислот. Синтез соединений контролируется генами. Многие вещества бактериальная клетка может получать извне - из окружающей среды или организма хозяина.

Вода составляет от 70 до 90 % биомассы. Содержание воды больше у капсульных бактерий, меньше всего - в спорах.

Белки встречаются во всех структурных элементах клетки. Белки могут быть более простые (протеины) и сложные (протеиды), в чистом виде или в комплексе с липидами, сахарами. Выделяют структурные (структурообразующие) и функциональные (регуляторные) белки, к последним относятся ферменты.

В состав белков входят как обычные для эукариотов аминокислоты, так и оригинальные - диаминопимелиновая, D-аланин, D-глутанин, входящие в состав

пептидогликанов и капсул некоторых бактерий. Только в спорах находится дипиколиновая кислота, с которой связана высокая резистентность спор. Жгутики построены из белка флагеллина, обладающего сократительной способностью и выраженными антигенными свойствами. Пили (ворсинки) содержат особый белок-пилин.

Пептидную природу имеют капсулы представителей рода *Bacillus*, возбудителя чумы, поверхностные антигены ряда бактерий, в том числе стафилококков и стрептококков. Белок А - специфический белок *S.aureus* - фактор, обуславливающий ряд свойств этого возбудителя. Белок М - специфический белок гемолитических стрептококков серогруппы А, позволяющий дифференцировать серовары (около 100), что имеет эпидемиологическое значение.

Ряд белков содержит наружная мембрана грамотрицательных бактерий, из которых 3 - 4 мажорных (основных) и более 10- второстепенных, выполняющих различные функции. Среди мажорных белков - порины, образующие диффузные поры, через которые в клетку могут проникать мелкие гидрофильные молекулы.

Белки входят в состав пептидогликана - биополимера, составляющего основу бактериальной клеточной стенки. Он состоит из остова (чередующиеся молекулы двух аминокислот) и двух наборов пептидных цепочек - боковых и поперечных. Наличие двух типов связей - гликозидных (между аминокислотами) и пептидных, которые соединяют субъединицы пептидогликанов, придает этому гетерополимеру структуру молекулярной сети. Пептидогликан - наиболее устойчивое соединение, которое образует ригидную мешковидную макромолекулу, определяющую постоянную форму бактерий и ряд их свойств.

1. Пептидогликан содержит родо - и видоспецифические антигенные детерминанты.
2. Он запускает классический и альтернативный пути активации системы комплемента.
3. Пептидогликан тормозит фагоцитарную активность и миграцию макрофагов.
4. Он способен инициировать развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).
5. Пептидогликан обладает противоопухолевым действием.
6. Он оказывает пирогенное действие, т.е. вызывает лихорадку.

Из соединений белков с небелковыми компонентами наибольшее значение имеют липопроотеиды, гликопротеиды и нуклеопротеиды.

Удивительное таинство жизни- синтез белка осуществляется в рибосомах. Существует два основных типа рибосом - 70S (S- константа седиментации, единица Сведберга) и 80S. Рибосомы первого типа встречаются только у прокариотов. Антибиотики не действуют на синтез белка в рибосомах типа 80S, распространенных у эукариотов.

Липиды (главным образом фосфолипиды) содержатся в цитоплазматической мембране (липидный бислой), в также в наружной мембране грамотрицательных бактерий. Есть микроорганизмы, содержащие большое количество липидов (до 40% сухого остатка)- микобактерии. В состав липидов входят различные жирные кислоты, весьма специфичные для разных групп микроорганизмов. Их определение имеет в ряде случаев диагностическое значение, например у анаэробов, микобактерий.

У микобактерий туберкулеза в составе липидов имеется ряд кислотоустойчивых жирных кислот - фтионовая, миколовая и др. Высокое содержание липидов и их состав определяют многие свойства микобактерий туберкулеза:

- устойчивость к кислотам, щелочам и спиртам;

- трудная окрашиваемость красителями (используют специальные методы окраски, чаще по Цилю- Нильсену);
- устойчивость возбудителя к солнечной радиации и дезосредствам;
- патогенность.

Тейхоевые кислоты встречаются в клеточных стенках грамположительных бактерий. Представляют собой водорастворимые линейные полимеры, содержащие остатки глицерина или рибозы, связанные фосфодиэфирными связями. С тейхоевыми кислотами связаны главные поверхностные антигены ряда грамположительных бактерий.

Углеводы встречаются чаще в виде полисахаридов, которые могут быть экзо - и эндоклеточными. Среди экзоклеточных полисахаридов выделяют каркасные (входят в состав капсул) и истинно экзополисахариды (выходят во внешнюю среду). Среди бактериальных полисахаридов многие находят медицинское применение. Декстраны-полисахариды с большой молекулярной массой, по виду напоминают слизь. 6% раствор-кровезаменитель полиглюкин. Декстрановый гель сефадекс используется в колоночной хроматографии как молекулярное сито. Эндоклеточные полисахариды- запасные питательные вещества клетки (крахмал, гликоген и др.).

Липополисахарид (ЛПС) - один из основных компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий, это соединение липида с полисахаридом. ЛПС состоит из комплекса:

1. Липид А.
2. Одинаковое для всех грамотрицательных бактерий полисахаридное ядро.
3. Терминальная сахаридная цепочка (О - специфическая боковая цепь).

Синонимы ЛПС - эндотоксин, О - антиген.

ЛПС выполняет две основные функции - определяет антигенную специфичность и является одним из основных факторов патогенности. Это- эндотоксин, токсические свойства которого проявляются преимущественно при разрушении бактериальных клеток. Его токсичность определяется липидом А. ЛПС запускает синтез более 20 биологически активных веществ, определяющих патогенез эндотоксикоза, обладает пирогенным действием.

Нуклеиновые кислоты- ДНК и РНК. Рибонуклеиновые кислоты (РНК) находятся главным образом в рибосомах (р-РНК- 80- 85%), т (транспортные) - РНК- 10%, м (матричные) - РНК- 1- 2%, главным образом в одноцепочечной форме. ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) может находиться в ядерном аппарате (хромосомная ДНК) или в цитоплазме в специализированных образованиях – плаزمиды - плазмидная (внехромосомная) ДНК. Микроорганизмы отличаются по структуре нуклеиновых кислот, содержанию азотистых оснований. Генетический код состоит всего из четырех букв (оснований) - А (аденин), Т (тимин), Г (гуанин) и Ц (цитозин). Наиболее часто для характеристики микроорганизмов используют как таксономический признак процентное соотношение Г/Ц, которое существенно отличается у различных групп микроорганизмов.

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. Каково место микробов в систематике организмов?
2. В чем состоят особенности микробов как объектов изучения микробиологии?
3. Каковы задачи медицинской микробиологии?
4. Каково значение микробиологии в деятельности врача-микробиолога.

5. В чем состоят различия: эукариотов и прокариотов?
6. Какие признаки лежат в основе классификации прокариотов?
7. Назовите основные группы прокариотов.
8. Из чего формируется и как пишется название вида микроорганизма?
9. Какие методы исследования используются в микробиологии?
10. В чем преимущества и недостатки микроскопического метода исследования?
11. Какие типы микроскопов используют для изучения морфологии микробов?
12. Каковы состав и назначение иммерсионной системы «светового» микроскопа?
13. В каких случаях для световой микроскопии используют объективы х40 и х8?
14. Как определить общее увеличение микроскопа?
15. Какова разрешающая способность современных «световых» микроскопов с иммерсионной системой?
16. Назовите основные формы бактерий.
17. Как приготовить препарат для микроскопического исследования живых бактерий и бактерий в окрашенном состоянии?
18. Для чего и как проводят фиксацию мазков? Какова техника окраски по Граму?
19. В чем состоит принципиальное различие простых и сложных методов окраски микропрепаратов? Приведите примеры.
20. Почему метод Грама относится к дифференциальным методам окраски? В чем его сущность? Приведите примеры Гр+ и Гр- бактерий.
21. Перечислите обязательные структурные элементы бактериальной клетки.
22. Из каких элементов состоит геном бактерий? Какие из них не относят к постоянным элементам? Что представляет собой хромосома бактерий?
23. Какова биологическая роль цитоплазматической мембраны?
24. Назовите особенности строения клеточной стенки Грам- бактерий.
25. Назовите особенности строения клеточной стенки Грам+ бактерий.

## **Практическое занятие №2**

### **Тема: "Морфология и структура бактерий. Сложные методы окраски"**

#### **Цель самоподготовки**

После самостоятельного изучения темы студент должен знать структуру бактериальной клетки.

#### **Исходный уровень знаний**

Для усвоения материала темы необходимо вспомнить:

- принципы классификации микроорганизмов;
- основные размеры и формы бактерий;
- назначение сложных методов окраски.

#### **Цель занятия**

1. Отметить различия в строении и химическом составе прокариотов и эукариотов.
2. Усвоить, что сложные методы окраски служат для дифференциации микробов между собой.

3. Найти различия в структуре и химическом составе грамположительных и грамотрицательных бактерий.
4. Ознакомиться с основными методами сложной окраски, применяемыми для выявления структурных элементов бактерий.

### **План изучения темы**

1. Постоянные структурные элементы бактериальной клетки.
2. Непостоянные структурные элементы бактериальной клетки.
3. Биологическая роль структурных элементов клетки.
4. Методы изучения структуры бактериальной клетки.

### **После изучения темы студент должен уметь**

1. Выявлять структурные элементы бактериальной клетки.
2. Дифференцировать микроорганизмы в зависимости от наличия или отсутствия структурных элементов.

### **Актуальность темы:**

Бактерии - это одноклеточные микроорганизмы, которые относятся к домену Procaruota. Они широко распространены, включают много представителей, среди которых есть сапрофитные и патогенные формы.

Морфология бактерий - это наука, которая изучает форму и структуру бактерий в онто - и филогенезе. На основе морфологических исследований бактерий установлено, что они отличаются размерами, формой и расположением клеток. Сведения о строении бактериальных клеток помогают определить функции отдельных структур. Знания морфологических и структурных особенностей разных бактерий являются необходимыми для их идентификации и дифференциации, для понимания их влияния на макроорганизм. Все это обуславливает актуальность темы занятия и формирует позитивную мотивацию ее изучения.

**Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:**

<b>Термин</b>	<b>Определение</b>
Прокариоты	Одноклеточные организмы, которые имеют двухнитевую кольцевую ДНК, не имеют сформированного ядра, типичных клеточных структур, митоза.
Кокки	Бактерии шарообразной формы, некоторые виды вытянуты и напоминают свечу, ланцет, бобы. В зависимости от взаимного расположения клеток (после деления) кокки подразделяются на микрококки - одиночные, беспорядочно расположенные кокки; диплококки - располагаются попарно; стрептококки - образуют цепочку при делении кокков в одной плоскости; тетракокки - сочетания по четыре кокка; сарцины - кокки, соединенные в виде пакетов, и стафилококки - скопления кокков, напоминающие грозди винограда.

Палочковидные бактерии	Бактерии цилиндрической формы
Извитые бактерии	Бактерии изогнутой формы с одним или несколькими завитками.
<b><i>Постоянные структурные элементы бактериальных клеток</i></b>	
Нуклеоид	Аналог ядра у бактерий, двойная кольцевая нить ДНК
Цитоплазма	Зернистая коллоидная система, которая содержит разные органеллы, органические и неорганические соединения; в ней протекают процессы метаболизма
Цитоплазматическая мембрана	Ограничивает цитоплазму, имеет сложное химическое строение, играет активную роль в процессах метаболизма
Мезосомы	Аналог митохондрий, производное от цитоплазматической мембраны, принимает участие в энергетическом метаболизме и делении клеток.
Клеточная стенка	Биогетерополимер со сложным химическим составом; внешняя оболочка бактерий.
Рибосомы	Белоксинтезирующие системы
<b><i>Непостоянные структурные элементы бактериальной клетки</i></b>	
Капсулы	Защитный слизистый слой, который покрывает клеточную стенку
Споры	Форма существования бактерий в неблагоприятных условиях для сохранения генетической информации
Жгутики	Поверхностные структуры у некоторых палочковидных бактерий в виде тонких нитей, обеспечивают активную подвижность.
Пили (фимбрии, реснички)	Тонкие полые короткие нити, покрывающие поверхность бактериальных клеток, обуславливают их адгезию
Секс-пили (F-пили)	Принимают участие в конъюгации бактерий
Включения	Запасные питательные вещества (волютин, гликоген и др.)

### **Теоретические вопросы к занятию:**

- Различия в строении, химическом составе, функциях прокариотических и эукариотических клеток.
- Классификация бактерий по морфологическим признакам.
- Характеристика постоянных структурных элементов бактериальных клеток и их функции.
- Непостоянные структурные компоненты, их роль в процессах жизнедеятельности бактерий.
- Определение разных бактерий по морфологическим и тинкториальным признакам.
- Практическое значение изучения морфологии бактерий.

### **Практические задания, которые выполняются на занятии:**

На демонстрационных препаратах:



- Изучить различные формы и взаимное расположение клеток бактерий, окрашенных по Граму.
- Изучить кислотоустойчивость микобактерий туберкулеза, окрашенных методом Циля-Нильсена
- Обнаружить споры у палочковидных бактерий при окрашивании по методу Ожешко.
- Найти включение у бактерий на препаратах, окрашенных по методу Нейссера.
- Определить капсулы у бактерий при использовании окрашивания по Бурри-Гинсу (или Йоне).
- Выявить жгутики у палочковидных бактерий, окрашенных по методу Лефлера.
- Сделать препараты-мазки из чистых культур неизвестных бактерий, окрасить по Граму и охарактеризовать по морфологическим и тинкториальным свойствам.

### Содержание темы:

На практическом занятии студенты изучают отличия в строении и функциях прокариотов и эукариотов, знакомятся с морфологическими и структурными особенностями бактериальных клеток, изучают роль постоянных и непостоянных структур в жизнедеятельности бактерий, готовят препараты-мазки из чистых культур разных бактерий, красят их по методу Грама и характеризуют на основании морфологических и тинкториальных свойств. Изучают разные методы световой и электронной микроскопии. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

**Бактерии. Форма и размер бактерий.** По внешнему виду различают три основные формы бактерий: шаровидную (кокки), палочковидную (цилиндрические) и извитую (рис. 3).



Рис. 3. **Основные формы бактерий:**

1 — микрококки; 2 — диплококки; 3 — стрептококки; 4 — тетракокки; 5 — сарцины; 6 — стафилококки; 7 — бациллы; 8 — бактерии; 9 — стрептобактерии; 10 — вибрионы; 11 — спириллы; 12 — спирохеты

### Основные формы бактерий (рис. 3.):

1. **Кокки** — шаровидные бактерии (греч. *coccus* — зерно), диаметром примерно 1 мкм, их взаимное расположение связано с особенностями деления:

а) *микрোকки* — делятся в одной плоскости, располагаются беспорядочно, поодиночке. Входят в состав нормальной микрофлоры, находятся во внешней среде. Заболеваний у людей не вызывают;

б) *диплококки* (греч. *diploos* — двойной) — делятся в одной плоскости, располагаются парами:

- пневмококки — ланцетовидные;

- нейссерии (гонококки и менингококки) — бобовидные.

в) *тетракокки* — делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, образуя группы по четыре особи; медицинского значения не имеют;

г) *сарцины* (лат. *sarcina* — связка, тук) — делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и клетки после деления остаются соединенными друг с другом, возникают пакеты правильной кубической формы из 8, 16 и большего количества кокков. Часто обнаруживаются в воздухе;

д) *стрептококки* (греч. *streptos* — цепочка) — овальные, делятся в одной плоскости, но при делении не отделяются друг от друга и образуют цепочки. Среди стрептококков много патогенных микроорганизмов: возбудители ангины, скарлатины, гнойных воспалительных процессов;

е) *стафилококки* (греч. *staphylos* — гроздь винограда) — имеют форму идеального шара, делятся беспорядочно в различных плоскостях, образуя скопления, напоминающие грозди винограда. Вызывают многочисленные заболевания, прежде всего, гнойно-воспалительные.

## **2. Палочки различаются:**

а) *по размерам:*

– коккобактерии длиной до 1,5 мкм, толщиной 0,2 мкм — бордетеллы, бруцеллы, франциселлы, гемофилы, риккетсии;

– мелкие и средние длиной 2–5 мкм, толщиной 0,4–0,8 мкм; — энтеробактерии;

– длинные палочки длиной до 10 мкм, толщиной 0,5–2 мкм — бациллы;

б) *по форме клеток и их концов:* имеют строго цилиндрическую или овоидную форму, концы палочек могут быть ровными, закругленными, заостренными, обрубленными;

в) *по взаимному расположению:*

– энтеробактерии — прямые, располагаются беспорядочно;

– коринебактерии (греч. *corune* — булава) — располагаются попарно, в виде римской цифры V или в виде растопыренных пальцев, *S. diphtheriae* на концах имеет расширения, похожие на булаву, где содержатся включения полифосфатов — зерна волютина;

– клостридии (лат. *clostridium* — веретено) — располагаются беспорядочно, имеют веретенообразную форму благодаря терминально или субтерминально расположенной споре;

– бациллы (имеют эндоспоры) — располагаются цепочками.

г) *по способности к спорообразованию:*

– бактерии — не образуют спор; необходимо иметь в виду, что термин «бактерия» часто используют для обозначения всех микроорганизмов-прокариот;

– бациллы — спорообразующие аэробы; диаметр эндоспоры обычно не

превышает ширины клетки;

– *кlostридии* — спорообразующие анаэробы; диаметр споры больше диаметра бактериальной клетки, в связи с этим клетка напоминает веретено, барабанную палочку или теннисную ракетку.

### 3. *Извитые бактерии:*

– *вибрионы* — короткие клетки, образуют один изгиб, изогнутость их тел не превышает одной четверти оборота спирали, т. е. выглядят наподобие изогнутых палочек или скобочек;

– *спирохеты* (трепонемы, лептоспиры, боррелии) — тонкие и длинные, имеют различное число завитков, специфический для различных представителей характер движения и особенности строения (особенно концевых участков).

– *кампилобактерии и спириллы* — длинные завитые клетки, образуют 2—3 изгиба из одного или нескольких оборотов;

– *актиномицеты* (греч. actis — луч, mykes — гриб) — ветвящиеся клетки.

4. *Полиморфные бактерии* — обладают морфологической изменчивостью, в зависимости от условий имеют вид палочек, кокков или слабоветвящихся форм (напр., микоплазмы).

**Размеры** бактерий измеряются в мкм, их органеллы — в нм. Типичный представитель кокков имеет диаметр около 1 мкм, палочковидных бактерий — толщину 0,5 мкм и длину 2 мкм. Самая маленькая бактерия — микоплазма — имеет диаметр 0,1 мкм. Самый большой представитель прокариот — спирохета — имеет длину 250 мкм.

### **Строение бактериальной клетки.**

Обязательными органоидами являются: ядерный аппарат (нуклеоид), цитоплазма, цитоплазматическая мембрана.

Необязательными (второстепенными) структурными элементами являются: клеточная стенка, капсула, споры, пили, жгутики.

1. В центре бактериальной клетки находится **нуклеоид** - ядерное образование, представленное чаще всего одной хромосомой кольцевидной формы. Состоит из двухцепочечной нити ДНК. Нуклеоид не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной.

2. **Цитоплазма** - сложная коллоидная система, содержащая различные включения метаболического происхождения (зерна волютина, гликогена, гранулезы и др.), рибосомы и другие элементы белоксинтезирующей системы, плазмиды (вненуклеоидное ДНК), *мезосомы* (образуются в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму, участвуют в энергетическом обмене, спорообразовании, формировании межклеточной перегородки при делении).

3. **Цитоплазматическая мембрана** ограничивает с наружной стороны цитоплазму, имеет трехслойное строение и выполняет ряд важнейших функций - барьерную (создает и поддерживает осмотическое давление), энергетическую (содержит многие ферментные системы - дыхательные, окислительно - восстановительные, осуществляет перенос электронов), транспортную (перенос различных веществ в клетку и из клетки).

4. **Клеточная стенка** - присуща большинству бактерий (кроме микоплазм, ахлеплазм и некоторых других, не имеющих истинной клеточной стенки микроорганизмов). Она обладает рядом функций, прежде всего, обеспечивает механическую защиту и постоянную форму клеток, с ее наличием в значительной

степени связаны антигенные свойства бактерий. В составе - два основных слоя, из которых, наружный - более пластичный, внутренний - ригидный.

Основное химическое соединение клеточной стенки, которое специфично только для бактерий - *пептидогликан* (муреиновые кислоты). От структуры и химического состава клеточной стенки бактерий зависит важный для систематики признак бактерий - **отношение к окраске по Граму**. В соответствии с ним выделяют две большие группы - грамположительные (“Грамм+”) и грамотрицательные (“Грамм - “) бактерии. Стенка грамположительных бактерий после окраски по Граму сохраняет комплекс йода с *генциановым фиолетовым* (окрашены в сине- фиолетовый цвет), грамотрицательные бактерии теряют этот комплекс и соответствующий цвет после обработки и окрашены в розовый цвет за счет докрасивания фуксином.

Пептидогликан (муреин, мукопептид, ПГ) образует опорный скелет бактериальной клетки, составляет основу КС и специфичен только для бактерий. ПГ имеет структуру молекулярной сети, благодаря двум типам связей — гликозидным и пептидным.

Цепочки ПГ образованы чередующимися остатками *N*-ацетилглюкозамина и *N*-ацетилмурамовой кислоты, соединенными между собой  $\beta$ -1,4-гликозидными связями (рис. 4).

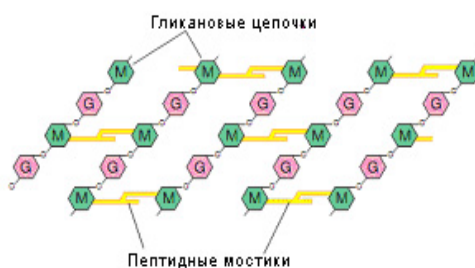
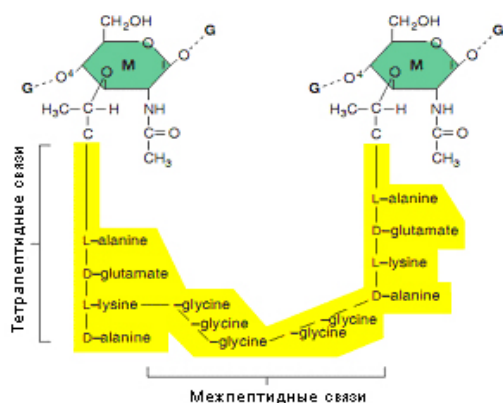


Рис.4. Гликозидные связи соединяют *N*-ацетилмурамовую кислоту (М) и *N*-ацетилглюкозамин (G) в молекуле ПГ



В КС бактерий содержатся структуры и вещества, которых нет у человека, животных и растений:

- *N*-ацетилглюкозамин;
- *N*-ацетилмурамовая кислота;

- мезо–диаминопимелиновая кислота;
- D–аланин;
- D–глутаминовая кислота.

Это «ахилесова пята» бактерий, используемая врачами в борьбе с инфекцией, так как некоторые лекарственные препараты действуют только на КС бактерий, и не затрагивают эукариотических клеток высших организмов.

### **Особенности клеточной стенки грамположительных бактерий.**

Мощная, толстая, несложно организованная клеточная стенка, в составе которой преобладают пептидогликан и тейхоевые кислоты, нет липополисахаридов (ЛПС), часто нет диаминопимелиновой кислоты.

- 1) *мощная и толстая*, в зависимости от вида бактерий толщиной 20–60 нм (в 2–3 раза толще, чем у Грам- бактерий);
- 2) *основную часть массы КС составляет ПГ (40–90%)*;
- 3) *ПГ многослойный (10 слоев)*;
- 4) *у Грам+ бактерий обнаружено более 100 различных химических типов ПГ.*

Большинство различий относится к структуре тетрапептида. В образовании боковых пептидных связей у Грам+ бактерий участвует *LL–диаминопимелиновая кислота* или *лизин*;

5) ПГ ковалентно связан с *тейхоевыми кислотами (ТК)* (от греч. teichos — стенка). ТК — полимерные цепи, состоящие их 8–50 остатков рибита (пятиатомного спирта) или глицерина (трехатомного спирта), остатки соединены между собой фосфодиэфирными связями. Длинные линейные молекулы ТК могут пронизывать весь ПГ слой, достигая внешней поверхности КС. В этом случае они являются основными антигенами Грам+ бактерий. Свободные гидроксилы фосфорной кислоты придают ТК свойства полианиона и определяют поверхностный заряд клетки. Углеводные компоненты ТК входят в состав клеточных рецепторов для бактериофагов. *Липотейхоевые кислоты* фиксированы в мембране липофильными концами;

6) *нет ЛПС, содержится небольшое количество полисахаридов, липидов и белков*; полисахариды и липиды ковалентно связываются с макромолекулами КС; белки формируют на внешней поверхности КС отдельный слой;

- 7) *КС плотно прилегает к ЦПМ, нет периплазматического пространства*;

### **Особенности клеточной стенки грамотрицательных бактерий.**

Клеточная стенка значительно тоньше, чем у грамположительных бактерий, содержит ЛПС, липопротеины, фосфолипиды, диаминопимелиновую кислоту. Устроена более сложно - имеется внешняя мембрана, поэтому клеточная стенка трехслойная.

- 1) *значительно (в 2–3 раза) тоньше*, чем у Грам+; ее толщина 10–20 нм;
- 2) *содержание ПГ значительно меньше*, чем у Грам+ бактерий, и составляет в зависимости от вида бактерий 5–10 % сухой массы КС;
- 3) *ПГ однослойный или двухслойный*, толщиной 2–3 нм;
- 4) *у всех Грам- бактерий строение ПГ одинаково*. В образовании боковых пептидных связей у Грам+ бактерий участвует *только мезо–диаминопимелиновая кислота* (лизин отсутствует). Поэтому гетерополимерные цепи между собой связаны редкими поперечными связями через *два однотипных тетрапептида*. В образовании межпептидной связи участвует мезо–диаминопимелиновая кислота и D–аланин;

5) ПГ не содержит ТК;

6) ПГ неплотно прилегает к ЦПМ. Только у Грам- бактерий между ЦПМ и ПГ КС есть периплазматическое пространство. Тонкий ПГ соединен белками с наружной мембраной;

7) КС многослойная, сверху ПГ только у Грам- бактерий находится наружная мембрана (НМ) толщиной 8–10 нм. Она оставляет до 80% сухой массы КС. НМ по строению сходна с внутренней ЦПМ и состоит из липопротеина (ЛП), липополисахарида (ЛПС), фосфолипидов и белков.

Основной компонент НМ — билипидный слой: внутренний слой образован ЛП, а наружный — ЛПС. ЛП, ЛПС и другие липиды связаны ковалентно, ЛП ориентированы липофильными концами наружу.

ЛПС занимает 30–40 % поверхности НМ и состоит из трех компонентов:

– липида А, который «заякоривает» ЛПС в НМ, он содержит глюкозамин и жирные кислоты, придает токсичность липополисахариду и является одним из основных факторов патогенности. Токсические свойства проявляются преимущественно при разрушении бактериальных клеток;

– кор-слоя (лат. *core* — ядро), одинакового для всех Грам- бактерий, наиболее постоянной частью которого является кетодезоксиоктоновая кислота;

О-специфической цепи полисахарида, образованной повторяющимися идентичными олигосахаридными последовательностями. Она определяет антигенную специфичность, т.е. серовар определенного штамма бактерий, является О-антигеном.

При обработке грамположительных бактерий ферментами, разрушающими пептидогликан, возникают полностью лишённые клеточной стенки структуры — **протопласты**. Обработка грамотрицательных бактерий лизоцимом разрушает только слой пептидогликана, не разрушая полностью внешней мембраны; такие структуры называют **сферопластами**. Протопласты и сферопласты имеют сферическую форму (это свойство связано с осмотическим давлением и характерно для всех безклеточных форм бактерий).

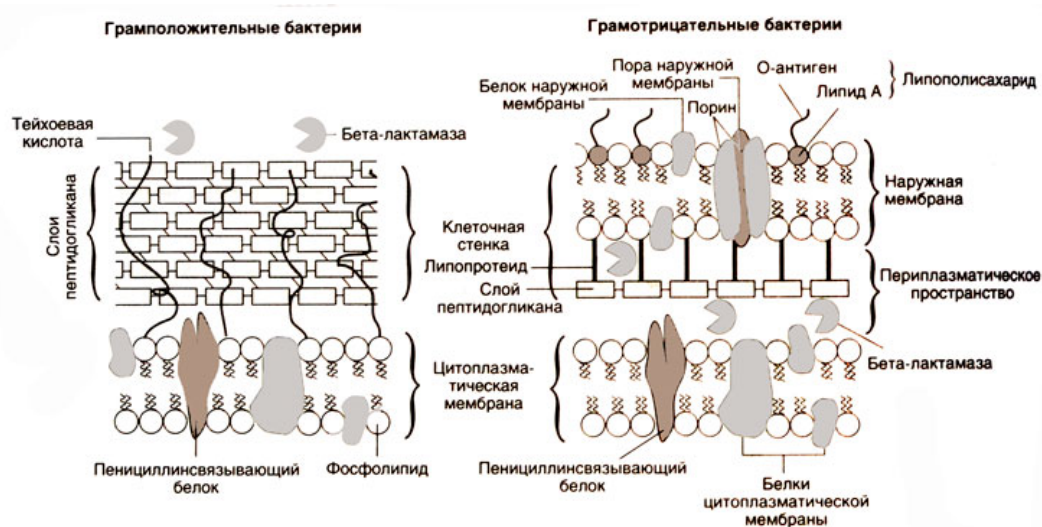


Рисунок 45.3. Клеточная стенка бактерий Tortora et al., 1989.

## L- формы бактерий.

Под действием ряда факторов, неблагоприятно действующих на бактериальную клетку (антибиотики, ферменты, антитела и др.), происходит *L- трансформация* бактерий, приводящая к постоянной или временной утрате клеточной стенки. *L- трансформация* является не только формой изменчивости, но и приспособления бактерий к неблагоприятным условиям существования. В результате изменения антигенных свойств (утрата О- и К- антигенов), снижения вирулентности и других факторов *L- формы* приобретают способность длительно находиться (*персистировать*) в организме хозяина, поддерживая вяло текущий инфекционный процесс. Утрата клеточной стенки делает *L- формы* нечувствительными к антибиотикам, антителам и различным химиопрепаратам, точкой приложения которых является бактериальная клеточная стенка. *Нестабильные L- формы* способны *реверсировать* в классические (исходные) формы бактерий, имеющие клеточную стенку. Имеются также стабильные *L- формы* бактерий, отсутствие клеточной стенки и неспособность реверсировать которых в классические формы бактерий закреплены генетически. Они по ряду признаков очень напоминают микоплазмы и другие *молликуты* - бактерии, у которых клеточная стенка отсутствует как таксономический признак. Микроорганизмы, относящиеся к микоплазмам - самые мелкие прокариоты, не имеют клеточной стенки и как все бактериальные бесстеночные структуры имеют сферическую форму.

*К поверхностным структурам бактерий* (необязательным, как и клеточная стенка), относятся *капсула, жгутики, микроворсинки*.

*Капсула* или слизистый слой окружает оболочку ряда бактерий. Выделяют *микрокапсулу*, выявляемую при электронной микроскопии в виде слоя микрофибрилл, и *макрокапсулу*, обнаруживаемую при световой микроскопии. Капсула является защитной структурой (прежде всего от высыхания), у ряда микробов - фактором патогенности, препятствует фагоцитозу, ингибирует первые этапы защитных реакций- распознавание и поглощение. У *сапрофитов* капсулы образуются во внешней среде, у патогенов - чаще в организме хозяина. Существуют ряд методов окраски капсул в зависимости от их химического состава. Капсула чаще состоит из полисахаридов (наиболее распространенная окраска - по *Гинсу* или *Бурри-Гинсу*), реже - из полипептидов.

#### **Функции капсулы:**

1. Играет защитную роль во внешней среде: предохраняет бактерии от механических повреждений, высыхания, создает дополнительный осмотический барьер, так как гидрофильна и хорошо связывает воду.
2. Является источником запасных питательных веществ.
3. Выполняет адгезивную функцию: обеспечивает прикрепление бактерий к различным поверхностям, в т. ч. к рецепторам клетки хозяина.
4. Является фактором патогенности: подавляет различные этапы фагоцитарной реакции (переваривание, а иногда даже распознавание и поглощение). Фагоцитоз капсульных бактерий незавершенный, бактерии сохраняются (персистируют) в фагоцитах, иногда даже размножаются в них. При этом капсульные бактерии (напр., клебсиеллы, гонококки, золотистый стафилококк) недоступны для действия антител и комплемента, а также антибиотиков, непроникающих в клетку.
5. Препятствует действию бактериофагов.
6. Определяет антигенную специфичность, это К-антиген. У некоторых бактерий (пневмококков) — определяет вирулентность.
7. Бактериальные полисахариды применяются в медицине:



- молочнокислая бактерия *Leuconostoc mesenteroides* за несколько часов превращает раствор в студень — декстран, который используют для повышения вязкости водных растворов, 6%-ный раствор декстрана — кровезаменитель полиглюкин;
- препарат из декстрана — сефадекс — применяется в хроматографии в качестве «молекулярного сита» для разделения веществ с большой молекулярной массой.

### Выявление капсулы:

1. При обычных методах окраски капсулы видны плохо — как неокрашенный ореол вокруг бактериальной клетки. Для их выявления лучше использовать негативное контрастирование: добавление таких красителей, которые в капсулу не проникают (тушь, нигрозин, конго красный). Наиболее распространен *метод Бурри—Гинса*:

- каплю китайской микрзернистой туши и петлю исследуемого материала смешивают, готовят мазок при помощи стекла со шлифованным краем (как тонкий мазок крови), высушивают;
- фиксируют химически или физически;
- окрашивают водным фуксином 3-5 мин;
- промывают водой, высушивают, микроскопируют с масляной иммерсией: фон черный (тушевой), бактерии красные, капсулы неокрашенные (рис. 6).

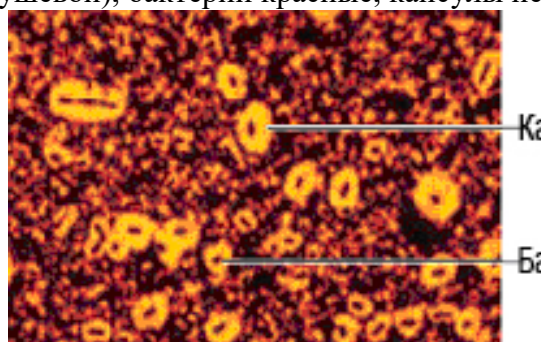


Рис.6. Окраска по Бурри—Гинсу

2. В серологических реакциях с противокапсульными сыворотками.

3. При помощи реакции набухания капсулы Нейфельда: при добавлении гомологичных антисывороток капсулы становятся видимыми вследствие отложения белка антител.

4. Электронная микроскопия: капсула визуализируется в виде микрофибрилл из мукополисахаридов, которые тесно прилегают к КС.

Методы 2–4 позволяют выявлять микрокапсулу, которая не обнаруживается методом 1.

Жгутики. Подвижные бактерии могут быть скользящие (передвигаются по твердой поверхности в результате волнообразных сокращений) или плавающие, передвигающиеся за счет нитевидных спирально изогнутых белковых (*флагеллиновых* по химическому составу) образований- жгутиков.

По расположению и количеству жгутиков выделяют ряд форм бактерий.

1. Монотрихи - имеют один полярный жгутик.
2. Лофотрихи - имеют полярно расположенный пучок жгутиков.
3. Амфитрихи - имеют жгутики по диаметрально противоположным полюсам.



4. Перитрихи - имеют жгутики по всему периметру бактериальной клетки.

Способность к целенаправленному движению (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис) у бактерий генетически детерминирована.

– При электронной микроскопии обнаружено, что **жгутик состоит из трех частей**: спиральной нити, крюка и базального тела (рис. 8).

Основную часть жгутика составляет длинная **спиральная нить** (фибрилла) — жесткий полый цилиндр диаметром около 120 нм, состоящий из белка флагеллина. По длине нити белковые молекулы образуют 11 рядов и уложены в виде спирали. В процессе роста нити белковые молекулы, синтезированные внутри клетки, проходят через полость цилиндра и пристраиваются в спираль на ее конце. На конце жгутика имеется белковая шапочка (крышечка), закрывающая отверстие цилиндра и препятствующая выходу молекул белка в окружающую среду. Длина нити жгутика может достигать нескольких микрометров. У некоторых видов бактерий жгутик снаружи дополнительно покрыт чехлом. У поверхности КС спиральная нить переходит в утолщенную изогнутую структуру — крюк.

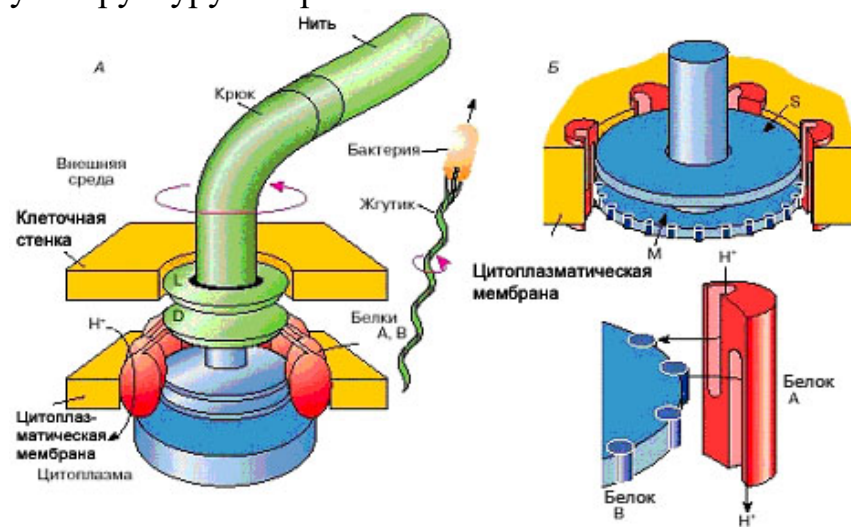


Рис. 8. Схема строения жгутика

**2. Крюк** (толщиной 20–45 нм) вблизи поверхности клетки — относительно короткий цилиндр, состоит из белка, отличающегося от флагеллина, и служит для обеспечения гибкого соединения нити с базальным телом.

**3. Базальное тело** находится в основании жгутика и обеспечивает его вращение. Базальное тело содержит 9–12 различных белков и состоит из двух или четырех дисков (колец), нанизанных на стержень, являющийся продолжением крюка. Эти кольца вмонтированы в ЦПМ и КС. Два внутренних кольца (М и S) — обязательные составные части базального тела. М-кольцо локализовано в ЦПМ, S-кольцо располагается в периплазматическом пространстве грамотрицательных или в пептидогликановом мешке грамположительных бактерий. Два наружных кольца (D и L) необязательны для движения, так как имеются только у грамотрицательных бактерий, локализованы соответственно в пептидогликановом слое и в наружной мембране КС. Кольца S, D и L неподвижны и служат для фиксации жгутика в КС. Вращение жгутика определяется вращением М-кольца, встроенного в ЦПМ клетки. Таким образом, особенности строения базального тела жгутика определяются строением КС.

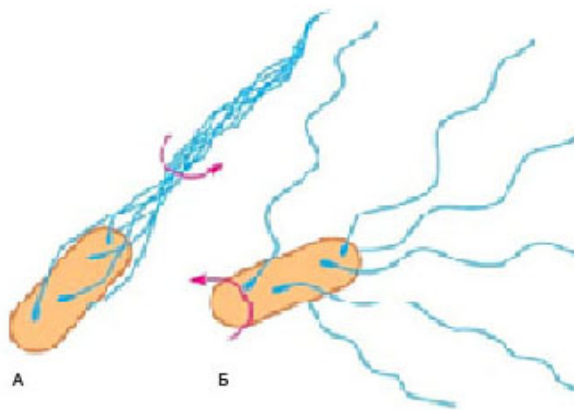
Функционально базальное тело представляет собой электромотор, работающий на протонах. М-кольцо базального тела (вращающийся ротор), окружено мембранными

белками, имеющими отрицательные заряды (статор мотора). Бактериальная клетка обладает эффективным механизмом, позволяющим превращать электрохимическую энергию в механическую. Поэтому на работу жгутика бактерия тратит около 0,1 % всей расходуемой ею энергии. При работе жгутика используется протондвижущая сила, которая обеспечивается разностью концентраций протонов на внешней и внутренней сторонах мембраны (на внешней стороне их больше) и наличием более отрицательного заряда на внутренней стороне мембраны. Протондвижущая сила заставляет протоны проходить через базальное тело внутрь клетки, при этом они задерживаются на определенных участках ротора, придавая им положительный заряд, затем протоны уходят внутрь клетки. Заряженные участки расположены таким образом, что возникает сила притяжения между заряженными участками ротора и статора, М-кольцо начинает вращаться со скоростью около 300 об/с. Механизм вращения: зарядка–перезарядка группы COOH в аминокислотах. Для полного оборота кольца через базальное тело должно пройти 500–1000 протонов. Вращение М-кольца через жестко связанную с ним ось и крюк передается нити жгутика, которая функционирует как пропеллер или корабельный винт. Бактерия плавает до тех пор, пока работает винт, вклад инерции исключительно мал.

Кроме того, бактерии, даже мертвые, находящиеся в водной среде, перемещаются в результате броуновского движения. Бактериальная клетка все время подвержена ударам окружающих молекул, находящихся в тепловом движении. Удары, наносимые с разных сторон, бросают бактерию из стороны в сторону.

Тип движения жгутиков — вращательный. Существуют два вида движения: прямолинейное и кувыркание (периодические случайные изменения направления движения). Когда жгутики вращаются против хода часовой стрелки (около 1 секунды), с частотой 40–60 об./с (близко к скорости среднего электромотора), их нити сплетаются в единый жгут (рис. 9а). Вращение жгутиков передается клетке. Так как клетка намного массивнее жгутика, она начинает двигаться по прямой в противоположном направлении, со скоростью в 3 раза меньшей, чем скорость движения жгутика.

Так обеспечивается поступательное движение клетки, скорость которого в жидкой среде для разных видов бактерий составляет 20–200 мкм/с (это соответствует примерно 300–3000 длин тела в минуту) и более медленное перемещение по поверхности твердых сред.



*Рис. 9.* Расположение жгутиков на клетке кишечной палочки при их вращении:  
А — против часовой стрелки,  
Б — по часовой стрелке

### **Функции жгутиков:**

1. Обеспечивают адгезию — начальную стадию инфекционного процесса.
2. Обеспечивают подвижность бактерий.
3. Определяют антигенную специфичность, это Н-антиген.

#### **Выявление жгутиков:**

1. Фазовоконтрастная микроскопия нативных препаратов («раздавленной» и «висячей» капли). Микроскопически подвижность определяют у клеток суточной культуры. Для того чтобы отличить подвижность от пассивного броуновского движения, к капле исследуемой культуры добавляют каплю 5 %-ного водного раствора фенола, активное движение в этом случае прекращается.

2. Темнопольная микроскопия нативных препаратов.

3. Световая микроскопия окрашенных красителями или металлами препаратов. Так как жгутики очень легко повреждаются при приготовлении препарата, в повседневной практике эти методы используются редко.

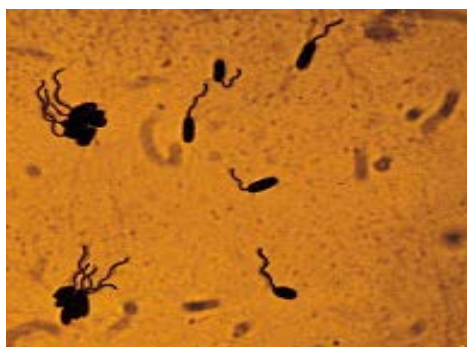
Для окраски жгутиков используют клетки, выращенные на скошенном агаре. Бактериальной петлей отбирают клетки, находящиеся у конденсационной воды и осторожно переносят в стерильную дистиллированную воду такой же температуры, что и температура инкубирования бактерий на скошенном агаре, а бактерии с петли не стряхивают, а осторожно погружают в воду. Пробирку с бактериями оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Используют химически чистое (вымытое в хромовой смеси) стекло, на которое наносят 2–3 капли суспензии. Суспензию распределяют по поверхности стекла, осторожно его наклоняя. Высушивают препарат на воздухе.

Жгутики очень тонкие, поэтому их можно обнаружить только при специальной обработке. Вначале при помощи протравки достигается разбухание и увеличение их размера, а затем производится окраска препарата, благодаря чему они становятся видимыми при световой микроскопии.

#### **Чаще используют метод серебрения по Морозову (рис. 10):**

- препарат фиксируют раствором ледяной уксусной кислоты 1 минуту, промывают водой;
- наносят раствор таннина (дубящий, делающий жгутики более плотными) на 1 мин, промывают водой;
- обрабатывают препарат при подогревании импрегнирующим раствором азотнокислого серебра 1–2 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют.

При микроскопии видны темно-коричневые клетки и более светлые жгутики.



*Рис. 10.* Выявление жгутиков методом серебрения

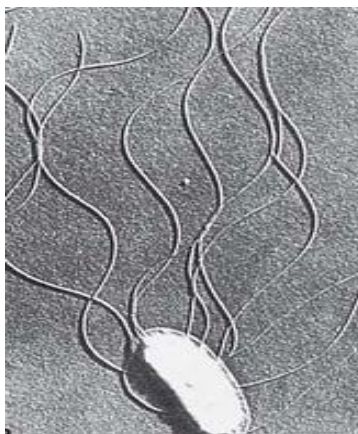


Рис. 11. Выявление жгутиков методом электронной микроскопии

4. Электронная микроскопия препаратов, напыленных тяжелыми металлами (рис. 11).

5. Косвенно — по характеру роста бактерий при посеве в полужидкий 0,3 %-ный агар. После инкубирования посевов в термостате в течение 1–2 сут отмечают характер роста бактерий:

- у неподвижных бактерий (напр., *S. saprophyticus*) наблюдается рост по ходу укола — «гвоздь», а среда прозрачна;
- у подвижных бактерий (напр., *E. coli*) наблюдается рост в стороны от укола, по всему столбику агара — «елочка», и диффузное помутнение среды.

Фимбрии или реснички - короткие нити, в большом количестве окружающую бактериальную клетку, с помощью которых бактерии прикрепляются к субстратам (например, к поверхности слизистых оболочек). Таким образом, фимбрии являются факторами адгезии и колонизации.

**Фимбрии I (общего) типа** имеются у большинства бактерий. Они покрывают всю поверхность клетки, располагаются перитрихально или полярно. Количество фимбрий велико — от нескольких сотен до нескольких тысяч на одну бактериальную клетку. Синтез фимбрий контролируется бактериальной хромосомой, утрата фимбрий приводит к их новому синтезу.

Покрывая всю клетку, фимбрии создают ворсистую поверхность (рис. 12, 13). Иногда фимбрии сливаются в комки, придавая неопрятный вид клетке; в других случаях поверхность клеток покрыта войлокообразным чехлом, состоящим из сплетений тонких нитей.

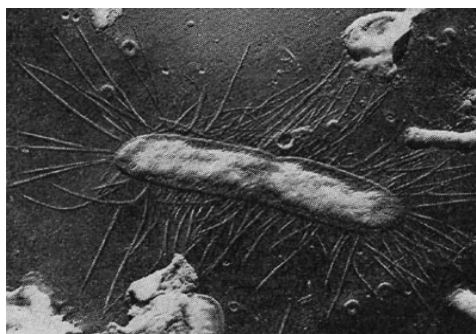


Рис. 12. Палочковидная бактерия с фимбриями. Увел. x 15 000

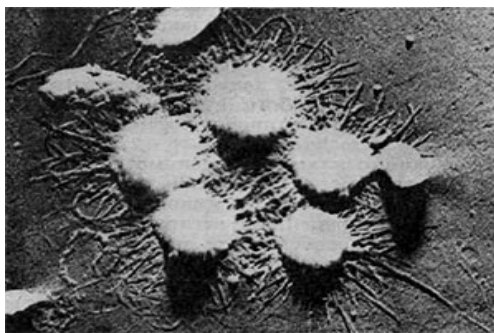


Рис. 13. Кокки с фимбриями.  
Увел. х 12000

**Пили 2 типа** (синонимы: конъюгативные, половые, секс-пили) образуются только мужскими клетками-донорами, содержащими трансмиссивные плазмиды (F, R, Col), в ограниченном количестве (1–4 на клетку), имеют терминальные вздутия.

#### **Функции фимбрий:**

##### **Фимбрии обоих типов:**

1. Обладают антигенной активностью.
2. На них адсорбируются бактериофаги (специфические вирусы бактерий).

##### **Фимбрии 1 типа:**

3. Адгезивная функция: обеспечивают прикрепление бактерий к клеткам слизистых оболочек организма хозяина и к другим субстратам (клеткам растений, грибов, неорганическим частицам и органическим остаткам).
4. Механическая защита бактериальной клетки. Придают бактериям свойство гидрофобности и способствуют объединению клеток в группы.
5. Увеличивают всасывательную поверхность клетки бактерий, участвуют в процессах питания, водно-солевого обмена и в транспорте метаболитов.

##### **Половые пили:**

6. F–пили (фактор фертильности) обеспечивают конъюгацию у бактерий — передачу части генетического материала от донорской клетки к реципиентной, встречаются в небольшом количестве в виде тонких белковых ворсинок.

#### **Выявление фимбрий:**

1. Электронная микроскопия.

#### Эндоспоры и спорообразование.

**Спорообразование** - способ сохранения определенных видов бактерий в неблагоприятных условиях среды. **Эндоспоры** образуются в цитоплазме, представляют собой клетки с низкой метаболической активностью и высокой устойчивостью (**резистентностью**) к высушиванию, действию химических факторов, высокой температуры и других неблагоприятных факторов окружающей среды. При световой микроскопии часто используют метод выявления спор *по Ожеешко*. Высокая резистентность связана с большим содержанием *кальциевой соли дипиколиновой кислоты* в оболочке спор. Расположение и размеры спор у различных микроорганизмов отличается, что имеет дифференциально- диагностическое (таксономическое) значение. Основные фазы “жизненного цикла” спор - *споруляция* (включает подготовительную стадию, стадию предспоры, образования оболочки, созревания и покоя) и *прорастание*,

заканчивающееся образованием вегетативной формы. Процесс спорообразования генетически обусловлен.

### Рекомендации по оформлению протокола.

Студенты заносят в протокол таблицу "Различия между прокариотическими и эукариотическими клетками", записывают методы световой и электронной микроскопии, готовят препараты из чистых культур микроорганизмов разной морфологии, окрашивают их по Граму. Изучают препараты в микроскопе, делают рисунки микроорганизмов в протоколах. Изучают демонстрационные препараты микроорганизмов разной морфологии и строения, зарисовывают изученные микроорганизмы в протоколах.

### Различия между прокариотическими и эукариотическими клетками

	Признаки	Прокариоты	Эукариоты
<b>Генетический аппарат</b>			
1	Наличие ядерной мембраны	-	+
2	Количество хромосом	1	>1
3	Хромосомы содержат гистоны	-	+
4	Деление ядер митозом	-	+
5	Наличие ядрышек	-	+
<b>Цитоплазматические структуры</b>			
1	Эндоплазматический ретикулум и система микротрубочек	-	+
2	Аппарат Гольджи	-	+
3	Лизосомы	-	+
4	Митохондрии	-	+
5	Рибосомы цитоплазмы	70 S	80 S
<b>Химический состав</b>			
1	Пептидогликан	+	-
2	Тейхоевые кислоты	+	-
3	Магниевые соли рибонуклеиновой кислоты	+	-
4	Стерин в клеточной мембране	-	+
5	Полиненасыщенные жирные кислоты	-	+
<b>Функции клеток</b>			
1	Фагоцитоз и пиноцитоз	-	+
2	Внутриклеточное пищеварение	-	+
3	Амебоидное движение	-	+

### *Капсула бактерий*

При определенных условиях культивирования многие виды бактерий различных таксономических групп образуют слизистое вещество, формирующее вокруг клетки структуру, которая называется капсулой.



Колонии капсулообразующих бактерий имеют влажную, блестящую поверхность и называются мукоидными. Среди сапрофитных бактерий капсула хорошо выражена у представителей родов *Azotobacter*, *Leuconostoc*, *Rhizobium*, патогенных – *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* и др.

Капсула предохраняет клетку от обезвоживания, механического повреждения, капсульное вещество создает вокруг клетки дополнительный осмотический барьер, регулирующий поступление и выделение различных веществ и ионов, а также аэрацию бактерий.

Лучше всего капсулы выявляются во влажных препаратах, так как составляющие их сильно гидратированные коллоидные полимеры легко разрушаются и сокращаются в размерах при высушивании и фиксации. Для выявления капсул пользуются различными методами, среди которых можно отметить **метод Бурри – Гинса** (метод негативного контрастирования).

Техника:

1. На предметное стекло наносят каплю водного раствора фуксина, в которую с помощью стерильной петли вносят исследуемую культуру бактерий.

2. Рядом с первой каплей помещают каплю туши. Две капли смешивают и с помощью другого предметного стекла делают мазок как мазок крови (ребром одного стекла проводят по поверхности другого).

3. Мазок высушивают на воздухе.

4. Микроскопируют, пользуясь иммерсионной системой. **На темно-дымчатом фоне препарата видны розовые клетки микроорганизмов, окруженные бесцветной капсулой.**

### ***Цитоплазматические включения***

У многих бактерий, выращиваемых в определенных условиях, в результате обменных процессов в цитоплазме образуются отложения, которые называют включениями.

Среди них – отложения жира, поли- $\beta$ -гидрооксимасляной кислоты, полифосфатов, полисахаридов, серы и различных кристаллов. Для выявления этих включений, которые сильно преломляют свет, применяется несколько методов. Включения волютина хорошо выражены у *Spirillum volutans*, *Bacillus subtilis*, а также у возбудителей сибирской язвы и дифтерии.

Гранулы волютина имеют относительно крупные размеры, окрашиваются различными красителями, изменяя цвет последних. Например, при окрашивании метиленовым синим волютин окрашивается в ярко-красный цвет. Такое явление получило название *метахромазии*. Гранулы волютина представлены **полифосфатами** – запасаемым веществом, которое служит источником фосфатных групп.

### ***Окраска гранул волютина по Нейссеру.***

Техника:

1. На фиксированный мазок наносят 2 – 3 капли раствора метиленового синего по Нейссеру и окрашивают в течение 1 – 2 мин.

2. Краситель сливают, препарат промывают водой.

3. Мазок обрабатывают раствором Люголя в течение 20 – 30 с.

4. Не промывая препарат водой, мазок дополнительно окрашивают 2 – 3 мин 2 % раствором везувина.

5. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют, используя иммерсионную систему. Цитоплазма окрашивается в желтый цвет, а гранулы волютина – в темно-синий.

### Простые и сложные методы окраски.

Название метода	Обнаруживаемые структуры	Результаты окраски	Микроорганизмы
<b>Простые методы окраски</b>			
	Обнаружение микроорганизмов, определение их количества и формы, расположения	Препараты, содержащие клеточные структуры, красят метиленовым синим, т.о. фон препарата окрашивается слабее, чем микробные тела	
<b>Сложные методы окраски</b>			
<b>Метод Грама</b>	Различное отношение микроорганизмов к красителям трифенилметановой группы <u>Различия в строении клеточной стенки</u>	Грамположительные – фиолетовые. Грамотрицательные – красные.	Гр+ – стафилококки и стрептококки Гр- – гонококки, менингококки, возбудители кишечных инфекций
<b>Метод Ожешко</b>	<u>Споры</u>	Споры – красные, цитоплазма и вегетативные клетки – голубые.	Bacillus cereus Bacillus anthracoides Bacillus anthracis
<b>Метод Бурри</b>	<u>Изучение общей морфологии клеток</u>	На темном фоне неокрашенные тела бактерий	Ранее использовался для выявления спирохет
<b>Метод Бурри-Гинса</b>	<u>Капсула</u>	На темном фоне бесцветные капсулы и клетки красного цвета, прокрашенные фуксином	Klebsiella pneumoniae
<b>Метод серебрения по Морозову</b>	<u>Жгутики, спирохеты</u>	Спирохеты окрашиваются в темно-коричневый или почти черный цвет	
<b>Метод Романовско-го-Гимза</b>	Ядерное вещество, <u>идентификация некоторых</u>	Ядерное вещество – красно-фиолетовое, цитоплазма – слабо-розовая, <u>риккетсии</u> – ярко-рубиновые на фоне	Хламидии, простейшие, риккетсии, спирохеты



	<u>микроорганизмов</u>	слабо-розовой цитоплазмы. <u>Спирохеты</u> : Treponema – светло-розовые, Borrelia – сине-фиолетовые, Leptospira – светло-розово-фиолетовые	
<b>Метод Нейссера</b>	<u>Зерна воллютина</u>	Цитоплазма – желтая, воллютин – темно-синий, почти черный	Коринебактерии и дифтерии
<b>Метод Циля-Нильсена</b>	<u>Выявление кислотоустойчивых бактерий</u>	Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются фуксином в красный цвет, остальное клеточное окружение метиленовым синим - в голубой	Микобактерии туберкулеза Mycobacterium tuberculosis
<b>Метод Здродовского</b>	<u>Риккетсии</u>	Ядро клетки-хозяина – синее, цитоплазма клетки-хозяина – голубая, риккетсии - красные	Бактерии порядка Rickettsiales

### Вопросы для самоконтроля:

1. Перечислите необязательные структурные элементы бактериальной клетки, какова их биологическая роль?
2. Какими методами можно выявить капсулу?
3. Как происходит спорообразование у бактерий? Перечислите спорообразующие бактерии.
4. Перечислите бактерии образующие капсулу. Какова роль капсулы для микроба?
5. L-формы бактерий. В каких случаях образуются, свойства?
6. Особенности строения клеточной стенки туберкулезных бактерий.
7. Какова биологическая роль бактериальных рибосом?
8. Какова биологическая роль спор, включений?
9. Какова биологическая роль жгутиков, какую роль могут выполнять пили?
10. Какие методы позволяют изучить подвижность бактерий? Перечислите подвижные и неподвижные бактерии (по 5 примеров)
11. Какими методами можно выявить нуклеоид, цитоплазматическую мембрану, клеточную стенку?
12. Основные функции клеточной стенки.
13. Сферопласты. Протопласты.
14. Какими методами можно выявить споры?
15. Какими методами можно выявить включения? Примеры бактерий имеющих включения.

### Практическое занятие №2 (продолжение). Морфология и структура спирохет, актиномицетов, грибов, риккетсий, хламидий

Среди перечисленных микробов имеются возбудители заболеваний, с которыми приходится сталкиваться врачу любой специальности: сифилис, лептоспироз, сыпной тиф, актиномикоз, грибковые поражения кожи и волос, кандидоз (нередко развивающийся как осложнение при лечении антибиотиками), микоплазменная пневмония, уретриты и многие другие. Врачу необходимо знать морфологию возбудителей, уметь определить их под микроскопом. Это не только необходимо для полноценной теоретической подготовки врача, но важно и в практическом отношении, так как с различиями в структуре микробов связаны и особенности течения болезни, их различия по чувствительности к антимикробным препаратам, от чего зависит выбор химиотерапевтического препарата для лечения. Так, например, к разным веществам чувствительны грибы и бактерии, микоплазмы и бактерии, актиномицеты и грибы, риккетсии и бактерии. Кроме того, необходимо знать названия основных патогенных представителей каждой группы микробов и уметь грамотно написать их латинские названия.

### **Цель самоподготовки**

После самостоятельного изучения темы студент должен знать морфологию и структуру грибов, актиномицетов, спирохет, микоплазм, риккетсий и хламидий, методы изучения этих групп микроорганизмов, уметь написать по-латыни названия патогенных представителей перечисленных групп микробов.

### **Исходный уровень знаний**

Для усвоения материала данной темы необходимо знать: - структуру бактерий (для сравнения) – из предыдущих занятий; - морфологию простейших (для сравнения) – из курса биологии.

### **Цель занятия**

1. Отметить особенности строения и морфологии грибов, актиномицетов, спирохет, микоплазм, риккетсий и хламидий.
2. Познакомиться с методами изучения морфологии этих микроорганизмов.

### **План изучения темы**

1. Морфология грибов, классификация, значение в медицине.
2. Морфология актиномицетов, патогенные представители.
3. Морфология спирохет, классификация, структура, патогенные представители.
4. Морфология микоплазм, риккетсий, хламидий; патогенные представители.

### **После изучения темы студент должен уметь**

1. Дифференцировать основные группы изучаемых микроорганизмов по особенностям их строения в готовых микропрепаратах.

**Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:**

<b>Термин</b>	<b>Определение</b>
Эукариоты	Это высшие микроорганизмы (грибы, простейшие),

	которые имеют дифференцированное ядро, типичные клеточные структуры (митохондрии, эндоплазматическую сеть, аппарат Гольджи и тому подобное).
Спирохеты	Прокариоты. Одноклеточные подвижные микроорганизмы, являют собой тонкие спирально извитые клетки.
Фибриллы	Фибриллы - длинные нитевидные молекулы белка флагеллина, расположенные под клеточной стенкой, которые обеспечивают подвижность спирохет.
Цисты	Цисты - форма существования спирохет в неблагоприятных условиях
Актиномицеты	Прокариоты. Нитевидные ветвистые клетки, которые напоминают гифы грибов
Гифа	Основной структурный элемент актиномицетов и грибов - короткие палочковидные или нитевидные образования
Мицелий	Скопление переплетающихся гифов.
Споры, спорообразования	Способ выживания бактерий в неблагоприятных условиях, способ размножения актиномицетов и грибов
Друзы	Скопления утолщенных гифов актиномицетов, которые образуются в патологическом материале
Плесневые грибы	Эукариоты. Мицелиальные грибы, которые состоят из ветвистых разделенных или не разделенных перепонками (септами) нитей гифов, которые, переплетаясь, образуют мицелий
Дрожжи, дрожжеподобные грибы	Эукариоты с овальной, палочковидной формой клеток, неспорогенные.
Почкование	Способ размножения дрожжей и дрожжеподобных грибов
Псевдомицелий	Цепочка удлиненных клеток дрожжеподобных грибов, которая образуется в результате размножения их путем почкования, но образованные дочерние клетки не расходятся

### **Теоретические вопросы к занятию:**

- Место грибов, актиномицетов, спирохет в системе живых существ
- Морфологические свойства и структура спирохет, сходство с бактериями и простейшими.
  - Морфология и тинкториальные свойства актиномицетов. Сходство с бактериями и грибами.
  - Основные морфологические признаки плесневых грибов, критерии для их классификации. Морфология простейших.
  - Дрожжи и дрожжеподобные грибы рода Кандида, их морфологические признаки и отличия.

### **Практические задания, которые выполняются на занятии:**

- Изучить на демонстрационных препаратах-мазках морфологические свойства дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов, актиномицетов, спирохет, простейших.
- Исследовать морфологию плесневых грибов (пеницилла, мукора, аспергилла) на твердых питательных средах.
- Приготовить препараты-мазки из чистых культур неизвестных микроорганизмов, окрасить по Граму и определить их морфологические и тинкториальные свойства.
- Приготовить препарат-мазок из собственного зубного налета, покрасить по Граму и охарактеризовать найденную микрофлору по морфологическим и тинкториальным признакам, пользуясь демонстрационными рисунками.

### **Содержание темы:**

На практическом занятии студенты изучают демонстрационные препараты морфологических и структурных свойств риккетсий, хламидий, микоплазм, спирохет, актиномицетов, грибов, простейших. Готовят препараты-мазки из чистых культур неизвестных микроорганизмов. Готовят препарат-мазок из собственного зубного налета и определяют найденную микрофлору по морфологическим и тинкториальным свойствам согласно приведенному рисунку. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

### **Морфология и структура риккетсий.**

**Актуальность темы.** На территории стран СНГ наблюдаются следующие риккетсиозы: сыпной тиф (в частности, болезнь Бриля), крысиный тиф, марсельская лихорадка, клещевой сыпной тиф Северной Азии, везикулезные риккетсиоз, Кулихорадка, лихорадка цуцугамуши, волынская лихорадка. Есть природные очаги везикулезных риккетсиозов, марсельской лихорадки, лихорадки цуцугамуши и клещевого сыпного тифа Северной Азии, активно действуют.

**Эпидемический сыпной тиф** - это системная инфекция с острым течением, с тяжелой интоксикацией, быстрым эпидемическим распространением, что дает до 30% летальных исходов.

Лабораторная диагностика многих риккетсиозов основывается на выделении возбудителя из крови больных. В связи с этим необходимо знать морфологию риккетсий и методы их окраски для распознавания их под микроскопом.

**Риккетсии** - группа мелких полиморфных грамотрицательных бактерий, являющихся паразитами членистоногих, различных животных и человека.

Название этой группе микроорганизмов дал в 1916 Роха-Лима, предложивший назвать возбудителя сыпного тифа *Rickettsia prowazekii* в честь двух ученых: американского - Г.Т. Риккетс и чешского - С Провачека, которые первыми его обнаружили (Г.Т. Риккетс в 1909 г., С Провачек в 1913 гг.) при изучении сыпного тифа и, заразившись, погибли от него.

Семейство *Rickettsiaceae* состоит из трех триб: *Rickettsiae*, *Ehrlichiae*, *Wolbachiae*. Триба *Rickettsiae* делится на 4 рода: *Rickettsia*, *Rochalimaea*, *Coxiella*, *Ehrlichia*.

Строение риккетсий аналогично строению других бактерий; у риккетсий выделяют оболочку, протоплазму и зернистые включения. Ядерная структура представлена зернышками ДНК и РНК. Для микроорганизмов, особенно риккетсий сыпного тифа, характерен полиморфизм. По П.Ф. Здродовскому выделяют следующие типы: коккообразные, палочковидные, удлиненные нитевидные. Размножаются риккетсии

подобно бактериям путем поперечного деления, но им присущ внутриклеточный паразитизм. Таким образом, они занимают промежуточное положение между бактериями и вирусами. Проявляют риккетсии с помощью специальных методов окраски: по Здродовского, Романовскому-Гимзе. Патогенные представители риккетсий - риккетсия Провачека, *R. typhi*, *R. conorii*.

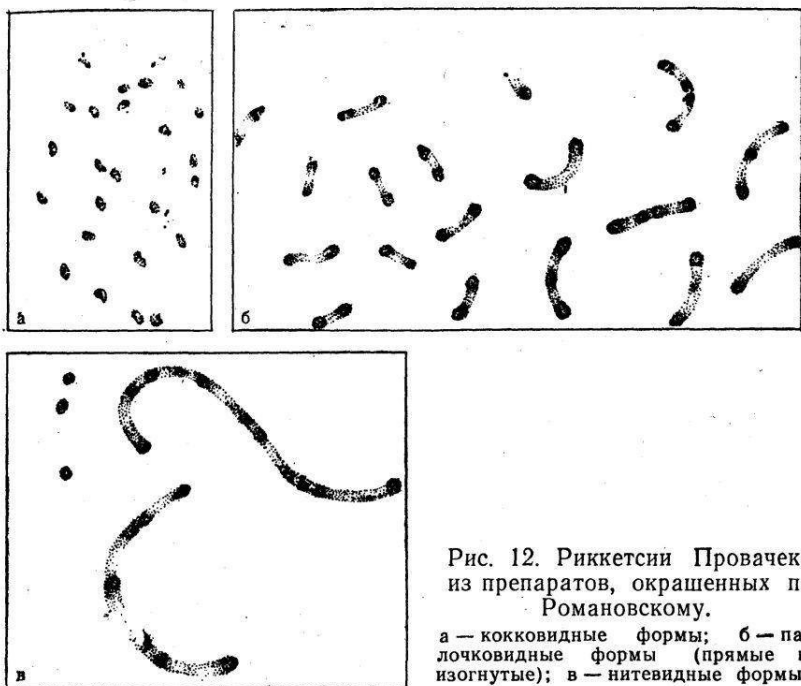


Рис. 12. Риккетсии Провачека из препаратов, окрашенных по Романовскому.  
а — кокковидные формы; б — палочковидные формы (прямые и изогнутые); в — нитевидные формы.

### Морфология и структура хламидий.

**Хламидии** - уникальная группа мелких патогенных грамотрицательных подвижных бактерий, являющихся возбудителями различных болезней человека и животных. У людей они вызывают заболевания глаз, мочеполовой и дыхательной систем.

Ежегодно трахомой болеют от 400 до 500 млн. человек, из них более 10 млн. становятся слепыми. Уретритами хламидийной этиологии страдают до 6% мужчин; 10-12% женщин детородного возраста, у 50% которых при родах происходит инфицирование ребенка и развивается офтальмия и пневмония новорожденных.

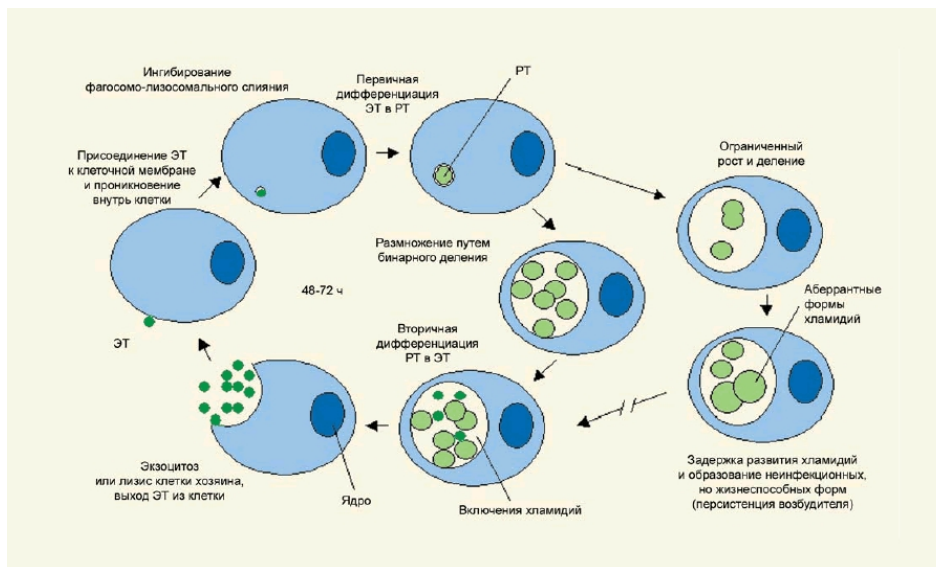
**Хламидии** - облигатные внутриклеточные организмы прокариотной системы. Имеют сферическую форму, РНК и ДНК, рибосомы, клеточные стенки по строению сходны со стенками грамотрицательных бактерий, но лишены пептидогликанов; хорошо окрашиваются по Романовскому-Гимзе.

Хламидии размножаются бинарным делением только в цитоплазме эукариотических клеток с уникальным циклом развития. Жизненный цикл хламидий представлен двумя основными формами, сменяющими друг друга - ретикулярные тельца (вегетативная форма) и элементарные тельца (спороподобная форма).

**Элементарные тельца** (ЭТ) - инфекционная внеклеточная форма. Они обеспечивают передачу заболевания от человека (животного) к человеку. **Ретикулярное тельце** (РТ) - внутриклеточная форма, развивается с ЭТ, что попало в цитоплазму. После образования РТ хламидийная клетка бинарно делится, образуются тельца включения в виде вакуолей в цитоплазме.

Тельца включения прилегают к ядру клетки и их можно обнаружить в иммерсионном микроскопе при окраске, используемой для диагностики хламидиоза.

Для человека патогенны следующие представители рода *Chlamydia*: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*.



### Классификация хламидий.

Семейство Chlamydiaceae:

1. Род *Chlamydia*: *C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*;

2. Род *Chlamyphila*: *C. pneumoniae*, *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. caviae*, *C. felis*.

Бактериологическая диагностика хламидиозов состоит из предварительного микроскопического исследования материала с целью выявления хламидий в инфицированных клетках, окрашенных по Романовскому-Гимзе.

### Морфология и структура микоплазм.

Многие виды микоплазм патогенны для человека, и вызывают поражения дыхательных путей, суставов, сердца, мочеполовой и нервной систем.

30-60% уретритов негонококковой этиологии вызвано *M. hominis*. Существует мнение, что уреаплазменная инфекция может быть причиной как женского, так и мужского бесплодия. Кроме того, *M. hominis* при внутриутробном заражении плода может быть причиной врожденных аномалий развития ребенка в связи с ее способностью влиять на хромосомы клетки.

Лабораторная диагностика не играет решающей роли в распознавании микоплазменной пневмонии. Широко используется выделение чистой культуры возбудителя с последующей идентификацией на основании морфологических, культуральных и др. признаков.

**Микоплазмы** - свободноживущие прокариоты, не имеют настоящей клеточной стенки и не способны синтезировать ее компоненты. Функции клеточной стенки выполняет **трехслойная** мембрана цитоплазмы. Большинство видов представлены мелкими клетками, характеризующихся выраженным плеоморфизмом, могут образовывать коковидные, формы, ветвящиеся и крупные многоядерные формы, которые способны образовывать псевдомицелий. Окрашиваются по Романовскому-Гимзе. От

человека выделяют представителей рода *Mycoplasma* и *Ureaplasma*, включающих патогенные и сапрофитные виды.

### **Классификация микоплазм.**

Семейство *Mycoplasmataceae*:

1. Род *Mycoplasma*: *M. buccale*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. orale*, *M. salivarium*;

2. Род *Ureaplasma*: *Ureaplasma urealyticum*.

Для человека патогенны *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum*.

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. Что изучает морфология бактерий? Что такое бактерия?
2. Какая разница между прокариотами и эукариотами?
3. Как классифицируют бактерии по морфологическим признакам?
4. Какие структурные элементы являются постоянными в бактериальной клетке, их назначение?
5. Что собой представляют непостоянные структурные элементы клеток бактерий, каковы их функции?
6. С какой целью изучают морфологические и структурные особенности бактериальных клеток?
7. Таксономия риккетсий.
8. Морфология риккетсий, их классификация по форме.
9. Методы окраски риккетсий
10. Представители риккетсий, патогенные для человека.
11. Таксономия хламидий, их классификация, патогенные представители.
12. Биологическая особенность хламидий. Основные стадии жизненного цикла хламидий.
13. Морфология хламидий, ретикулярные тельца, элементарные тельца.
14. Методы выявления включений хламидий в цитоплазме. Практическое использование телец-включений.
15. Таксономия микоплазм. Классификация, патогенные представители.
16. Ультраструктура и морфология микоплазм.
17. Методы окраски микоплазм.
18. Представители микоплазм, патогенных для человека.

### **Рекомендации по оформлению протокола.**

В протоколы необходимо записать информацию о микроскопических грибах, сделать рисунки демонстрационных препаратов спирохет, актиномицетов, грибов, простейших.

### **Морфология и структура грибов, актиномицетов.**

**Грибы - это эукариоты, принадлежащие к царству *Mycota* (*Fungi*).**

Они отличаются от прокариотических микроорганизмов более сложным строением и более совершенным способом размножения.

Классификацию грибов осуществляют по типу мицелия и способу размножения:

Низшие	Высшие	Совершенные	Несовершенные
Chitridiomycetes	Ascomycetes	Ascomycetes	Deuteromycetes
Hyphochitridiomycetes	Basidiomycetes	Basidiomycetes	
Oomycetes	Deuteromycetes		
Zygomycetes			

Большинство патогенных грибов принадлежат к дейтеромицетам, некоторые - к аскомицетам или зигомицетам.

По морфологии различают грибы нитевидные (плесени) и дрожжи, дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

Клетки плесневых грибов называют гифами, они переплетаются, ветвятся, образуя тело гриба - мицелий. Он бывает одноклеточный (несептированный), - у низших грибов, и многоклеточный (септированный), - у высших. Септы - это перегородки в гифах. Различают субстратный (вегетативный) мицелий и воздушный (репродуктивный, генеративный), который может быть пигментированным.

Дрожжи и дрожжеподобные грибы рода *Candida* - это одноклеточные микроорганизмы овальной формы. Они не образуют мицелий, но *Candida* в результате почкования могут создавать цепочки из удлинённых клеток, которые называют псевдомицелием.

Клетки грибов покрыты оболочкой, имеют цитоплазматическую мембрану, четко дифференцированные одно или несколько ядер с ядрышками, комплекс Гольджи, митохондрии, лизосомы, разнообразные включения.

Культивируют грибы на питательных средах Сабуро, Чапека, сусло - агаре. Большинство из них аэробы.

Грибы размножаются бесполом (вегетативным) и половым путями. Размножающиеся бесполом путем, - вегетативно (почкованием, разделением гифницы, спорами), называют несовершенными.

Размножающиеся путем полового процесса - слияния мужских и женских гамет, в результате чего образуются гаплоидные клетки - споры, называются совершенными.

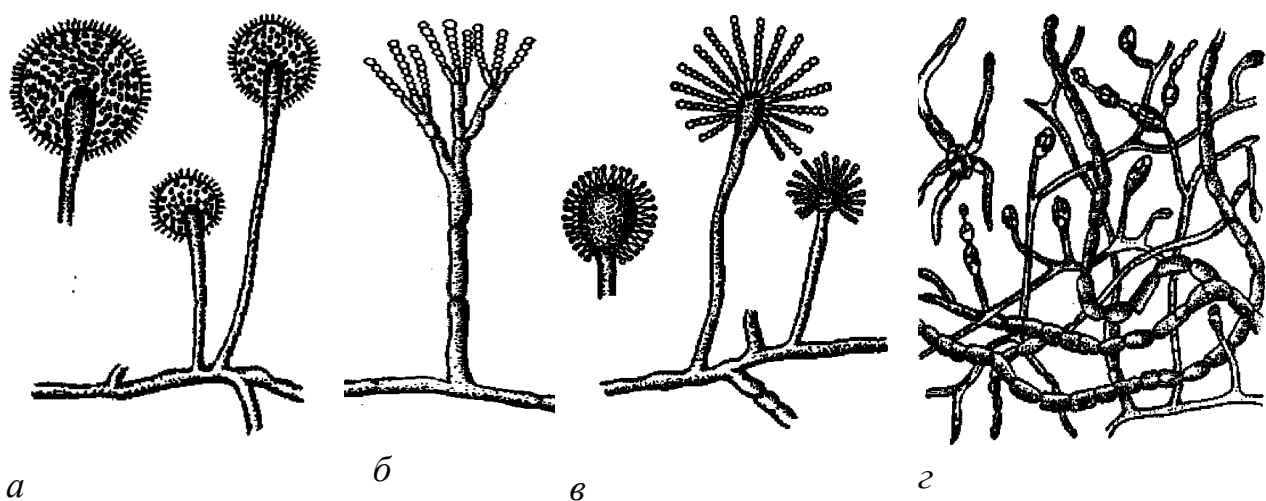


Рис. 5 Морфологические особенности грибов различных классов: а - *Mucor*; б - *Penicillium*; в - *Aspergillus*; з - *Alternaria*



Для большинства видов грибов, имеющих медицинское значение, характерно наличие конидий (или экзоспор), являющихся формами неполового размножения. Их классификация во многом основывается на морфологических формах конидий. Их наиболее частые формы - бластоспоры, хламидоспоры, артросторы, конидиоспоры.

Бластоспоры - простые структуры, которые образуются в результате почкования, с последующим отделением почки от родительской клетки, например у дрожжевых грибов.

Хламидоспоры образуются в результате увеличения гифальных клеток с образованием толстой оболочки, защищающей споры от неблагоприятных условий окружающей среды.

Артросторы - споры, образующиеся путем фрагментации гиф на отдельные клетки. Они встречаются у дрожжеподобных грибов, возбудителя кокцидиоидоза, тканевых форм дерматофитов в волосе, кожных чешуйках и в ногтях.

Конидиоспоры - зрелые наружные споры, возникающие на дифференцированных конидиофорах (конидионосцах), отличающихся от других нитей мицелия по форме и размерам (у аспергилл, пеницилл) или располагающиеся по бокам и на концах любой ветви мицелия, прикрепляясь к ней непосредственно или тонкой ножкой.

К эндоспорам совершенных грибов относятся спорангиоспоры муконовых грибов, развивающихся в специальных органах (спорангиях), располагающихся на вершине спорангионосца. Споры освобождаются при разрыве стенки спорангия.

Эндоспоры обнаруживают также у тканевых форм возбудителей кокцидиоидоза. Они развиваются в круглых образованиях - сферулах, при разрыве стенки зрелой сферулы попадают во внешнюю среду.

Основное функциональное отличие спор у бактерий и грибов: у бактерий споры обеспечивают переживание в неблагоприятных условиях окружающей среды, у грибов образование спор- способ размножения.

### **Морфология дрожжей и их характеристика**

*Дрожжи* – это высшие одноклеточные грибы. Большинство дрожжей относится к двум классам грибов – аскомицетам и дейтеромицетам.

Дрожжи по отношению к кислороду делятся на факультативные анаэробы (в аэробных условиях осуществляют дыхание и активно накапливают биомассу, а в анаэробных условиях вызывают спиртовое брожение) и аэробы.

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах; от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Морфологическое разнообразие форм дрожжей изображено на рис. 6.

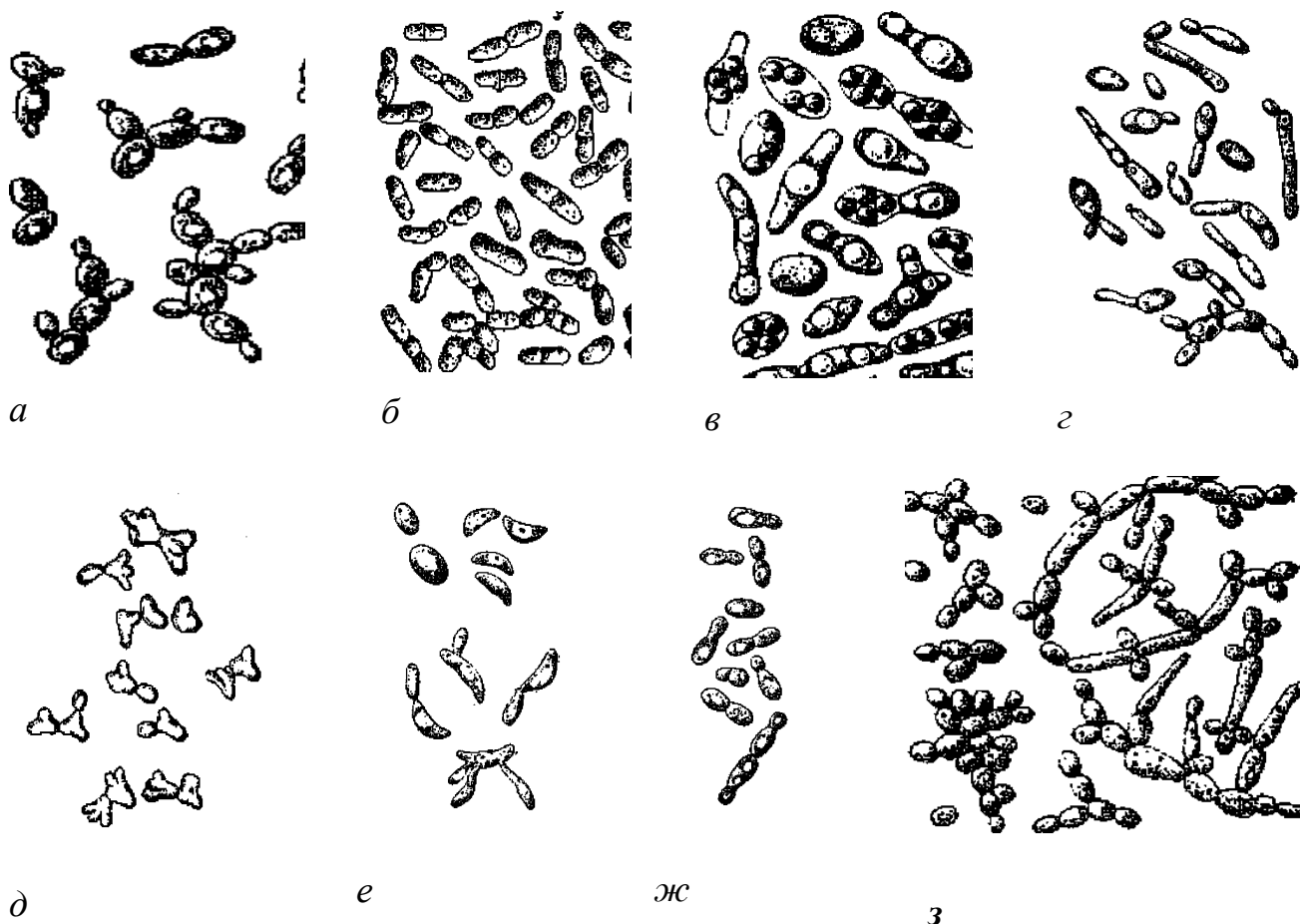


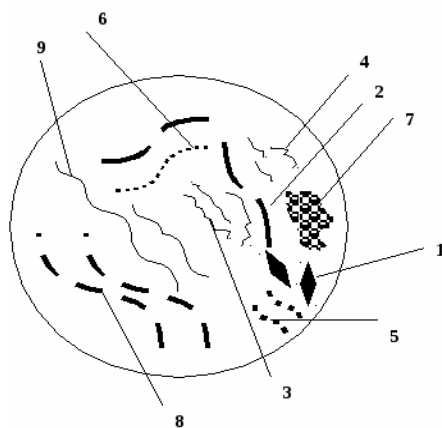
Рис. 6 Формы дрожжевых клеток: а - овальная яйцевидная; б - цилиндрическая; в – апикулятная; лимоновидная; г – стреловидная; д – треугольная; е – серповидная; ж – колбовидная; з, и - мицелевидная

Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования. В зависимости от вида дрожжи вегетативно могут размножаться почкованием (так размножаются дрожжи овальной формы), бинарным делением (характерно для дрожжей цилиндрической или палочковидной формы) или почкующимся делением. Кроме вегетативного размножения, дрожжи – аскомицеты могут размножаться половым путем с образованием аскоспор.

Дрожжи - дейтеромицеты могут размножаться только вегетативным способом.

Студенты готовят препарат из собственного зубного налета, красят по Граму и делают рисунок в протоколе, на котором помечают разные бактерии.

### Микрофлора зубного налета



1. Фузобактерии (Гр<sup>+</sup> веретеновидные бактерии);
- 2, 8. Лактобациллы (Гр<sup>+</sup> стрептобактерии);
- 3-4. Трепонемы (Гр<sup>+</sup> нитевидные извитые бактерии);
- 5-6. Стрептококки (Гр<sup>+</sup> кокки);
7. Стафилококки (Гр<sup>+</sup> кокки);
9. Лептотрихии (Гр<sup>+</sup> удлинённые или нитевидные бактерии)

#### Грамположительные микроорганизмы

1. Грибы Кандида
2. Микрококки
3. Стрептококки
4. Стафилококки
5. Лактобактерии
6. Вейлонеллы
7. Фузобактерии

#### Грамотрицательные микроорганизмы

8. Вибрионы
9. Спириллы
10. Спирохеты
11. Бактероиды
12. Лептотрихии
13. Эпителиальная клетка

**Простейшие (Protozoa)** - это эукариотические одноклеточные организмы, имеющие микроскопический размер. Патогенные для человека простейшие принадлежат к разным классам: саркодовые (дизентерийная амеба), жгутиковые (лейшмании, лямблии, трихомонады, трипаносомы), споровики (токсоплазма, малярийные плазмодии), реснитчатые (балантидии).

Простейшие широко распространены в природе. Это связано со способностью простейших к быстрому размножению, их маленькими размерами, а также тем, что в неблагоприятных условиях большинство из них образует цисты, которые способны переносить изменения температуры, влажности, и тому подобное. Для простейших характерно наличие сложного жизненного цикла, который сопровождается иногда изменением хозяина, как, например, у возбудителя малярии (комар-человек) или токсоплазмоза (кошка-человек).

Простейшие имеют органеллы движения (жгутики, реснички, псевдоподии), пищеварения (вакуоли), также возможно пищеварения в результате фагоцитоза. Размножаются они несколькими способами: простым и многократным делением, половым путем, образованием цист. Поверхность тела простейших покрыта клеточной мембраной. В большинстве из них есть внешняя эластичная оболочка - пеликула, которая играет защитную роль. Для проникновения в клетку хозяина простейшие имеют специальные устройства, например, у токсоплазм есть сложный комплекс органелл - коноид с фибриллами, трихомонады и лямблии имеют специальные присоски.

Для выявления простейших используется микроскопия нативных и окрашенных препаратов из исследуемого материала в иммерсионном, фазово-контрастном или люминесцентном микроскопах. Для детального изучения ультраструктуры используется электронная микроскопия.

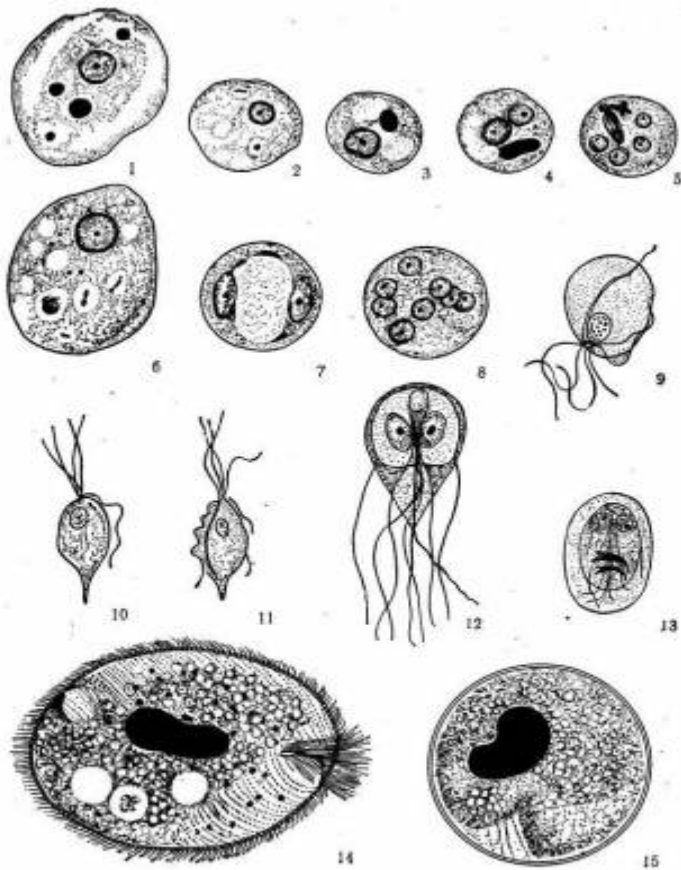


Рис. 17. Морфология простейших.  
 1-5 — дизентерийная амeba; 6-8 — кишечная амeba; 9-11 — трихомонады человека; 12, 13 — лямблии; 14, 15 — балантидия

При микроскопии препаратов следует учитывать, что каждый из представителей простейших имеет ряд морфологических особенностей, зависят не только от вида, но и от стадии развития паразита. Болезни, которые вызывают простейшие, называются протозойными. К ним относятся: малярия, лейшманиоз, токсоплазмоз, амeбиаз, лямблиоз и другие.

### Алгоритм лабораторной работы:

1. Знакомство с классификацией простейших.
2. Изучение морфологии простейших по схемам, таблицам и в демонстрационных препаратах.
3. Разбор схемы жизненного цикла малярийных плазмодиев.

### Жизненный цикл малярийного плазмодия

1. При укусе в кровь человека попадают спорозоиты (бесполое поколение).
2. С током крови они попадают в печень, где делятся путём шизогонии. Шизогония — это способ бесполого размножения, при котором ядро делится на множество частей, вокруг каждой возникает цитоплазма и клетка делится на много частей.
3. После нескольких делений в печени спорозоиты выходят в кровь и проникают в эритроциты.
4. В эритроцитах плазмодии также делятся шизогонией. В момент разрыва эритроцита в кровь выделяются токсины — ядовитые продукты жизнедеятельности плазмодия, которые вызывают лихорадку.

5. Через несколько таких делений плазмодии превращаются в клетки – предшественники гамет – гаметоциты.

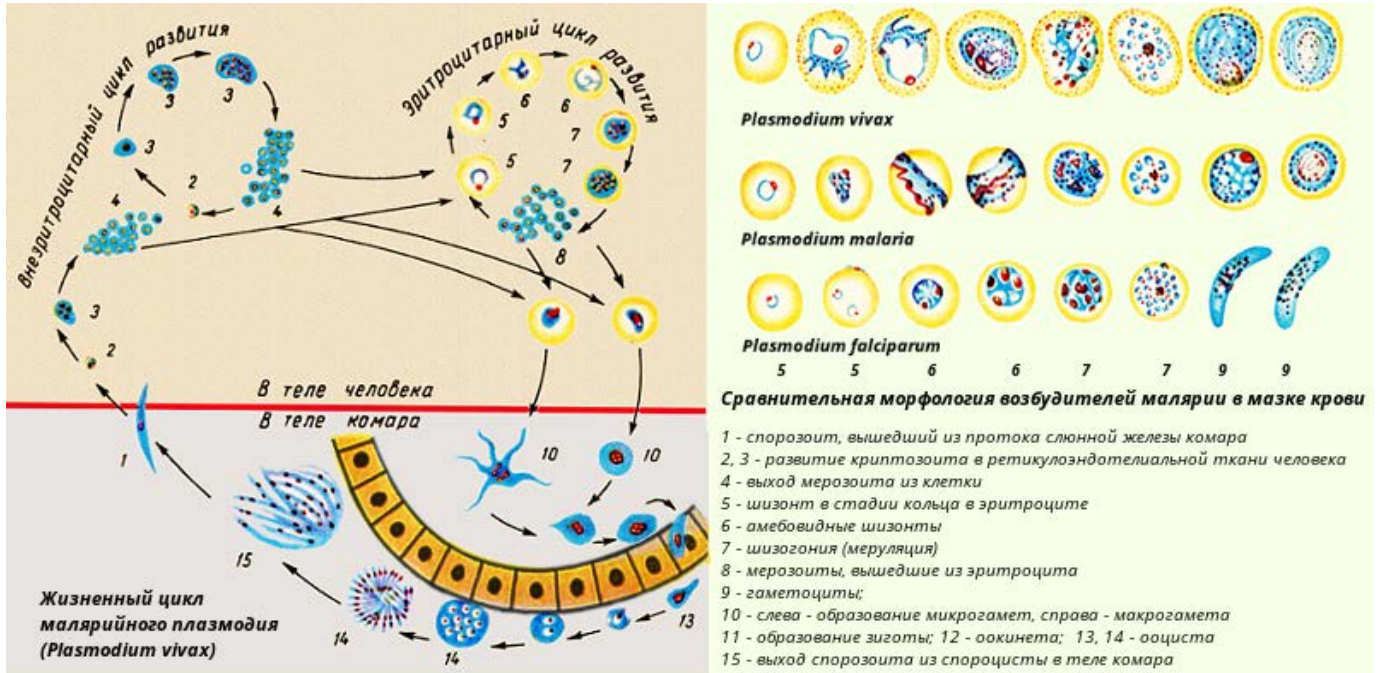
6. При укусе гаметоциты попадают в организм комара, выходят из эритроцитов и превращаются в гаметы.

7. Гаметы попадают в кишечник комара и сливаются, образуя оплодотворённую яйцеклетку – зиготу.

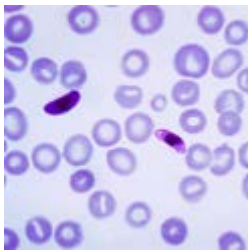
8. Зигота попадает в гемолимфу комара, где делится => образуются спорозоиты.

9. Спорозоиты попадают в слюнные железы комара

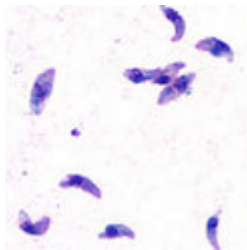
10. Цикл повторяется



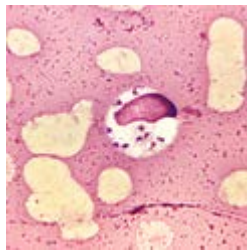
### Малярийный плазмодий



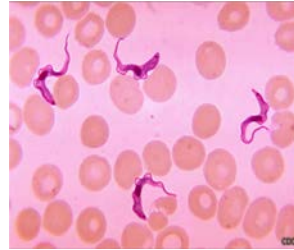
Токсоплазма



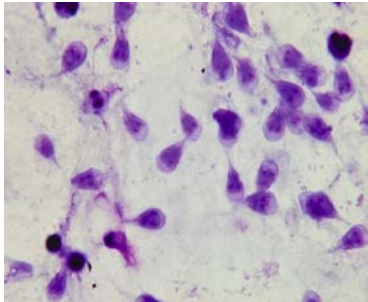
### Лейшмании



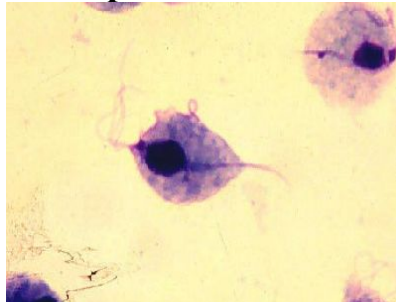
Трипаносомы



### Лямблии



### Трихомонады



4. Разбор схемы жизненного цикла трипаносом, лейшманий, лямблий, трихомонад, токсоплазм.

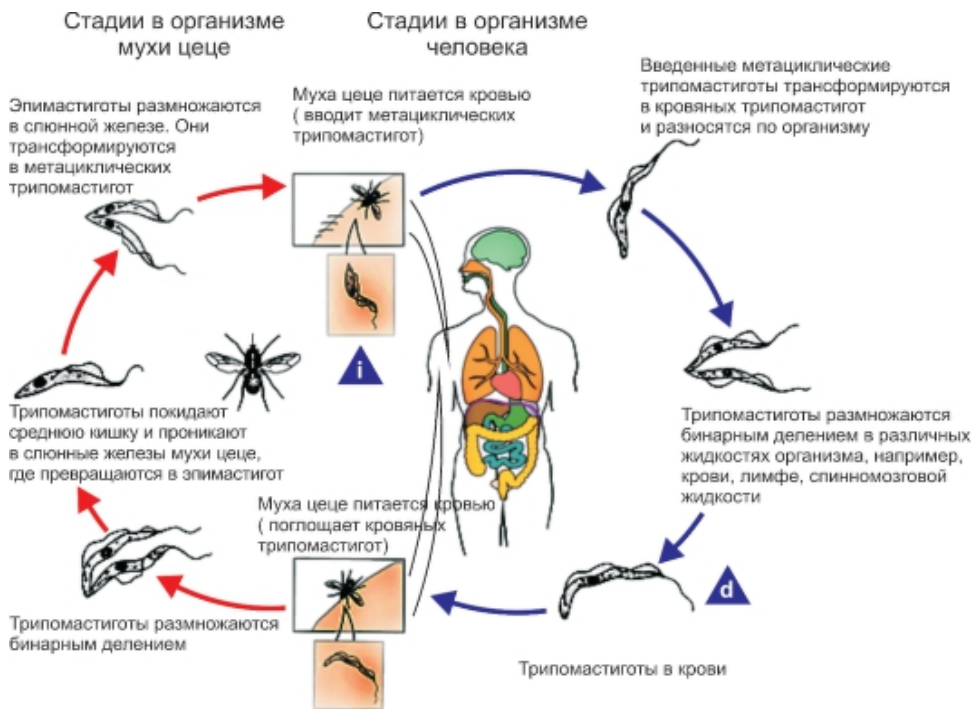


Рис. 2.8. Жизненный цикл *Trypanosoma gambiense* и *Trypanosoma rhodesiense*. i - инфекционная стадия; d - диагностическая стадия.

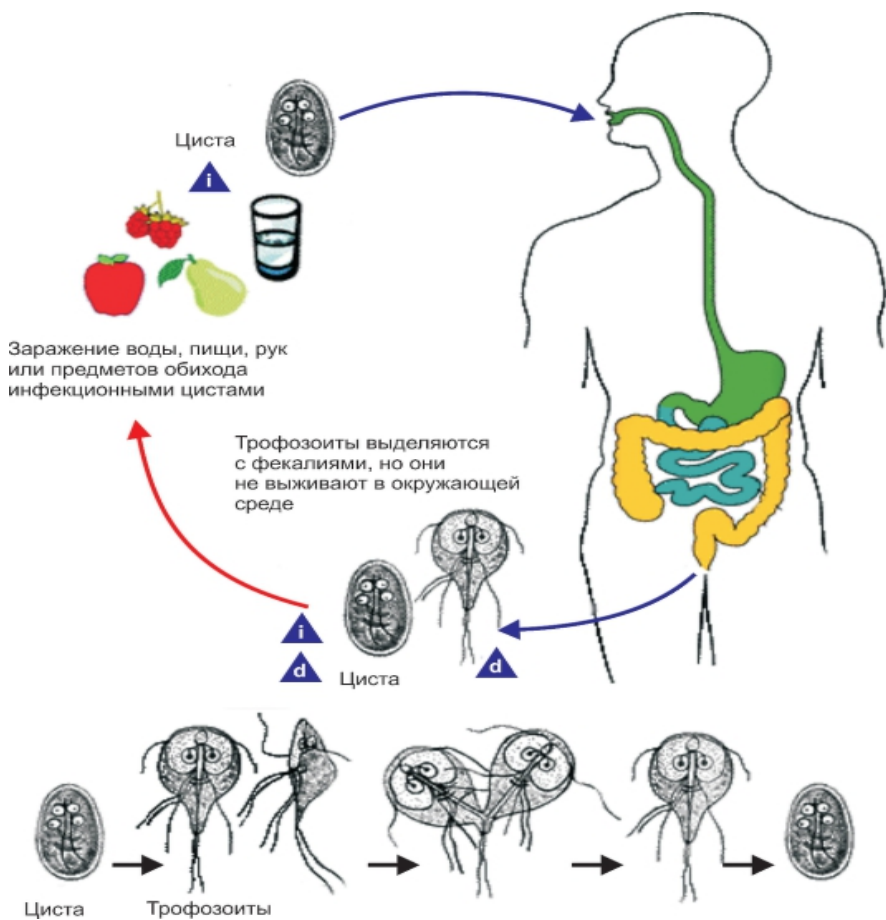
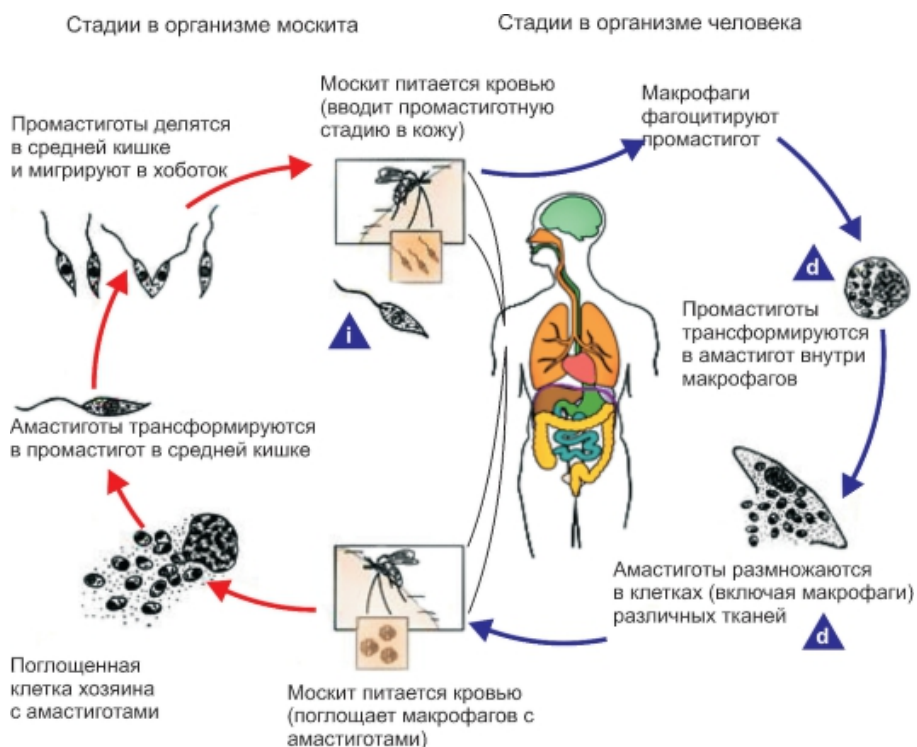


Рис. 2.21. Жизненный цикл *Lambliia intestinalis*. i - инфекционная стадия; d - диагностическая стадия.



## Жизненный цикл лейшманий



## Жизненный цикл токсоплазм

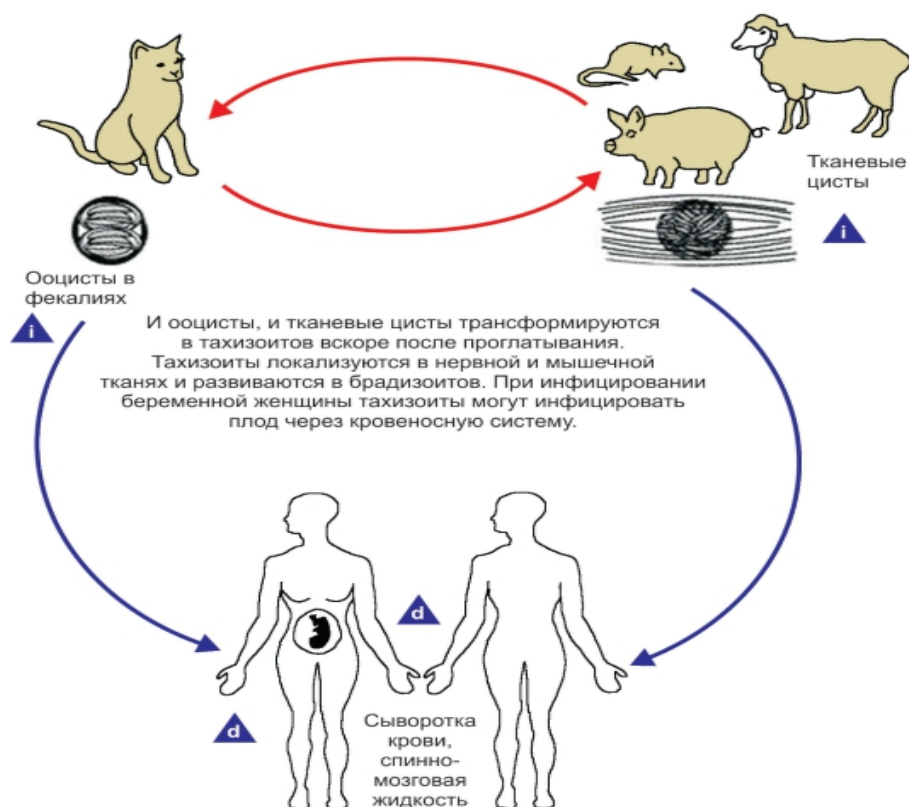
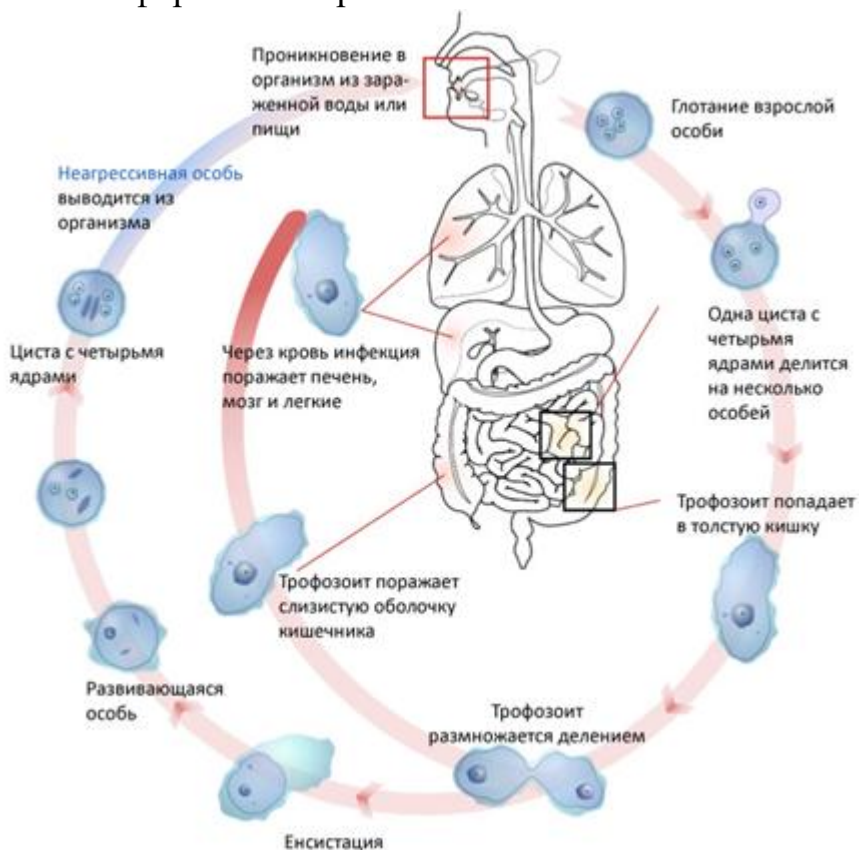


Рис. 2.22. Жизненный цикл *Toxoplasma gondii*.

i - инвазионная стадия; d - диагностическая стадия: 1) серологический метод диагностики или 2) прямое обнаружение паразита в периферической крови, амниотической жидкости или тканях.

5. Микроскопия и анализ демонстрационных препаратов простейших.
6. Замалювання демонстрационных препаратов и схем жизненных циклов простейших.
7. Оформление протокола.



### Вопросы для самоконтроля

1. К каким доменам относятся спирохеты, грибы, простейшие, актиномицеты?
2. Какую форму имеют клетки грибов? В чем отличие ложного и истинного мицелия?
3. Перечислите способы размножения грибов. Можно ли считать образование спор способом размножения грибов? Чем отличаются споры грибов от спор бактерий?
4. В чем проявляются культуральные особенности грибов?
5. Есть ли среди микроскопических грибов

полезные для человека грибы? Назовите их?

6. Как классифицируют грибы? Как изучают морфологию грибов?
7. Каково значение грибов для человека?
8. Каково значение актиномицетов для человека? Для фармации?
9. В чем состоят морфологические и физиологические особенности спирохет? Приведите примеры патогенных для человека спирохет. Как их культивируют?
10. Можно ли использовать микроскопический метод для дифференциации спирохет?
11. Простейших относят к прокариотам или эукариотам? С чем это связано?
12. Каковы морфологические особенности простейших? Как осуществляется у простейших движение, питание, дыхание, размножение?
13. Как классифицируют простейших, вызывающих заболевания у человека?

### Практическое занятие №3

#### Физиология микробов. Питательные среды. Культивирование бактерий аэробов и анаэробов. Методы выделения чистых культур бактерий

На предыдущих занятиях вы познакомились с морфологией и тинкториальными свойствами микроорганизмов. Изучение этих свойств необходимо, но, как правило, недостаточно для идентификации возбудителя, то есть определения вида микроба. Поэтому на практике наряду с микроскопическим методом применяется



микробиологический метод – культивирование, выделение чистой культуры возбудителя и изучение его физиологических свойств.

### **Цель самоподготовки**

- Изучить особенности энергетического и пластического обмена у бактерий.
- Ознакомиться с различными питательными средами для культивирования микроорганизмов и их классификацией.
- Изучить образцы готовых питательных сред, их компоненты. Ознакомиться с техникой приготовления, разлива и подготовки к стерилизации разных питательных сред (МПА, МПБ, бульон Мартена, Хоттингера, мясо-пептонный желатин, пептонная вода, кровяной агар, среда Эндо, Левина, цветной ряд Гиса и др.).
- Изучить культуральные свойства бактерий.
- Усвоить методику определения сахаролитических, протеолитических и гемолитических свойств бактерий.
- Ознакомиться с методами выделения чистых культур аэробных бактерий.
- Изучить принципы и методы стерилизации, стерилизационную аппаратуру, режимы стерилизации в разных аппаратах и контроль эффективности стерилизации в автоклаве и воздушно-жаровом стерилизаторе.

### **Исходный уровень знаний**

Для усвоения материала необходимо знать: - основные группы веществ: белки, жиры, углеводы, нуклеиновые кислоты, минеральные вещества, их функции; - из курса биохимии вспомнить механизмы биологического окисления, окислительно-восстановительный потенциал; - приготовление мазка, окраска по Граму в модификации Синёва.

### **Цель занятия**

1. Уяснить особенности метаболизма микроорганизмов, принципы их культивирования в лабораторных условиях.
2. Изучить наборы питательных сред. Классифицировать среды по происхождению, консистенции, составу, назначению.
3. Познакомиться с характером роста бактерий на жидких и плотных питательных средах, с различными типами колоний.
4. Освоить технику посева для выделения чистых культур бактерий.

### **План изучения темы**

1. Химический состав бактериальной клетки.
2. Механизмы и типы питания бактерий.
3. Питательные среды, требования к ним, классификация.
4. Рост и размножение микробов.
5. Биологическое окисление у бактерий.

### **После самостоятельного изучения темы студент должен знать:**

- химический состав бактериальной клетки; типы, механизм питания, питательные среды, их состав и назначение;
- типы биологического окисления у микроорганизмов;

- методы культивирования и выделения чистой культуры аэробов и анаэробов;

**Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:**

<b>Термин</b>	<b>Определение</b>
Физиология микроорганизмов	Физиология микроорганизмов - это раздел микробиологии, изучающий биохимические и энергетические процессы, которые происходят в бактериальной клетке и обеспечивают воссоздание ее структурного материала и энергетические потребности.
<b>Группы питательных сред</b>	
1. Основные (универсальные) питательные среды	Основные питательные среды - это среды, которые по составу, наличию питательных веществ пригодны для культивирования многих видов бактерий. К ним относятся мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА).
2. Специальные питательные среды	Специальные среды используются в тех случаях, когда микроорганизмы не растут на простых питательных средах.
3. Элективные среды	Элективные среды - это среды для избирательного выделения и накопления микробов определенного вида из материалов, содержащих разнообразную микрофлору
4. Селективные среды	Селективные среды - это среды, которые благодаря добавлению определенных компонентов (желчь, анилиновые красители, антибиотики и др.) способны подавлять развитие одних видов микроорганизмов, но не влияют на другие виды.
5. Дифференциально-диагностические среды	Дифференциально-диагностические среды - это среды, которые позволяют определить ферментативные свойства микроорганизмов и проводить их дифференциацию. Они разделяются на среды для определения протеолитических, пептолитических, сахаролитических, гемолитических, редуцирующих свойств бактерий.
6. Стерилизация	Стерилизация - это полное уничтожение микроорганизмов на предметах, материалах, в питательных средах.
7. Дезинфекция	Дезинфекция - это совокупность мероприятий для полного, частичного или избирательного уничтожения потенциально патогенных для человека возбудителей на разных объектах окружающей среды с целью предупреждения передачи возбудителя от источника инфекции к восприимчивому организму.

**Теоретические вопросы к занятию:**

- Что изучают в разделе "Физиология микроорганизмов"?

- Особенности метаболических процессов у бактерий, ферменты бактерий, их классификация.
- Механизмы питания у бактерий. Классификация микроорганизмов по типу питания.
- Питательные среды для культивирования бактерий, их классификация. Требования к питательным средам.
- Характеристика и принципы изготовления отдельных групп сред.
- Методы определения ферментативной активности бактерий.
- Чувствительность микроорганизмов к действию физических, химических и биологических агентов. Механизмы их действия.
- Что такое стерилизация? Принципы и методы стерилизации.
- Стерилизационная аппаратура, режим работы этих приборов.
- Контроль эффективности стерилизации в автоклаве и воздушно-жаровом стерилизаторе.
- Что такое дезинфекция, асептика, антисептика?

### **Практические задания, которые выполняются на занятии:**

- Ознакомиться с классификацией и принципами изготовления разных групп питательных сред: основных, специальных и дифференциально-диагностических.
- Изучить образцы питательных сред и компонентов, которые входят в их состав (мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), кровяной МПА, Эндо и другие).
- Усвоить методику определения сахаролитических, протеолитических и гемолитических свойств бактерий.
- Ознакомиться с методами стерилизации, стерилизационной аппаратурой и принципами контроля эффективности стерилизации в автоклаве.
- Ознакомиться со стерилизационной лабораторией кафедры и аппаратурой, которая в ней находится (автоклав, сухожаровой и текучепаровой стерилизатор, аппарат для инактивации сыворотки).

### **Актуальность темы:**

Всім мікроорганізмам властивий безперервний обмін із навколишнім середовищем – метаболізм. Метаболізм складається з двох протилежних, але взаємозалежних процесів: асиміляція (анаболізм, конструктивний метаболізм); і дисиміляція (катаболізм, енергетичний метаболізм).

За типом живлення всі мікроорганізми розділяють на автотрофи і гетеротрофи.

Автотрофи – чисельна група вільно існуючих мікроорганізмів (бактерій, грибів, водоростей), основним (факультативні автотрофи) або єдиним (облігатні автотрофи) джерелом вуглецю або азоту для яких є неорганічні речовини.

Гетеротрофи – організми, які набувають вуглецю і азоту з органічних речовин.

За характером використання джерела енергії розрізняють три групи бактерій:

1. Фототрофи – як джерело енергії використовують сонячне світло;
2. Літотрофи – неорганічний вуглець;
3. Органотрофи – органічний вуглець (вуглеводи, жирні кислоти).

Найважливіші об'єкти для медичної мікробіології – хемоорганотрофи, їх розділяють на сапрофіти і паразити.

Сапрофіти в процесі своєї життєдіяльності використовують органічні речовини, які є в навколишньому середовищі.

Паразити харчуються за рахунок органічних сполук тварин і людини.

Прототрофи – синтезують всі сполуки з глюкози і солей амонія.

Ауксотрофи додатково потребують спеціальних речовин – чинників

Поглинання бактеріями, грибами, водоростями живильних речовин, здійснюється гідрофільно (живильні речовини повинні бути в розчинному вигляді) завдяки:

1. Пасивній дифузії,
2. Полегшеній дифузії,
3. Активному транспорту (за участю спеціальних ферментів – пермеаз),
4. Транслокацією хімічних груп.

У лабораторних умовах бактерії вирощують на живильних середовищах. Живильні середовища повинні імітувати природні умови, в яких знаходяться мікроорганізми, і містити:

1. Джерело енергії,
2. Джерело вуглецю,
3. Джерело азоту,
4. Солі (сульфати, фосфати, хлориди та інші),
5. Чинники зростання (триптофан для *S.typhi*, глутатіон для гонококів),
6. Мати рН 7,2-7,6,
7. Бути стерильними.

Живильні середовища розділяють на чотири основні групи:

1. Універсальні (МПА, МПБ) – містять живильні речовини, у присутності яких ростуть багато видів патогенних бактерій.

2. Спеціальні – застосовують для вирощування бактерій, які не розмножуються на універсальних середовищах (кров'яний агар, сироватковий бульйон, сироватковий агар і ін.)

3. Вибіркові (елективні) – характеризуються тим, що на них добре розвиваються тільки певні види бактерій і погано або зовсім не ростуть інші види (лужна пептонна вода – для холерного вібріона). Живильні середовища, які містять певні концентрації антибіотиків, елективні для стійких до цих антибіотиків штамів і разом з тим селективні для антибіотикочутливих культур.

4. Диференціально-діагностичні середовища (Гіса, Ендо, Плоскирева).

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон.

МПА – м'ясо-пептонний агар.

Пептон – білок, частково переварений пепсином або трипсином.

Агар-агар – комплексні полісахариди, які виділено з водоростей. Розріджуються при температурі 80-100°C, ущільнюються при температурі 35-42 °C.

**Стерилізація** – процес, який супроводжується руйнуванням всіх видів мікроорганізмів, включаючи спори і віруси.

**Дезинфекція** – процес руйнування патогенних мікроорганізмів, які можуть викликати інфекцію.

Стерилізація може здійснюватися двома методами:

1. Фізичний (сонячне випромінювання, сухий жар, пара, фільтрування, вплив радіаційного випромінювання, ультразвук).

2. Хімічний (кислоти, луги, галогени, редуруючі агенти, формальдегід, фенол, мила, фарби і ін.)

Микробиологическая работа, и в первую очередь практические задания, связана с приготовлением питательных сред для выращивания микроорганизмов. Среды необходимы для накопления, выделения и хранения микроорганизмов. Питательные среды используются при бактериологической диагностике инфекционных заболеваний. Кроме этого, питательные среды используются для выращивания культур с целью исследования их обмена веществ, для производства с помощью микроорганизмов ценных продуктов метаболизма: ферментов, антибиотиков, витаминов и тому подобное. Качество диагностики и качество бактериальных препаратов часто зависит от полноценности питательных сред.

### Содержание темы:

На практическом занятии студенты изучают питательные среды для культивирования микроорганизмов, их назначение и принципы получения. Изучают методику определения ферментативных свойств бактерий. Знакомятся со стерилизационной аппаратурой и изучают методы стерилизации, которые применяются в микробиологической практике. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

### Рекомендации по оформлению протокола.

Записать классификации питательных сред.

Классификация питательных сред

#### 1. ПО КОНСИСТЕНЦИИ

Плотные (Твердые)	Полужидкие	Жидкие
МПА, мясопептонный желатин, свернутая сыворотка, свернутый яичный белок; применяют для выделения микроорганизмов, изучения морфологии колоний, диагностических целей, количественного учета микроорганизмов	МПА – мясопептонный агар, применяют для хранения культур	Пептонная вода, мясопептонный бульон (МПБ), сахарный МПБ; применяют для изучения физиолого-биохимических свойств микроорганизмов, для накопления их биомассы или продуктов обмена

#### 2. ПО ПРОИСХОЖДЕНИЮ

Естественные (натуральные)	Искусственные	Синтетические
натуральные продукты животного или растительного происхождения: молоко,	среды, приготовленные по специальным рецептам из различных настоев или отваров животного или	среды, приготовленные из определенных химических соединений в точно указанных

яйца, овощи, животные ткани, желчь, сыворотка крови	растительного происхождения с добавлением неорганических солей, углеводов, азотистых веществ	концентрациях, способных обеспечить азотное, углеродное, минеральное питание; состав их всегда точно известен и постоянен, поэтому они широко используются для изучения метаболизма и генетики бактерий
---	--	---

### 3. ПО НАЗНАЧЕНИЮ И СОСТАВУ

общего назначения (универсальные)	специального назначения
для культивирования большинства бактерий	для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах.

<b>Основные (простые)</b>	<b>Специальные (сложные)</b>	<b>Элективные (избирательные)</b>	<b>Дифференциально-диагностические</b>
используют для культивирования многих видов микроорганизмов: ПВ, МПБ, МПА, питательный агар (ПА), сусло-агар, сусло жидкое, питательный желатин; на простых средах хорошо растут прототрофные бактерии; они служат основой для приготовления ряда сложных питательных сред	используют для выделения и культивирования тех микроорганизмов, которые не могут расти на простых средах: сахарный МПБ, сахарный МПА, сывороточный МПБ, кровяной МПА, асцитический МПБ, сывороточный агар	используют для выделения определенного вида из мест естественного обитания и для получения накопительных культур; на этих средах преимущественно растет определенный вид, другие не растут или растут плохо: щелочная ПВ для холерного вибриона), среда Сабуро для грибов), желточно-солевой агар (для стафилококка), сывороточные среды □ среда Ру и среда	среды используют для изучения биохимических свойств и дифференцировки (отличия) одного вида микроорганизмов от другого по его ферментативным свойствам: среды Эндо, Левина, Плоскирева, среды Гисса. Состав сред подбирается таким образом, чтобы четко выявить характерные отличия ферментативных свойств одного вида от другого.

		Леффлера (для дифтерийных коринебактерий), среда Китта-Тароцци (для анаэробов), среды с желчью (для тифо-паратифозных бактерий), среды с глицерином (для микобактерий туберкулеза)	
--	--	--	--

### Требования к питательным средам

1. В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы;
2. Среда должна быть сбалансирована по химическому составу. Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органогенных элементов - C:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;
3. Среды должны иметь достаточную влажность, обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %.
4. Среда должна иметь определенное значение pH среды. Среди микроорганизмов различают *ацидофилы* (кислотолюбивые микроорганизмы), *алкалофилы* (щелочелюбивые микроорганизмы) и *нейтрофилы* (лучше всего растут в нейтральной среде с pH около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. pH является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения pH в среду добавляют буферные системы (например: фосфатный буфер), CaCO<sub>3</sub> (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например: аминокислоты, полипептиды, белки) и др.;
5. Среды должны быть *изотоничными* для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.
6. Среды должны обладать определенным *окислительно-восстановительным потенциалом* ( $rh_2$ ), определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают  $rh_2=41$ , насыщенный водородом  $rh_2=0$ . Облигатные анаэробы размножаются при  $rh_2$  не выше 5, аэробы – не ниже 10.
7. Среды должны быть *стерильными*, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.
8. Наличие стимуляторов роста

- 9. Буферность
- 10. Вязкость
- 11. Прозрачность

Для определения ферментативных свойств бактерий осуществляют посев культуры *E.coli* на ряд Гиса (выявление сахаролитических свойств); культуру *Proteus vulgaris* засевают уколом на среду с желатином (выявление протеолитических свойств). Студенты должны ознакомиться с изменениями, которые происходят в названных средах при наличии у бактерий соответствующих ферментов и токсинов. Например, на средах Гиса изменяется цвет, среда с желатином разжижается, а на кровяном агаре вокруг колоний, выделяющих гемолизин, появляется зона просветления (демонстрация).

### Культуральные свойства бактерий

Культуральные свойства бактерий характеризуют их питательные потребности, условия и характер роста на твердых и жидких питательных средах. В зависимости от пищевых потребностей того или другого вида микроба питательные среды должны содержать соответствующие питательные вещества (об этом было подробно сказано выше). Для роста и размножения микроорганизмов важную роль также играют температурные условия. По отношению к температурному оптимуму все бактерии делят на 3 группы: **психофилы**, **мезофилы** и **термофилы**. Подавляющее большинство патогенных микроорганизмов относится к мезофилам, их температурный оптимум составляет 34-37°C.

На жидких питательных средах бактерии могут образовывать следующие формы роста:

- 1) равномерное помутнение и осадок на дне - большинство патогенных бактерий;
- 2) пленку на поверхности среды - холерный вибрион, коринебактерии дифтерии, микобактерий туберкулеза и др.;
- 3) пленку с отходящими в глубь среды нитями (сталактиты) - возбудитель чумы;
- 4) «придонно-пристеночный» рост – стрептококки;
- 5) рост в виде «комочка ваты» - сибиреязвенная палочка.

На плотных средах бактериальные клетки, фиксированные на поверхности среды, образуют макроскопические скопления (колонии) бактерий одного вида, выросших в результате размножения одной или нескольких бактериальных клеток.

Колонии разных видов бактерий отличаются по размерам, форме, поверхности, консистенции, окраске и др. Все эти признаки, как правило, видоспецифичны, поэтому они имеют важное диагностическое значение, т.е. их изучение используется для определения видовой принадлежности исследуемой культуры.

Размеры колоний варьируют от десятых долей - до 5-6 мм. Различают точечные (колонии с диаметром не более 1 мм), средние (размером 2-4 мм), крупные (более 5 мм).

Форма колоний может быть круглая, розетковидная, звездчатая, древовидная и др.

Колонии бывают плоскими, выпуклыми, куполообразными, вдавленными. Края у колоний могут быть ровными, волнистыми, фестончатыми, расплывчатыми, изрезанными и др.

Поверхность колоний может быть гладкая или шероховатая, влажная или сухая. По консистенции различают однородные или зернистые колонии, по прозрачности матовые,



непрозрачные или прозрачные. Колонии могут быть бесцветными или окрашенными (пигментированными). Белые, золотистые, лимонно-желтые колонии у стафилококков, рубиново-красные - у серраций, сине-зеленые - у синегнойной палочки, кремовые - у микобактерий туберкулеза.

Различают колонии S и R типа. S-типа колонии - круглые, гладкие, блестящие, выпуклые, с ровными краями, влажные. R-типа колонии более крупные, плоские, шероховатые, матовые, неправильной формы, с исчерченными краями.

подавляющее большинство патогенных бактерий образует колонии S-типа. R-типа колонии образуют:

1. Возбудитель сибирской язвы - матовые, плоские с локонообразной периферией колонии (колонии в виде «львиной гривы»).

2. Возбудитель чумы - периферийная кружевная зона, вокруг приподнятой центральной части колонии (колонии в виде «кружевного платочка»).

3. Возбудитель туберкулеза - морщинистые колонии светло-кремового цвета (колонии в виде «тутовой ягоды»).

4. Возбудитель дифтерии - плоские колонии с радиальной исчерченностью (колонии в виде «цветка маргаритки»).

5. Микоплазмы - колонии состоят из центра, врастающего в глубь среды, и периферийной ажурной части (колонии в виде «яичницы-глазуньи»).

### Задание 3. Изучить принципы и методы стерилизации.

#### Принципы стерилизации

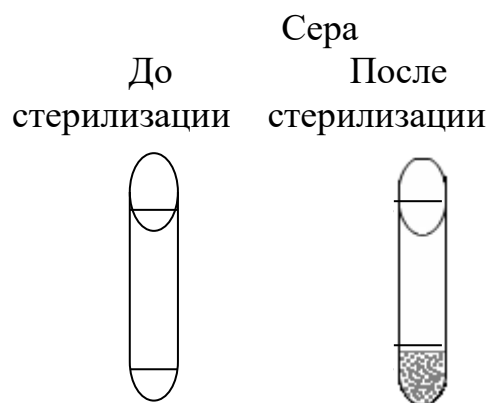
Физический	Физико-химический	Химический	Биологический
Тепловая Ультразвуковая Лучевая Электроток и током ультравысокой частоты	Адсорбционно- фильтрационная: фильтры-свечи, фильтры-пластинки (асбеста, нитро- целлюлозные)	Обработка: галоидами, кислотами, альдегидами, щелочами, эфирами, спиртами и др.	Обработка анти- биотиками

Метод стерилизации	Прибор	Темпера- тура	Время стерилизации	
<u>Фламбирование или прокалывание в пламени</u> (бактериологические петли, препаровальные иглы, пинцеты)	Газовая горелка или спиртовка		До появления ярко-красного свечения	
<u>Кипячение</u> (шприцы, хирургический инструментарий, предметные и покровные стекла)	Стерилизато р	100°C	Не менее 40 минут	
<u>Стерилизация сухим жаром</u> (стеклянная посуда: чашки Петри, пробирки, пипетки и др.)	Сушильный шкаф (печь Пастера)	165°C	1 час	
		180°C	40 мин	
		200°C	10-15 мин	
Стерилизация паром под давлением	обеззараживание инфицированного материала	Автоклав	давление- 2 атм. 134°C	15-20 мин

	простые питательные среды		давление-1 атм. 120°C	
Стерилизация текучим паром (если стерилизуемый материал не выдерживает высокой температуры – питательные среды с витаминами и углеводами)	Аппарат Коха или автоклав (незавинченн ая крышка, открытый выпускной клапан)		100°C	20-30 мин в течение 3 дней
Тиндализация (для обеспложивания питательных сред, компоненты которых разлагаются при 100°C и выше)	Водяная баня	60-65°C	1 ч – 5 дней	
		70-80°C	1 ч – 3 дня	
Пастеризация (стерилизация напитков и пищевых продуктов – вино, молоко, соки и др.)		50-65°C	15-30 мин	
		70-80°C	5-10 мин	

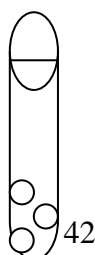
### Контроль эффективности стерилизации в автоклаве.

- Химический контроль** - используют вещества с определенной температурой плавления (сера - 119°C, бензойная кислота - 120-122°C, бензоафтол - 110°C, манноза и мочевины - 132-133°C, индикаторные бумажки температурного режима).



- Биологический контроль** (биотесты - это бумажные диски или полоски, лоскутки марли, на которых находятся споровые бактерии с известной термостойкостью).

Бумажные диски  
со споровой культурой бактерий



## Вопросы для самоконтроля.

1. Назовите основные механизмы питания бактерий. Как делятся бактерии по типу усвоения углерода? Азота?
2. Какие микроорганизмы относят к сапрофитам? Паразитам?
3. Какие требования предъявляются к питательным средам? Как делятся питательные среды по происхождению и назначению?
4. Какие питательные среды относят к «простым»? Примеры. Чем отличаются специальные и «элективные» питательные среды? Примеры.
5. С какой целью используются дифференциально-диагностические среды? Примеры и принципы их работы.
6. Какие вы знаете ферменты бактерий? Их назначение.
7. Как и для чего изучают ферменты бактерий?
8. Какова роль ферментов при микробном обсеменении растительного лекарственного сырья и готовых лекарственных форм? Приведите примеры.
9. Какие Вы знаете пигменты бактерий? Для чего их изучают?
10. Назовите основные принципы культивирования микроорганизмов. Что такое рост и размножение бактерий? Назовите особенности размножения бактерий.
11. Назовите основные фазы роста микробной культуры. Что такое чистая культура бактерий, штамм, клон?
12. По каким признакам определяют чистоту выросшей культуры бактерий? Что такое колония бактерий?
13. Что понимают под культуральными свойствами бактерий?
14. Как подразделяются бактерии по типу дыхания? Каковы механизмы дыхания бактерий?
15. Как выделяют чистую культуру аэробов? Перечислите этапы исследования по дням.
16. Назовите бактерии, являющиеся по типу дыхания строгими анаэробами. Возбудителями, каких заболеваний они являются? Почему облигатные анаэробы погибают в присутствии кислорода?
17. Перечислите методы культивирования строгих анаэробов. В чем состоит сущность биологического метода?
18. Как выделяют чистую культуру анаэробов?
19. В чем состоит отличие выделения чистой культуры аэробов и строгих анаэробов?
20. Какие питательные среды используют для культивирования строгих анаэробов? Использование, каких веществ в составе питательных сред способствует снижению окислительно-восстановительного потенциала среды?
21. Какие существуют способы культивирования вирусов? Как получают культуры клеток? Примеры культур клеток.
22. Что понимают под внутриклеточными включениями при вирусных инфекциях? Как и для чего их выявляют?

## **Действие физических и химических факторов на микроорганизмы. Стерилизация. Дезинфекция.**

1. Какие факторы внешней среды могут оказать неблагоприятное воздействие на микробы?
2. Как действует на микробы высушивание? Что такое лиофильное высушивание?
3. Каков механизм губительного действия на микробы лучистой энергии?
4. Можно ли использовать ультразвук для стерилизации воздуха закрытых помещений?
5. Как действует на микробы замораживание, замораживание и оттаивание?
6. Перечислите методы стерилизации. От чего зависит выбор метода?
7. Какие материалы можно стерилизовать дробными методами теплового воздействия? Как этот метод осуществляется?
8. Назовите основные режимы, аппаратуру и стерилизуемые материалы при тепловых методах стерилизации (в качестве примеров материалы, используемые в аптеке – посуда, халаты).
9. Почему при дробных методах стерилизации материал оставляют на сутки не в холодильнике, а в термостате или при комнатной температуре?
10. Как стерилизуют белковые среды? Металлические предметы? Лабораторную посуду? Вспомогательный материал: пробки, прокладки, упаковочный материал?
11. Можно ли отнести пастеризацию и тиндализацию к методам стерилизации? Почему?
12. Какие материалы и как стерилизуют ионизирующим излучением?
13. Перечислите методы дезинфекции. От чего зависит выбор
14. Охарактеризуйте основные группы галогеносодержащих соединений дезинфектантов.
15. В чем состоит отличие дезинфектантов и антисептиков?
16. Назовите основные механизмы действия дезинфектантов.
17. Что понимают под асептикой? В чем состоит сущность асептического приготовления лекарственных препаратов?
18. В чем состоит отличие стерилизации от дезинфекции?
19. Охарактеризуйте основные группы кислородсодержащих дезинфектантов.
20. Охарактеризуйте основные группы альдегидсодержащих дезинфектантов и спиртов.

### **Практическое занятие №4**

#### **Тема: Рост и размножение микроорганизмов. Выделение чистых культур бактерий. Дыхание бактерий.**

Выделение микроорганизмов из разных материалов и получение их чистых культур широко используется для изучения микробного загрязнения объектов окружающей среды, выявления микробной контаминации шовного, перевязочного материала, инструментария и тому подобное.

В клинико-диагностических микробиологических лабораториях выделение чистых культур и их идентификация представляют собой суть основного метода диагностики

инфекционных заболеваний - бактериологического. Изучение чистой культуры дает возможность всесторонне охарактеризовать биологические свойства микроорганизмов, которые ее составляют, и определить их видовую принадлежность. А это, как известно, является наиболее точным критерием в диагностике инфекционного заболевания или бактерионосительства.

Выделение чистых культур необходимо для проведения научно-исследовательских работ, а также в микробиологическом производстве вакцин, антибиотиков и других биологически активных продуктов микробной жизнедеятельности.

**Цель самоподготовки:**

- Изучить принципы, методы, этапы выделения чистых культур бактерий.
- Овладеть техникой засева материала с целью получения изолированных колоний бактерий.
- Усвоить методику культивирования анаэробных бактерий.

**Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию.**

Термин	Определение
Чистая культура	Чистая культура - это популяция микроорганизмов одного вида, которая выращена на стерильной питательной среде.
Популяция микроорганизмов	Совокупность микроорганизмов одного вида, которые относительно долгое время существуют на определенной территории (в биотопах).
КОЕ	Колониеобразующая единица - показатель количества бактерий, которые образуют колонии, в 1 мл среды.
Аэробные микроорганизмы	Микроорганизмы, метаболизм которых происходит при наличии в среде существования свободного кислорода, который выполняет функцию конечного акцептора полученных от субстрата электронов.
Анаэробные микроорганизмы	Микроорганизмы, которые для синтеза и строения микробной клетки, ее структурных компонентов и для процессов жизнедеятельности получают энергию без доступа свободного кислорода путем расщепления питательных веществ.
Этология микробов	Этология микробов - учение об их "биосоциальном" поведении, "языке" и механизмах общения между собой ("Quorum sensing"). Микробы живут как биосоциальные существа в колониях, культурах, биопленках.

**Теоретические вопросы к занятию:**

1. Понятие о чистой культуре микроорганизмов.
2. Цель выделения чистой культуры микроорганизмов.
3. Принципы и методы выделения чистых культур бактерий.
4. Этапы выделения чистых культур, их суть.
5. Понятие о колонии микроорганизмов.

6. Методы получения изолированных колоний микроорганизмов.
7. Методы создания анаэробных условий для культивирования анаэробных микроорганизмов.

### **Практические задания, которые выполняются на занятии:**

- Изучить принципы, методы, этапы получения чистых культур бактерий.
- Освоить работу с бактериологической петлей, чашками Петри, пробирками и осуществить посев исследуемого материала на твердые питательные среды с целью получения изолированных колоний бактерий.
- Ознакомиться с методами культивирования анаэробов.

### **Содержание темы**

На практическом занятии студенты изучают принципы, методы и этапы выделения чистых культур бактерий. Осваивают технику посева материала на твердые питательные среды методом штриховых посевов. Осуществляют первый этап выделения чистых культур аэробных и анаэробных бактерий, засевая исследуемые материалы на соответствующие среды и создавая соответствующие условия культивирования, необходимые для микроорганизмов с разными биологическими свойствами. Цель - получение изолированных колоний. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

### **Рекомендации по оформлению протокола.**

Выделение чистых культур и их идентификация (определение видовой принадлежности) представляют собой суть основного метода диагностики инфекционных заболеваний - бактериологического.

### **Методы и принципы выделения чистых культур бактерий**

Используют бактериологический, биологический (заражение лабораторного животного), био-бактериологический методы. Сущность бактериологического (культурального) метода состоит в посеве исследуемого материала с использованием методов механического разобщения микробов, чтобы получить рост в виде изолированных колоний.

### **Методы разобщения микроорганизмов основаны на:**

1) механическом разобщении бактериальных клеток на поверхности плотных питательных сред шпателем (по Дригальскому), или рассеву штрихами калиброванной петлей (по Гольду), или тампоном, после забора им исследуемого материала;

2) фильтрации исследуемого материала перед посевом (материал пропускают через специальные фильтры с определённым диаметром пор и разделяют содержащиеся в нем микроорганизмы по величине). Этот метод применяют, например, для очистки вирусов от бактерий, а также при получении бактериофагов и токсинов (в фильтрате остается фаг, или очищенный токсин, тогда как на фильтре остаются бактериальные клетки);

3) предварительном разведении в жидкой среде посевного материала с последующим высевом определённой посевной дозы на чашки с агаризованной питательной средой (метод пластинчатых разводов по Коху);

4) биологических свойствах микроорганизма, культуру которого необходимо выделить из исследуемого материала:

а) для получения культур психрофильных бактерий посеvy инкубируют при низких температурах для избирательного подавления размножения сопутствующей микрофлоры;

б) метод Шукевича, используемый для выделения культуры бактерий, характеризующихся «ползучим» ростом (протеи);

в) для выделения спорообразующих бактерий прогревают посевной материал на водяной бане при 80<sup>0</sup>С 10-15 мин, перед высевом. При этом погибают вегетативные формы, а споры в таких условиях сохраняются и при посеве на соответствующую питательную среду прорастают;

г) метод ингибирования основан на различном действии некоторых химических веществ и антибиотиков, которые добавляют в питательную среду с целью задержки роста сопутствующих микроорганизмов. Эффект ингибирования учитывается при создании селективных питательных сред. С этой же целью может быть использована предварительная обработка исследуемого материала химическими веществами перед посевом. Например, обработка материала перед посевом серной кислотой (5% раствор) быстро убивает большинство микроорганизмов, кроме кислотоустойчивых, которые выживают в этих условиях. Биологический метод основан на способности некоторых бактерий быстро размножаться в организме чувствительных к ним лабораторных животных (биопроба) или растений. Для заражения подбирают наиболее восприимчивые к предполагаемому возбудителю инфекции виды животных или виды растений. После появления у заражённых организмов признаков болезни их убивают. Органы исследуют гистологически, микроскопически для обнаружения в них возбудителя. В некоторых случаях производят посев органов и тканей на питательные среды с целью выделения чистой культуры возбудителя (био-бактериологический метод).

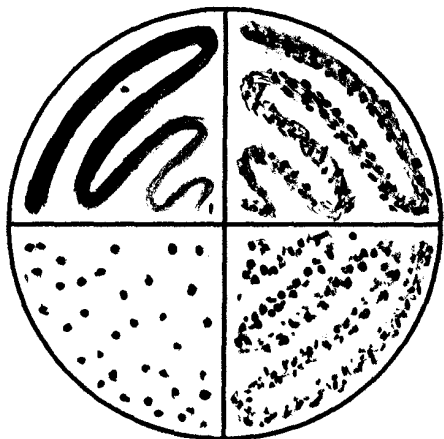
### **Техника посева микроорганизмов на питательные среды**

**Посев уколом** осуществляется уколом микробиологической петлём или иглой в столбик плотной или полужидкой питательной среды. Применяется для выращивания анаэробов, для выявления характера роста по ходу укола и для определения газообразования. У подвижных и неподвижных микроорганизмов характер роста будет различным. Посев уколом практикуют также для длительного хранения культур.

**Посев петлей** (посев *штрихами*) по методу Гольда. На внешней стороне дна чашки Петри с питательным агаром проводят разграничительные линии, разделяющие её на 4 сектора. Исследуемый материал вносят петлём в первый сектор и проводят ею параллельные линии по всему сектору на расстоянии одна от другой около 5 мм. Этой же петлём, не изменяя её положения по отношению к агару, проводят такие же линии на других секторах чашки. В том месте, где на агар попало большое количество микробных клеток, рост микроорганизмов будет в виде сплошного штриха. На секторах с небольшим количеством клеток микроорганизмы вырастают в виде отдельных колоний.

**Посев шпателем по методу Дригальского.** Используют 3 чашки Петри с питательной средой. На 1-ю чашку петлём или пипеткой наносят каплю исследуемого материала и растирают стерильным шпателем по всей поверхности питательного агара. Затем шпатель, не обеззараживая, переносят во 2-ю чашку и втирают оставшиеся на нём

микроорганизмы в поверхность питательной среды. Далее шпатель переносят в 3-ю чашку и аналогичным образом производят посев. На 1-й чашке вырастает максимальное количество колоний, на 3-й – минимальное. В зависимости от содержания микробных клеток в исследуемом материале на третьей или на второй и третьей чашках вырастают отдельные колонии, пригодные для выделения чистой культуры.



**Посев по методу Шукевича.** Исследуемый материал засевают в конденсационную воду свежескошенного агара. При размножении подвижные формы микробов из конденсационной воды распространяются по агару, как бы «вползают» на его поверхность. Отсевая материал из верхнего края роста культуры в конденсационную воду свежескошенного агара и повторяя это несколько раз, можно выделить чистую культуру.

### **Приборы, методы и среды для культивирования анаэробов**

**Микроанаэростат** – используется для создания вакуума с дозированным содержанием кислорода. Прибор представляет собой герметически закрывающийся сосуд, снабжённый манометром, в который помещают посеы и откачивают воздух. Микроанаэростат помещают в термостат.

**Эксикатор** – стеклянный лабораторный сосуд с притёртой крышкой. В его донной части имеется дополнительная емкость, куда наливается смесь пирогаллола и едкого натра или гидросульфита натрия и двууглекислой соды. На сетку-подставку помещают посеы и притирают крышку с помощью вазелина. Эксикатор помещают в термостат.

**Метод Фортнера.** В чашку Петри наливают питательный агар с 1-2% глюкозы. Посредине чашки стерильным скальпелем вырезают канавку шириной приблизительно 1 см. Одну половину чашки засевают культурой аэробов (сарцина, кишечная палочка), вторую – культурой анаэробов или исследуемым на их наличие материалом. Засеянную чашку закрывают, герметизируют и помещают вверх дном в термостат. Быстрорастущие аэробы, поглощая кислород, создают тем самым благоприятные условия для роста анаэробных микроорганизмов.

**Метод Перетца.** В стерильную чашку Петри помещают стеклянные палочки, на которые кладут стеклянные пластинки или предметные стекла. В пробирку с 20 мл расплавленного и охлажденного до 50°C МПА с 10% глюкозы (рН 7,0-7,2) вносят исследуемый материал и добавляют 2-4 капли 10% гидросульфита натрия на 10% растворе углекислой соды. Содержимое пробирки быстро перемешивают и выливают в чашку с таким расчётом, чтобы агар заполнил пространство между стеклянной



пластинкой и дном чашки. Чашки инкубируют при 37<sup>0</sup>С 24-48 часов. Колонии анаэробов вырастают под стеклянной пластинкой.

**Метод Вейон-Виньяля.** В пробирку с 0,5% расплавленным и охлажденным до 40-45<sup>0</sup>С сахарным агаром вносят исследуемый материал и перемешивают. При необходимости материал разводят путём переноса в последующие 2-3 пробирки с расплавленным агаром. Содержимое пробирок набирают в пастеровские пипетки. После заполнения пипетки вытянутый конец запаивают, а противоположный конец закрывают стерильной ваткой и заливают парафином. Трубки помещают в термостат; через 2-3 суток в агаре вырастают глубинные колонии, видимые в проходящем свете, которые можно изолировать. Для этого трубку надрезают напильником выше уровня намеченной колонии, надламывают, а колонию извлекают петлёй и пересевают для накопления чистой культуры в соответствующую питательную среду.

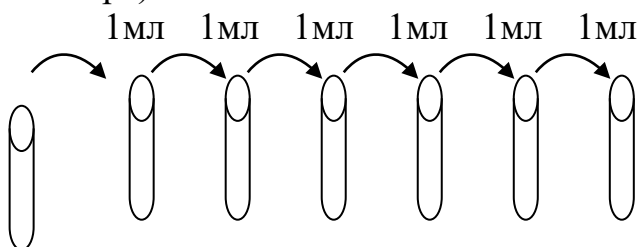
**Метод Битгнера.** К крышке чашки Петри с посевом исследуемого материала или выделенной культуры анаэробов прикрепляют пакет из фильтровальной бумаги, содержащей пирогаллол, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и тальк. Чашку герметизируют при помощи парафина или скотча. Содержимое пакета увлажняется за счёт образующегося конденсата, и ингредиенты вступают в реакцию, которая сопровождается поглощением O<sub>2</sub> и выделением CO<sub>2</sub>. Газ-пак (Generbag anaer). Система Generbag anaer состоит из воздухонепроницаемых пакетов, изготовленных из прозрачной пластмассы и генераторов, содержащих смесь веществ, поглощающих кислород. Последовательность работы: вынуть генератор из пакета, поместить в нижнюю часть воздухонепроницаемого пакета, затем поместить чашки (или пробирки) с посевами и с помощью специальной скрепки закрыть пакет. Инкубация при 37<sup>0</sup>С.

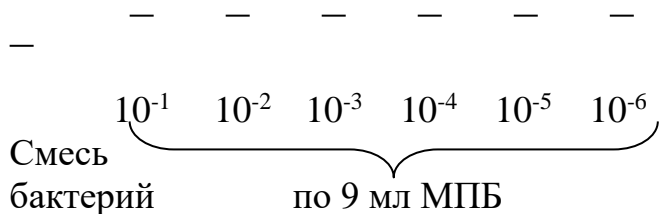
**Среда Китта-Тароци.** Содержит мясо-пептонный бульон, 0,5% глюкозы и 0,15% агара. На дно пробирки для адсорбции O<sub>2</sub> помещают кусочки варёной печени или фарша слоем 1-1,5 см и заливают 6-7 мл среды. Среду перед посевом регенерируют (прогревают 15-20 мин на водяной бане для удаления воздуха, а затем быстро охлаждают). После посева среду заливают вазелиновым маслом и помещают в термостат. Полужидкий сахарный агар (высокий столбик). В пробирку с 6-7 мл расплавленного и охлаждённого до 40-45<sup>0</sup>С полужидкого питательного агара, содержащего 0,5-1% глюкозы, вносят исследуемый материал и перемешивают. Посевы помещают в термостат.

**Среда для контроля стерильности (СКС).** Рост многих анаэробных микроорганизмов возможен только на средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом. Поэтому в среды добавляют восстановители, например, тиогликолевую кислоту или её натриевую соль, цистеин, аскорбиновую кислоту. Функции восстановителей выполняют и другие компоненты среды: глюкоза, пептон. СКС содержит питательный бульон, витаминный препарат ЭКД, NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, глюкозу, тиогликолят натрия, цистеин, агар (0,75%). Среду разливают в пробирки по 6-7 мл.

## **I. Методы, которые основываются на принципе механического разъединения микроорганизмов:**

1. Метод серийных разведений материала в жидкой питательной среде (метод Л. Пастера).





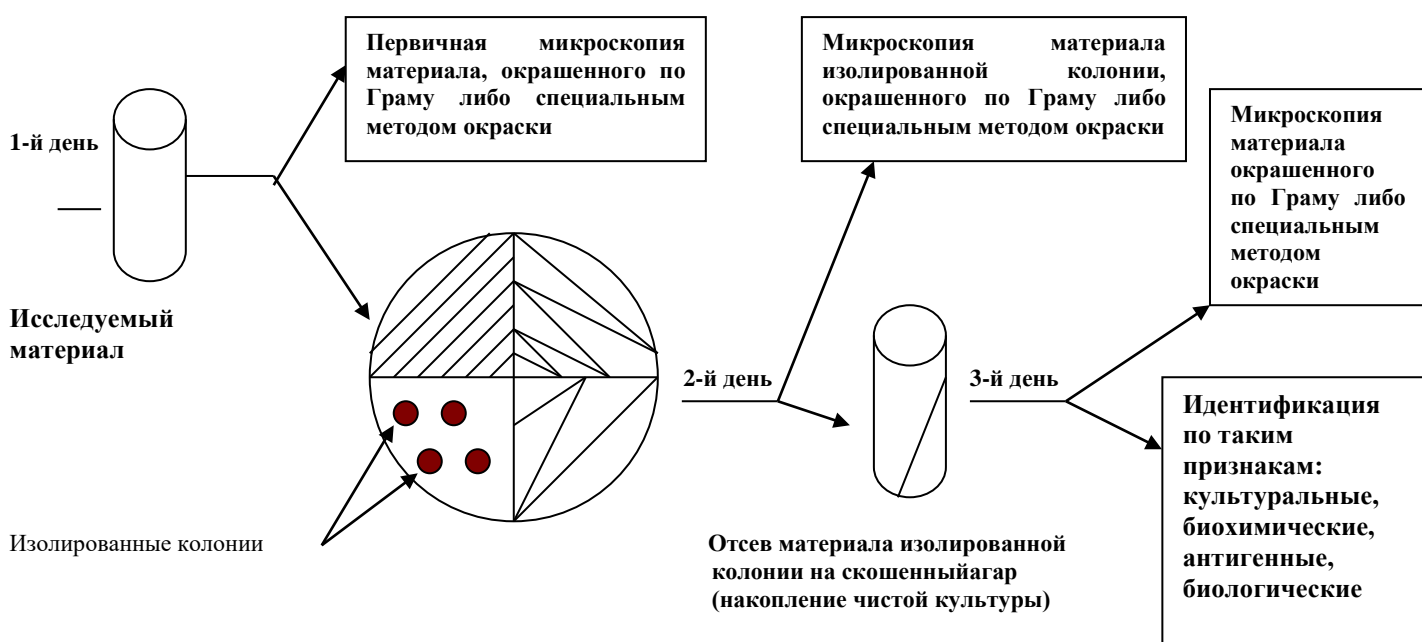
**Ознакомьтесь с этапами выделения чистой культуры микроорганизмов по способу Дригальского. Сделать посев исследуемого материала в соответствии с данной схемой.**

### Схема выделения чистой культуры аэробов.

**1-й день.** Микроскопия мазка из исследуемого материала, окрашенного по Граму с целью ознакомления с микрофлорой исследуемого материала и ориентировочного выбора питательной среды. Посев исследуемого материала бактериальной петлей на чашку с питательной средой по секторам для механического разобщения микробных клеток и получения изолированных колоний. Инкубирование посевов происходит в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение суток.

**2-й день.** Изучение культуральных свойств выросших колоний и отбор изолированных колоний. Микроскопия мазков из части изолированных колоний, окрашенных по Граму для проверки чистоты выросшей колонии. Пересев изолированной колонии на скошенный питательный агар для накопления и сохранения чистой культуры. Инкубирование посевов происходит в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение суток.

**3-й день.** Изучение готовых посевов на скошенном ПА. Микроскопия мазков со скошенного ПА, окрашенных по Граму; просмотр нескольких полей зрения.



Материал, который содержит микроорганизмы, рассеивают параллельными штрихами по поверхности твердой питательной среды с помощью бактериологической петли.

## II. Методы, которые основываются на принципе использования биологических особенностей микроорганизмов:

1. Метод выделения подвижных бактерий.
2. Метод выделения термостойких бактерий.
3. Метод выделения анаэробов.
4. Методы выделения кислото- и щелочеустойчивых микроорганизмов.
5. Метод выделения микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, анилиновым красителям, и др.
6. Методы выделения бактерий на селективных средах.
7. Метод выделения культур путем заражения чувствительных лабораторных животных.

### Основные этапы выделения чистой культуры бактерий.

Этапы	Задачи этапов
I Взятие исследуемого материала.	1. Взять материал, который содержит возбудителя. 2. Сохранить возбудителя в материале. 3. Предотвратить инфицирование себя и окружающих лиц.
II Посев материала на твердые питательные среды.	Получить изолированные колонии.
III Исследование изолированных колоний: 1. Изучение культуральных свойств (форма, размер, цвет, и др.). 2. Микроскопия препарата, изготовленного из микроорганизмов колонии и окрашенных по Граму или другим методом (определение морфологической однородности и однотинкториальности)	Отобрать колонию, подозрительную на колонию патогенных микроорганизмов (на основе изучения культуральных и морфологических свойств)
IV Пересев отобранной колонии микроорганизмов на скошенную питательную среду.	Получить чистую культуру.
V. Исследование культуры: 1. Изучение культуральных признаков. 2. Микроскопия препарата, изготовленного из микроорганизмов колонии и окрашенных по Граму или другим методом (определение морфологической однородности и однотинкториальности)	Определить чистоту культуры (признаки чистой культуры - морфологическая однородность и однотинкториальность микроорганизмов).

После выделения чистой культуры определяют вид микроорганизма (**идентифицируют**).

### Основные этапы идентификации (определение видовой принадлежности) чистой культуры бактерий

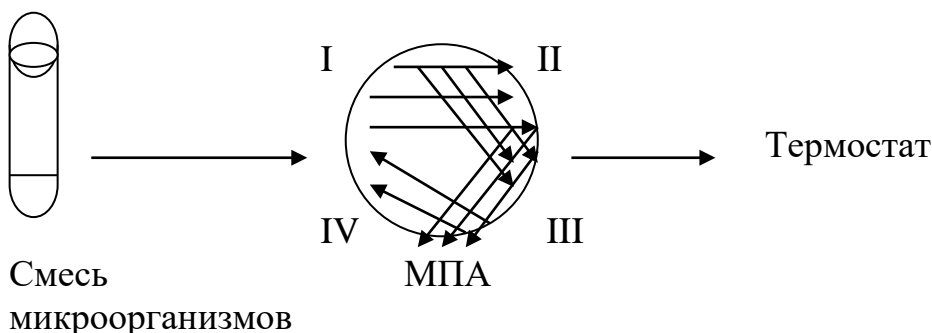
Этапы	Цель
-------	------

1. Определить морфологические и тинкториальные свойства (окраска по Граму или другим методом).	Определить вид микроорганизма
2. Определить активную подвижность (методы "раздавленной" или "висячей" капли).	
3. Определить культуральные свойства (характер колоний, характер роста культуры в жидких и на твердых питательных средах).	
4. Определить ферментативные свойства (посев на дифференциально-диагностические среды).	
5. Определить антигенные свойства (провести серологические реакции).	
6. Определить чувствительность культуры к специфическому фагу.	
7. Определить патогенность (инфицирование лабораторных животных).	
8. Определить другие свойства (по необходимости).	

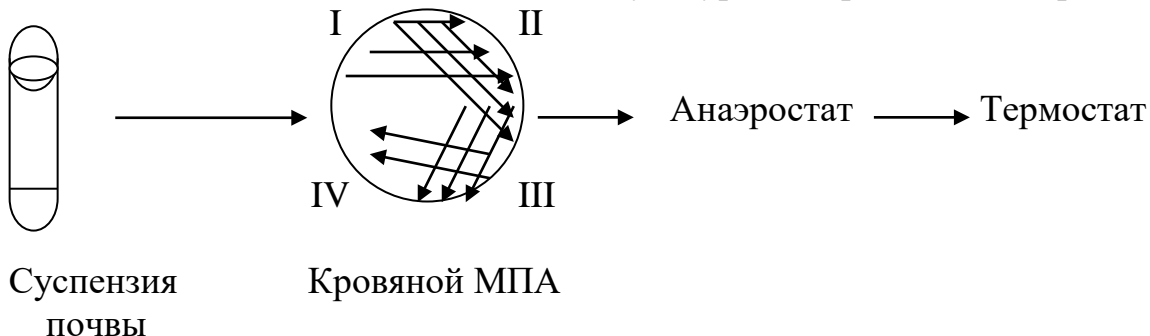
**Вид** - совокупность микроорганизмов, которые имеют общие морфофизиологические свойства (морфологические, тинкториальные, культуральные, ферментативные, антигенные и др.) и похожий генотип (высокая степень гомологии ДНК, близкое суммарное содержимое пар Г+Ц).

Вид микроорганизмов определяют по их морфологическим, тинкториальным, культуральным, ферментативными, антигенным и другим свойствами.

**Задание 1.** Начать выделение чистой культуры аэробных бактерий из смеси микроорганизмов.



**Задание 2.** Начать выделение чистой культуры анаэробных бактерий из почвы.



**Вопросы для самоконтроля.**

- В чем заключается суть бактериологического метода диагностики инфекционных заболеваний?
- Что такое чистая культура микроорганизмов?
- Какие признаки чистой культуры бактерий?
- С какой целью получают и где применяют чистую культуру микроорганизмов?
- Какие существуют методы посева микроорганизмов с целью получения изолированных колоний?
- На каких принципах основываются методы выделения чистой культуры?
- Какие биологические свойства микроорганизмов положены в основу методов выделения чистых культур бактерий?
- Каковы основные этапы выделения чистой культуры, в чем их суть?
- Какие вы знаете методы создания анаэробных условий для культивирования микроорганизмов?

## 2-й этап выделения чистых культур бактерий

Одним из этапов бактериологического метода исследования (основного метода диагностики инфекционных заболеваний) - является **получение изолированных колоний** микроорганизмов. Каждый вид микроорганизмов имеет определенный характер роста и определенные признаки колоний на твердой питательной среде (так же, как и свои особенности роста в жидкой питательной среде). Учитывая это, с целью выделения возбудителя инфекционного заболевания, надо знать методы и владеть техникой получения изолированных колоний из материала. Кроме того, морфологические и тинкториальные признаки, которые выявляют при окрашивании по Граму, культуральные свойства, а также характер движений имеют чрезвычайно большое диагностическое значение при характеристике отдельных микроорганизмов, и позволяют дать предварительный ответ о возбудителе инфекции.

### **Цель самоподготовки:**

- Освоить методики исследования колоний микроорганизмов (внешние признаки, микроскопия, подвижность микроорганизмов).
- Овладеть техникой пересева колоний бактерий на питательные среды (аэробных бактерий на скошенный МПА, анаэробных бактерий на специальные среды).

**Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию.**

Термин	Определение
Культуральные свойства	Культуральные свойства - характер роста в жидких и на твердых питательных средах, свойства колоний
Колония	Потомство одной микробной клетки, которое выросло на поверхности, или в глубине твердой питательной среды.
Диссоциация микробов	Одна из форм внутрипопуляционной изменчивости, когда в популяции появляются особи и клоны, которые отличаются от исходного типа формой колоний (S - R диссоциация) и другими

	признаками (например, потерей капсулы, подвижности; снижение ферментативной активности, вирулентности, антигенности; чувствительности к фагам, физических и химических факторов и др.)
Формы колоний	<b>S-колонии</b> - круглые, выпуклые, имеют ровный край и гладкую и блестящую поверхность. При пересеве в жидкую питательную среду образуют равномерное помутнение. <b>R-колонии</b> - для них характерной является неправильная форма, зазубренный край и морщинистая, шершавая поверхность. При пересеве в жидкую питательную среду образуют зернистый осадок.
Рост микроорганизмов	Согласованное увеличение количества всех компонентов бактериальной клетки
Размножение микроорганизмов	Увеличение числа клеток в популяции.
Способы размножения бактерий	Бинарное деление (большинство бактерий), фрагментация клеток (актиномицеты); спорами (стрептомицеты); фрагментация и почкование (микоплазмы); цикл развития хламидий (у них есть 2 формы: внеклеточные инфекционные элементарные тельца (не способные к разделению) и внутриклеточные, способные к бинарному разделению, в результате чего формируются элементарные тельца).
Рост бактерий в периодической культуре (стационарное культивирование)	Стационарное (периодическое) культивирование - это рост бактериальной популяции в условиях среды, к которой не добавляются питательные вещества и из которой не удаляются продукты метаболизма. Периодическая культура имеет несколько фаз развития: лаг-фаза - период между внесением микробов в питательную среду и началом размножения; лог-фаза (экспоненциальная) - увеличение числа бактерий проходит с постоянной скоростью; стационарная - количество бактерий перестает увеличиваться, то есть в единице объема содержится постоянное количество микробов; отмирание - уменьшение количества бактерий в популяции в результате их гибели.

### Теоретические вопросы к занятию:

- Методы исследования колоний.
- Признаки, по которым характеризуют колонии.
- Понятие о морфологических, тинкториальных, культуральных свойствах микроорганизмов.
- Пигменты бактерий, их физиологичное значение.
- Характер роста микроорганизмов в жидких питательных средах.
- Понятия "рост" и "размножение" микроорганизмов.
- Способы размножения бактерий.
- Факторы, тормозящие размножение микробов.

- Понятие "периодическая культура", фазы ее развития.
- Методы определения подвижности бактерий.

### Практические задания, которые выполняются на занятии:

- Изучить признаки, по которым характеризуют колонии.
- Освоить способы макро- и микроскопического исследования колоний.
- Определить подвижность аэробных бактерий методом "раздавленной" капли.
- Осуществить посев микроорганизмов на твердые и жидкие питательные среды с целью получения чистой культуры.

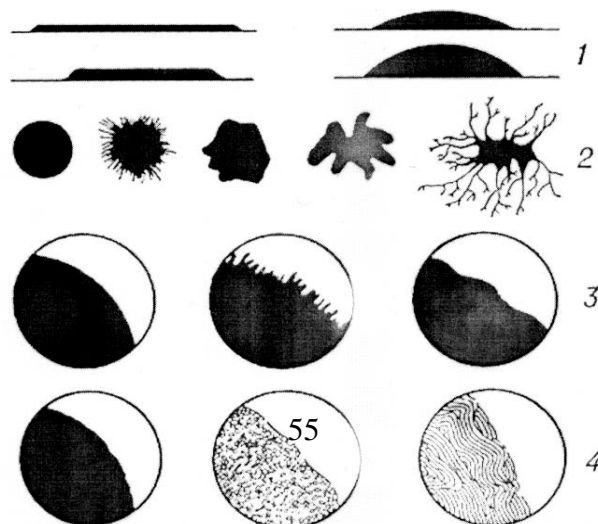
### Содержание темы.

На практическом занятии студенты изучают признаки, по которым характеризуют колонии. Осваивают способы макро- и микроскопического исследования колоний. Осваивают технику посева материала петлей на твердые питательные среды (в пробирки со скошенным МПА) и в жидкие питательные среды (среда Врублевского) для получения чистых культур аэробных и анаэробных бактерий. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

### Рекомендации по оформлению протокола.

#### Признаки колоний

- 1. Профиль:** плоский, плоско-приподнятый, слегка выпуклый, холмистый, выпукло-порезанный, с вдавленным центром, с выпуклым центром, куполообразный.
- 2. Форма:** круглая, розеткообразная, звездчатая, листовидная, и др.
- 3. Контур края:** ровный, зубчатый, волнистый, фестончатый, реснитчатый, бахромчатый, нитчатый, ветвистый.
- 4. Консистенция:** сухая, влажная, слизистая.
- 5. Цвет:** белый, желтый, красный; бесцветные. Отмечают, выделяется ли пигмент в среду.
- 6. Прозрачность:** прозрачные, полупрозрачные, непрозрачные.
- 7. Поверхность:** гладкая, шершавая, морщинистая, холмистая; блестящая, матовая.
- 8. Структура:** однородная, мелкозернистая, грубозернистая, волокнистая.
- 9. Размер:** большие (диаметр более чем 4-5 мм), средние (2-4 мм), мелкие (1-2 мм). Если диаметр менее 1 мм, то такие колонии называют точечными.

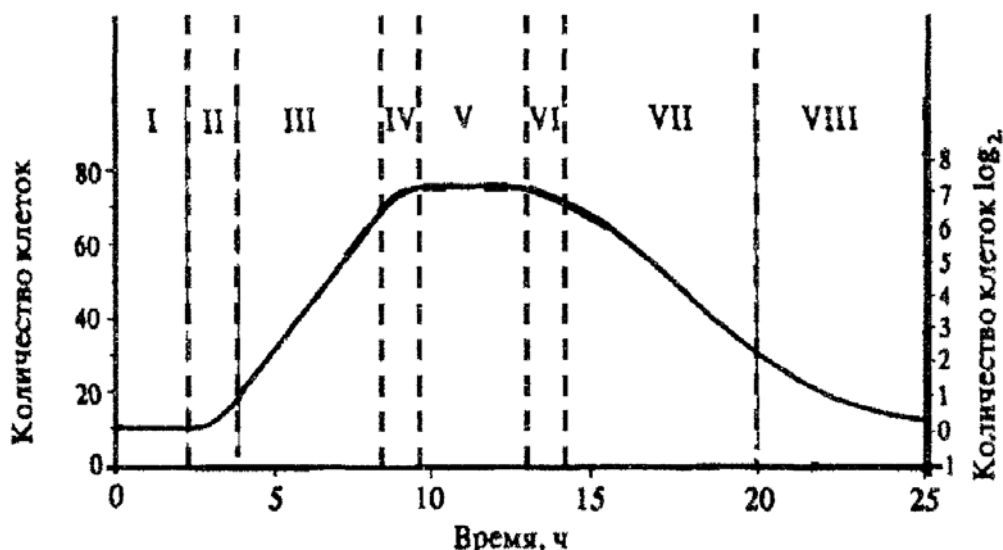


## Классификация пигментов бактерий

Группа пигментов	Растворимость	Типичный представитель
Каротиноиды	Жирорастворимые	<i>Staphylococcus aureus</i>
Меланины	Не растворимые в воде и кислотах	<i>Bacteroides (Prevotella) melaninogenica</i>
Пироловые	Спирторастворимые	<i>Serratia marcescens</i>
Фенозиновые	Водорастворимые	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

### Рост бактерий в бактериальной популяции

**Популяция** — совокупность бактерий одного вида или нескольких видов (смешанная ассоциация), которые развиваются в ограниченном пространстве в закрытой или замкнутой системе. Культивирование м/о в закрытой системе — периодическое культивирование. Развиваясь в закрытой системе, популяция м/о ведет себя как многоклеточный организм, имеющий генетическое ограничение роста. Рост бактерий в бактериальной популяции можно представить в виде графика, в котором можно показать зависимость числа клеток от времени (кривая роста).



В кривой можно выделить несколько фаз.

1. **Ляг-фаза** (начальная, от англ. lag-запаздывание) - период между посевом бактерий и началом размножения. Продолжительность ляг-фазы в среднем 4 -5 ч. Бактерии при этом увеличиваются в размерах и готовятся к делению. Количество клеток не изменяется. В этот период идет адаптация клеток к тем условиям, в которые они были помещены. Клетки синтезируют индуцибельные ферменты, с помощью которых клетки утилизируют источники питания. Длительность фазы зависит от возраста (молодые клетки растут быстрее), биологических особенностей культуры, полноценности питательной среды.

2. **Фаза задержки размножения.** Скорость размножения не велика.

3. **Фаза логарифмического (экспоненциального) роста** является периодом интенсивного деления бактерий. Продолжительность ее около 5 – 6 ч. При оптимальных



условиях роста бактерии могут делиться каждые 20 - 40 мин. Самая максимальная скорость размножения. Количество клеток увеличивается в геометрической прогрессии.

4. **Фаза отрицательного ускорения.** Замедление размножения клеток.

5. **Фаза стационарного роста.** Скорость роста равна скорости отмирания клеток, то есть количество клеток не увеличивается. Причиной отмирания является истощение питательных компонентов, изменение рН среды, накопление продуктов метаболизма и т.д. Количество клеток, которое культура достигает в стационарной фазе — максимальное. Это количество клеток называется урожаем. Определяется объемом среды, плотностью или количеством клеток и условиями культивирования.

6. **Фаза ускоренной гибели.** Скорость отмирания больше, чем скорость размножения, но она не достигает максимума.

7. **Стадия логарифмической гибели.** Культура либо погибает, либо переходит в состояние анабиоза.

### Вопросы для самоконтроля.

- Какие существуют методы исследования колоний микроорганизмов?
- По каким признакам делают вывод о чистоте колонии?
- В чем заключается биологическое значение S - R -диссоциации?
- Какое физиологическое значение для бактерий имеют пигменты?
- Могут ли внешний вид колонии и способность образовывать пигменты быть стойкими признаками вида, и использоваться для их идентификации?
- Чем отличается рост микроорганизмов на твердых и в жидких питательных средах?
- От чего зависит характер роста микроорганизмов в жидких питательных средах?
- Как называется потомство одной микробной клетки, которое выросло на поверхности, или в глубине твердой питательной среды?
- Чем отличаются экспоненциальная и стационарные фазы развития периодической культуры?
- Какое биологическое свойство микроорганизмов определяют методом "раздавленной" капли?

### Дыхание микроорганизмов.

*Дыхание, или биологическое окисление,* основано на окислительно-восстановительных реакциях, идущих с образованием энергии. Энергия необходима микробной клетке для ее жизнедеятельности. При дыхании происходят процессы окисления и восстановления: окисление – отдача донорами (молекулами или атомами) водорода или электронов; восстановление – присоединение водорода или электронов к акцептору. Акцептором водорода или электронов может быть молекулярный кислород – такое дыхание называется аэробным, а если акцептором служат нитрат, сульфат, фумарат, то такое дыхание называется анаэробным (нитратным, сульфатным, фумаратным). Анаэробизм – жизнедеятельность, протекающая при отсутствии свободного кислорода. Если донорами и акцепторами водорода являются органические соединения, то такой процесс называется *брожением*. При брожении происходит ферментативное расщепление органических соединений (преимущественно углеводов) в

анаэробных условиях. По конечному продукту расщепления углеводов различают спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое и другие виды брожения.

### По типу дыхания выделяют четыре группы микроорганизмов.

1. **Облигатные (строгие) аэробы.** Им необходим **20%** молекулярный (атмосферный) кислород для дыхания.

2. **Микроаэрофилы** нуждаются в уменьшенной концентрации (низком парциальном давлении) свободного кислорода. Для создания этих условий в газовую смесь для культивирования обычно добавляют CO<sub>2</sub>, например до 10- процентной концентрации.

3. **Факультативные анаэробы** могут потреблять глюкозу и размножаться в аэробных и анаэробных условиях. Среди них имеются микроорганизмы, толерантные к относительно высоким (близких к атмосферным) концентрациям молекулярного кислорода - т.е. аэротолерантные, а также микроорганизмы, которые способны в определенных условиях переключаться с анаэробного на аэробное дыхание.

4. **Строгие анаэробы** размножаются только в анаэробных условиях, т.е. в бескислородных условиях или при очень низких концентрациях молекулярного кислорода, который в больших концентрациях для них губителен. Биохимически анаэробное дыхание протекает по типу бродильных процессов, молекулярный кислород при этом не используется.

Аэробное дыхание энергетически более эффективно (синтезируется большее количество АТФ).

В процессе аэробного дыхания образуются токсические продукты окисления (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- перекись водорода, O<sub>2</sub><sup>-</sup> - свободные кислородные радикалы), от которых защищают специфические ферменты, прежде всего каталаза, пероксидаза, пероксиддисмутаза. У анаэробов эти ферменты отсутствуют, также как и система регуляции окислительно- восстановительного потенциала (rH<sub>2</sub>).

Основные методы создания анаэробных условий для культивирования микроорганизмов.

1. Физический - откачивание воздуха, введение специальной газовой бескислородной смеси (чаще- N<sub>2</sub>- 85%, CO<sub>2</sub>- 10%, H<sub>2</sub>- 5%).

2. Химический - применяют химические поглотители кислорода.

3. Биологический - совместное культивирование строгих аэробов и анаэробов (аэробы поглощают кислород и создают условия для размножения анаэробов).

4. Смешанный - используют несколько разных подходов.

### 3-й этап выделения чистых культур бактерий

Заключительным этапом бактериологического метода исследования (основного метода диагностики инфекционных заболеваний) - является **идентификация чистой культуры**, то есть определение вида микроорганизмов. Идентифицировать культуру можно лишь на основании целого комплекса признаков, а именно: культуральных, морфологических, тинкториальных, ферментативных, антигенных и других. В условиях практической микробиологической лаборатории наиболее часто определяют ферментативные свойства чистой культуры с использованием "цветного" ряда Гисса.

Принцип изучения ферментативных свойств бактерий с использованием "цветного" ряда Гисса положен в основу современных методов, которые используются с этой же целью: системы индикаторных бумажек (СИБ), панели биохимической дифференциации (ПБД), системы автоматизированной идентификации. Они более стандартизированы и менее трудоемкие, сравнительно с использованием "цветного" ряда Гисса.

Выделение чистой культуры из патологического материала и установления ее вида дает возможность поставить диагноз инфекционного заболевания и установить чувствительность культуры бактерий к антибиотикам. Последнее необходимое для разработки рациональной схемы лечения.

**Цель самоподготовки:**

- Дать определение таксономическим категориям в классификации микроорганизмов.
- Определить морфологические, тинкториальные свойства и оценить чистоту культуры.
- Определить цель и усвоить основные этапы идентификации чистой культуры бактерий.
- Освоить микроскопический метод исследования подвижности бактерий - метод "раздавленной" капли.
- Определить ферментативные свойства чистой культуры аэробных бактерий.

**Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию.**

<b>Термин</b>	<b>Определение</b>
Вид	Совокупность микроорганизмов, которые имеют общие морфофизиологические свойства (морфологические, тинкториальные, культуральные, ферментативные, антигенные и др.) и схожий генотип (высокая степень гомологии ДНК, близкое суммарное содержимое пар Г+Ц).
Штамм	Чистая культура микроорганизмов, полученная из определенного источника (организма, внешней среды), или из одного и того же источника в разные промежутки времени.
Клон	Потомство одной клетки.
Идентификация	Определение вида микроорганизмов на основании изучения их морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных (биохимических), антигенных и других свойств.

**Теоретические вопросы к занятию:**

- Таксономические категории в классификации микроорганизмов.
- Признаки чистой культуры.
- Биологические особенности, положенные в основу идентификации микроорганизмов.
- Классификация ферментов микроорганизмов.

- Методы определения ферментативной активности микроорганизмов.
- Методы определения способности микроорганизмов к активному движению.

### **Практические задания, которые выполняются на занятии:**

- Исследовать культуру аэробных бактерий - определить культуральные, морфологические, тинкториальные признаки, активную подвижность методом "раздавленной" капли. Сделать вывод о чистоте культуры.
  - Определить ферментативные свойства чистой культуры аэробных бактерий.
  - Исследовать культуру анаэробных бактерий - определить культуральные, морфологические, тинкториальные признаки. Сделать вывод о чистоте культуры.

### **Содержание темы.**

На практическом занятии студенты изучают таксономические категории микроорганизмов, определяют морфологические, тинкториальные свойства. Исследуют культуру анаэробных бактерий, делают вывод о чистоте культуры. Определяют цель идентификации чистой культуры и усваивают основные этапы идентификации чистой культуры бактерий. Определяют ферментативные свойства чистой культуры аэробов и исследуют способность бактерий к активному движению с помощью микроскопического метода - метода "раздавленной" капли. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

### **Рекомендации по оформлению протокола.**

С целью идентификации чистой культуры бактерий (определение вида микроорганизмов) необходимо:

1. Изучить морфологические и тинкториальные свойства (окраска по Граму или другим методом).
2. Определить активную подвижность (методы "раздавленной" или "висячей" капли).
3. Изучить культуральные свойства (тип колоний, характер роста культуры в жидких и на твердых питательных средах).
4. Изучить ферментативные свойства (посев на дифференциально-диагностические среды).
5. Определить антигенные свойства (осуществить серологические реакции).
6. Определить чувствительность культуры к специфическому фагу.
7. Определить патогенность (заражение лабораторных животных).
8. Определить другие свойства (по необходимости).

### **Посев на цветной ряд Гисса позволяет:**

1. Выявить ферментацию углеводов (сахаров) к кислоте и газу.
2. Выявить редуцирующие свойства и интенсивность восстановления цвета индикатора.
3. Выявить пептонолитические свойства (на МПБ). О распаде пептона судим на основе выявления конечных продуктов:
  - сероводорода (индикаторная бумажка, смоченная раствором ацетата свинца - чернеет);
  - индола (индикаторная бумажка, смоченная 12% раствором щавелевой кислоты, становится розового цвета);
  - аммиака (красная лакмусовая бумажка приобретает синюю окраску).

4. Установить характер роста на жидкой питательной среде.

## Биохимические свойства микроорганизмов.

### Роль ферментов в жизнедеятельности бактерий.

Все питательные вещества и любые элементы, подвергающиеся превращения в бактериальной клетке, вступают в реакции с участием ферментов.

Ферменты или энзимы – специфичные белковые катализаторы, присутствующие во всех живых клетках.

В настоящее время существует несколько классификаций ферментов:

#### I. По механизму действия:

1. Регуляторные (аллостерические) ферменты воспринимают метаболические сигналы и в соответствии с ними изменяют свою каталитическую активность.

2. Эффекторные ферменты – подразделяются на 6 классов (по типу, катализируемой химической реакции):

а) *оксидоредуктазы* – перенос электронов

б) *трансферазы* – перенос различных химических групп

в) *гидролазы* – перенос функциональных групп на молекулу воды

г) *лиазы* – присоединение групп по двойным связям и обратные реакции

д) *изомеразы* – перенос групп внутри молекулы с образованием изомерных форм

е) *лигазы* – образование связей C-C, C-S, C-O, C-N за счет реакций конденсации, сопряженных с распадом АТФ.

#### II. По условиям образования:

1. Индукцибельные – наличие в субстрата в среде вызывает синтез фермента, отвечающего за его катаболизм.

2. Конститутивные – синтезируются в независимости от условий среды.

#### III. По месту действия:

1. Экзоферменты – проявляют свою активность вне клетки бактерии.

2. Эндоферменты – все ферменты, катализирующие биохимические реакции внутри клетки.

#### IV. По химическому составу:

1. Простые – состоят только из молекулы белка

2. Сложные – кроме молекулы белка содержат также ко-фермент (например, ион металла). Если ко-фермент отсутствует – энзим не активен!

Определение ферментативной активности бактерий играет огромную роль в их идентификации, т.к. способность синтезировать определенные ферменты является генетически детерминированным, стабильным признаком бактерий.

Чаще всего изучают сахаролитические, протеолитические, пептолитические, гемолитические свойства, образование ферментов декарбоксилаз, оксидаз, каталазы, плазмокоагулазы, ДНК-азы, фибринолизина, преобразование нитратов в нитриты. Для этого разработаны специальные питательные среды – пестрый ряд Гиса, МПБ, свернутая сыворотка, молоко и др.

### Практическое использование ферментов микробного происхождения.

Получение микробных ферментов – важнейшая отрасль промышленной микробиологии. Например, для улучшения пищеварения применяют готовые препараты ферменты – амилазы, целлюлазы, протеазы, липазы, облегчающих соответственно гидролиз крахмала, целлюлозы, белка и липидов. При изготовлении сладостей для предупреждения кристаллизации сахарозы применяют инвертазу дрожжей, для осветления фруктовых соков – пектиназу. Коллагеназа клостридий и стрептокиназа стрептококков, гидролизующая белки, способствуют заживлению ран и ожогов. Литические ферменты бактерий, секретируемые в окружающую среду, действуют на клеточные стенки патогенных микроорганизмов и служат эффективным средством в борьбе с последними, даже если они обладают множественной устойчивостью к антибиотикам. В качестве инструментария в биоорганической химии, геной инженерии и генотерапии используют выделенные из бактерий рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, полимеразы, ДНК-лигазы и прочие ферменты, направленно модифицирующие нуклеиновые кислоты.

### **Вопрос для самоконтроля.**

- На какие таксономические категории разделяют микроорганизмы?
- По каким признакам делают вывод о чистоте культуры?
- Какие свойства микроорганизмов изучают и определяют с целью идентификации чистой культуры бактерий?
- Чем определяется биохимическая активность микроорганизмов?
- Какие существуют классификации ферментов?
- Какие существуют методы определения ферментативной активности бактерий?
- Для каких микроорганизмов способность образовывать пигменты является стойким признаком вида, который используют для их идентификации?
- Дайте определение терминам штамм, вид, клон.

Биохимическая активность	Название питательной среды	Характер изменений под воздействием бактериальной культуры	
Протеолитическая (расщепление белков)	Молоко	Растворение сгустка казеина	
	Среда с желатиной	Разрежение (посев уколом в столбик питательной среды)	
Пептолитическая (расщепление пептонов – продуктов неполного гидролиза белка)	МПБ	Определяют образование $\text{NH}_3$ (индикатор – лакмусовая бумага - синее), $\text{H}_2\text{S}$ (бумага пропитанная ацетатом свинца - чернеет), индола (бумага пропитанная 12% щавелевой кислотой - розовая)	
	Пептонная вода		
Сахаролитические (расщепление сахаров)	Среда Гисса (1% пептонная вода + 0,5% натрий хлорид + 1% углевода (глюкоза, лактоза, мальтоза, манит, сахароза) + индикатор)		
	Дифференциально-диагностические среды для выявления лактозы ферментации	Среда Эндо (агар+лактоза+фуксин, обесцвеченный сульфатом натрия)	Лактозоположительные колонии – темно-красные с металлическим блеском (E.coli), лактозоотрицательные – бесцветные (сальмонеллы).
		Среда Плоскирева (агар с солями желчных кислот + лактоза + цитрат натрия + гипосульфит натрия – кальцинированная сода + йод + нейтральный красный + бриллиантовый зеленый)	Лактозоположительные колонии – розовые, лактозоотрицательные колонии - бесцветные
		Среда Левина (МПА + лактоза + однозамещенный фосфат калия + метиленовый синий + эозин)	Стерильная среда – фиолетовая. Лактозоположительные колонии – темно-синие, лактозоотрицательные – розовые.
		Среда Ресселя (полужидкий агар+ 1% лактоза + 1% глюкоза + индикатор ВР – смесь водного голубого и розоловой кислоты) Разливают так, чтобы образовался столбик агара и скошенная поверхность.	Если ферментируют: 1. <u>лактозу и глюкозу</u> – изменение цвета (при подкислении) во всей среде на синий. 2. <u>только глюкозу</u> – изменение цвета столбика среды. 3. <u>газообразование</u> – появление пузырьков или разрыв среды.
Гемолитические (определение продукции ферментов патогенности – гемолизина)	Кровяной агар (агар + 5-10% дефебрированной или свежей крови барана или кролика)	Способны продуцировать гемолизины – в среде вокруг колоний образуются зоны просветления на матовом фоне. По цвету гемолиза определяют тип гемолизина ( $\alpha$ – зеленоватый, $\beta$ - бесцветный, $\gamma$ – без видимых изменений)	
Липолитические	Введение в питательные среды липидов или жироподобных субстанций – твинов.	Положительный результат – радужные венчики вокруг колоний.	
Редуцирующая способность	Введение в состав питательных сред красителей	Фиксируя время изменения индикатора, судят о выраженности редуцирующей способности.	
Декарбоксилазная	Введение в состав питательных сред аминокислот (лизина, орнитина, глутаминовой кислоты и др.)	Изменение цвета индикатора	
Плазмокоагулязная	Цитратная плазма кролика	Образование фибринового сгустка	
Лецитовителазная (лецитиназная, вителазная)	Желточно-солевой агар или агар Чистовича (синонимы)	Вокруг колоний зона помутнения с характерным радужным венчиком по периферии	
ДНК-азная	Введение в состав сред ДНК (после инкубации бактерий такие среды заливают на 7-10 мин 1N HCl)	HCl взаимодействует с ДНК, образуя непрозрачный белый преципитат. ДНК-аза деполимеризует ДНК и при добавлении HCl вокруг колоний образуется прозрачная зона	

**Практическое занятие №5**  
**Генетика микробов, генная инженерия, биотехнология.**  
**ПЦР диагностика.**

Способность микроорганизмов изменять свои свойства имеет непосредственное отношение к практической медицине, так как может оказать влияние на результаты лечения, диагностики и профилактики инфекционных заболеваний. В последние годы основные достижения генетики получены на модели микроорганизмов. Возникли новые научные направления – молекулярная генетика и генетическая инженерия. Развитие этих направлений позволило изучить тонкую структуру гена и обеспечивает возможность получения организмов с запланированными свойствами, лечения наследственных заболеваний человека и получение антибиотиков, гормонов, антител и других биологических веществ промышленным путём (биотехнология).

**Цель самоподготовки**

После самостоятельного изучения темы студент должен знать: - структуру и особенности генома микроорганизмов; - формы изменчивости микроорганизмов, условия, вызывающие изменение их свойств; - внехромосомные генетические факторы, их свойства и роль в изменчивости микроорганизмов; - значение изменчивости микроорганизмов для практической медицины.

**Исходный уровень знаний**

Для усвоения материала темы необходимо знать основные законы генетики, тонкую структуру генов и механизмы, обеспечивающие их функционирование, а также нарушение функции генов в результате мутаций (биология); структуру и функции нуклеиновых кислот, ферменты, участвующие в реализации генетической информации (биохимия).

**Цель занятия**

1. Ознакомиться с особенностями генома бактериальной клетки, видами и формами изменчивости микроорганизмов.
2. Ознакомиться с практическим применением достижений геной инженерии.

**План изучения темы**

1. История развития учения о генетике микроорганизмов.
2. Формы изменчивости микроорганизмов.
3. Значение изменчивости микроорганизмов для теории и практики медицины.

**После изучения темы студент должен уметь**

1. Выявить проявления фенотипической изменчивости (модификации) у бактерий.
2. Интерпретировать результаты опытов по получению фено- и генотипической изменчивости у бактерий.



### 3. Ученье и оценить результаты ПЦР.

#### **Генетика бактерий и вирусов.**

Молекулярная биология, изучающая фундаментальные основы жизни, является в значительной степени детищем микробиологии. В качестве основных объектов изучения в ней используют вирусы и бактерии, а основное направление - молекулярная генетика основана на генетике бактерий и фагов.

Бактерии - удобный материал для генетики. Их отличает:

- относительная простота генома (совокупности нуклеотидов хромосом);
- гаплоидность (один набор генов), исключая доминантность признаков;
- различные интегрированные в хромосомы и обособленные фрагменты ДНК;
- половая дифференциация в виде донорских и реципиентных клеток;
- легкость культивирования, быстрота накопления биомасс.

#### **Общие представления о генетике.**

**Ген** - уникальная структурная единица наследственности, носитель и хранитель жизни. Он имеет три фундаментальные функции.

1. Непрерывность наследственности - обеспечивается механизмом репликации ДНК.
2. Управление структурами и функциями организма - обеспечивается с помощью единого генетического кода из четырех оснований (А - аденин, Т - тимин, Г - гуанин, Ц - цитозин). Код триплетный, поскольку кодон - функциональная единица, кодирующая аминокислоту, состоит из трех оснований (букв).
3. Эволюция организмов - благодаря мутациям и генетическим рекомбинациям.

В узкоспециальном плане ген чаще всего представляет структурную единицу ДНК, расположение кодонов в которой детерминирует первичную структуру соответствующей полипептидной цепи (белка). Хромосома состоит из особых функциональных единиц - **оперонов**.

Основные этапы развития (усложнения) генетической системы можно представить в виде следующей схемы:

кодон → ген → оперон → геном вирусов и плазмид → хромосома прокариот (нуклеоид) → хромосомы эукариот (ядро).

#### **Генетический материал бактерий.**

1. **Ядерные структуры бактерий** - хроматиновые тельца или нуклеоиды (хромосомная ДНК). У бактерий одна замкнутая кольцевидная хромосома (до 4 тысяч отдельных генов). Бактериальная клетка гаплоидна, а удвоение хромосомы (репликация ДНК) сопровождается делением клетки. Вегетативная репликация хромосомной (и плазмидной) ДНК обуславливает передачу генетической информации по вертикали - от родительской клетки - к дочерней. Передача генетической информации по горизонтали осуществляется различными механизмами - в результате конъюгации, трансдукции, трансформации, сексдукции.

2. **Внехромосомные молекулы ДНК** представлены **плазмидами**, мигрирующими генетическими элементами - транспозонами и инсервационными (вставочными) или IS- последовательностями.

**Плазмиды** - экстрахромосомный генетический материал (ДНК), более просто устроенные по сравнению с вирусами организмы, наделяющие бактерии

дополнительными полезными свойствами. По молекулярной массе плазмиды значительно меньше хромосомной ДНК, содержат от 40 до 50 генов.

Их объединение в одно царство жизни с вирусами связано с наличием ряда общих свойств - отсутствием собственных систем мобилизации энергии и синтеза белка, саморепликацией генома, абсолютным внутриклеточным паразитизмом.

Их выделение в отдельный класс определяется существенными отличиями от вирусов.

1. Среда их обитания - только бактерии (среди вирусов, кроме вирусов бактериофагов имеются вирусы растений и животных).

2. Плазмиды сосуществуют с бактериями, наделяя их дополнительными свойствами. У вирусов эти свойства могут быть только у умеренных фагов при лизогении бактерий, чаще же всего вирусы вызывают отрицательные последствия, лизис клеток.

3. Геном представлен двунитевой ДНК.

4. Плазмиды представляют собой "голые" геномы, не имеющие никакой оболочки, их репликация не требует синтеза структурных белков и процессов самосборки.

Плазмиды могут распространяться по вертикали (при клеточном делении) и по горизонтали, прежде всего путем конъюгационного переноса. В зависимости от наличия или отсутствия механизма самопереноса (его контролируют гены *tra*-оперона) выделяют **конъюгативные** и **неконъюгативные** плазмиды. Плазмиды могут встраиваться в хромосому бактерий - **интегративные** плазмиды или находиться в виде отдельной структуры - **автономные** плазмиды (**эписомы**).

#### **Классификация и биологическая роль плазмид.**

Функциональная классификация плазмид основана на свойствах, которыми они наделяют бактерии. Среди них - способность продуцировать экзотоксины и ферменты, устойчивость к лекарственным препаратам, синтез бактериоцинов.

#### **Основные категории плазмид.**

1. **F- плазмиды** - донорские функции, индуцируют деление (от *fertility* - плодовитость). Интегрированные F - плазмиды- *Hfr*- плазмиды (высокой частоты рекомбинаций).

2. **R- плазмиды** (*resistance*) - устойчивость к лекарственным препаратам.

3. **Col- плазмиды** - синтез колицинов (бактериоцинов)- факторов конкуренции близкородственных бактерий (антогонизм). На этом свойстве основано колицинотипирование штаммов.

4. **Шу- плазмиды** - синтез гемолизина.

5. **Ent- плазмиды** - синтез энтеротоксинов.

6. **Tox- плазмиды** - токсинообразование.

Близкородственные плазмиды не способны стабильно сосуществовать, что позволило объединить их по степени родства в Inc- группы (*incompatibility*-несовместимость).

Биологическая роль плазмид многообразна, в том числе:

- контроль генетического обмена бактерий;
- контроль синтеза факторов патогенности;
- совершенствование защиты бактерий.

Бактерии для плазмид - среда обитания, плазмиды для них- переносимые между ними дополнительные геномы с наборами генов, благоприятствующих сохранению бактерий в природе.

**Мигрирующие генетические элементы** - отдельные участки ДНК, способные определять свой перенос между хромосомами или хромосомой и плазмидой с помощью фермента рекомбинации транспозазы. Простейшим их типом являются инсерционные последовательности (IS- элементы) или вставочные элементы, несущие только один ген транспозазы, с помощью которой IS- элементы могут встраиваться в различные участки хромосомы. Их функции - координация взаимодействия плазмид, умеренных фагов, транспозонов и генофора для обеспечения репродукции, регуляция активности генов, индукция мутаций. Величина IS- элементов не превышает 1500 пар оснований.

**Транспозоны (Tp- элементы)** включают до 25 тысяч пар нуклеотидов, содержат фрагмент ДНК, несущий специфические гены, и два Is- элемента. Каждый транспозон содержит гены, приносящие важные для бактерии характеристики, как и плазмиды (множественная устойчивость к антибиотикам, токсинообразование и т.д.). Транспозоны - самоинтегрирующиеся фрагменты ДНК, могут встраиваться и перемещаться среди хромосом, плазмид, умеренных фагов, т.е. обладают потенциальной способностью распространяться среди различных видов бактерий.

### **Понятие о генотипе и фенотипе.**

**Генотип** - вся совокупность имеющихся у организма генов.

**Фенотип** - совокупность реализованных (т.е. внешних) генетически детерминированных признаков, т.е. индивидуальное (в определенных условиях внешней среды) проявление генотипа. При изменении условий существования фенотип бактерий изменяется при сохранении генотипа.

Изменчивость у бактерий может быть ненаследуемой (модификационной) и генотипической (мутации, рекомбинации).

Временные, наследственно не закрепленные изменения, возникающие как адаптивные реакции бактерий на изменения окружающей среды, называются **модификациями** (чаще - морфологические и биохимические модификации). После устранения причины бактерии реверсируют к исходному фенотипу.

Стандартное проявление модификации - распределение однородной популяции на две или более двух типов - диссоциация. Пример - характер роста на питательных средах: S- (гладкие) колонии, R- (шероховатые) колонии, M- (мукоидные, слизистые) колонии, D- (карликовые) колонии. Диссоциация протекает обычно в направлении S-R. Диссоциация сопровождается изменениями биохимических, морфологических, антигенных и вирулентных свойств возбудителей.

**Мутации** - скачкообразные изменения наследственного признака. Могут быть спонтанные и индуцированные, генные (изменения одного гена) и хромосомные (изменения двух или более двух участков хромосомы).

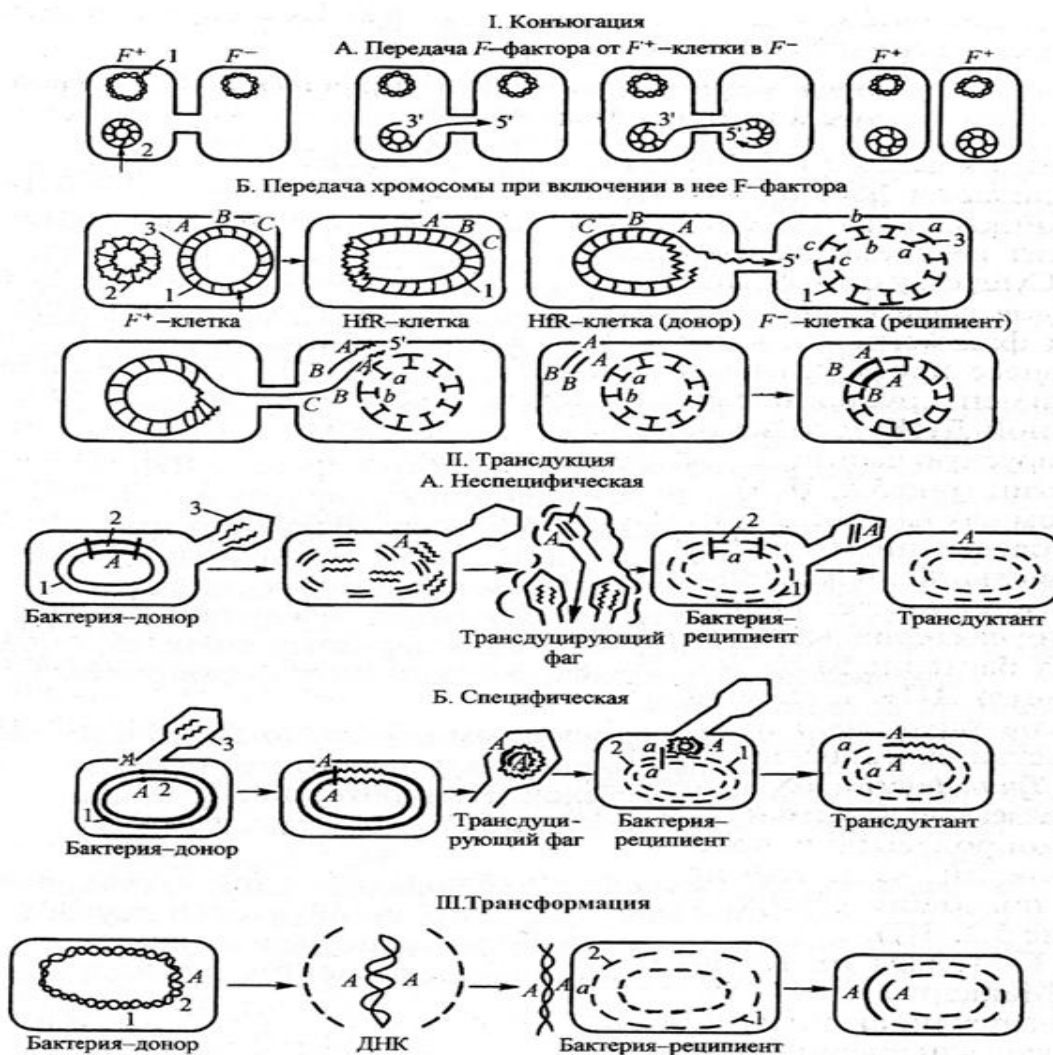
Одновременно у бактерий имеются различные механизмы репарации мутаций, в том числе с использованием ферментов - эндонуклеаз, лигаз, ДНК-полимеразы.

**Генетические рекомбинации** - изменчивость, связанная с обменом генетической информации. Генетические рекомбинации могут осуществляться путем трансформации, трансдукции, конъюгации, слияния протопластов.

1. **Конъюгация** - при непосредственном контакте клеток. Контролируется *tra* (transfer) опероном. Главную роль играют конъюгативные F- плазмиды.
2. **Трансдукция** - перенос генетического материала от клетки-донора клетке-реципиенту фагами (умеренными фагами - специфическая трансдукция).
3. **Трансформация** - захват и поглощение из внешней среды фрагментов чужой ДНК и образование на этой основе рекомбинанта.

**Схема бактериальной конъюгации**

- 1- клетка-донор образует F-пили.
- 2- F-пили прикрепляются к клетке-реципиенту.
- 3- Мобильная плазида разрывается и одна цепь ДНК перемещается в клетку-реципиент.
- 4- В обеих клетках синтезируется вторая цепь ДНК и образуются F-пили. Обе клетки могут быть донорами.



## Генетика вирусов

Геном вирусов содержит или РНК, или ДНК (РНК- и ДНК- вирусы соответственно). Выделяют **позитивную** (+) РНК, обладающую матричной активностью и соответственно- инфекционными свойствами, и **негативную** ( - ) РНК, не проявляющую инфекционные свойства, которая для воспроизводства должна транскрибироваться (превращаться) в + РНК. Механизмы репродукции различных вирусов очень сложные и существенно отличаются. Основные их схематические варианты представлены ниже:

1. вирионная (матричная) +РНК комплементарная -РНК (в рибосомах) вирионная +РНК.
2. - РНК вирусная (информационная) +РНК - РНК (формируется на геноме зараженной клетки).
3. однонитчатая ДНК: +ДНК +ДНК -ДНК +ДНК -ДНК +ДНК +ДНК.
4. ретровирусная однонитчатая РНК: РНК ДНК (провирус) РНК.
5. двунитчатая ДНК: разделение нитей ДНК и формирование на каждой комплементарной нити ДНК.

Генофонд вирусов создается и пополняется из четырех основных источников: двух внутренних (мутации, рекомбинации) и двух внешних (включение в геном генетического материала клетки хозяина, поток генов из других вирусных популяций).

**Комплементация** - функциональное взаимодействие двух дефектных вирусов, способствующее их репликации и горизонтальной передаче.

**Фенотипическое смешивание** - при заражении клетки близкородственными вирусами с образованием вирионов с гибридными капсидами, кодируемыми геномами двух вирусов.

Популяционная изменчивость вирусов связана с двумя разнонаправленными процессами - мутациями и селекцией, связанными с внешней средой как индуктором мутаций и фактором стабилизирующего отбора. Гетерогенность вирусных популяций - адаптационный генетический механизм, способствующий пластичности (устойчивости, приспособляемости) популяций, фактор эволюции и сохранения видов во внешней среде.

Генофонд вирусных популяций сохраняется за счет нескольких механизмов:

- восстановления изменчивости за счет мутаций;
- резервирующих механизмов (возможность перехода любых, даже негативных мутаций в следующую генерацию)- комплементация, рекомбинация;
- буферных механизмов (образование дефектных вирусных частиц, иммунных комплексов и др.), способствующие сохранению вируса в изменяющихся внешних условиях.

## Экология микроорганизмов.

Микроорганизмы распространены повсюду. Они заселяют почву, воду, воздух, растения, организмы животных и людей - экологические среды обитания микробов.

Выделяют свободноживущие и паразитические микроорганизмы. Всюду, где есть хоть какие - то источники энергии, углерода, азота, кислорода и водорода

(кирпичиков всего живого), обязательно встречаются микроорганизмы, различающиеся по своим физиологическим потребностям и занимающих свои экологические ниши. Микроорганизмы в экологических нишах сосуществуют в виде сложных ассоциаций - **биоценозов** с различными типами взаимоотношений. Все типы взаимоотношений микроорганизмов объединяются понятием симбиоз. Он.

#### **Экологические связи в микробиоценозах**

- **Симбиоз** – (от греч. *συμ-* — «совместно» и *βίος* — «жизнь») — это тесное и продолжительное сосуществование представителей разных биологических видов, может быть антагонистическим и синэргическим.

**Любая форма взаимодействия между организмами разных видов, в том числе:**

- **Нейтрализм (0/0)**– обитающие в одном биотопе популяции не оказывают друг на друга ни стимулирующего, ни подавляющего действия.

- **Сотрудничество (+/+)** – слабая степень взаимозависимости симбионтов.

- **Мутуализм (+/+)** – полная степень взаимозависимости симбионтов, при которой они выполняют разные, дополняющие друг друга, жизненные функции.

- **Комменсализм (нахлебничество) (+/0)** – сожительство особей разных видов, при котором выгоду из симбиоза извлекает один вид, не причиняя другому вреда, комменсалы питаются остатками пищи хозяина, которые в его рационе не имеют значения.

- **Конкуренция (антагонизм)** – подавление одной популяции другой.

- **Паразитизм (+/-)** – одна популяция (паразит), нанося вред другой популяции (хозяину), извлекает для себя пользу.

#### **Генетические методы диагностики инфекционных заболеваний**

##### **Идентификация нуклеиновых кислот**

Метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (НК) основывается на способности НК специфически соединяться (гибридизироваться) с комплементарными фрагментами гомологичных ДНК или РНК искусственно созданных нитей, меченных изотопами или ферментами (пероксидаза, щелочная фосфатаза).

##### **Полимеразная цепная реакция (ПЦР).**

В случаях, когда в исследуемом материале ДНК или РНК мало или недостаточно для того, чтобы установить её точную генетическую принадлежность, прибегают к полимеразной цепной реакции, основу которой составляет катализируемое ДНК-полимеразой многократное образование копий определённого участка ДНК. ПЦР была разработана в 1983 году американским учёным Керри Мюллисом. Принцип метода заключается в удвоении (амплификации) участка ДНК, ограниченного праймерами, при помощи фермента ДНК- полимеразы. За каждый следующий цикл амплификации происходит удвоение как исходного участка ДНК, так и вновь синтезированных фрагментов

(амплификатов). В результате этого число фрагментов растет в геометрической прогрессии (цепная реакция). После 30 - 40 циклов их число превышает несколько миллиардов, что делает возможным их обнаружение различными методами. В 1993 году К. Мюллис за свои исследования был удостоен Нобелевской премии. ДНК состоит из двух цепей, построенных из четырёх нуклеотидов: аденина, тимина, гуанина, цитозина (А, Т, Г, Ц). Последовательность нуклеотидов одной цепи комплементарна последовательности другой. У каждой цепи есть 3'- и 5'-концы. 3'-конец одной цепи связан с 5'-концом другой. ДНК-полимераза узнает азотистые основания в цепочке-матрице и наращивает вторую цепочку от 3'- к 5'-концу ДНК, делая подобие негатива. В среде, где производится синтез, должен присутствовать строительный материал – свободные нуклеотиды. ДНК-полимераза начинает работать только тогда, когда к цепи ДНК присоединяется *праймер*.

Праймер представляет собой небольшую цепочку нуклеотидов, служащую затравкой для синтеза новой цепи. С матрицей она соединяется комплементарно. В праймере должно быть не менее 20-30 нуклеотидов: чем их больше, тем точнее выбирается антипоследовательность. Многократно повторяя эту операцию, полимераза способна удлинять 3'-конец праймера до тех пор, пока не достигнет 5'-конца матрицы. Однако если добавить в среду дидезоксинуклеотидтрифосфат (ddNTP), например, дидезоксиаденин (ddA), дальнейший рост цепи невозможен, поскольку к 3'-концу нуклеотиды присоединяться уже не могут. Зная последовательность оснований, на его границе синтезируют праймер-антипоследовательность из 20-30 нуклеотидов. Их добавляют к препарату расплетённой ДНК, они связываются с родственным участком. С этого места начинает работать фермент-копирующий ДНК-полимераза. Чтобы ограничить нужный участок с другой стороны, с 3'-конца, нужны ddNTP четырёх типов. Копия антипараллельна, и по ней ДНК-полимераза движется в обратную сторону. Работу она начинает с праймера ко второму граничному участку (он должен быть антипоследовательностью, то есть таким же, как в матрице). Дойдя до конца, который был началом в предыдущем проходе, фермент уже во втором цикле выдаёт точную копию избранного участка. Полимераза копирует её в следующем цикле, потом обе копии, потом – 4 и т.д. Заставив полимераза работать дальше побочных продуктов реакции - копий с длинными хвостами с обеих сторон, будет всё меньше. После 20 проходов будет около 1 миллиона копий нужного участка, а других фрагментов – лишь несколько десятков.

### **Техника ПЦР**

Исследуемым материалом для ПЦР может быть культура бактерий, нуклеиновые кислоты, выделенные из клеток, биологические жидкости (кровь, моча), материал из внешней среды – вода, почва, пищевые продукты и т.д., содержащие ДНК или РНК.

На I этапе (**денатурация**) молекула ДНК разделяется нагреванием до 95<sup>0</sup>С на 2 комплементарные нити.

На II этапе (**отжиг**) в реакционную смесь добавляют искусственно синтезированные ДНК-олигонуклеотидные праймеры двух типов. Одни из них комплементарны началу одной цепи ДНК, другие – концу второй. Одновременно вводится смесь 4 типов ddNTP. Праймеры соединяются с цепями ДНК.

На III этапе смесь нагревают до 70°C и добавляют фермент ДНК-полимеразу (термостабильную), выделенную в 1980 году Калединым из бактерий *Thermus aquaticus*, живущих в горячих источниках. Этот фермент достраивает вслед за каждым праймером вторую цепь. Процесс удвоения повторяется 20-30 раз до получения миллиона копий исходной молекулы ДНК. Для проведения ПЦР применяются специальные термостаты – термальные циклеры, позволяющие многократно и быстро проводить нагревание и охлаждение исследуемых проб.

На IV этапе проводится оценка результатов ПЦР с помощью электрофореза в 1% геле с окраской фракций ДНК бромидом этидия, ярко светящимся в ультрафиолетовых лучах. Полученные электрофореграммы затем анализируются. ПЦР наиболее эффективна для обнаружения микроорганизмов, трудно культивируемых в лабораторных условиях. Как правило, эти возбудители – внутриклеточные паразиты, длительно персистирующие в организме хозяина.

### **Некоторые разновидности ПЦР**

1. «Вложенная» ПЦР (Nested PCR) - есть вторая пара праймеров, которая амплифицирует кусочек полученного кусочка.

2. «Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR) - перед проведением ПЦР с помощью серии ферментативных реакций как бы приклеивают известные фрагменты на концы неизвестного, чтобы можно было его амплифицировать.

3. ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) - берется РНК (молекула, которая является промежуточным этапом между ДНК и белками в живой клетке), а из нее с помощью фермента обратной транскриптазы получают ДНК, с которой уже проводят ПЦР. Это удобно, например, для того, чтобы выявить, какие именно гены в данной клетке экспрессируются.

4. Ассиметричная ПЦР (Assymetric PCR) - если нужны продукты амплификации преимущественно одной из двух цепей ДНК. Добавляют неравное количество праймеров.

5. Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR) - используются флуоресцентно меченые реагенты, и специальный прибор рассматривает пробирку, в которой идет реакция, и сообщает: "готово столько-то продукта! а теперь уже вдвое больше!" Принцип метода ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR) основан на детекции продуктов амплификации уже в процессе реакции и проведении мониторинга кинетики накопления ампликонов. Это означает, что учет результата ПЦР (числа ампликонов) происходит после каждого цикла амплификации, а не в конце, как при обычной ПЦР. Чем больше в исходной пробе было специфической ДНК, тем раньше и больше увеличится число специфических фрагментов. "ПЦР в реальном времени" (Real-Time PCR) позволяет осуществлять количественную оценку содержания ДНК в исследуемом материале.

6. ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR) - чтобы амплифицировать длинный (больше 10 тысяч пар оснований) фрагмент, используют ПЦР с двумя полимеразы: одна из них, Таq-полимераза, может синтезировать длинную цепь, а вторая, ДНК-полимераза с 3'5'-экзонуклеазной активностью, может исправить ошибки, допущенные первой.



7. Multiplex PCR - добавляют несколько пар праймеров и одновременно амплифицируют несколько фрагментов.

### **Контрольные вопросы**

Дайте определение понятий «наследственность» и «изменчивость». Основные этапы развития учения о наследственности и изменчивости у микроорганизмов. Что такое генотип, фенотип? Особенности структуры генома прокариотов. Структурная модель ДНК по Уотсону и Крику. Что такое генетический код? Какими символами обозначается генотип и фенотип бактерий? Перечислите внехромосомные факторы наследственности. Перечислите бактериальные плазмиды; какие свойства они кодируют? Что такое трансмиссивные, нетрансмиссивные плазмиды? Что такое транспозоны, Is-последовательности? Формы изменчивости микроорганизмов: генотипическая и фенотипическая. Механизмы наследственной изменчивости бактерий: мутации и рекомбинации, виды рекомбинаций. Укажите фамилию учёного, опыты которого с пневмококками наметили пути для поиска материальной основы наследственности. Опишите механизм трансформации, трансдукции, конъюгации. Применение генетических методов в диагностике инфекционных заболеваний.

**Задача.** У больного К. с диагнозом бактериальная дизентерия в первый день заболевания выделен возбудитель дизентерии с типичными для этого вида биохимическими и другими свойствами (не ферментировал лактозу). Через два дня у этого же больного был выделен микроб, у которого все свойства были типичными для возбудителя дизентерии: у него появилась способность ферментировать лактозу. Какой генетический механизм возникновения у возбудителя дизентерии нового свойства можно предположить? Как доказать наличие предполагаемого вами механизма изменчивости? Дайте определение понятий: молекулярная биология, биотехнология, генетическая инженерия. Опишите последовательность этапов генной инженерии. Укажите способы получения чистых генов для генетической инженерии; векторы (проводники) с помощью которых рекомбинантную ДНК можно ввести в клетку. Ферменты, с помощью которых можно расщеплять молекулу ДНК на отдельные фрагменты, «сшивать» отдельные фрагменты ДНК. Достижения генетической инженерии и биотехнологии: перечислите основные продукты, применяемые в медицине. Геномная инженерия: методы, достижения. Значение изменчивости микроорганизмов для практической медицины. Задания для выполнения в процессе самоподготовки

### **Составьте схему: «Формы изменчивости бактерий».**

Самостоятельная работа студента на практическом занятии 1. Учёт посевов предыдущего занятия. 2. Опыт по выявлению спонтанных мутаций у бактерий. Цель опыта: определить, имеются ли мутанты, устойчивые к стрептомицину, в культуре бактерий, которая не соприкасалась со стрептомицином. Методика: на чашке с МПА производится рассев культуры бактерий с целью получения изолированных колоний. После суточного инкубирования в термостате выросшие колонии с помощью игольчатого штампа-репликатора переносятся на чашку с

МПА, содержащим стрептомицин, и контрольную чашку. После суточного инкубирования в термостате учитывают результат.

Результат: зарисовать чашки с колониями.

Вывод: сформулировать.

3. Опыт конъюгации бактерий. Цель опыта: определить, возможна ли конъюгация между данными штаммами.

**Задача:** получить прототрофный рекомбинант путём конъюгации двух ауксотрофных культур. Материал: донор, ауксотроф по лейцину, реципиент - ауксотроф по треонину. Методика: суточные бульонные культуры этих штаммов смешивают во флаконе и оставляют в термостате на 30-60 минут. В результате конъюгации от клеток донора к реципиенту передаются гены, кодирующие способность синтезировать треонин, и образуются прототрофные клетки. Для выявления этих клеток смесь бактерий высевает на среду, в которой отсутствуют лейцин и треонин (так называемая минимальная среда). Если конъюгация произошла, то на минимальной среде вырастут колонии прототрофных рекомбинантов. Донор и реципиент не вырастают.

Результат: нарисовать чашку с готовым результатом опыта. Вывод: сформулировать. 4. Нарисовать в тетради схемы опытов трансформации и трансдукции. 5. Опыт бактериоциногении. Цель: определить, какие из испытуемых культур кишечной палочки способны продуцировать колицины. Методика: испытуемые культуры засеяны бляшками на чашке с МПА. После двухсуточной инкубации в термостате выросшие культуры убиты парами хлороформа. На поверхность посева наливается растопленный МПА, содержащий колицинчувствительную культуру. После инкубации в термостате учитывается результат по зонам отсутствия роста вокруг колоний колициногенных культур. Результат: зарисовать. Вывод: сформулировать (указать колициногенные культуры). 6. Диссоциация бактерий. Посмотреть с помощью бинокулярной лупы колонии эпидермального стафилококка: гладкие (S) и шероховатые (R).

## **Практическое занятие №6**

### **Тема: "Химиотерапевтические препараты. Антибиотики"**

#### **Актуальность темы.**

**Химиотерапия** - одно из важнейших средств в борьбе с инфекционными заболеваниями и злокачественными опухолями. Применение антибиотиков и противомикробных препаратов сделало возможным эффективное лечение многих смертельных болезней, увеличило продолжительность жизни человека и улучшило ее качество.

В то же время бесконтрольное применение антибиотиков и противомикробных препаратов может привести к развитию многочисленных осложнений.

Следовательно, врач, который применяет химиотерапию, должен четко представлять себе механизмы действия антибиотиков и противомикробных препаратов, возможную пользу и вред и назначать препараты исходя из баланса первого и второго.

Для этого он должен владеть основными методиками определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Все это обуславливает актуальность темы занятия и формирует позитивную мотивацию ее изучения.

**Цель самоподготовки:**

- Проанализировать явление микробного антагонизма.
- Объяснить механизм действия антибиотиков на микробную клетку.
- Оценить методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
- Сделать вывод о чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
- Трактовать механизмы стойкости микроорганизмов к антибиотикам.
- Объяснить механизмы осложнений антибиотикотерапии.

**Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию.**

Термин	Определение
Химиотерапевтический препарат	Химическое вещество, способное избирательно подавлять рост и размножение микроорганизмов в живом организме.
Химиотерапия	Использование противомикробных препаратов для лечения инфекционных заболеваний и химиопрепаратов - для лечения злокачественных опухолей.
Химиотерапевтический индекс	Отношение максимальной переносимой дозы к минимальной терапевтической.
Максимальная переносимая доза	Максимальная доза противомикробного препарата, которая не вызывает у пациента побочных действий.
Минимальная терапевтическая доза	Минимальная доза противомикробного препарата, способная подавлять рост и размножение микроорганизмов.
Антиметаболит	Противомикробный препарат, который по химической структуре подобен полезным для бактерии веществам, но блокирует процессы их обмена.
Антагонизм	Тип взаимоотношений между организмами, при котором один вид подавляет развитие другого
Антибиотики	Химиотерапевтические препараты биологического происхождения или их полусинтетические производные и синтетические аналоги, которые способны в низких концентрациях избирательно повреждать или убивать микробов или клетки злокачественных опухолей, подавлять в организме больного возбудителей заболеваний или задерживать рост злокачественных новообразований.
Антибиотик узкого спектра	Способен влиять на отдельные группы микроорганизмов (например, только на грамположительных или только на

действия	грамотрицательных)
Антибиотик широкого спектра действия	Способен влиять на разные группы микроорганизмов (и на грамположительных, и на грамотрицательных)
Бактерицидный антибиотик	Уничтожает микроорганизмы.
Бактериостатический антибиотик	Прекращает рост микроорганизмов.
Оксфордская единица	Минимальное количество пенициллина, которое прекращает рост золотистого стафилококка в 50 мл МПБ.
Единица действия	Минимальная концентрация антибиотика, которая прекращает рост чувствительного микроорганизма в определенном объеме питательной среды.
Международная единица	Как правило, 1 микрограмм антибиотика
Минимальная подавляющая концентрация	Минимальное количество антибиотика, которое прекращает рост микроорганизмов.
Лекарственная устойчивость	Способность микроорганизма расти в присутствии минимальной подавляющей концентрации антибиотика.

### **Теоретические вопросы к занятию:**

История развития антимикробной терапии. Периоды развития химиотерапии.

Труды Д. Л. Романовского, П. Эрлиха, Г. Домагга. Открытие сульфаниламидов.

Основные принципы рациональной химиотерапии.

Понятие о противомикробном препарате, химиотерапевтическом индексе.

Микробный антагонизм, его механизмы. Микробы-антагонисты - продуценты антибиотиков. Учение И. И. Мечникова о физиологической роли молочнокислых бактерий в кишечнике.

История открытия первых антибиотиков: А. Флеминг, З. Ваксман. Антибиотики, определение, биологическая роль в природе. Принципы получения антибиотиков.

Классификация антибиотиков по происхождению, химическому составу, по механизму и спектру антимикробного действия. Естественные, полусинтетические и синтетические антибиотики.

Механизм действия антибиотиков на микробную клетку. Антибиотики - ингибиторы синтеза пептидогликана клеточной стенки, синтеза белка, нуклеиновых кислот, а также нарушающие функцию цитоплазматической мембраны.

Бактерицидное и бактериостатическое действие антибиотиков.

Единицы измерения антимикробной активности антибиотиков. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Понятие о минимальной

угнетающей концентрации. Антибиотикограмма.

Осложнения антибиотикотерапии. Дисбактериоз. Антибиотикорезистентные, антибиотикозависимые и толерантные к антибиотикам штаммы бактерий.

Естественная и приобретенная устойчивость к антибиотикам. Генетические и биохимические механизмы антибиотикорезистентности. Роль плазмид и транспозонов в формировании лекарственной устойчивости бактерий. Пути предотвращения формирования резистентности бактерий к антибиотикам. Принципы рациональной антибиотикотерапии.

Межклеточная коммуникация у бактерий ("чувство кворума") и перспективы создания на ее основе антимикробных препаратов нового поколения.

### **Практические задания, которые выполняются на занятии:**

- Ознакомиться с методами определения микробного антагонизма.
- Изучить демонстрацию определения минимальной подавляющей концентрации антибиотиков, методом серийных разведений.
- Овладеть методикой определения чувствительности микроорганизма к антибиотикам методом дисков.

### **Содержание темы.**

На практическом занятии студенты изучают явление антагонизма в бактерий, методы определения антагонизма и способы его практического использования, основные классификации антибиотиков и примеры препаратов, которые иллюстрируют эти классификации, знакомятся с методикой определения минимальной подавляющей концентрации антибиотиков методом серийных разведений и проводят определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом дисков. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

## **Рекомендации по оформлению протокола**

### **Химиотерапевтический индекс**

Это отношение максимальной переносимой дозы к минимальной терапевтической.

**Максимальная переносимая доза** - наибольшее количество препарата, которое не вызывает побочных эффектов у больного.

**Минимальная терапевтическая доза** - наименьшая доза, которая способна подавлять рост и размножение микробов в организме.

Максимальная переносимая доза должна втрое или больше превышать минимальную терапевтическую.

### **Антагонизм у бактерий.**

Форма взаимоотношений, когда один микроорганизм подавляет развитие других

Механизмы антагонизма :

Конкуренция за питательный субстрат (разная скорость роста)

Выделение микробами-антагонистами кислот, спиртов и щелочей

Выделение микробами-антагонистами антибиотиков и бактериоцинов

Хищничество

## **Требования к антибиотикам**

Высокая активность против микробов

Минимальная токсичность

Сохранение активности в жидкостях организма

Растворимость, хорошее распределение в организме, легкое выведение

Отсутствие аллергенности

Как можно более медленное развитие лекарственной устойчивости у микробов

### **Измерение активности антибиотиков**

ЕД - единица действия - минимальное количество антибиотика, способное подавлять рост чувствительного микроорганизма в определенном объеме питательной среды.

В настоящее время активность большинства антибиотиков измеряется в микрограммах. Обычно 1 мкг химически чистого антибиотика соответствует 1 ЕД

### **Осложнения при антибиотикотерапии**

Токсичность

Дисбактериоз

Аллергические реакции

Эндотоксический шок

Косвенное действие на микроорганизмы (развитие лекарственной устойчивости)

### **Химиотерапия и химиотерапевтические препараты. Антибиотики.**

Честь разработки адекватных подходов к лечению инфекционных болезней принадлежит русскому ученому Дмитрию Леонидовичу Романовскому, который в 1890 году указал что «истинная специфичность действия на самую сущность болезни, на производящего ее паразита» заключается «в разрушительном действии на паразита» и для каждой инфекции должно быть найдено «вещество, которое при введении в заболевший организм окажет наименьший вред последнему и вызовет наибольшее деструктивное действие в патогенном агенте».

История современных антимикробных средств началась с открытия Паулем Эрлихом способности анилиновых красителей убивать трипаносомы. Основываясь на собственных результатах изучения химиотерапевтических препаратов, «повреждающих» микробы и их токсины, но не собственные клетки организма, Эрлих разработал постулат о «волшебной пуле» - веществе с минимальной органотропностью и максимальной паразитотропностью.

В 1908г. Австрийский химик П. Гельмо получил р-аминобензолсульфамид (сульфаниламид) из каменноугольной смолы. В 1932г. бактериолог Г. Домагк детально изучил действие стрептозона (красный стрептоцид).

В 1928г. А. Флеминг открыл пенициллин. Следствием этой знаменитой «случайности» (в открытую чашку Петри со стафилококками нечаянно попала плесень *P. notatum*, образовавшая зону задержки роста) явилось начало новой эры в химиотерапии. Первый отечественный пенициллин (крустозин) был получен З.В. Ермольевой из *P. crustosum* в 1942г.

При оценке эффективности антимикробных препаратов к основным критериям относят химиотерапевтический индекс, достижимую концентрацию в сыворотке крови, спектр активности.

**Химиотерапевтический индекс** – отношение минимальной терапевтической дозы к максимально переносимой. При индексе меньше единицы – препарат можно использовать для лечения инфекций, т.к. его терапевтическая доза будет меньше переносимой.

Антимикробные агенты действуют только на вегетирующие клетки, но не на споры или цисты. Выбор препарата для химиотерапии определяет спектр его активности (препараты широкого спектра действия и препараты узкого спектра действия) и чувствительность к нему микроорганизмов. Препараты со специфической активностью включают антибактериальные, противогрибковые, антипротозойные и противовирусные.

**Антибиотики** – химиотерапевтические препараты биологического происхождения, или их полусинтетические производные и синтетические аналоги, которые способны в низких концентрациях избирательно тормозить рост и размножение или убивать микроорганизмы.

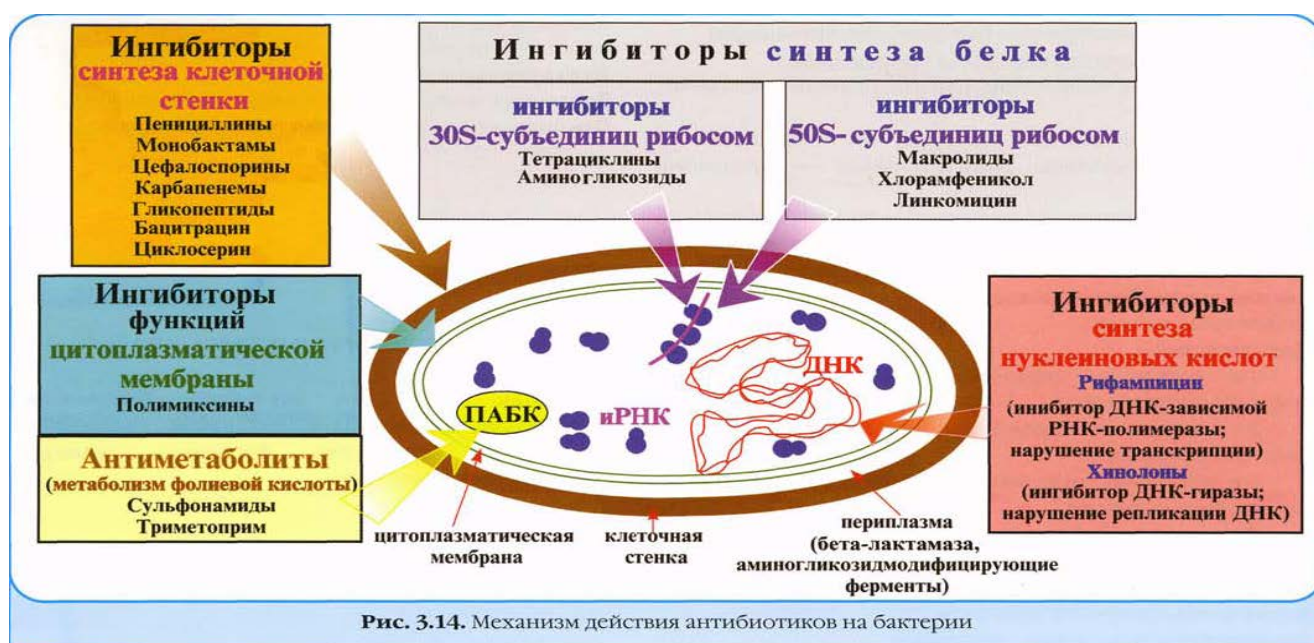


Рис. 3.14. Механизм действия антибиотиков на бактерии

### Классификация антибиотиков.

#### 1. По типу продуцента:

а) антибиотики, синтезируемые грибами (бензилпенициллин, гризеофульвин, цефалоспорины)

б) антибиотики, синтезируемые актиномицетами (стрептомицин, эритромицин)

в) антибиотики, синтезируемые бактериями (полимиксины)

#### 2. По способу получения:

а) биосинтетические (природные)

б) полусинтетические (химическое соединение ядра природного антибиотика с различными химическими радикалами)

в) синтетические

#### 3. По механизму действия:

а) влияние на синтез компонентов клеточной стенки (ингибирование синтеза пептидогликана) –  $\beta$ -лактамы антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы), бацитрацины, ванкомицин и циклосерин;

б) влияние на функции ЦПМ, что приводит к выходу из клетки белков, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, ионов с последующей гибелью клетки – полимиксины, полиеновые антибиотики, грамицидины;

в) влияние на синтез белка (путем нарушения функциональных свойств рибосом) – аминогликозиды (стрептомицин, гентамицин, тобрамицин, амикацин), тетрациклины, хлорамфеникол, макролиды, азалиды, линкозамиды;

г) влияние на транскрипцию и синтез нуклеиновых кислот – на практике применяют анзамидины (рифамицины) – наиболее известен рифампицин, который ингибирует ДНК-зависимую РНК-полимеразу, что приводит к торможению синтеза бактериальной РНК, а также поздних стадий самосборки поксвирусов.

#### 4. По эффекту, оказываемому на бактерии (грибы):

а) бактериостатические (фунгиостатические)

б) бактерицидные (фунгицидные).

#### 5. по происхождению:

Продуценты	Примеры антибиотиков
Бактерии	Полимиксин, грамицидин
Грибы	Пенициллины, цефалоспорины
Актиномицеты	Стрептомицин, тетрациклин
Высшие растения	Иманин, сальвин, хлорофиллипт
Животные	Лизоцим
Мхи и лишайники	Уснинова кислота

### **Побочные эффекты антибиотикотерапии.**

Эффективность применения антимикробных препаратов различных классов ограничивают их многочисленные побочные эффекты (токсические и аллергические реакции, дисбактериозы и т.д.).

1. Дисбактериозы (дисбиозы) обычно развиваются после применения антибиотиков широкого спектра, подавляющих жизнь многих бактерий, в том числе и непатогенных. В результате конкурентный баланс в микробных ценозах резко нарушается, что дает устойчивым видам возможность колонизировать свободные участки. Этими химиорезистентными бактериями обычно являются условно-патогенные виды. Их чрезмерное размножение может приводить к развитию вторичных эндогенных инфекций. Наиболее часто наблюдают дисбактериозы кишечника, вызванные приемом тетрациклинов внутрь. Для профилактики этого осложнения следует назначать препараты узкого спектра, контролировать вероятность избыточного роста грибов и широко использовать эубиотики.

Было замечено, что нормальная микрофлора кишечника, кожи и т.д. нередко подавляет активность патогенных бактерий, особенно если они подавляют собой новую для организма микрофлору. Это действие развивается в результате секреции нормальной микрофлорой различных бактерицидных субстанций (например,



колицинов). Другой механизм – конкуренция за рецепторы на поверхности клеток хозяина, а также создание низкого рН (молочнокислые бактерии). В качестве пробиотиков, т.е. продуктов, содержащих живые культуры микроорганизмов, которые заселяют естественные ниши микроорганизма используют: бифидумбактерии и молочнокислые бактерии; молочнокислые стрептококки, ацидофильную палочку, *V. subtilis*; *E. coli* и другие микроорганизмы.

К эубиотикам (пробиотикам) относятся монокомпонентные препараты типа бифидумбактерина, лактобактерина, колибактерина, энтерола и др., а также поликомпонентные препараты, содержащие 2 и более видов микроорганизмов – бификол, бифилакт, линекс, биоспорин.

2. Токсические реакции зависят от свойств самого препарата, его дозы, способа введения, состояния больного. Среди осложнений данной группы на первом месте находится поражение печени (тетрациклины, эритромицин). Второе место занимают антибиотики с нефротоксическим действием (аминогликозиды).

3. Аллергизирующее действие – наиболее этим действием обладают природные антибиотики, особенно пенициллины. Спектр аллергических реакций варьирует от кожных высыпаний до анафилактического шока.

4. Иммунодепрессивные эффекты во многом обусловлены цитостатическим эффектом препаратов на иммунокомпетентные клетки. Поскольку эукариотические клетки практически лишены специфических мишеней для лекарственных средств, это действие носит неспецифический характер и направлено на самые различные клеточные популяции. Среди применяемых антибиотиков наиболее выраженным иммунодепрессивным эффектом обладают препараты, способные подавлять функции органов кроветворения (левомецетин). Антибиотик циклоспорин, первоначально разработанный как противогрибковое средство, но проявивший выраженное ингибирующее действие на развитие клеточных цитотоксических реакций. Это свойство побудило использовать его при пересадках органов в качестве препарата, подавляющего отторжение трансплантата.

5. Тератогенное действие. Не менее 5% всех врожденных аномалий связано с приемом лекарственных средств. Антибиотики могут оказывать на плод: 1) эмбриотоксическое действие, возникающее в первые 3 недели после оплодотворения и заключается в влиянии на зиготу и бластоцист, находящиеся в просвете фаллопиевых труб или в полости матки (до имплантации); 2) тератогенное действие, возникающее с начала 4-й и до конца 8-й недели беременности и приводящее к различным нарушениям развития плода; 3) фетотоксическое действие, возникающее в последние недели беременности, проявляется чрезмерно выраженным характерным для данного лекарственного средства действием

Антагонистические отношения проявляются в невозможности совместного существования некоторых видов микроорганизмов вследствие того, что одни из них препятствуют размножению других, задерживая их рост или вызывая их гибель.

Изучение явлений антагонизма привело к открытию специфических антибактериальных веществ, продуцируемых бактериями и грибами в окружающую среду – антибиотиков.

В клинической практике чувствительными к антибиотикам считаются те микроорганизмы, на которые испытуемый антибиотик в концентрации, достигаемой в очаге инфекции, оказывает бактериостатическое или бактерицидное действие. При лабораторном исследовании мерой чувствительности является минимальная концентрация препарата, подавляющая рост возбудителя заболевания при стандартных условиях постановки опыта.

**По степени чувствительности к антибиотикам** патогенные микроорганизмы подразделяются на 4 группы:

1. **чувствительные** – терапевтические дозы антибиотиков достаточны для достижения лечебного эффекта при общих заболеваниях;
2. **среднечувствительные** – лечебный эффект при общих заболеваниях достигается только при назначении повышенных доз антибиотиков;
3. **умеренно устойчивые** – лечебный эффект только при локализации очага в месте, где происходит концентрация антибиотика, или если антибиотик вводят непосредственно в очаг инфекции;
4. **устойчивые** – лечебный эффект отсутствует.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяется методом диффузии в агар с применением бумажных дисков или методом разведения в жидких и плотных питательных средах.

#### **Определение чувствительности микробов к антибиотикам методом диффузии в агар с применением дисков.**

Применяемые среды: МПА, кровяной или сывороточный агар (стрептококки, пневмококки и др.)

Материал для посева: 18-20 часовые (при интенсивном росте 4-5 часовые, при замедленном – 2-3 суточные) бульонные или агаровые культуры.

На поверхность среды наносят 1 мл исследуемой культуры, покачивают пробирку для распределения культуры по поверхности, а излишки жидкости отсасывают пипеткой. Засеянные чашки подсушивают при комнатной температуре, затем стерильным пинцетом на поверхность среды кладут диски, пропитанные различными антибиотиками. Диски должны находиться на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 2-2,5 см от края чашки. Каждая чашка может служить для одновременного испытания штамма к действию 5-8 антибиотиков. Засеянные чашки на 18 часов помещают в термостат при 37°C.

Антибиотик диффундирует в агар, формируя вокруг диска **зону задержки роста** чувствительных к нему бактерий. Наибольшая концентрация антибиотика отмечается в месте расположения диска; по направлению к периферии содержание его снижается.

Измерение зоны задержки роста производят с помощью циркуля или миллиметровой линейки. Измеряемый диаметр зоны должен проходить через центр диска.

При зоне задержки роста диаметром до 10 мм штамм расценивается как малочувствительный, зона задержки роста более 10 мм свидетельствует о чувствительности штамма к исследуемому материалу.

### **Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом серийных разведений.**

Сущность данного метода - выявление роста исследуемой микробной культуры в ряду пробирок с питательной средой, содержащей разные концентрации антибиотиков. Метод серийных разведений позволяет определить минимальную концентрацию антибиотика, ингибирующую рост, изучаемого микроорганизма.

Из порошка антибиотика (желательно стандарта) делают навеску и растворяют стерильной дистиллированной водой из такого расчета, чтобы в 1 мл раствора содержалось 2000 мкг/Ед. Из полученного основного раствора готовят все последующие разведения антибиотиков, диапазон серии разведений определяется установленными критериями чувствительности микроба.

Для разделения антибиотиков служат стандартные питательные среды (мясопептонный бульон, бульон на переваре Хоттингера, рН 7,2—7,4), обеспечивающие оптимальные условия роста исследуемого вида и не содержащие веществ, подавляющих действие антибиотиков.

В приготовленные разведения антибиотика вносят бульонные культуры микроорганизмов в логарифмической или ранней стационарной фазе роста. Для большинства патогенных микроорганизмов этот период соответствует 16—18 ч; для некоторых видов, рост которых замедлен,—48 ч. Вместо бульонных культур допускается использование агаровых культур, которые разводят бульоном и стандартизируют. Бульонную культуру или взвесь агаровой культуры исследуемых бактерий в бульоне добавляют в объеме 1 мл к каждому разведению антибиотика. При этом концентрация антибиотика в пробирке становится в 2 раза ниже. Все ряды пробирок включают по одной контрольной пробирке, содержащей 1 мл бульона без антибиотика и 1 мл культуры каждого испытываемого штамма.

Штатив с пробирками помещают в термостат при 37°C на 16—20 ч. Учитывают полученные результаты, отмечая последнюю пробирку с отчетливо видимой задержкой микробного роста. Количество антибиотика в этой пробирке представляет собой минимальную ингибирующую концентрацию для испытываемого штамма, определяющую степень чувствительности его к данному антибиотику.

### **Бактериофаг.**

В 1917 г. французский ученый д'Эрель отметил, что фильтрат испражнений человека, выздоравливающего после дизентерии, обладает способностью вызывать просветление бульонной культуры одноименных бактерий. Просветление микробной взвеси было обусловлено лизисом, т. е. растворением находящихся в ней микробных клеток.

Агент, вызывающий растворение микробных клеток, д'Эрель назвал бактериофагом, а явление в

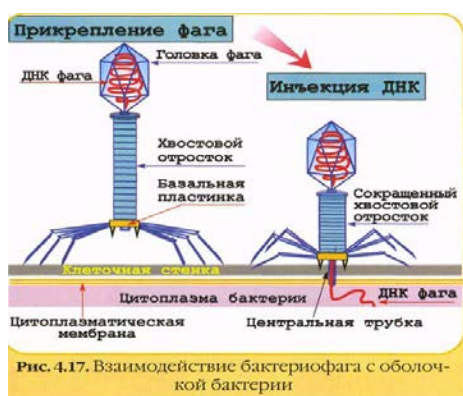


Рис. 4.17. Взаимодействие бактериофага с оболочкой бактерии

целом — феноменом бактериофагии, что в дословном переводе означает «пожирание бактерий».

При дальнейшем изучении оказалось, что бактериофаг представляет собой разновидность вирусов, вызывающих поражение и гибель бактерий. Как и все вирусы, бактериофаги ведут паразитический образ жизни, хозяевами их являются бактерии. Размножение бактериофага возможно только в живых клетках, находящихся в стадии деления. В процессе размножения фагов были выявлены последовательные **этапы**:

- 1) адсорбция частиц фага на поверхности микробной клетки;
- 2) проникновение фага в микробную клетку;
- 3) образование внутри бактериальной клетки фаговых частиц; 4) лизис клетки и освобождение активных частиц фага.

Период от момента инфицирования клетки бактериофагом и началом ее лизиса называется латентным. Продолжительность его у одних фагов исчисляется минутами, у других - часами.

При некоторых условиях бактериофаг, проникая в микробную клетку, включается в геном клетки и существует ней, не вызывая лизиса – лизогения - симбиоз микробной клетки с фагом, культуры, которые содержат фаг, не лизируясь - лизогенные. Лизогенные культуры устойчивы к фагу, который они несут. А фаги, находящиеся в лизогенных бактериях, получили название умеренных. Вирулентные фаги вызывают лизис культуры микробных клеток и освобождение размножившегося фага. Связь, имеющаяся между фагом и лизогенной культурой, стойко передается по наследству.

Специфичность различных фагов выражена неодинаково: одни из них лизируют культуры микробов определенного вида (моновалентные фаги), другие — только отдельные штаммы или варианты внутри одного и того же микроба (типовые фаги), третьи, так называемые поливалентные фаги, вызывают лизис клеток различных родственных видов микробов. В практике микробиологии специфичность моновалентных фагов используют для определения видов микробов. Резко выраженные избирательные свойства типовых фагов позволяют разделить микробов одного и того же вид на различные фаготипы. В естественных условиях фаготип бактерий характеризуется большой стабильностью.

### ***Титрование бактериофага.***

После выявления бактериофага в исследуемом материале необходимо определить его количественное содержание или, как принято говорить, найти титр фага.

Для выражения титра бактериофага можно пользоваться двумя показателями: количеством активных корпускул бактериофага, содержащихся в 1 мл исследуемой жидкости бактериофага, или величиной наибольшего разведения исследуемой жидкости, при котором бактериофаг проявляет свое литическое действие. Полученную при этом величину выражают отрицательным логарифмом 10, где степень указывает разведение фага. Средний титр бактериофага составляет 10.

Для титрования бактериофага предложены различные методы, однако наибольшее распространение получили способ титрования фага в жидкой питательной среде, предложенный Аппельманом, и метод агаровых слоев Грациа.

#### Титрование бактериофага в жидкой питательной среде по методу Аппельмана.

Метод Аппельмана основан на внесении различных количеств титруемого бактериофага в бульон, засеянный одной и той же дозой культуры гомологичных микробов, с целью получения феномена бактериофагии.

Двенадцать пробирок, содержащих по 4,5 мл мясопептонного бульона, ставят в штатив в один ряд. В 1-ю пробирку стерильной пипеткой вносят 0,5 мл исследуемого фага. Содержимое пробирки перемешивают и 0,5 мл жидкости из 1-й пробирки переносят во 2-ю, из 2-й - в 3-ю и т. д. до 10-й включительно. Из 10-й пробирки лишние 0,5 мл выливают, 11-я и 12-я пробирки контрольные. Переносят жидкость из одной пробирки в другую каждый раз отдельной стерильной пипеткой емкостью 1 мл. Таким образом, в 10 пробирках получают разведения бактериофага от 1:10 до 1: 10<sup>-10</sup>.

Во все 10 пробирок приготовленного ряда разведений вносят по 0,2 мл 18—24-часовой бульонной культуры бактерий, одноименных титруемому фагу. Прибавляемая культура не должна содержать устойчивых к фагу клеток.

Густота микробной взвеси, прибавляемой в пробирки с титруемым бактериофагом, существенного значения не имеет, так как опытным путем было установлено, что изменение микробной концентрации в пределах 100 000—4 500 000 в 1 мл не оказывает заметного влияния на исход титрования бактериофага. Пробирка 11-я — контроль культуры, содержит 5 мл бульона и 0,2 мл бульонной культуры микробов. Пробирка 12-я - контроль на стерильность, содержит 5 мл бульона без добавления культуры и фага. Штатив с пробирками помещают в термостат при 37°C на 18—20 ч.

Учет результатов производят через 18—20 ч после инкубации в термостате при 37°C. Титром считают то максимальное разведение бактериофага, при котором наблюдается полный лизис чувствительной к нему культуры. Практически это соответствует той последней пробирке в ряду, в которой бульон еще остается совершенно прозрачным.

#### ***Фаготипаж бактерий и методы фаготипирования.***

Специфические бактериофаги являются очень точными индикаторами, определяющими видовую и типовую принадлежность бактерий. Поэтому они нашли широкое применение для идентификации бактерий.

В настоящее время наиболее полно и тщательно разработаны методы фагодиагностики стафилококков и бактерий брюшного тифа и паратифов. По отношению к микробам тифо-паратифозной группы найдены фаги, с помощью которых можно с большой точностью определять виды бактерий и четко разграничивать определенное количество типов в пределах этих видов.

#### Техника фаготипирования микробов по модифицированному методу Креджи и Иенсена.

В основу фаготипирования положен принцип совместного выращивания типизируемой культуры с типовым бактериофагом. Наступление лизиса является индикаторным признаком, определяющим типовую принадлежность бактерий.

Для фаготипирования бактерий рекомендуется применять 1,5% мясо-пептонный агар с 5% глицерина.

Суточную агаровую культуру исследуемого штамма отсевают на бульон и помещают в термостат при 37 °С. С появлением заметного роста культуру набирают в пастеровскую пипетку с тонко оттянутым капилляром и наносят небольшими каплями на поверхность хорошо подсушенной питательной среды. Расположение капель на поверхности агара можно наметить заранее. Количество капель должно соответствовать числу типовых фагов плюс 1 капля для контроля роста культуры. Каплям культуры дают возможность впитаться, для чего требуется 3-10 мин. Затем на поверхность каждой капли наносят эксцентрично по 1 капле типового фага с таким расчетом, чтобы часть культуры оставалась свободной от воздействия бактериофага. Сектор, оставшийся свободным от воздействия бактериофага, является контролем роста культуры. При постановке опыта для каждого типа бактериофага берут отдельную пипетку. Типовой бактериофаг применяют в критическом тест - разведении, т. е. в наибольшем разведении, при котором исследуемый бактериофаг вызывает на плотной питательной среде явный лизис культуры гомологического фаготипа и не лизирует культуры других гетерологических типов. После того как бактериофаг впитается в питательную среду, чашки с посевом помещают в термостат при 37 °С. Через 6—8 ч производят учет результатов фаготипирования. Непрерывное 6-часовое инкубирование чашек в термостате можно заменить 2-часовой инкубацией, после которой чашки переносят в холодильник, а на следующий день их снова на 3—4 ч помещают в термостат и затем учитывают результаты.

Наличие хорошо выраженного лизиса исследуемой культуры с одним из типовых фагов указывает на принадлежность культуры к данному фаготипу. Появление выраженных признаков лизиса одновременно в нескольких каплях указывает на то, что степень разведения типовых фагов, взятых в опыт, недостаточна. В этих случаях опыт следует повторить с большими разведениями бактериофагов.

Учет фаготипирования производят как в проходящем, так и в падающем свете. Интенсивность лизиса отмечают с помощью четырехкрестной системы.

### ***Практическое применение фагов.***

Бактериофаги широко используют в микробиологических лабораториях (в лабораторной диагностике инфекций), а также в клинике для лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

**1. Фагоиндикация** – метод определения видовой принадлежности микроорганизмов, выделенных в чистой культуре, по типу лизирующего фага. По содержанию бактериофагов в объектах окружающей среды (например, в воде) можно судить о присутствии в них соответствующих патогенных бактерий. Подобные исследования проводят при эпидемиологическом анализе вспышек инфекционных болезней.

**2. Фаготипирование** – используется при внутривидовой идентификации бактерий, т.е. определении фаговара (фаготипа). Метод основан на строгой специфичности действия фагов. Фаговар бактерии определяется тем типом фага, который вызвал ее лизис (образование стерильного пятна, «бляшки», или «негативной колонии», фага). Методику фаготипирования используют **для выявления источника и путей распространения инфекции** (эпидемиологическое маркирование). Выделение бактерий одного фаговара от разных больных указывает на общий источник их заражения.

**3. Фаготерапия** – применение бактериофагов для лечения инфекционных заболеваний. Чаще всего используются брюшнотифозный, сальмонеллезный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый, стрептококковый фаги и комбинированные препараты (колипротейный, пиобактериофаги и др). Бактериофаги назначают по показаниям перорально, парентерально или местно в виде жидких, таблетированных форм, свечей или аэрозолей.

**4. Фагопрофилактика** - применение бактериофагов с целью профилактики инфекционных заболеваний у людей, бывших в контакте с больным, но статус которых еще не известен (характерные симптомы еще не проявляются).

**5. Бактериофаги широко применяют в генной инженерии и биотехнологии** в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

#### Механизм действия антибиотиков на бактерии

Группа	Действие на клетку	Механизм специфического действия	Примеры
<b>Ингибиторы синтеза компонентов клеточной стенки</b>			
β-лактамы	бактерицидные	Тормозят синтез пептидогликана, селективно угнетая активность ферментов, участвующих в терминальной перекрестной сшивке линейных молекул гликопептидов (основной фермент - транспептидаза); вторая мишень – аутолитические ферменты, которые удаляют деградировавшие компоненты клеточной стенки.	Пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы.
Бацитрацины	бактерицидные	Нарушение полимеризации пептидогликана.	Бацитрацин
Ванкомицин	бактерицидные	Блокирование синтеза пептидогликана.	Ванкомицин

Циклосерин	бактериостатики	Нарушает включение D-аланина в пептидогликан	Циклосерин
<b>Ингибиторы функций цитоплазматической мембраны</b>			
Полимиксины	бактерицидные	Нарушение осмотической резистентности ЦПМ (действие подобно катионным детергентам)	Полимиксин В, полимиксин Е
Полиены	фунгицидные	Связывают эргостерол ЦПМ клетки гриба, что ведет к потере клеткой низкомолекулярных соединений.	Нистатин, леворин, амфотерицин В
Грамицидины	бактериостатики	Нарушение целостности ЦПМ.	
<b>Ингибиторы синтеза белка</b>			
Аминогликозиды	бактерицидные	Взаимодействуют с 30S субъединицей рибосом, образуя необратимый комплекс с рибосомальным белком, в результате чего блокируется образование пептидных связей, ингибируется взаимодействие тРНК с комплексом мРНК-рибосома, а также возможно искажение кода мРНК в результате чего образуются дефектные полипептиды.	Более 50 препаратов: 1-е поколение – стрептомицин, 2-е – гентамицин, 3-е – амикацин
Тетрациклины	бактериостатики	Взаимодействуют с 30S субъединицей рибосом, блокируя присоединение тРНК к комплексу мРНК-рибосома, а также нарушает включение новых аминокислот в полипептид.	Природные – тетрациклин, окситетрациклин. Полусинтетические – доксициклин
Хлорамфеникол	бактерицидные	Взаимодействуют с 50S субъединицей рибосом, ингибируя пептидилтрансферазу, которая ответственна за	Левомецетин



		образование пептидных связей.	
Макролиды	бактериостатики	Подавление активности пептидилтрансфераз.	Природные – эритромицин, олеандомицин. Полусинтетические – кларитромицин
Азалиды	бактериостатики	Подавление активности пептидилтрансфераз; способны депонироваться в фагоцитах и, следовательно, проявлять активность в отношении фагоцитируемых микроорганизмов.	Азитромицин
Линкозамиды	бактериостатики	Подавление активности пептидилтрансфераз (Все штаммы E.coli резистентны).	Природные – линкомицин. Синтетические – клиндамицин
<b>Ингибиторы транскрипции и синтеза нуклеиновых кислот</b>			
Анзамицины (рифамицины)	бактерицидные	Ингибирует ДНК-зависимую РНК-полимеразу, что влечет за собой торможение синтеза любых видов бактериальной РНК.	Полусинтетический – рифампицин
<b>Химиотерапевтические препараты</b>			
Сульфаниламиды	бактериостатики	Конкурентно угнетают дигидропероат синтетазу, что препятствует образованию дигидрофолиевой кислоты и соответственно тетрафолиевой кислоты, необходимой для синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований.	Структурные аналоги р-аминобензойной кислоты
Хинолоны	бактерицидные	Ингибируют активность ДНК-топоизомеразы (ДНК-гиразы), что препятствует деспирализации ДНК и ведет к невозможности	Налидиксовая кислота, ципрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин

		транскрипции.	
Производные нитроимидазола	бактерицидные (селективны в отношении грамотрицательных анаэробов)	Бактериальные белки ферредоксины восстанавливают нитрогруппы препарата до нитрозогидроксил амин групп. Метаболит депонируется в клетках бактерий, вызывая нарушения в структуре ДНК.	Метронидазол
Диамино пиримидины	бактерицидные (в комбинации с ко-тримоксазолом)	Ингибируют синтез ДНК у бактерий и некоторых грибов, подавляя активность дигидрофолатредуктазы, что ведет к нарушению образования фолиевой кислоты.	Триметоприм

### **Лекарственная устойчивость**

Способность микроорганизмов расти в присутствии антибиотика.

Различается

Видовая (естественная) лекарственная устойчивость

Приобретенная лекарственная устойчивость

### **Механизмы формирования лекарственной устойчивости**

Продукция ферментов, которые разрушают антибиотик ( $\beta$ -лактамазы)

Мутации Инфицирование R -плазмидами и транспозонами

Исчезновение или модификация мишени для действия антибиотика (L -формы)

### **Принципы рациональной антибиотикотерапии**

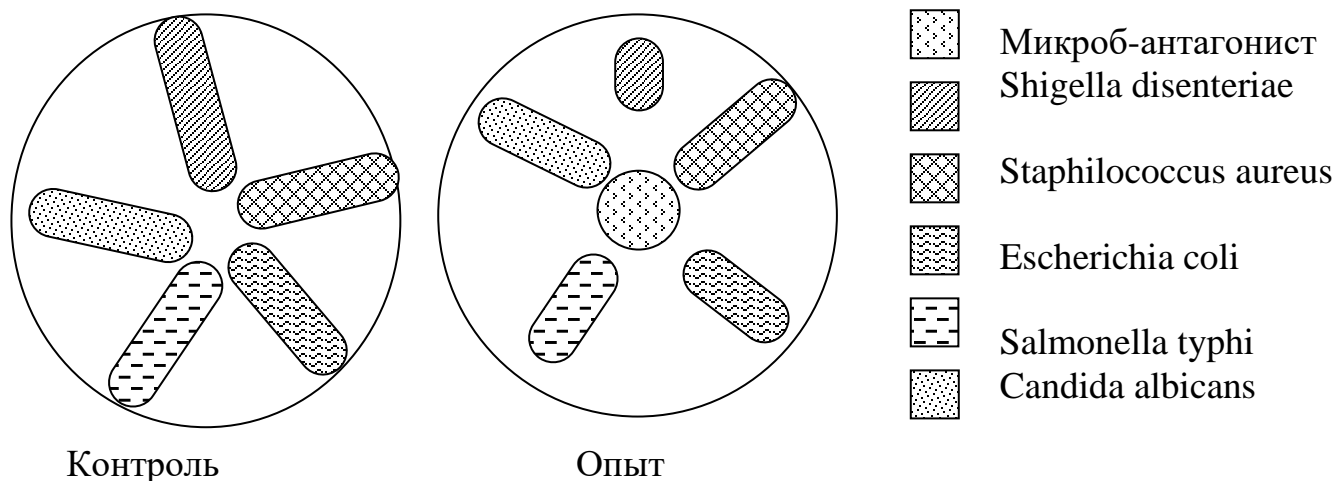
Применение антибиотиков в зависимости от чувствительности к ним возбудителей

Строгое соблюдение схем антибиотикотерапии

Применение комбинированной антибиотикотерапии

Периодическая замена антибиотиков в процессе лечения

**Задание 1. Изучить на демонстрационном препарате явление антагонизма у бактерий.**



Вывод: Микроб-антагонист подавляет рост *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* и *Salmonella typhi*, и не влияет на *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

**Задание 2. Определить минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотиков методом серийных разведений.**

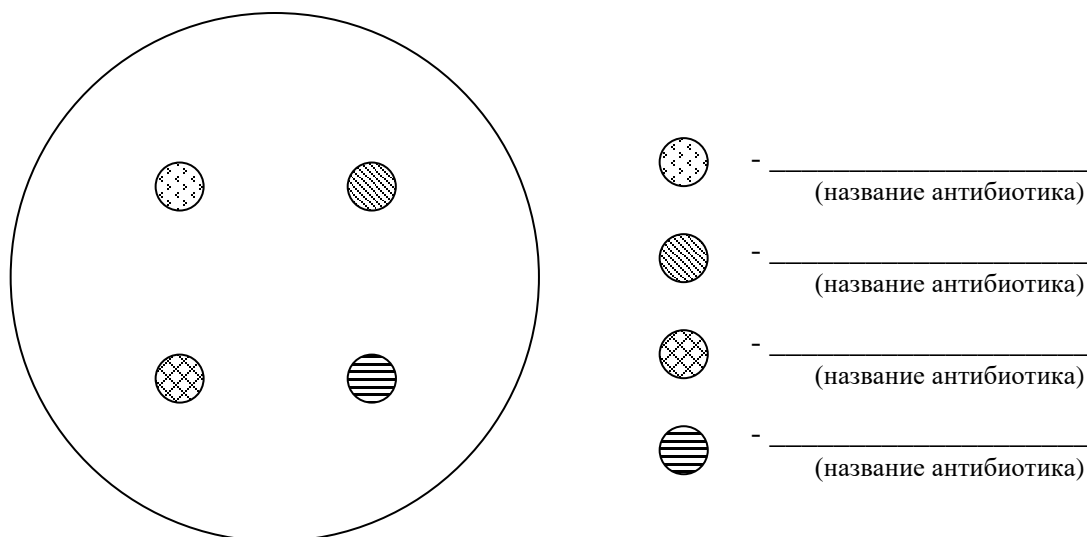
Разведение стрептомицина	64,0 ЕД	32,0 ЕД	16,0 ЕД	8,0 ЕД	4,0 ЕД	2,0 ЕД	1,0 ЕД	0,5 ЕД	0,25 ЕД	Контроль <i>E.coli</i>	Контроль стрептомицина
Рост <i>E.coli</i>	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—
Разведение пенициллина	38,4 ЕД	19,2 ЕД	9,6 ЕД	4,8 ЕД	2,4 ЕД	1,2 ЕД	0,6 ЕД	0,3 ЕД	0,15 ЕД	Контроль <i>S.aureus</i>	Контроль пенициллина
Рост <i>S.aureus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—

+ - + - рост микроорганизмов в среде

- - отсутствие роста микроорганизмов

Вывод. МПК стрептомицина для *E.coli* составляет 2,0 ЕД, МПК пенициллина для *S.aureus* - 0,6 ЕД.

**Задание 3. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков.**



Вывод. Начали определение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам.

### **Микрофлора окружающей среды и тела человека.**

Экология микроорганизмов – наука о взаимоотношениях микробов друг с другом и с окружающей средой. В медицинской микробиологии объектом изучения служит комплекс взаимоотношений микроорганизмов с человеком.

В природе микроорганизмы заселяют практически любую среду (почва, вода, воздух) и распространены гораздо шире, чем другие живые существа. В зонах обитания микроорганизмы образуют биоценозы – сложные ассоциации со специфическими и часто необычными взаимоотношениями. Каждое микробное сообщество в конкретном биоценозе образуют специфичные аутохтонные микроорганизмы, т.е. микробы, присущие конкретной области. В состав этих сообществ могут внедряться аллохтонные микробы (например, паразитические), обычно в них не встречающиеся.

### **Микробиологическое исследование воды.**

Санитарно-микробиологическое исследование воды проводится путем непрямой оценки ее эпидемиологического благополучия путем выявления так называемых санитарно-показательных микроорганизмов и определения общего микробного числа (ОМЧ).

Основной источник возбудителей заболеваний человека – теплокровные животные, которые выделяют их в окружающую среду фекальным или воздушно-капельным путем вместе с многочисленными представителями нормальной микрофлоры кишечника и верхних дыхательных путей. Поэтому санитарно-показательные микроорганизмы отобраны именно из представителей нормальной микрофлоры.

Для воды такими санитарно-показательными микроорганизмами являются бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – представители семейства Enterobacteriaceae, которые выделяются во внешнюю среду с испражнениями и являются количественным показателем степени фекального загрязнения воды. Поэтому чем больше ее фекальное загрязнение, тем выше вероятность

контаминации воды соответствующими патогенными микроорганизмами. Среди БГКП особенно выделяют E.coli, которые достаточно быстро гибнут во внешней среде и именно поэтому являются показателем свежего фекального загрязнения.

Показатели, определяемые при оценке санитарного состояния воды:

1. Общее микробное число в 1 см<sup>3</sup>.
2. Число БГКП в 1 дм<sup>3</sup>.
3. Число термостабильных кишечных палочек (фекальных колиформ – индекс ФК) в 100 см<sup>3</sup>.
4. Число патогенных микроорганизмов в 1 дм<sup>3</sup>.
5. Число колифагов 1 дм<sup>3</sup>.

#### **Взятие проб водопроводной воды.**

1. Для проведения анализа отбирают 500 см<sup>3</sup> воды в стерильные флаконы, закрытые ватно-марлевой пробкой, покрытой сверху бумажным колпачком. Предварительно обжигают кран спиртовым факелом и выпускают воду в течение 10 мин.

2. На флакон наклеивают этикетку, где указывают место отбора пробы, ее номер, дату и время, температуру воды и воздуха, фамилию санитарного врача или его помощника, цель исследования и адрес лаборатории.

3. Исследование проводят не позднее 2 ч после отбора пробы. Если это невозможно – срок может быть увеличен до 6 часов при условии хранения пробы при температуре 1-5°C

#### **Определение общего микробного числа воды (ОМЧ).**

Этот показатель определяет количество микроорганизмов, которые вырастают на МПА при 37°C в течение 24ч.

Водопроводная вода высевается в объеме 1 см<sup>3</sup> в неразведенном виде, равномерно раскапывая на дно стерильной чашки Петри, затем заливают растопленным и охлажденным до 45°C МПА. Круговыми движениями смешивают воду с агаром. После застывания среды посева выращивают в термостате при 37°C в течение 24ч. Посев делается одновременно на две чашки. Через сутки подсчитывают число колоний в двух чашках и находят среднее арифметическое.

В соответствии с действующими правилами водопроводная вода может содержать не более 100 микробов, т.е. ОМЧ – не более 100.

#### **Определение количества БГКП.**

Индекс БГКП определяют при помощи метода мембранных фильтров и двухфазных бродильных проб.

Суть **бродильного метода** состоит в посеве определенных объемов воды в среды накопления с последующим посевом на агар Эндо, дифференцирование бактерий, которые выросли, и определение индекса БГКП по таблицам.

1-й день. Воду засевают во флаконы и пробирки с ГПС (глюкозо-пептонной средой) или ЛПС (лактозо-пептонной средой) с поплавками или комочками ваты для выявления газообразования по следующей схеме:

Посуда	Количество питательной среды	Количество воды для посева
Флакон	10 мл концентрированной	100 мл воды

	ГПС	
Пробирка	1 мл концентрированной ГПС	10 мл воды
Пробирка	10 мл норм. концентрации ГПС	1 мл воды
Пробирка	10 мл норм. концентрации ГПС	0,1 мл воды

Посевы инкубируют в термостате при 37°C в течение 24ч.

2-й день. Учет результатов:

1. Отсутствие помутнения, образования кислоты и газа во флаконах и пробирках – отрицательный результат на наличие БГКП.
2. Помутнение, образование кислоты и газа на (ГПС) или помутнения на (ЛПС) – основание для пересева материала на среду Эндо.

3-й день. Просматривают посевы на среде Эндо:

1. Микробного роста нет или присутствуют колонии с культуральными признаками, не характерными для E.coli или плесневые грибы - отрицательный результат на наличие БГКП.
2. При обнаружении лактозоположительных колоний – микроскопия материала колоний и постановка оксидазного теста для определения принадлежности бактерий к семейству Enterobacteriaceae.

Наличие грамотрицательных неспороносных палочек с отрицательным оксидазным тестом позволяет дать положительный ответ о наличии БГКП в исследуемой воде. Результат анализа оценивают в виде коли-индекса и коли-титра по таблице.

**Коли-индекс** – количество особей кишечной палочки, обнаруженное в 1 л исследуемой воды.

**Коли-титр** – наименьшее количество исследуемого материала (в мл), в котором обнаруживается хотя бы одна клетка E.coli.

**Схема пересчета коли-индекса в коли-титр:**

$$\underline{\text{Коли-титр} = 1000 / \text{коли-индекс}}$$

Основные микробиологические нормативы качества воды изложены в приказе МОЗ Украины №383 о утверждении государственных санитарных правил и норм "Гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько-питного водопостачання".

### Мікробіологічні показники безпеки питної води

№	Найменування показників	Одиниці виміру	Нормативи
1	Число бактерій в 1 см <sup>3</sup> води (ЗМЧ)	КУО / см <sup>3</sup>	не більше 100
2	Число бактерій групи кишкових паличок в 1 дм <sup>3</sup> води (індекс БГКП)	КУО / дм <sup>3</sup>	не більше 3
3	Число термостабільних кишкових паличок в 100 см <sup>3</sup> води (індекс ФК)	КУО / 100 см <sup>3</sup>	відсутність
4	Число патогенних мікроорганізмів у 1 дм <sup>3</sup> води	КУО / дм <sup>3</sup>	відсутність
5	Число коліфагів у 1 дм <sup>3</sup> води	БУО / дм <sup>3</sup>	відсутність

Примітки: КУО – колонієутворюючі одиниці (мікроорганізми);  
 БУО – бляшкоутворюючі одиниці (віруси).

### Микробиологическое исследование воздуха.

Микрофлору атмосферного воздуха исследуют в основном при неблагоприятной эпидемиологической ситуации. В воздухе закрытых помещений, особенно больничных, наряду с непатогенными сапрофитами могут выявляться и патогенные микроорганизмы. Санитарно-показательными микроорганизмами для воздуха закрытых помещений являются золотистые стафилококки,  $\alpha$  – и  $\beta$  – гемолитические стрептококки.

При санитарно-гигиенической оценке воздуха больничных помещений определяют такие показатели:

1. ОМЧ в 1 м<sup>3</sup> воздуха.
2. Количество в 1 м<sup>3</sup> санитарно-показательных бактерий.

Выявление золотистых стафилококков и гемолитических стрептококков выше допустимых нормативов свидетельствует о непосредственной эпидемиологической опасности.

При проведении микробиологических исследований воздуха используют седиментационный, аспирационный и фильтрационный методы.

#### Седиментационный метод Коха.

Основан на принципе осаждения микроорганизмов.

Две чашки Петри с МПА или кровяными средами для гемолитических стрептококков или желточно-солевым агаром для стафилококков открывают и оставляют на горизонтальной поверхности на месте взятия пробы. В зависимости от степени предполагаемого микробного обсеменения воздуха выбирается время экспозиции: 5-10 мин при массивном обсеменении, 20-40 мин – при незначительном.

Инкубируют при 37°C в течение 24ч и затем еще 24 ч при комнатной температуре.

Определение ОМЧ воздуха: подсчитывают количество колоний на МПА в обеих чашках и находят среднее арифметическое. По данным Омелянского на площадь 100 см<sup>2</sup> за 5 мин оседает столько бактерий, сколько их содержится в 10 дм<sup>3</sup> воздуха. Площадь стандартной чашки Петри составляет 66 см<sup>2</sup>.

Например, на чашке с агаром после 5 мин экспозиции выросло 33 колонии. Тогда на 100 см<sup>2</sup> агара выросло бы  $33 \cdot 100 / 66 = 50$  колоний, т.е. то количество бактерий, что содержится в 10 дм<sup>3</sup> воздуха. Следовательно, в 1 м<sup>3</sup> их будет  $50 \cdot 1000 / 10 = 5000$ .

При просмотре чашек Петри с элективными средами обращают внимание на колонии, характерные для гемолитических стрептококков (на кровяных средах) и золотистых стафилококков (ЖСА). Типичные колонии микроскопируют, выделяют чистые культуры, идентифицируют до вида и только после этого подсчитывают количество санитарно-показательных микроорганизмов в  $1 \text{ м}^3$  воздуха.

#### **Аспирационный метод Кротова.**

Основан на ударном действии струи воздуха о поверхность питательной среды и прилипания к нему бактерий. Исследования проводят при помощи аппарата Кротова.

При определении ОМЧ пропускают, как правило,  $100 \text{ в } 1 \text{ дм}^3$  воздуха со скоростью в  $25 \text{ дм}^3 / \text{мин}$ . Если определяют количество санитарно-показательных бактерий объем исследуемого воздуха увеличивают до  $300\text{-}500 \text{ дм}^3$ .

Расчет ОМЧ:  $X = a * 1000 / V$ , где  $a$  – количество колоний, которые выросли в чашке Петри,  $V$  – объем воздуха, заданный для исследования в  $\text{дм}^3$ ,  $1000$  – заданный объем воздуха для определения ОМЧ.

#### **Фильтрационный метод.**

Для проведения анализа используют специальные приборы: Дьяконова, Речменского, Киктенко, Паб-!, ПОВ-1 и др. Принцип их действия сводится к пропусканию определенного объема воздуха через жидкость в приборе (или фильтр) с последующим посевом на питательные среды. Подсчитывают количество колоний, которые выросли, и проводят перерасчет на весь объем жидкости в приборе и определяют число микроорганизмов в  $1 \text{ м}^3$  воздуха.

В настоящее время предложены только лишь временные положения про допустимое нормирование микробного загрязнения отдельных больничных и других помещений.

В воздухе операционных, родильных залов, реанимационных, перевязочных и процедурных ОМЧ до работы не должно превышать  $500$ , после работы –  $1000$ ; количество *S.aureus* – не более  $4$ , гемолитических стрептококков – быть не должно.

В воздухе больничных палат зимой ОМЧ – не более  $3500$ , *S.aureus* – до  $24$ , гемолитических стрептококков – не более  $24$ ; летом ОМЧ – не более  $5000$ , *S.aureus* – до  $52$ , гемолитических стрептококков – не более  $36$ .

### **Микробиологическое исследование смывов с рук и предметов.**

Исследование смывов с рук и предметов делают по эпидемиологическим показаниям. В повседневной работе проводят выявление санитарно-показательных микроорганизмов: БГКП, стафилококки, энтерококки.

Смыв проводят стерильным тампоном, помещенным в пробирку с МПБ или ГПС. Сухой тампон проталкивают до полного смачивания в бульоне, вынимают и делают смыв.

Сначала протирают кожу левой руки, затем правой в такой последовательности: тыл кисти, ладонь, межпальцевые промежутки, ногтевые ложа.

После окончания смыва тампон погружают в питательную среду.

Для определения общей обсемененности из пробирки (после тщательного отжимания тампона и перемешивания)  $1 \text{ см}^3$  жидкости вносят в стерильную чашку



Петри, заливают 15 мл растопленного и охлажденного агара. После инкубации подсчитывают число колоний, определяют ОМЧ.

Определение БГКП, стафилококков и энтерококков проводят путем посева на элективные питательные среды. Колонии подсчитывают и идентифицируют так же, как и при анализе воды.

### **Вопросы для самоконтроля.**

- В чем отличия фармакотерапии и химиотерапии?
- В чем заключается исторический вклад Эрлиха, Домагка, Флеминга и Ваксмана в учение о химиотерапии?
- Что такое антибиотик?
- Как определяется химиотерапевтический индекс?
- Из каких источников получают антибиотики?
- Каковы требования к антибиотикам?
- Какие существуют механизмы действия антибиотиков на микроорганизмы?
- Как измеряется активность антибиотиков?
- Как определяется чувствительность микроорганизма к антибиотикам?
- Зачем определять чувствительность микроорганизмов к антибиотикам?
- Какие существуют осложнения антибиотикотерапии?
- Как должен действовать врач, чтобы предотвратить эти осложнения?

## **Практическое занятие №7**

### **Субмодуль №1 по теме «Морфология и физиология микроорганизмов».**

#### **Вопросы для подготовки:**

#### ***Морфология и структура бактерий.***

1. Основные отличия прокариот и эукариот. Формы бактерий с дефектом синтеза клеточной стенки, протопласты, сферопласты, L-формы бактерий.
2. Морфология и строение бактерий. Роль отдельных структур в жизнедеятельности бактерий и в патогенезе инфекционных заболеваний.
3. Морфология и классификация простейших.
4. Морфология и классификация грибов.
5. Методы исследования в микробиологии. Принципы организации, аппаратура и режим работы бактериологической и серологической лабораторий.
6. Бактериоскопический метод исследования. Этапы. Оценка.

#### ***Физиология микроорганизмов.***

1. Типы и механизмы питания микроорганизмов. Механизмы проникновения питательных веществ в бактериальную клетку. Химический состав микроорганизмов. Питательные среды, требования к ним.
2. Классификация питательных сред, которые используются в микробиологии.

3. Дыхание микроорганизмов. Аэробный и анаэробный типы дыхания. Ферменты и структуры клетки, которые принимают участие в процессе дыхания. Методы культивирования анаэробных бактерий.

4. Ферменты микроорганизмов, их роль в обмене веществ. Использование их для дифференциации бактерий. Ферменты патогенности.

5. Рост и способы размножения бактерий. Механизмы клеточного деления, фазы размножения культуры бактерий в стационарных условиях.

6. Бактериологический метод исследования. Принципы выделения чистых культур бактерий и их идентификации.

7. Влияние физических, химических и биологических факторов на микроорганизмы. Стерилизация, методы, контроль эффективности стерилизации. Асептика. Антисептика.

### ***Генетика микроорганизмов и химиотерапевтические препараты.***

1. Химиотерапия и химиотерапевтические препараты. Механизм антибактериального действия сульфаниламидов. Роль П. Эрлиха и Г. Домагка в развитии учения о химиотерапии.

2. Явление антагонизма микроорганизмов. Роль отечественных микробиологов в развитии учения об антагонизме микробов.

3. Антибиотики, характеристика, принципы получения. Классификация по механизму действия на микроорганизмы.

4. Лекарственная устойчивость микроорганизмов, механизм образования устойчивых форм. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Практическое значение. Принципы борьбы с лекарственной устойчивостью бактерий.

5. Материальные основы наследственности микроорганизмов. Генотип и фенотип. Виды изменчивости. Фенотипическая изменчивость.

6. Генотипическая изменчивость. Мутации, их разновидности. Генетические рекомбинации: трансформация, трансдукция и конъюгация.

7. Внехромосомные факторы наследственности бактерий. Плазмиды, их основные генетические функции. Мигрирующие элементы. Роль мутаций, рекомбинаций и селекции в эволюции микроорганизмов. Основные факторы эволюции.

8. Значение генетики и развития общей и медицинской микробиологии, вирусологии, молекулярной биологии. Микробиологические основы генной инженерии. Схема получения генных структур и наследственно измененных организмов. Достижения генной инженерии, использование генноинженерных препаратов в медицине.

### ***Санитарная микробиология.***

1. Экология микроорганизмов. Распространение микробов в природе. Значение работ С.М. Виноградского.

2. Нормальная микрофлора тела человека, ее роль в физиологических процессах и возникновении патологии человека. Возрастные особенности нормальной микрофлоры носа, кожи, ротовой полости, половых органов, кишечника.

3. Гнотобиология. Дисбактериоз и причины его возникновения.

4. Пробиотики и эубиотики, их характеристика, механизм действия.

5. Санитарная микробиология, предмет, задачи. Санитарно-показательные микроорганизмы, требования, предъявляемые к ним, их значение для характеристики объектов окружающей среды.

6. Принципы санитарно-микробиологических исследований объектов окружающей среды, их оценка. Санитарно-бактериологический контроль качества питьевой воды. Требования госстандарта к питьевой воде.

7. Экология микроорганизмов. Микрофлора окружающей среды: воздуха, воды, грунта. Методы исследования.

8. Санитарно-показательные микроорганизмы, которые используются при оценке качества воды. Методы санитарно-микробиологического исследования воды и их оценка.

9. Микрофлора воздуха, их характеристика. Роль воздуха в передаче инфекционных заболеваний. Микробное число и санитарно-показательные микроорганизмы воздуха закрытых помещений, методы определения, их оценка.

## **Рекомендованная литература.**

### **Основная:**

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология; М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005, 734 с.
2. Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С., Ширококов В. П. Медицинская и санитарная микробиология: учебное пособие.— М., 2008.-462 с.
3. Ширококов В. П., Янковский Д. С., Дымент Г. С. Микробная экология человека с цветным атласом : учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений IV уровня аккредитации и врачей-интернов / В. П. Ширококов, - К. : Червона рута-Турс, 2010. – 336 с.

### **Дополнительная:**

4. Medical microbiology / edited by Samuel Baron, MD. - 4th ed. The University of Texas Medical Branch and Galveston, 1996, 1273 p.
5. W.Levinson, E.Jawetz. Medical microbiology and immunology: examination and board review, 6th ed. The McGraw - Hill Companies, 2000, 582 p.
6. Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С. Практична мікробіологія: Посібник.-Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.
7. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія: підручнтк для студентів вищ.мед.навч.закл. /Під редакцією В.П. Ширококова.- Вінниця: Нова Книга, 2010. - 969 с.