

ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ
Факультет ветеринарной медицины
Кафедра эпизоотологии и микробиологии

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Методические пособие для подготовки к практическим занятиям
по общей микробиологии

Новосибирск 2020

УДК

Составитель к. б.н, доц. О.А. Колганова, к.в.н, Кречетова В.Н., ст. преп.
Юдина Н.В.

Рецензент

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: методическое пособие по подготовке к практическим занятиям по ветеринарной микробиологии. Новосиб. гос.аграрный ун-т; сост. О.А.Колганова, Кречетова В.Н., Юдина Н.В. – Новосибирск, 2020.- 57с.

В методическом пособии предложена примерная программа по дисциплине «Ветеринарная микробиология, иммунология и микология», раздел «Общая микробиология». Изложены темы, методические указания по самоподготовке студентов, даны методические пояснения по самостоятельному изучению некоторых разделов ветеринарной микробиологии. Предназначены для студентов очного и заочного отделения факультета ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарной экспертизы

Утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим советом ФВМ НГАУ протокол № 27 от 21.09. 2020 г.

Новосибирский государственный аграрный университет

ТЕМЫ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

ТЕМА 1: ОБЩАЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА

1. Микроскоп, его устройство
2. Основные правила работы с микроскопом
3. Техника приготовления мазка-препарата

Оборудование и материалы: Микроскоп, иммерсионное масло, набор красок, спирт 96°, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, физиологический раствор, салфетки, культура.

Бактериологическая техника – совокупность методов и приемов, применяющихся при бактериологическом исследовании. Бактериологическая техника включает методы обнаружения, культивирования и выделения бактерий из исследуемого материала с последующей их идентификацией. Одним из распространенных приемов бактериологической техники является приготовление препаратов для микроскопии.

Микроско́п (др.-греч. Μικρός «маленький» + σκοπέω «смотрю») – прибор, предназначенный для получения увеличенных изображений, невидимых или плохо видимых невооружённым глазом.

Микроскоп состоит из механической, осветительной и оптической частей.

К механической части микроскопа относятся: подставка штатива (башмак), колонка штатива (тубусодержатель), тубус, предметный столик с клеммами или фиксаторами препарата, сортировочные винты (винты перемещения предметного столика и препарата), револьвер, макро- и микрометрические винты, винт конденсора, рычагири-диафрагмы, оправа

для светофильтров.

Оптическая часть микроскопа: объективы, окуляры.

Объектив микроскопа представляет собой сложную оптическую систему, образующую увеличенное изображение объекта, и является основной и наиболее ответственной частью микроскопа.

Объектив это набор



Рис. 1 - Объективы микроскопа

корреляционных линз, заключенных в металлический корпус. Объективы бывают суховоздушные (10, 20, 40) и иммерсионные (90, 100, 120).



Рис. 2 - Окуляры микроскопа

Окуляр – это плосковыпуклая линза, заключенная в металлический корпус. Плоская линза, обращенная к глазу, называется глазной. Выпуклая линза называется собирающей.

Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра.

Разрешающая способность микроскопа – это способность выдавать чёткое раздельное

изображение двух близко расположенных точек объекта.



Рис. 3 - Составные части микроскопа

Правила работы с микроскопом:

1. Работать с микроскопом следует сидя.

2. Микроскоп установить перед собой, немного слева на 2-3 см от края стола. Включить лампу, переведя тумблер в состояние I.

3. Передвигая препарат рукой, найти объект, расположить его в центре отверстия предметного столика.

4. Глядя на микропрепарат, с помощью винтов аккуратно, чтобы не раздавить стекло, поднять предметный столик к объективу.

5. Глядя одним глазом в окуляр и вращая винт наводки, плавно опускать предметный столик до положения, при котором хорошо будет видно изображение объекта.

Увеличение объекта под микроскопом определяют умножением показателя увеличения окуляра на увеличение линзы объектива.

Для работы с микроорганизмами используют бактериологические петли, иглы, шпатели.

Бактериологические петли изготавливают из проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях. Бактериологическая петля прокаливается, пробки и край пробирки с культурой микроорганизмов фламбируются.

Если в работе используются суспензии микроорганизмов или культуры, выращенные на жидких средах, они берутся предварительно простерилизованной пипеткой. Изучают микроорганизмы, изготавливая препараты из них. Для этого применяют чистые, хорошо обезжиренные стекла, на поверхности которых капля воды свободно растекается. При микроскопировании можно использовать культуры, выращенные в жидких средах.

Культуры, выращенные на твердых средах, можно суспендировать (развести) с помощью стерильной петли или иглы в капле стерильной жидкой среды или какого-нибудь раствора до слабого помутнения.

Петля бактериологическая – инструмент бактериологических лабораторий.



Рис. 3 - Петля бактериологическая

Используют для забора материала, взятия, переноса, посева, смешивания и других процедур с небольшой дозой бактерий и грибов. Состоит из пластмассового держателя и петли.

Петлю изготавливают из куска платиновой или никелево-стальной проволоки

7-10 см. в длину и диаметром 0,4-0,5 мм. Один конец проволоки закреплен в держателе, другой загнут в виде продолговатой петли размерами 2×3 мм, причем ушко петли должно быть полностью замкнутым, без видимого зазора.

Бактериологическую петлю стерилизуют до начала и после окончания работы прокаливанием на пламени горелки в течение 10-15 с (никелево-стальную – 20 с). После прокалывания бактериологическую петлю охлаждают на воздухе или о стерильную стенку пробирок (чашек).

Такой же инструмент, но с прямым свободным концом называется **бактериологической иглой**. Ее применяют для посева культуры или материала в столбик плотных питательных сред.



**Шпатель для
распределения
микроорганизмов** на
плотном агаре в чашках
Петри

Рис. 4 - Шпатель бактериологический

Техника работы с бактериологической петлей и микроорганизмами

Бактериологическую петлю берут в правую руку как карандаш, фламбируют над пламенем спиртовки сначала вертикально, затем горизонтально до покраснения.

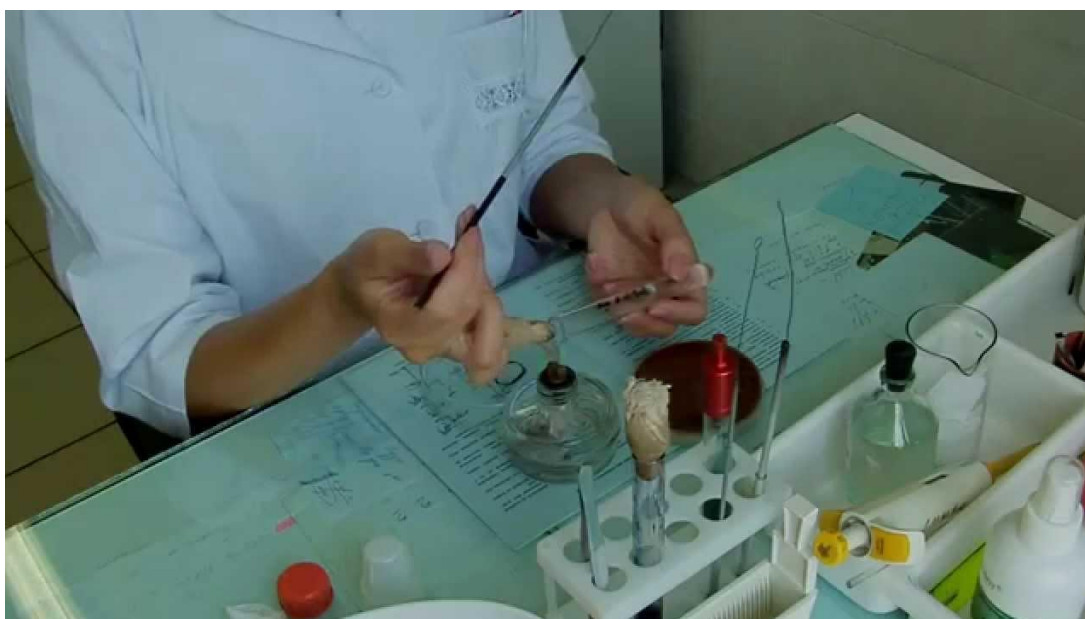


Рис. 5 - Техника приготовления мазка-препарата

Пробирку с культурой микроорганизмов держат в левой руке так, чтобы было видно рабочее поле (рост микроорганизмов).

Открывают пробирку мизинцем правой руки и держат пробку до окончания манипуляции. Край пробирки, перед тем как ее открыть обрабатываем над пламенем спиртовки.

Берут небольшое количество культуры бактерий и переносят на предметное стекло.

Обжигают край пробирки и пробку над пламенем спиртовки, закрывают пробирку пробкой и ставят ее в штатив, затем готовят мазок-препарат.

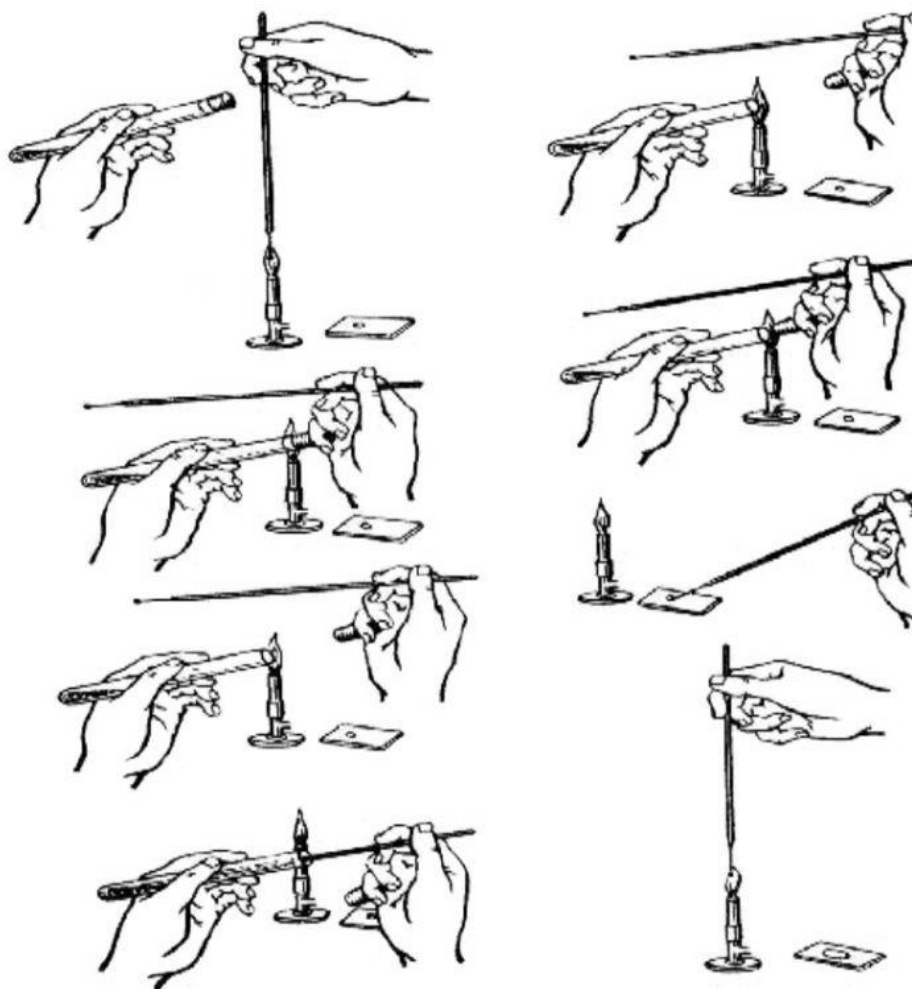


Рис. 6 - Техника приготовления мазка-препарата

Этапы приготовления мазков-препаратов

Приготовление состоит из нескольких последовательных операций:

- подготовка мазка;
- высушивание;
- фиксация;
- окраска.

Исследуемый материал наносят на чистое обезжиренное предметное стекло.

Для взятия бактериальной культуры:

- предметное стекло кладут на мостик ванночки
- нагревают до покраснения бактериальную петлю в пламени горелки;
- берут пробирку с исследуемой культурой в левую руку так, чтобы видеть поверхность среды; вращательным движением вынимают пробку из пробирки, прижимая ее мизинцем и безымянным пальцами правой руки к ладони;
- обжигают край пробирки, осторожно вводят петлю и берут исследуемый материал;
- вынимают петлю, обжигают край пробирки и закрывают пробкой.
- взятый материал осторожно распределяют в виде овала по предметному стеклу тонким слоем, после чего бактериальную петлю стерилизуют в пламени спиртовки;
- если препарат готовят из бактериальной культуры, выращенной на плотной среде, то на предметное стекло предварительно наносят каплю стерильного физиологического раствора
- мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре, чтобы не нарушить структуру микроорганизмов.
- фиксация препарата: высушенные мазки подвергают термической (предметное стекло (мазком вверх) проводят несколько раз через пламя горелки) обработке, в результате которой бактерии погибают и плотно прикрепляются к поверхности стекла.
- обводят контур мазка восковым карандашом с обратной стороны мазка.

Препарат готов к окрашиванию.

Задание 1. Ознакомиться с устройством микроскопа. Рассмотреть готовый мазок-препарат в иммерсионной системе, зарисовать в тетради.

Задание 2. Приготовить мазок-препарат *Bacillus. subtilis* и *Bacillus mesentericus*

ТЕМА 2: МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ МАЗКОВ-ПРЕПАРАТОВ

Материалы и оборудование. Пробирки с взвесями бактерий (различные виды кокков, эшерихий, атипичных микобактерий), 96° спирт, раствор Люголя, генцианвиолет, фуксин Циля, 5% раствор серной кислоты,

0,5%-ный раствор соляной кислоты, синька Леффлера, таблицы методов окраски.

В целях более подробного изучения клеточных структур бактерий микробиологические препараты окрашивают. Можно окрашивать живые бактериальные формы, однако такая окраска не даёт полной картины строения микробной клетки. В связи с этим приготавливают фиксированные препараты микроорганизмов. Фиксация убивает живые клетки и одновременно закрепляет их на поверхности предметного стекла.

Различают *простое* и *дифференциальное* окрашивание микроорганизмов. В первом случае прокрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны ее форма и размеры. Дифференциальное окрашивание выявляет только определенные структуры клетки и запасные вещества.

Сущность простого метода заключается в том, что происходит физико-химический процесс, при котором происходит адсорбция (поглощение) красителя микроорганизмами, чем выше концентрация красителя, тем выше скорость поглощения.

Для **простого окрашивания** клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Фиксированный препарат помещают на мостик, лежащий над лотком, наносят на него раствор красителя и выдерживают в нем в течение 1-3 мин. Следят за тем, чтобы во время окрашивания краситель на мазке не подсыхал, и в случае необходимости добавляют новую порцию красителя.



Рис. 7. Нанесение красителя на мазок

100×.

Для получения более чистых препаратов краситель наносят на мазок, покрытый фильтровальной бумагой.

По окончании окраски препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и просматривают с объективом

Метод окрашивания в модификации Синева позволяет использовать вместо раствора красителя заранее пропитанную им фильтровальную бумагу. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки.

Окраска по Граму (сложное окрашивание микроорганизмов) и ее использование для дифференциации бактерий с различным строением клеточной стенки.

Данный сложный (использующий более одного действующего вещества) метод окраски впервые был предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом (*Ch. Gram*) для окрашивания тканей, а позднее получил широкое распространение при окраске прокариот и был назван именем его разработчика.

Важное значение *метода окраски по Граму* в микробиологии определяется тем, что результаты окрашивания бактерий оказываются напрямую связанными с особенностями строения их клеточных стенок.

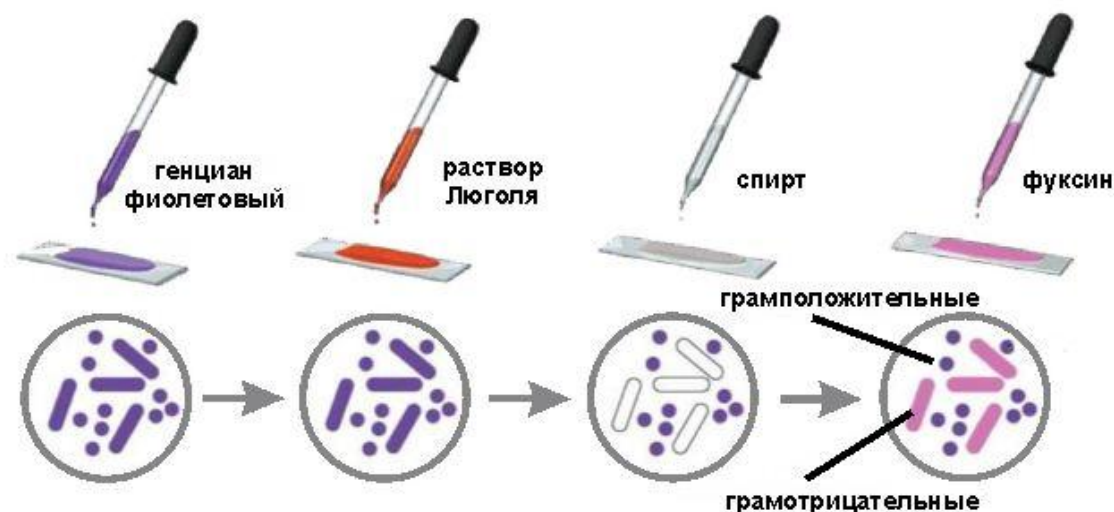
Объяснением этого являются выраженные различия в строении клеточных стенок *грамположительных* (по данному методу окрашивающихся в фиолетовый цвет) и *грамотрицательных* (по данному методу окрашивающихся в красный цвет) бактерий.

Первые из них имеют достаточно толстые слои из муреина (у эубактерий), удерживающие образующийся в протопласте комплекс «кристаллический фиолетовый + иод» и препятствующие его вымыванию из клетки при последующей обработке спиртом.

В свою очередь грамотрицательные бактерии не образуют подобных гетерополисахаридов или содержат их в небольших количествах, недостаточных для предотвращения экстрагирования

Методика окрашивания по Граму

| Фаза | Используемые краски, реактивы | Время действия | Процесс |
|------|--------------------------------|----------------|---|
| 1 | Генцианвиолет (смываем водой) | 2 мин | Все бактерии (Гр+ и Гр-) окрашиваются |
| 2 | Раствор Люголя (смываем водой) | 2 мин | Образуется комплекс нерастворимый у Гр+ и труднорастворимый у Гр- |
| 3 | Спирт 96° (смываем водой) | 5 сек | Обесцвечиваются Гр- бактерии |
| 4 | Фуксин (смываем водой) | 1 мин | Окрашиваются Гр- бактерии |



Окрашивание спор по Ожешко

Рис. 8 - Схема окраски мазка-препарата по Граму

Споры это зародышевые клетки, служащие для неполового размножения некоторых (грибы, водоросли) растений и части одноклеточных организмов.

Споры бактерий – круглые или овальные образования, представляющие собой особую форму существования определенных видов бактерий. Служат средством сохранения вида в неблагоприятных условиях.

Споры отличаются наличием плотной многослойной оболочки, повышенной устойчивостью к воздействию физических, химических и биологических факторов внешней среды.

Высокая резистентность связана с большим содержанием кальциевой соли дипикалиновой кислоты в оболочке спор.

При световой микроскопии часто используется метод Ожешко.

Методика окрашивания по Ожешко

| Фаза | Используемые краски, реактивы | Время действия | Процесс |
|------|--|----------------|---|
| 1 | 0,5% р-р HCL (смываем водой) | 4 мин | Протравливание, разрыхление экзины |
| 2 | Фуксин Циля при слабом нагревании (смываем водой) | 4 мин | Окраска спор и вегетативной части клетки |
| 3 | 5%-ный р-р серной кислоты (смываем водой) | 5 сек | Обесцвечиваются вегетативные части клетки |
| 4 | Метиленовая синь (смываем водой) | 4 мин | Окрашивается вегетативная часть клетки |

Раствор соляной кислоты разрыхляет оболочку спор и тем самым повышает ее тинкториальные свойства, при этом споры и вегетативная форма окрашивается в красный цвет.

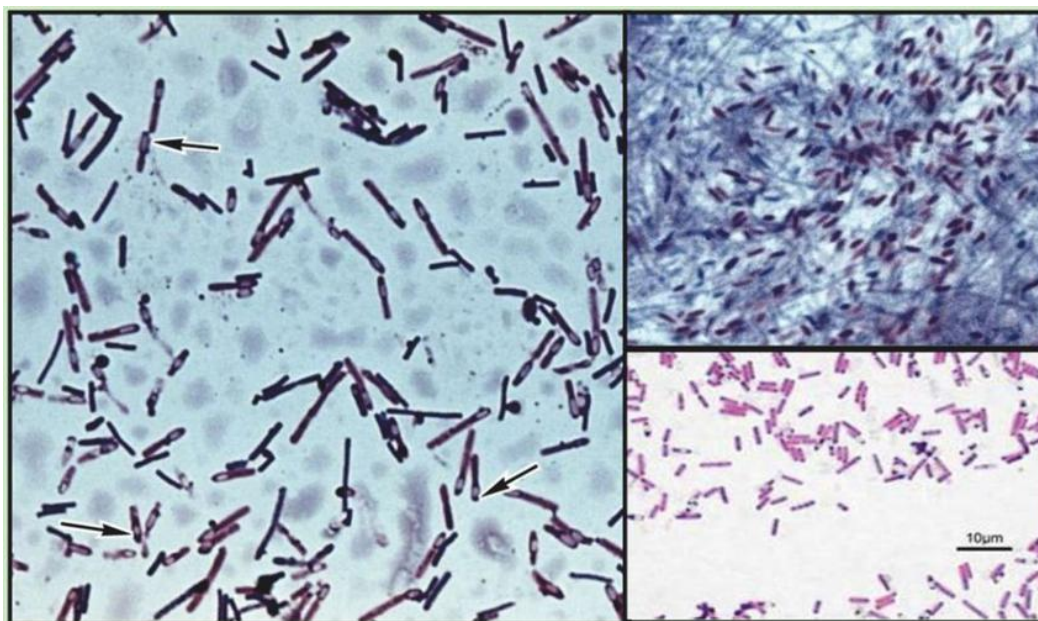


Рис. 9 - Споры бактерий (окраска по Ожеешко)

При обработке препарата серной кислотой вегетативные формы обесцвечиваются и окрашиваются метиленовым синим в голубой цвет, а споры остаются красными.

Метод окраски по Цилю-Нильсену

Этот метод окраски микроорганизмов используют для выявления кислотоустойчивых микобактерий (возбудителей туберкулёза, микобактериозов, лепры), актиномицетов и других кислотоустойчивых микроорганизмов. Кислотоустойчивость микроорганизмов обусловлена наличием в их клетках липидов, воска и оксикислот.

Такие микроорганизмы плохо окрашиваются разведёнными растворами красителей. Для облегчения проникновения красителя в клетки микроорганизмов нанесённый на препарат карболовый фуксин Циля подогревают над пламенем горелки. Окрашенные микроорганизмы не обесцвечиваются слабыми растворами минеральных кислот и спирта.

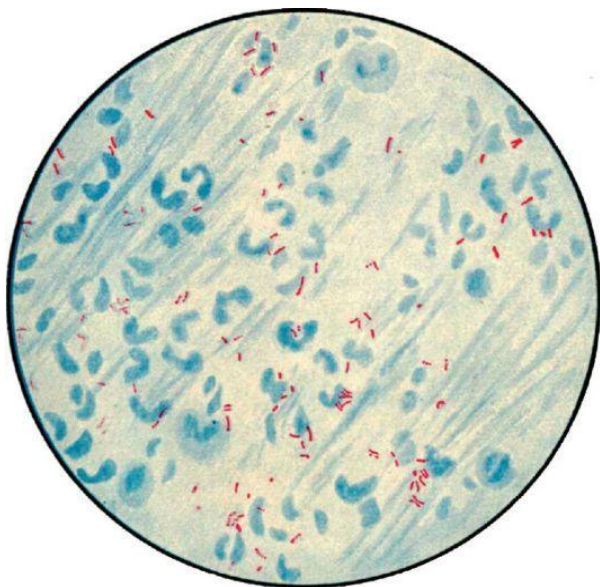


Рис. 10 - Мазок окрашенный по

Пиллю-Нильсену

путём нанесения на него 5%-го раствора серной кислоты или 3% солянокислого спирта в течение 3-х минут, и промывают несколько раз водой.

3. Окрашивают препараты водно-спиртовым раствором метиленового синего 1 минуту, промывают водой и высушивают.

При окраске по этому методу кислотоустойчивые бактерии приобретают интенсивно красный цвет, остальная микрофлора окрашивается в светло-синий цвет.

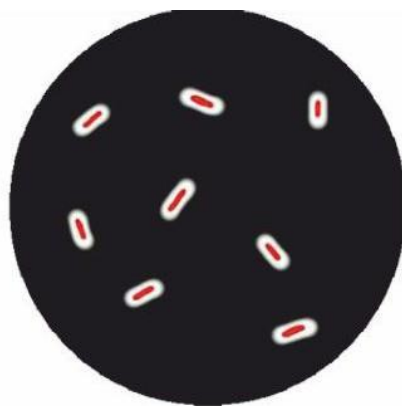
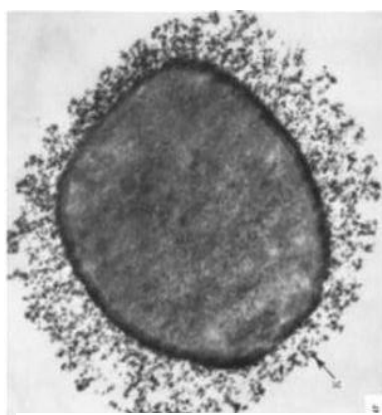


Рис. 11 - Микроскопическая картина: капсулы – бледно-желтого, а бактерии – коричневого цвета.

Это слизистый слой, расположенный над клеточной стенкой бактерии, представляет собой муциноподобное вещество толщиной более 0,2 мкм.

Состав: полисахариды и полипептиды (мономеры D-глутаминовой кислоты).

Этапы окраски

1. Фиксированный мазок, покрывают плоской фильтровальной бумагой и наливают на неё карболовый фуксин Циля. Мазок подогревают над пламенем горелки до появления паров, затем отводят для охлаждения и добавляют новую порцию красителя. Подогревание повторяют 2-3 раза.

После охлаждения снимают фильтровальную бумагу и промывают препарат водой.

2. Препарат обесцвечивают

Окрашивание капсул бактерий

Капсула

— поверхностная структура бактериальных клеток, залегающая поверх клеточной стенки или внешней мембраны и состоящая из экзополисахаридов.

Капсула гидрофильна, препятствует фагоцитозу бактерий, делает его незавершенным.

Функции капсулы: защитные адгезивные, патогенные и антигенные.

Выявление: негативное контрастирование по Бурри-Гинсу.

Микрокапсула – слизистое образование толщиной менее 0,2 мкм, выявленное при ЭМ.

Слизь – мукоидные полисахариды, не имеющие четких внешних границ.

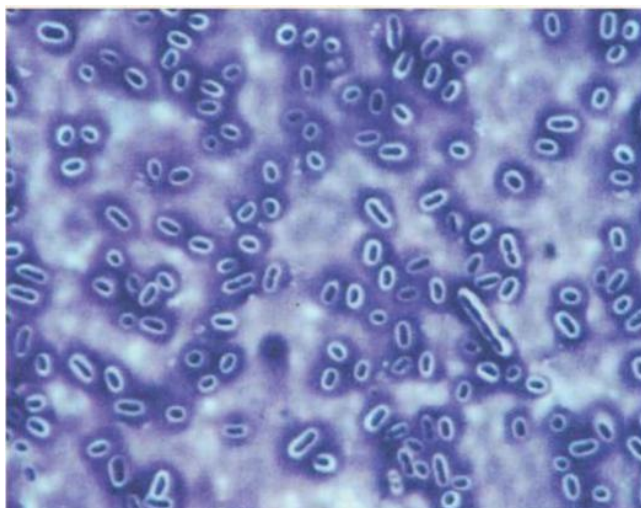


Рис. 12 - *Klebsiella pneumoniae* (×2500)

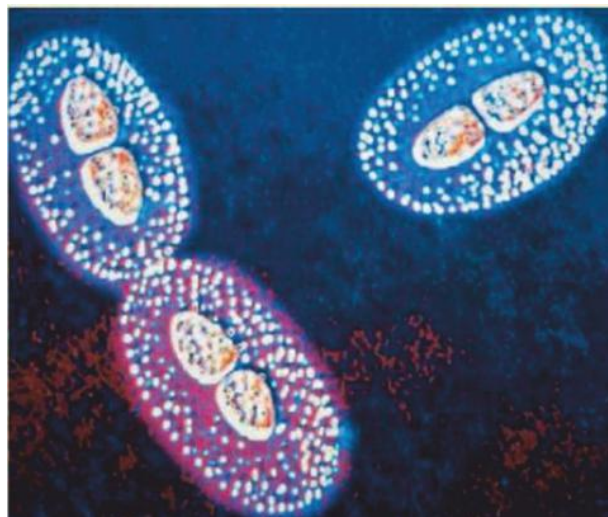


Рис. 13 - *Streptococcus pneumoniae* (×20000)

Сущность метода окрашивания капсул основана на применении явления метакромазии – при использовании одного красителя цитоплазма окрашивается в один цвет, а капсульное вещество в другой.

Методика окрашивания по Ольту

Техника. Мазок окрашивают 2-3 % водным раствором сафранина в течение 1-3 минут с последующим быстрым смыванием водой. Раствор сафранина готовят перед употреблением, растворяя краску в горячей воде с последующим фильтрованием. На мазок наносят каплю воды, накрывают покровным стеклом, а на него помещают каплю иммерсионной жидкости.

Окраска по Романовскому-Гимзе

Фиксированный мазок кладут в чашку Петри мазком вниз на подставки из стеклянной соломки или спичек и наливают рабочий раствор краски Романовского-Гимза (15-20 капель на 10 мл воды).

Через 15-20 мин препарат промывают водой и высушивают на воздухе.

Бактерии окрашиваются в темно-синий цвет, а капсулы – в розовый.



Рисунок 14 B. anthracis с капсулой в тканях (окраска по Романовскому-Гимзе)

Задание №1. Освоить методику окрашивания мазков (E.coli + B.subtilis) по Граму/

Задание № 2. Освоить методику окрашивания по Ожешко, используя культуру B.subtilis

Задание №3. Освоить методику окрашивания по Циль-Нильсену с использованием кислотоустойчивых бактерий.

ТЕМА 3: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ БАКТЕРИЙ

Некоторые бактерии обладают способностью самостоятельно двигаться благодаря наличию у них специальных органов – жгутиков.

Жгутики представляют собой нитевидные образования протоплазмы, их можно заметить только в электронный или ультрамикроскоп. Под обычным микроскопом они видны только после специальной окраски.

Чтобы обнаружить жгутики применяют специальные методы их окраски (способ Пешкова, Леффлера). Длина жгутиков достигает длины тела бактерий. Реже встречаются бактерии, которые передвигаются благодаря колебаниям и изгибам своего тела (спирохеты). Подвижность бактерий зависит от внешних условий и возраста клетки.

По характеру расположения и числу жгутиков различают:

- **монотрихи** – бактерии с одним жгутиком на одном конце клетки,
- **лофотрихи** – бактерии с несколькими жгутиками на одном из концов клетки,

- **перитрихи** – бактерии с большим числом жгутиков на всей поверхности бактериальной клетки.

Характер движения бактерии зависит главным образом от расположения жгутиков и частично от их формы тела.

Бактерии, у которых жгутики находятся на одном конце тела, двигаются обычно по прямой линии, совершая легкое колебательное движение.

У перитрихов движение сопровождается оживленным перевертыванием клетки в разные стороны.

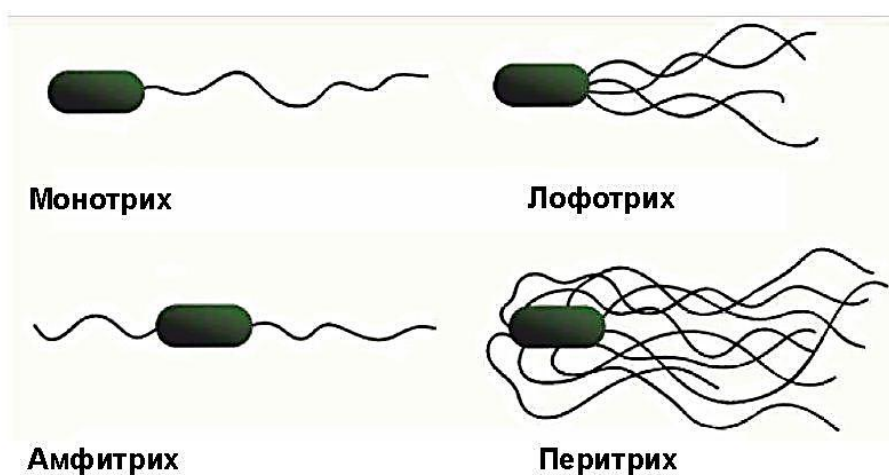


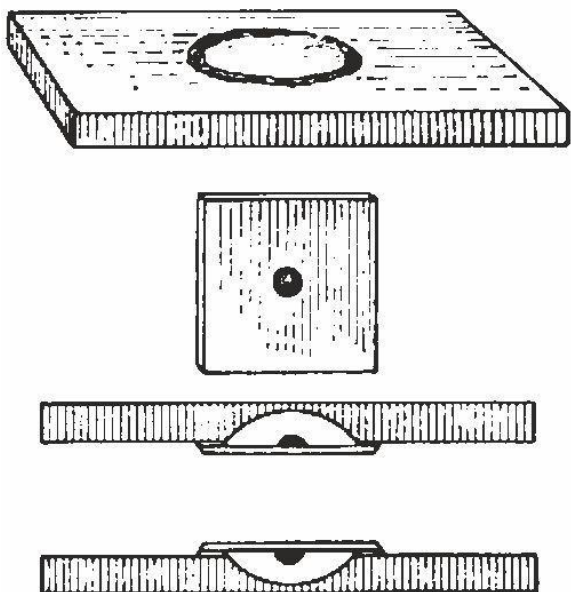
Рис. 15 - Типы жгутикования у бактерий

Для определения подвижности у бактерий необходимо использовать культуру не старше суточного возраста, так как старые культуры утрачивают способность передвигаться.

Оборудование и материалы: микроскоп, предметные стекла с луночкой, покровные стекла, вазелин, бактериологическая петля, культура *Bacillus mesentericus*.

Для приготовления «висячей капли» исследуемый материал наносят на середину обезжиренного покровного стекла. Затем берут предметное стекло с лункой, вокруг лунки наносят тонкий слой вазелина и стекло, повернув лункой, вниз прикладывают к покровному так, чтобы капля находилась в центре углубления. Предметное и покровное стекло переворачивают и капля оказывается герметично закрытой во влажной камере и защищенной от высыхания.

Для того чтобы стенки образовавшейся камеры не запотели, предметное стекло и лунку слегка увлажняют. Для исследования используют молодые (6-12-18 часовые, но не старые односуточные) бульонные культуры.



Метод «Висячая капля»

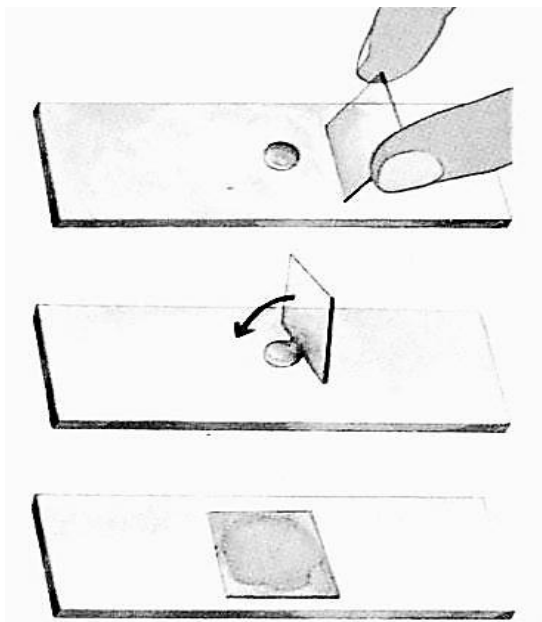
Для приготовления препарата необходимо стекло с лункой, покровное стекло, вазелин. Края лунки покрывают тонким слоем вазелина.

На покровное стекло наносят каплю культуры и осторожно накрывают покровное стекло стеклом с лункой, так чтобы капля оказалась в центре.

Склеившиеся стекла быстро переворачивают покровным стеклом вверх. Капля находится в герметичной

камере и сохраняется долгое время.

Микроскопия сначала при увеличении $8\times$. Находят край капли, а затем переводят на большое увеличение $40\times$



Метод «Раздавленная капля»

Каплю бактериальной взвеси наносят на обычное предметное стекло.

Накрывают покровным стеклом так, чтобы между стеклами не образовывались пузырьки воздуха, и капля не выходила за края покровного стекла.

Рассматривают объект при затемненном конденсоре, увеличение $\times 40$.

Метод Шукевича

Каплю микробной взвеси вносят в конденсат скошенной плотной среды (МПА) в пробирке.

Подвижные бактерии, передвигаясь из конденсата, растут на поверхности среды; неподвижные виды размножаются только в конденсате среды.

При наблюдении под микроскопом можно заметить активное движение бактерий, которые перемещаются в различных направлениях с разной скоростью.

Подвижность микроорганизмов также определяется на полужидких средах при посеве «уколом в столбик» агара:

- подвижные микроорганизмы вызывают помутнение всей толщи среды
- неподвижные растут по «уколу», оставляя остальную среду прозрачной.

Задание № 1. Провести исследование подвижности бактерий, используя метод «висячая капля».

Задание № 2. Провести исследование подвижности бактерий, используя метод «раздавленная капля».

Задание № 3. Провести исследование подвижности бактерий, используя метод Шукевича.

ТЕМА 4: МОРФОЛОГИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Материалы и оборудование: колонии микроскопических грибов, выращенные на среде Чапека и других субстратах, предметные и покровные стекла, жидкость для фиксации грибов (спирт + глицерин + вода 1:1:1), микроскоп, препаровальные иглы, спиртовка.

Грибы – бесхлорофилльные низшие эукариотические организмы.

Вегетативным телом гриба является мицелий. Мицелий образуется гифами. Гифы – ветвящиеся нитевидные клетки. Виды мицелия – субстратный и воздушный.

Высшие грибы – мицелий разделен септами (перегородками) т.е. септированный. Для прикрепления к субстрату и потребления из него питательных веществ на мицелии некоторых грибов образуются специальные выросты – ризоиды.

Низшие грибы – мицелий не септированный, представлен одной сильно разветвленной клеткой с многочисленными ядрами без перегородок (септ).

Размножение грибов:

- вегетативное (участками мицелия, спорами);
- репродуктивное (бесполое – почкование и при помощи спор; половое – слияние двух клеток с последующим редукционным делением).

Совершенные грибы – обладают способностью к половому размножению, не имеющие полового цикла называются несовершенными.

Грибы делятся на классы:

1. хитридиомицеты
2. оомицеты
3. дейтеромицеты
4. зигомицеты
5. аскомицеты
6. базидиомицеты

Методы исследования грибов

1. Визуально
2. Посев на питательные среды: 10 г исследуемого материала (зерно, шроты и др.) измельчают, заливают 100 мл дистиллированной воды, настаивают 1 час, периодически встряхивают, затем 1 мл надосадочной жидкости наносят на агар Чапека. Культивируют в течение 5-7 дней в термостате при температуре 27° С.
3. Макроскопически (под микроскопом в чашках Петри)
4. Микроскопически (метод «раздавленная капля»)

Особенности строения некоторых низших и высших грибов

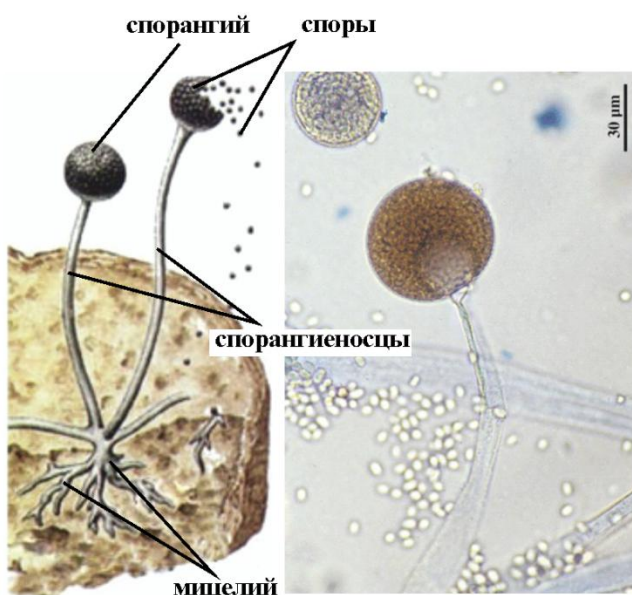


Рис. 16 - Строение Мукора

Типичными представителями **низших грибов** являются грибы рода *Mucor*, класс зигомицеты, «головчатая плесень», низшие, несовершенные.

Эндоспоры покрыты оболочкой, во влажной среде оболочка лопается, и высыпаются споры.

Грибница мукора состоит из одной сильно разросшейся, разветвленной многоядерной клетки. Спорангии со спорами образуются на вертикальных нитях

грибницы.

К **высшим грибам** относят грибы рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* и др.

Род Пенициллиум (*Penicillium*) относится к порядку гифомицетов (*Hyphomycetales*) из класса несовершенных грибов (*Deuteromycota*).

Его мицелий состоит из разветвленных нитей, разделенных перегородками на клетки, а спороношение напоминает кисть, отсюда и его название «кистевик»

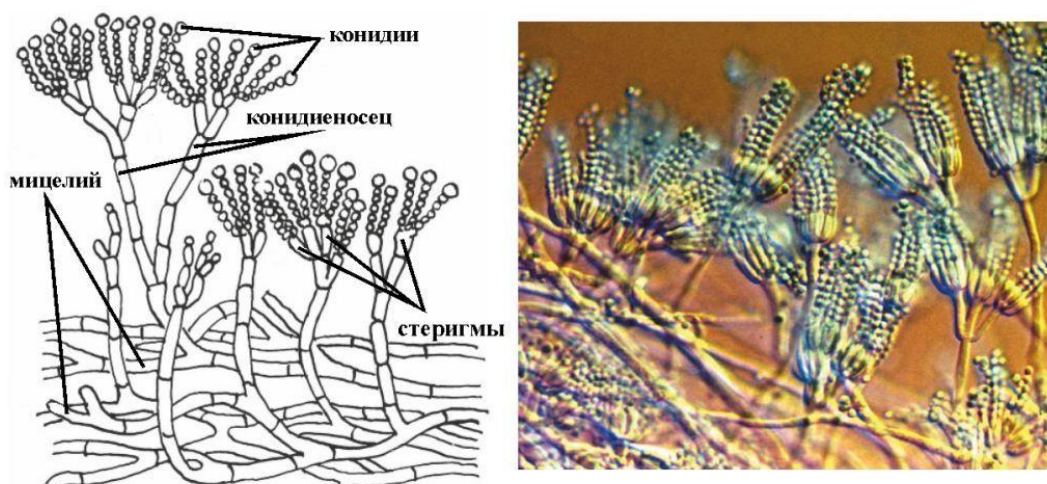


Рис. 17 - Строение гриба рода Пеницилл

На концах разветвленных конидиеносцев образуются цепочки конидий, с помощью которых пеницилл размножается.

Этот гриб встречается в виде плесени (зеленого, сизого, голубого цвета) на почве и продуктах растительного происхождения (на плодах, овощах, варенье, томатной пасте и др.).

Некоторые виды пеницилла используются для приготовления пенициллина – одного из наиболее известных антибиотиков.

- Мицелий септированный
- Конидиеносец
- Конидии (споры)

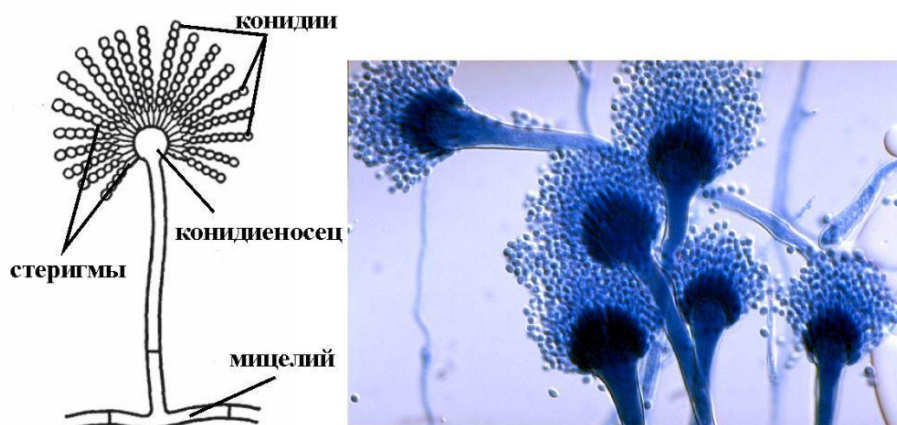


Рис. 18 - Строение гриба рода Аспергилл

Род Аспергилл (*Aspergillus*), класс дейтеромицеты, «Леечник», высшие, несовершенные. Вырабатывают пигмент различного цвета.

Стеригмы – верхушечная короткая клетка характерной формы (шаровидная, бутылочная и др.) носящая конидии.

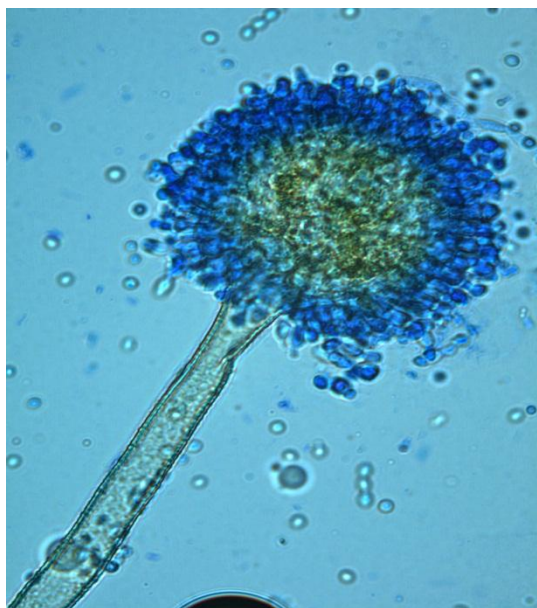


Рис. 19 - Aspergillus niger



Рис. 20 - Aspergillus flavus

Aspergillus niger – черный гриб. Конидиеносец крупный, головка шаровидная, стеригмы расположены по принципу подсолнуха. Могут быть одно- и двухярусные.

Aspergillus niger – черный гриб. Конидиеносец крупный, головка шаровидная, стеригмы расположены по принципу подсолнуха. Могут быть одно- и двухярусные.

Грибы *Aspergillus flavus* – желтый гриб, стеригмы расположены радиально к центру. Может быть одно- и двухярусный



Рис. 21 - Aspergillus nidulans

Грибы *Aspergillus nidulans* – темнозеленые колонии, в центре ярко желтого цвета, конидиеносец извилистый.

Стеригмы расположены строго вверх, всегда двухярусные, по бокам головка голая.

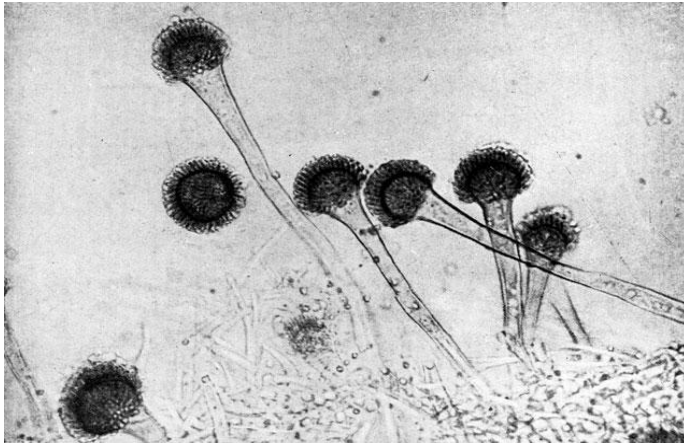


Рис. 22 - *Aspergillus fumigatus*

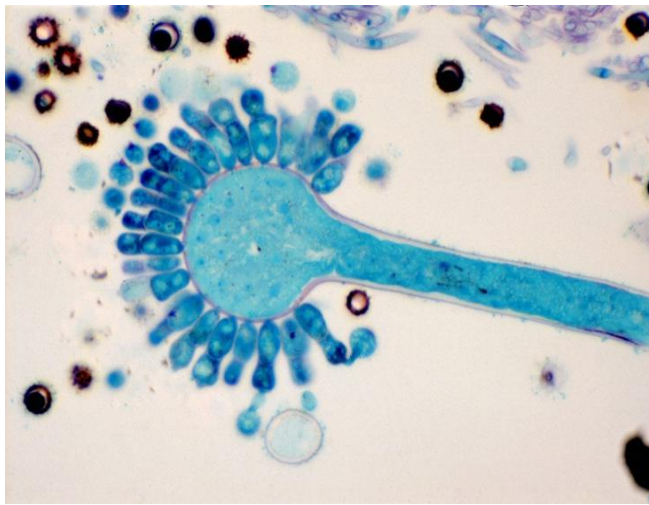


Рис. 23 - *Aspergillus candidus*

Макроконидии состоят из нескольких крупных клеток веретенообразной или серповидной формы. Микроконидии (более мелкие) образуются на воздушном мицелии, на простых или разветвленных конидиеносцах. Они чаще одноклеточные, редко с двумя-одной перегородками.

Вегетативный мицелий грибов рода *Fusarium* иногда образуют хламидоспоры, склероции.



Рис. 24 - Грибы рода *Ascomycetes*

Грибы *Aspergillus fumigatus* – зеленый гриб, колонии широкие темно-зеленого цвета, редко пушистые, войлочные. Сначала голубовато-зеленые, а при старении колонии темнеют.

Конидиеносец короткий, стеригмы одноярусные, расположены не радиально к центру.

Грибы *Aspergillus candidus* – белые порошистые колонии, четко ограниченные. Двух ярусные, стеригмы второго яруса в два раза меньше, чем стеригмы первого яруса.

У грибов рода *Fusarium* мицелий септирован, обычно окрашен в розовый, фиолетовый или другой цвет. На воздушном мицелии формируются макро- и микроконидии.

Дрожжи – относят к грибам рода *Ascomycetes*.

Это одноклеточные организмы круглой или овальной формы с двухконтурной оболочкой и ядром.

Живут в питательной среде, богатой сахарами, они разлагают сахара на спирт и углекислый газ.

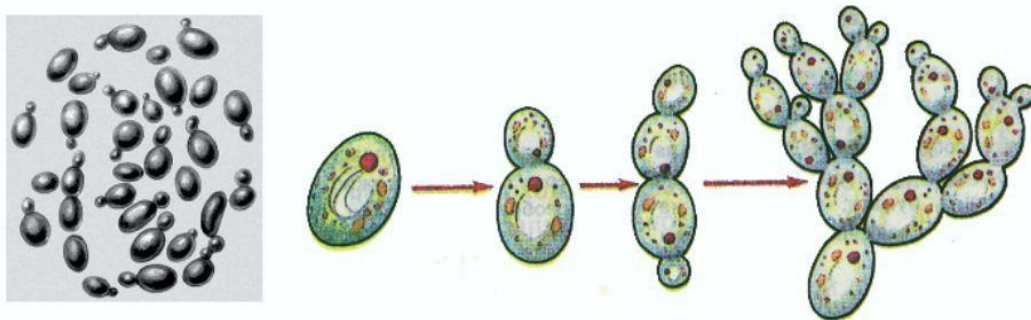


Рис. 25 - Размножение дрожжей

Размножение дрожжей происходит почкованием или делением; имеются виды дрожжей, размножающиеся половым путем. Споры полового размножения – аскоспоры – развиваются эндогенно в сумках (асках).

Человек с давних пор использует дрожжи для приготовления хлеба, пива и вина.

Задание № 1. Провести посев кормов на среды Чапека

Задание № 2. Провести исследование и дифференциацию микроскопических грибов, выросших на питательной среде

ТЕМА 5: КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ (МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, СТЕРИЛИЗАЦИЯ)

1. Понятие о культивировании микроорганизмов.
2. Способы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов
3. Техника посева микроорганизмов в жидкие и на плотные питательные среды
4. Стерилизация

Культивированием называют выращивание микроорганизмов на питательных средах в определенных условиях, а развивающийся при этом организм – культурой. Культивирование при определенной температуре называется инкубированием или инкубацией.

В лаборатории микроорганизмы выращивают на плотных и жидких питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, матрацы и чашки Петри. Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют различными методами. Внесение микроорганизмов в стерильную среду называется посевом, или инокуляцией.

Культивирование микроорганизмов можно проводить поверхностным или глубинным, периодическим или непрерывным методами, в аэробных или анаэробных условиях.

Поверхностное культивирование заключается в выращивании аэробных микроорганизмов на поверхности жидких и плотных питательных сред. При этом микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха. При поверхностном культивировании на жидких средах микроорганизмы растут в виде пленок.

Глубинное культивирование проводится на жидких питательных средах, в которых микроорганизмы развиваются во всем объеме питательной среды. Осуществляется глубинное культивирование в специальных аппаратах – **ферментаторах**, снабженных мешалками и системой подвода стерильного воздуха для обеспечения роста аэробных микроорганизмов.

Сочетание питательной среды и растущих в ней микроорганизмов называют **культуральной жидкостью**.

Аэрирование – продувание стерильного воздуха через культуральную жидкость.

Культивирование глубинным способом может быть периодическим или непрерывным.

При **периодическом методе** (глубинное культивирование) весь объем питательной среды засевают чистой культурой, и выращивание ведут в оптимальных условиях определенный период времени до накопления нужного количества целевого продукта.

Непрерывный метод характеризуется непрерывным поступлением в ферментатор свежей питательной среды и непрерывным оттоком готовой культуральной жидкости вместе с клетками введенной культуры микроорганизма.

При непрерывном культивировании можно задержать культуру на логарифмической стадии роста (или любой другой), установки могут длительно работать без остановки на дезинфекцию, время производства сокращается, процесс легче автоматизировать.

Различают гомогенно- и гетерогенно-непрерывное культивирование.

Гомогенно-непрерывный способ отличается интенсивным перемешиванием содержимого в ферментаторе, благодаря этому все параметры в любой точке аппарата и в вытекающей из него среде одинаковы.

Гетерогенно-непрерывный способ характеризуется незначительным перемешиванием среды или полным его отсутствием. При этом состав среды

в любой точке аппарата различен, однако показатели системы в целом не изменяются во времени.

Культивирование анаэробных микроорганизмов более сложно, чем выращивание аэробов, так как здесь должен быть сведен до минимума контакт микроорганизмов с молекулярным кислородом.

Для создания анаэробных условий используют различные приемы. Их подразделяют на:

- физические;
- химические;
- биологические.

Все они основаны на том, что микроорганизмы культивируют в каком-то замкнутом пространстве.

Физические методы:

культивирование в микроанаэроstate – вакуумном аппарате для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью. Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав: азот с 5 % CO_2 и 10 % H_2 .

Химические методы:

1) **Использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород.** В качестве поглотителей молекулярного кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реактивы.

2) **Использование восстанавливающих агентов**, которые добавляют в большинство сред для снижения окислительно-восстановительного потенциала среды: тиогликолат натрия, цистеин, аскорбиновая кислота.

Биологический способ:

1) **Выращивание совместно с аэробными или факультативно-анаэробными бактериями.**

Например, питательную среду в чашке Петри разделяют желобком на две половины, на одну половину засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой – анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется только после полного использования кислорода аэробом.

2) **Стерилизация** (от лат. *sterilis* – бесплодный) – полное уничтожение всех видов микроорганизмов и их спор на поверхности и внутри различных предметов, а также в жидкостях и воздухе.

Стерилизация является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. В практической работе под стерилизацией понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни, как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов, микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, различные инструменты и другие необходимые предметы с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Термин «стерильность» имеет абсолютное значение.

Различают физическую, механическую, химическую стерилизацию.

В микробиологии находят применение следующие способы стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение, из методов холодной стерилизации микробиологи используют стерилизацию фильтрованием, ультрафиолетовыми лучами и газообразными средствами. Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяются в первую очередь физико-химическими свойствами материала, подлежащего стерилизации, а иногда и целью исследования.

Физические методы стерилизации

К способам физического метода стерилизации относятся высушивание, сжигание и прокаливание, кипячение, пастеризация и тиндализация, горячий воздух (сухой жар), ультразвук, ультрафиолетовое и радиоактивное излучение, ток высокой частоты, солнечный свет.

Наиболее распространенным способом стерилизации предметов, допускающих применение высокой температуры, является стерилизация огнем, горячим воздухом и насыщенным водяным паром под давлением.

Обжигание и прокаливание широко применяется в микробиологической практике для обеззараживания инструментов, лабораторной и аптечной посуды.

Прокаливание в пламени горелки или *фламбирование* – способ стерилизации, при котором происходит полное обеспложивание объекта, так как погибают и вегетативные клетки, цисты и споры микроорганизмов. Обычно прокаливанием стерилизуют петли, шпатели, пипетки, предметные и покровные стекла, мелкие инструменты и другие зараженные предметы, если их нельзя кипятить. Не рекомендуется стерилизовать прокаливанием ножницы и скальпели, так как под воздействием огня режущая поверхность становится тупой.

Сухожаровая стерилизация осуществляется в сушильных шкафах (печах Пастера). Сухой горячий воздух оказывает бактерицидное, вирусоцидное, спороцидное действие и используется в основном для стерилизации изделий из стекла (лабораторная посуда – чашки Петри, колбы, пипетки, пробирки и др.), а также изделий из металла, которые могут быть простерилизованы паром под давлением. Наиболее эффективным режимом для этого способа стерилизации, обеспечивающего гибель вегетативных форм и спор, является температура 160-180° С в течение 15 минут.

Стерилизация насыщенным паром под давлением – это наиболее надежный и чаще всего применяемый способ стерилизации перевязочного материала, воды, некоторых лекарственных средств, питательных сред, мягкого инвентаря, инструментов, а также для обеззараживания отработанного зараженного материала. Стерилизация паром под давлением осуществляется в специальных аппаратах – автоклавах.

Полное обеспложивание материалов и предметов, не допускающих применения стерилизации высокой температурой, достигается путем повторно проводимой стерилизации водяным паром в аппарате Коха при температуре не выше 100°. Этот способ носит название *дробной стерилизации*. Он сводится к тому, что остающиеся неубитыми споровые формы микробов, через сутки в термостате при 37° прорастают в вегетативные клетки, гибель которых наступает при последующей стерилизации данного объекта текущим паром. Обработку текущим паром проводят три раза по 30-40 минут.

Однократный прогрев материала при температуре ниже 100° известен под названием *пастеризации*. Пастеризация предложена Пастером и предназначена в основном для уничтожения в основном без споровых микроорганизмов. Пастеризацию проводят при 60-70° от 15 до 30 минут, при 80° от 10 до 15 минут.

Дробная 5-6 кратная стерилизация при 60° в течение 1 часа носит название *тиндализации*.

Кипячение – способ стерилизации, применяемый для обеспложивания шприцев многократного пользования, хирургических инструментов, резиновых трубок, стеклянной и металлической посуды.

При ультрафиолетовом облучении бактерицидный эффект обеспечивают лучи длиной 200-450 нм., источником которых являются бактерицидные лампы.

Ультрафиолетовые лучи обладают высокой антимикробной активностью и могут вызывать гибель не только вегетативных клеток, но и их спор.

Солнечный свет вызывает гибель микроорганизмов в результате действия ультрафиолетового облучения и высушивания.

Радиоактивное излучение убивает все виды микроорганизмов как в вегетативной, так и в споровой форме. Оно широко применяется для стерилизации на предприятиях, выпускающих стерильную продукцию и стерильные изделия медицинского назначения одноразового пользования, для дезинфекции сточных вод и сырья животного происхождения.

Механический метод стерилизации

Стерилизация фильтрованием применяется в тех случаях, когда субстраты не выдерживают нагревания, в частности, для сред, содержащих белки, для сывороток, некоторых антибиотиков, витаминов, летучих веществ. Этот прием довольно широко применяется для стерилизации культуральной жидкости, когда необходимо освободить ее от клеток микроорганизмов, но сохранить все содержащиеся в ней продукты обмена в неизменном виде. Способ заключается в фильтровании жидкостей через специальные фильтры, имеющие мелкопористые перегородки и поэтому задерживающие клетки микроорганизмов.

Химический метод стерилизации

При химической стерилизации используют газы и средства из различных химических групп (перекисные, фенольные, альдегиды, щелочи и кислоты, поверхностно – активные вещества и др.). Для использования в быту выпускаются моющие, чистящие, отбеливающие и другие препараты, оказывающие антимикробное действие за счет введения в их состав различных химических веществ. Эти препараты используются для очистки и обеззараживания санитарно – технического оборудования, посуды, белья и пр.

Пар формальдегида (пароформ) может применяться в лечебных учреждениях для стерилизации металлических изделий медицинского назначения (скальпели, иглы, пинцеты, зонды, зажимы, крючки, кусачки и др.). Перед стерилизацией парами формальдегида изделия необходимо подвергнуть предстерилизационной очистке и тщательно просушить.

Стерилизацию химическим методом применяют несколько ограничено. Чаще всего этот метод используют для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред и иммунобиологических препаратов (вакцин и

сывороток). К питательным средам чаще всего добавляют такие вещества, как хлороформ, толуол, эфир. При необходимости освободить среду от этих консервантов ее нагревают на водяной бане при 56°C и консерванты испаряются.

Для консервации вакцин или сывороток используют мертиолат, борную кислоту, формалин.

Материалы и оборудование: бактериальные петли (иглы), бактериальные шпатели, колбы, пробирки, чашки Петри, стерильные пипетки, спиртовки, спички, культуры бактерий, питательные среды, спиртовка, термостат, микроскоп.

1. Посевы аэробов и анаэробов.
2. Питательные среды для аэробов и анаэробов

Ход работы:

1. Ознакомление со способами культивирования микроорганизмов, техникой посева на питательные среды, методами стерилизации
2. Отработать приемы пересева на плотную, жидкую среды микроорганизмов с одной пробирки, чашки Петри, колбы, в другую.
3. Ознакомиться со способами культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов, записать их в рабочей тетради. Сделать посевы сенной и кишечной палочки.

ТЕМА 6: КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ (ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ)

1. Понятие о питательных средах в микробиологии
2. Классификация питательных сред

Питательные среды в микробиологии — это субстраты, на которых выращивают микроорганизмы и тканевые культуры. Они применяются для диагностических задач, выделения и изучения чистых культур микроорганизмов, получения вакцин и лекарств, для других биологических, фармацевтических и медицинских целей.

Требования, предъявляемые 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 – С : N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;

3. Среда должна 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.

5. Среда должна быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.

6. Среда должна обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (r_h2), определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают $r_h2=41$, насыщенный водородом $r_h2 = 0$.

Облигатные анаэробы размножаются при r_h2 не выше 5, аэробы – не ниже 10.

7. Среда должна быть стерильными, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

Классификация микробиологических питательных сред

В микробиологии питательные среды разделяют на:

- среды определенного и неопределенного состава;
- натуральные, полусинтетические и синтетические;
- основные, диагностические, элективные;
- плотные, полужидкие, жидкие, сухие, сыпучие.

Натуральными питательными средами называют те, что получают из природных материалов: крови, мяса, белков, органов животных, растительных экстрактов и растительного сырья.

Примером таких сред могут быть мясной бульон, молочная сыворотка, пивное сусло, настои сена, агар-агар, кровь, желчь. Натуральные среды относятся к средам с неопределенным составом, который в разное время могут иметь разное количество тех или иных компонентов.

Полусинтетические среды тоже считаются средами с неопределенным составом. Они готовятся на основе натуральных питательных сред, но в них добавляются вещества, которые гарантируют культурам активное размножение. На полусинтетических средах выращивают культуры для получения витаминов, аминокислот, антибиотиков в промышленной фармацевтике.

Синтетические среды готовят из ингредиентов известного состава, в известной концентрации и соотношениях, поэтому эти среды относятся к средам определенного состава. С их помощью изучают метаболизм микроорганизмов, их биологические и физиологические свойства, возможность получения веществ, подавляющих или, наоборот, стимулирующих их развитие.

Основные, элективные и диагностические питательные среды

Основные среды служат для выращивания различных микробных культур, а также как основа для получения элективных и диагностических сред. К основным средам, например, относится мясной бульон, мясной агар, сусло, бульон Хоттингера.

Для разных культур в основные среды добавляют некоторые компоненты для стимулирования роста – это могут быть витамины, аминокислоты, природные экстракты. Так, возбудитель коклюша выращивается на среде с добавлением крови.

Элективные среды – среды для избирательного (селективного) выращивания биологических культур. Состав среды подбирается так, чтобы быть оптимальным для одного вида или группы близкородственных бактерий и подавлять развитие бактерий других видов.

Например, добавление в среду хлористого натрия в определенной концентрации подавляет рост всех бактерий, кроме стафилококков. С помощью элективных культур получают чистые культуры для дальнейшего размножения и накопления.

Диагностические среды служат для идентификации микроорганизмов. По изменению среды и ее химического состава (изменению окраски среды, появлению пузырьков газа и т.п.) определяют вид бактерий. В такие среды часто добавляют химические красители-индикаторы, такие как кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый, метиленовый синий, фуксин и другие. Они помогают разделить близкие культуры.

Скажем, в розовой среде Эндо, подкрашенной фуксином, кишечная палочка образует колонии красного цвета, а тифозные и дизентерийные колонии бактерий – бесцветные.

Материалы и оборудование: приготовленные питательные среды МПА, МПБ, Эндо, пипетки, бумага, вата, марля, пробирки, посевы с предыдущего занятия.

Сухие питательные среды для демонстрации

Ход работы:

1. Определить рост микроорганизмов на разных питательных средах, сделать посевы.
2. Описать демонстрационные среды: название среды, способы их приготовления, свойства, предназначение, дату реализации, производителя в рабочей тетради.

ТЕМА 7: МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

1. Определение чистой культуры

2. Освоение различных методов выделения чистых культур

Чистой культурой микроорганизмов называют популяцию микроорганизмов одного вида, полученную из изолированной микробной колонии.

Под колонией подразумевается потомство бактерий, возникающее в результате размножения одной микробной клетки. Выделение чистой культуры микроорганизмов является обязательным этапом всякого бактериологического исследования.

Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма. Для выделения чистых культур микроорганизмов из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору, предложено много различных методов

Для получения чистой культуры используют две основные группы методов:

- а) методы, основанные на принципе механического разделения микроорганизмов;
- б) методы, основанные на биологических свойствах микроорганизмов.

Методы, основанные на принципе механического разделения микроорганизмов

Рассев шпателем по Дригальскому. Берут 3 чашки Петри с питательной средой. На 1-ю чашку петлей или пипеткой наносят каплю исследуемого материала и растирают шпателем по всей поверхности питательного агара.

Затем шпатель переносят во 2-ю чашку и втирают оставшуюся на шпателе культуру 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 одной из чашек вырастают отдельные колонии, пригодные для выделения чистой культуры микроорганизма.

Метод Пастера (метод разведений). Из исследуемого материала готовят ряд последовательных, чаще десятикратных серийных разведений в жидкой стерильной среде или физиологическом растворе в пробирках. Далее высевает материал газоном по 0,5 мл из каждой пробирки. Предполагают, что в одной из пробирок останется количество микроорганизмов, поддающихся подсчету при высеве на пластинчатые среды. Этот метод дает возможность подсчитать микробное число в исследуемом материале. (Микробное число – количество колоний на последней чашке с ростом микроорганизмов, умноженное на степень разведения материала).

Рассев петлей (посев штрихами). Берут одну чашку Петри с питательным агаром и делят ее на 4 сектора, проводя разграничительные линии на внешней стороне дна чашки. Исследуемый материал петлей вносят в первый сектор и проводят ею параллельные линии по всему сектору на расстоянии одна от другой около 5 мм.

Этой же петлей, не изменяя ее 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 вырастают отдельные колонии. Кроме того, можно наливать разведенные растворы смешанной культуры на поверхность твердых сред в чашках.

Метод фильтрации. Метод основан на пропускании исследуемого материала через специальные фильтры с определенным диаметром пор и разделении содержащихся микроорганизмов по величине. Этот метод при-

меняется главным образом для очистки вирусов от бактерий, а также при получении фагов и токсинов (в фильтрате – чистый фаг, очищенный токсин)

Метод Коха (метод глубинного посева). Исследуемый материал вносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой в пробирку с расплавленной плотной питательной средой.

Равномерно размешивают содержимое пробирки, вращая ее между ладонями. Каплю разведенного материала переносят во вторую пробирку, из второй – в третью и т.д. Содержимое каждой пробирки, начиная с первой, выливают в стерильные чашки Петри.

После застывания среды в чашках, их помещают в термостат для культивирования.

Материалы и оборудование: приготовленные среды: МПА, среда Эндо. Посевной материал предыдущего занятия, пробирки, колбы, чашки Петри, микробиологические петли, шпатели Дригальского.

Ход работы:

1. Из посевов предыдущего занятия сделать мазки и окрасить их по Граму и микроскопируя, определить чистоту выделенных культур
2. Из предполагаемых чистых культур сделать пересевы для изучения культуральных и биохимических свойств бактерий.

ТЕМА 8: КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Рост микробных культур на различных средах
2. Основные признаки колоний выросших на поверхности плотных питательных сред.
3. Особенности роста микроорганизмов на жидких и п/жидких питательных средах.

Культуральные свойства микроорганизмов определяются характером роста их в плотных, жидких и полужидких питательных средах. Культуральные свойства характерны для каждого вида микроорганизмов и являются важным признаком.

На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона.

Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее из одной клетки.

В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате.

При их описании учитывают следующие признаки:

1) Форма колонии

Форма колоний: круглая, круглая с фестончатым краем, круглая с валиком по краю, ризоидная, с ризоидным краем, амёбовидная, нитевидная, складчатая, неправильная, концентрическая, сложная.

2. Размер (диаметр) колонии – измеряют в мм, если размер колонии не превышает 1 мм, то ее называют точечной, 1-2 мм – мелкой, 2-4 мм – средней, 4-6 и более мм – крупной.

3. Прозрачность. Колонии могут быть прозрачными, пропускающими свет, и мутными, через которые не видны контуры предметов.

4. Контур края. Различают гладкий (S) и шероховатый (R) контур края.

Контур края: гладкий (S), волнистый, зубчатый, лопастной, неправильный, реснитчатый, нитчатый, ворсинчатый, ветвистый.

5. Рельеф колонии (профиль): изогнутый, кратерообразный, бугристый, врастающий в агар, плоский, выпуклый, каплевидный, конусовидный.

Рельеф характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Рельеф колонии определяется невооруженным глазом или под лупой при рассматривании сверху и сбоку.

6. Поверхность колонии – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная.

7. Цвет. Эта культуральная характеристика выявляется при наличии в бактериальных клетках пигментов. Цвет колоний иногда является видовым признаком и входит в название. Иногда пигменты бактерий выделяются в субстрат и окрашивают ее.

8. Структура. Структура колоний определяется в проходящем свете при слабо увеличении микроскопа. У пигментированных колоний она не

определяется. Структура колоний: однородная, мелкозернистая, крупнозернистая, струйчатая, волокнистая

9. **Консистенция колоний** исследуется посредством прикосновения микробиологической петлей. По консистенции колонии бывают:

- пастообразные, легко снимающиеся и размазывающиеся по поверхности питательной среды наподобие сливочного масла;
- вязкие или слизистые, прилипающие и тянущиеся за петлей;
- волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности плотной – хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли;
- крошковатые;
- плотные, врастающие в среду.

На жидких питательных средах выявляются следующие формы роста бактерий:

1. Рост бактерий с равномерным помутнением среды, цвет которой остается неизменным или изменяется в соответствии с цветом водорастворимого пигмента, образующегося в культуре микроорганизма. Такой рост характерен для многих патогенных бактерий, относящихся к группе факультативных анаэробов.

2. Придонный рост бактерий характеризуется образованием осадка на дне пробирки с жидкой питательной средой. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Придонный рост характерен для бактерий с анаэробным типом дыхания.

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

4. Поверхностный рост бактерий характеризуется появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки, внешний вид и характер которой могут быть различными. Рост бактерий в виде поверхностно плавающей пленки характерен для микроорганизмов-аэрофилов.

Для выявления особенностей роста на полужидкой питательной среде исследуемую культуру засевают в столбик 0,2–0,5 %-ного полужидкого агара для того, чтобы особенности роста проявлялись особенно четко, прокол среды делают в непосредственной близости к стенке пробирки. Посев,

произведенный таким образом, дает возможность дифференцировать подвижные виды микроорганизмов от неподвижных.

Материалы и оборудование:

1.Среды с посевами с предыдущей лабораторной работы, посевы на МПЖ, МПА.

2. Микроскоп, измерительная математическая линейка, увеличительная лупа, бактериологическая петля.

Ход работы:

1.Изучают посевы предыдущего занятия, зарисовывают колонии в таблицу рабочей тетради.

2.Из отмеченных колоний делают пересевы на МПА (сенную палочку) и Эндо (кишечную палочку). Из данных колоний готовят мазки окрашивая их по Граму, морфологические свойства микроскопируемых бактерий заносят в таблицу рабочей тетради.

ТЕМА 8: БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Биохимические свойства – способность микроорганизмов к ферментации и ассимиляции тех или иных химических веществ

Биохимическая активность микроорганизмов очень разнообразна и обусловлена наличием у них специальных ферментных систем, а также условиями окружающей среды.

Ферменты играют важную роль в жизнедеятельности микробов – они участвуют в различных биохимических реакциях, лежащих в основе питания, дыхания, роста и размножения микроорганизмов.

Микроорганизмы разных видов при оптимальных условиях продуцируют постоянные ферменты; отдельные виды микробов обладают способностью расщеплять только белки и углеводы с образованием конечных продуктов распада, а некоторые – окислять и восстанавливать различные субстраты.

Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы. Микробная клетка, подобно клеткам высших организмов, оснащена достаточно активным ферментативным аппаратом. Ферменты микроорганизмов обладают теми же свойствами и функциями, что и ферменты высших организмов.

Ферменты «есть в полном смысле возбудители жизни», – писал академик И.П. Павлов.

Все биохимические реакции в клетках совершаются только при участии этих биологических катализаторов. **Ферменты** – это белки: простые и сложные, состоящие из белка и небелкового компонента (кофактора). В состав сложных белков могут входить различные металлы: железо, кобальт, медь, цинк и др. и простатическая группа (кофермент), которая может быть представлена органическими соединениями, витаминами или их производными, азотистыми основаниями и др.

Простатическая группа обуславливает активность ферментов, а белковая часть – избирательные свойства.

Ферментов огромное множество, что объясняется спецификой их действия: конкретный фермент взаимодействует только с конкретным веществом и, соответственно, катализирует только одно превращение. Например, фермент лактаза катализирует расщепление только молочного сахара (лактозы) на глюкозу и галактозу и не действует на другие углеводы; фермент каталаза расщепляет только пероксид водорода с образованием воды и свободного кислорода и т.д.

Ферменты чрезвычайно активны. Небольшого количества фермента достаточно на огромную массу субстрата.

Например, грамм амилазы при благоприятных условиях может превратить в сахар тонну крахмала. Интересно, но сами ферменты в реакции не расходуются. Характерной особенностью ферментов, отличающей их от неорганических катализаторов, является их специфичность действия: известная фраза: «субстрат и фермент подходят друг к другу, как ключ к замку» характеризует это как нельзя лучше.

Катализируемая ферментом реакция начинается со связывания субстрата с белковой частью фермента в определенном ее участке – активном центре. Образуется комплекс «фермент – субстрат».

По окончании реакции образовавшийся комплекс фермента с продуктами реакций распадается с освобождением исходного фермента и конечных продуктов ферментативного процесса. Ферменты отличаются неустойчивостью к воздействию некоторых факторов внешней среды, что объясняется белковой природой ферментов.

Потеря ферментами активности называется **инактивацией** (от лат. *in* – не + *activus* – действенный).

Все биохимические процессы, протекающие в микробных клетках, регулируются ферментами, поэтому любой фактор, действующий на активность фермента, будет действовать и на сам микроорганизм. Среди ферментов микроорганизмов много таких, которые встречаются и у растений, и у животных, но существуют и ферменты только «микробиологического происхождения».

В живой клетке действие ферментов происходит упорядоченно, строго согласованно. Ферменты расположены в различных клеточных структурах (мезосомах, митохондриях, цитоплазматической мембране и др.)

Хотя ферменты вырабатываются клеткой только при жизни, они временно остаются в активном состоянии и после ее гибели.

Например, под действием собственных ферментов происходит автолиз (от греч. *Autos* – сам + *lysis* – растворение) погибших микробных клеток. Процесс саморастворения (самопереваривания) микробных клеток под влиянием внутриклеточных ферментов – естественный этап в разрушении живого в цепи круговорота веществ в природе. Как уже говорилось о роли микроорганизмов в минерализации всего ушедшего из жизни живого, микроорганизмы – «мусорщики». Процесс автолиза объясняет великую мудрость природы – после гибели микроорганизмов их клетки разлагать некому, поэтому они делают это сами.

На внеклеточной активности ферментов основано использование ферментных препаратов микробного происхождения в различных биохимических производствах. Но эта же активность может приводить и к негативным результатам: например, при отсутствии живых клеток в контаминированном продукте его качество может снижаться за счет действия ферментов погибших микроорганизмов.

С самого начала открытия ферментов их названия носили случайный характер.

Например, фермент, расщепляющий крахмал, был назван диастазом, а фермент желудочного сока, расщепляющий белки, – пепсином.

Позднее названия ферментов стали составлять из корней слов, обозначающих вещества, на которые действует фермент, добавляя к нему окончание «аза». Фермент, расщепляющий крахмал (амилум), называли амилазой, фермент, разлагающий мальтозу, – мальтазой и т.п. Наряду с этим ферменты называют, но химическим процессам, которые они катализируют.

Например, ферменты, катализирующие отщепление водорода от субстрата (дегидрогенирование), называют дегидрогеназами, а

расщепляющие сложные органические соединения путем гидролиза – гидролазами.

В соответствии с действующей в настоящее время классификацией ферментов (Правила номенклатуры ферментов, принятые в 1972 г.) все ферменты разделены на шесть классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы.

В настоящее время во многих отраслях промышленности ферменты микробного происхождения вытесняют ферменты растительного и животного происхождения. Десятки различных ферментов в виде индивидуальных ферментных белков и технических препаратов разной степени очистки производятся в промышленном масштабе с использованием культур плесневых грибов, бактерий, дрожжей.

Примером использования ферментов микробного происхождения является производство этилового спирта, когда в сырье, содержащее крахмал, вместо зернового солода добавляют амилалитические ферменты из грибов. При производстве хлеба солод заменяют ферментами микробного происхождения, при этом повышаются качество изделий, их органолептические показатели. При производстве пива использование ферментов позволяет заменить солод.

Использование глюкоамилазы из грибов позволяет из крахмала получать глюкозу и патоку. При производстве соков и вин пектолитические грибные ферменты используются для разрушения пектинов, что ускоряет процесс выделения сока и повышает его выход. При производстве сыра вместо сычужного фермента используются ферменты микробного происхождения. Имеется опыт использования пептидаз микробного происхождения для размягчения мяса, ускорения его созревания, в различных технологических процессах при переработке сырья.

Материалы и оборудование:

1.Посевы предыдущего занятия

2.Питательные среды для изучения биохимических свойств выделенных культур: МПА с глюкозой, МПА с лактозой, МПБ, молоко снятое, молоко с метиленовой синью, индикаторная бумага, фильтровальная бумага пропитанная и высушенная 12% р-ом щавелевой кислоты и 5% р-ом уксусно-кислого свинца

Ход работы. 1. Визуально исследовать каждую засеянную среду.

2. Подробные результаты исследований занести в таблицу и определить вид выделенных культур с указанием их ферментативного состава.

3. По мере просмотра посевов определить биохимические свойства изучаемых культур: какие «сахара» они расщепляют, конечные продукты распада, действующие ферменты

ТЕМА 9: АНТИБИОТИКИ

1. Понятие антибиотиков.
2. Классификация антибиотиков.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
4. Побочные эффекты действия антибиотиков

Слово **антибиотик** произошло от термина «антибиоз». Впервые понятие «антибиоз» было использовано в 1899 г. для описания явлений бактериального антагонизма (от греч. «*antagonizmai*» – соперничество). Термин антибиотик в 1942 году предложил американский микробиолог и биохимик Зельман Абрахам Ваксман.

Британский микробиолог Александр Флеминг в 1928 г. установил, что в чашках Петри с культурой золотистого стафилококка, загрязненной плесневым грибом *Penicillium notatum*, рост микроорганизмов отсутствовал. Он решил, что зеленая плесень содержит и выделяет что-то мешающее росту стафилококков. Это что-то и оказалось тем веществом – пенициллином, которая выделяла плесень во внешнюю среду. Флеминг работал с неочищенным фильтратом, фильтрат задерживал рост различных микробов, даже будучи разведенным, в несколько сотен раз и не был ядовит для животных. Эти первые сведения о пенициллине были опубликованы в 1929 году. Но понадобилось еще 12 лет, чтобы пенициллин был выделен в кристаллическом виде и его можно было вводить больным.

В 1941 г. английский фармаколог Говард Флори и британский биохимик Эрнст Чейн выделили пенициллин в чистом виде, а в 1942 г. в СССР советский микробиолог и эпидемиолог Зинаида Виссарионовна Ермольева получила в чистом виде пенициллин (крустозин) из *Penicillium crustosum*.

Антибиотики (от греч. «*anti*» – против, «*bios*» – жизнь) – это химические вещества биологического происхождения (или их синтетические

производные), избирательно тормозящие рост и размножение или убивающие микроорганизмы.

Эта группа включает сотни препаратов различной химической структуры, отличающихся спектром и механизмом действия, побочными эффектами и показаниями к применению.

Антибиотики классифицируют:

- по происхождению,
- механизму действия,
- типу действия на клетку.
- химической структуре,
- спектру действия,
- направленности действия.

I. Классификация антибиотиков по происхождению

1. Природные (натуральные) антибиотики – штаммы-продуценты антибиотиков выращивают на искусственных питательных средах, а за тем антибиотик извлекают из питательной среды химическими методами.

Природные антибиотики в зависимости от продуцентов подразделяются:

1.1. Антибиотики, полученные из грибов, например рода *Penicillium* (пенициллин), рода *Cephalosporium* (цефалоспорины).

1.2. Антибиотики, полученные из актиномицетов. Группа включает около 80% всех антибиотиков. Среди актиномицетов основное значение имеют представители рода *Streptomyces*, являющиеся продуцентами стрептомицина, эритромицина, левомицетина, тетрациклина.

1.3. Антибиотики, продуцентами которых являются собственно бактерии. Чаще всего с этой целью используют представителей рода *Bacillus* и *Pseudomonas*. Примерами антибиотиков данной являются полимиксины, бацитрацины, грамицидин.

1.4. Антибиотики животного происхождения (получают из тканей высших животных, человека и рыб); из рыбьего жира выделяют эктерицид, из молок рыб – экмолин, из эритроцитов – эритрин.

1.5. Антибиотики растительного происхождения. К ним можно отнести фитонциды, которые выделяют лук, чеснок, сосна, ель, сирень, другие растения. В чистом виде они не получены, так как являются чрезвычайно нестойкими соединениями. Антимикробным действием обладают многие растения, например, ромашка, шалфей, календула.

2. Полусинтетические антибиотики – на начальной стадии производства вещество получают из натурального сырья, а затем продолжают искусственно синтезировать препарат, изменяя химическую структуру природного антибиотика.

3. Синтетические антибиотики представляют собой химические аналоги природных антибиотиков и синтезированные антибиотики, не имеющие природного аналога.

II. Классификация антибиотиков по механизму действия

С учетом механизма действия антибиотики разделяют на пять основных групп:

1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки (β -лактамы (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы (н-р, азтреонам), карбапенемы (н-р, имипенем)), бацитрацины, гликопептиды, циклосерин, фосфомицин, ванкомицин, тейкопланин и др.). Препараты этой группы проявляют наиболее избирательное действие, так как все они *влияют на синтез пептидогликана клеточной стенки бактерий*, отсутствующего в клеточных мембранах эукариотических клеток.

2. Ингибиторы функций и структуры цитоплазматической мембраны. (полимиксины, полиеновые антибиотики (н-р, нистатин, леворин, амфотерицин), грамицидины). Цитоплазматическая мембрана служит селективно проницаемым барьером, нарушение её функций приводит к выходу из клетки белков, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, ионов с последующей её гибелью.

3. Ингибиторы синтеза белка, в частности, ингибиторы синтеза белка на уровне рибосом. (аминогликозиды (н-р, стрептомицин, каамицин, гентамицин, стрептомицин, тобрамицин, амикацин и др.), тетрациклины (н-р, окситетрациклин, доксициклин, миноциклин и др.), хлорамфеникол, макролиды (н-р, эритромицин, олеандомицин, спирамицин, рокситромицин, кларитромицин и др.), азалиды (н-р, азитромицин), линкозамиды (н-р, линкомицин, клиндамицин). Ингибиторы синтеза белка нарушают функциональные свойства рибосом. Бактерии имеют 70 S рибосомы, а клетки млекопитающих – 80 S рибосомы.

Субъединицы этих типов рибосом и их функциональная специфичность весьма различна, что и объясняет подавление синтеза белка антибиотиками на бактериальных рибосомах без выраженного влияния на рибосомы млекопитающих.

4. Ингибиторы транскрипции и синтеза нуклеиновых кислот, в частности, ингибиторы РНК и ДНК-полимеразы, матричных функций ДНК. (анзамицины (рифампицин), фторхинолоны, актиномицин, нитрофураны, новобиоцин и др.). Наблюдается ингибирование ДНК-зависимой РНК-полимеразы, что приводит к торможению синтеза любых видов бактериальной РНК.

5. Модификаторы энергетического объема (антиметаболиты). (сульфаниламиды, изониазид). Ингибируют активность ферментов, участвующих в синтезе жизненно необходимых кислот, являющихся основными структурными компонентами бактерий.

III. Классификация антибиотиков по типу действия на клетку

В зависимости от типа воздействия на микробную клетку антибиотики классифицируют на две группы:

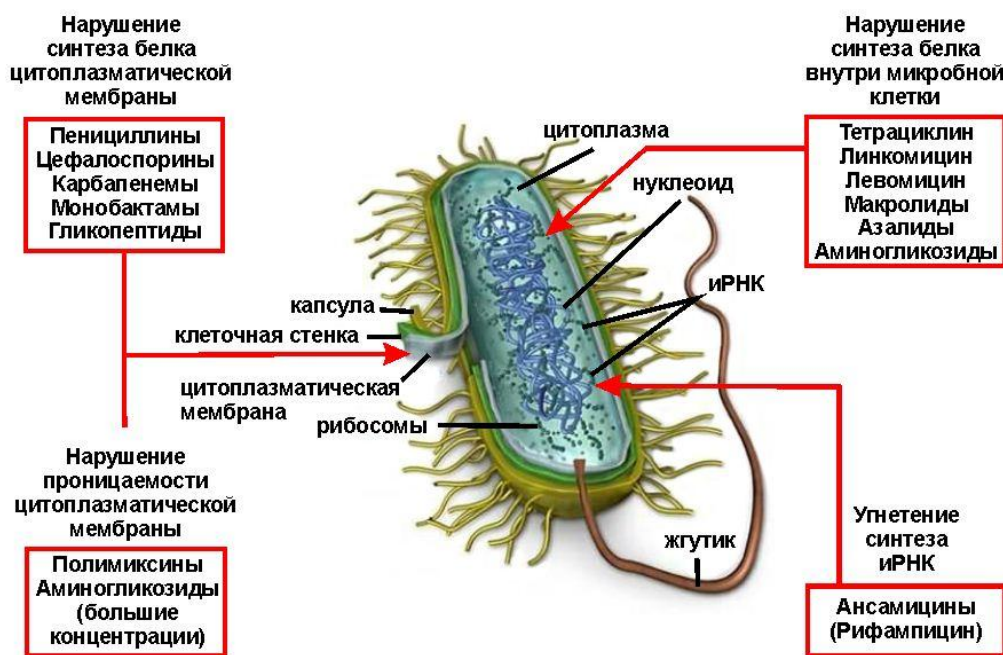


Рис. 26. Виды воздействия на микробную клетку антибиотиков

1. **Бактерицидные** – вызывают гибель микробной клетки (пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, рифампицин, полимиксины и др.);

2. **Бактериостатические** – задерживают рост микробной клетки (макролиды, тетрациклины, линкомицин, хлорамфеникол и др.).

IV Классификация антибиотиков по химической структуре

1. **Бета-лактамные антибиотики** – основу из молекулы составляет бета-лактамное кольцо. К ним относятся:

- **пенициллины** – это группа природных и полусинтетических антибиотиков, молекула которых содержит 6-аминопенициллановую кислоту, состоящую из двух колец – тиазолидонового и бета-лактамного. Среди них выделяют:
- **биосинтетические** (пенициллин G - бензилпенициллин),
- **аминопенициллины** (амоксациллин, ампициллин, бекампациллин),
- **полусинтетические «антистафилококковые» пенициллины** (оксациллин, метициллин, флоксациллин, диклоксациллин, флуоксациллин), основное преимущество которых – устойчивость к микробным бета-лактамазам, в первую очередь, стафилококковым.

2. **Цефалоспорины** – это природные и полусинтетические антибиотики, полученные на основе 7-аминоцефалоспориновой кислоты и содержащие цефемовое (также бета- лактамное) кольцо, т.е. по структуре они близки к пенициллинам. Они делятся на цефалоспорины:

- 1-го поколения: цепорин, цефалотин, цефалексин;
- 2-го поколения: цефазолин (кефзол), цефамезин, цефамандол (мандол);
- 3-го поколения: цефуроксим (кетоцеф), цефотаксим (клафоран), цефуроксим аксетил (зиннат), цефтриаксон (лонгацеф), цефтазидим (фортум);
- 4-го поколения: цефепим, цефпиром (цефром, кейтен) и другие.
- монобактамы – азтреонам (азактам, небактам);
- карбопенемы – меропенем (меронем) и имипинем. Причем имипинем применяют только в комбинации со специфическим ингибитором почечной дегидропептидазы циластатином – имипинем/циластатин (тиенам).

3. **Аминогликозиды** – они содержат аминсахара, соединенные гликозидной связью с остальной частью (агликоновым фрагментом) молекулы. К ним относятся: стрептомицин, гентамицин (гарамицин), канамицин, неомицин, мономицин, сизомицин, тобрамицин (тобра) и полусинтетические аминогликозиды – спектиномицин, амикацин (амикин), нетилмицин (нетиллин).

4. **Тетрациклины** – основу молекулы составляет полифункциональное гидронафтаценовое соединение с родовым названием тетрациклин. Среди них имеются природные тетрациклины – тетрациклин, окситетрациклин (клинимицин) и полусинтетические тетрациклины – метациклин, хлортетрин, доксициклин (вибрамицин), миноциклин, ролитетрациклин.

5. **Макролиды** – препараты этой группы содержат в своей молекуле макроциклическое лактоновое кольцо, связанное с одним или несколькими углеводными остатками. К ним относятся: эритромицин, олеандомицин, рокситромицин (рулид) азитромицин (сумамед), кларитромицин (клацид), спирамицин, диритромицин.

6. **Линкозамиды** – к ним относятся: линкомицин и клиндамицин. Фармакологические и биологические свойства этих антибиотиков очень близки к макролидам, и, хотя в химическом отношении это совершенно иные препараты, некоторые медицинские источники и фармацевтические фирмы – производители химиопрепаратов, например, делацина С, относят линкозамиды к группе макролидов.

7. **Гликопептиды** – препараты этой группы в своей молекуле содержат замещенные пептидные соединения. К ним относятся: ванкомицин (ванкацин, диатрацин), тейкопланин (таргоцид), даптомицин.

8. **Полипептиды** – препараты этой группы в своей молекуле содержат остатки полипептидных соединений, к ним относятся: грамицидин, полимиксины М и В, бацитрацин, колистин.

9. **Полиены** – препараты этой группы в своей молекуле содержат несколько сопряженных двойных связей. К ним относятся: амфотерицин В, нистатин, леворин, натамицин;

10. **Антрациклиновые антибиотики** – к ним относятся противоопухолевые антибиотики: доксорубицин, карминомицин, рубомицин, акларубицин.

Есть еще несколько достаточно широко используемых в настоящее время в практике антибиотиков, не относящихся ни к одной из перечисленных групп – фосфомицин, фузидиевая кислота (фузидин) рифампицин.

V. Классификация антибиотиков по противомикробному спектру

1. **Антибиотики широкого спектра действия**, активные в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий: хлорамфеникол, тетрациклины, аминогликозиды, полусинтетические пенициллины широкого спектра действия (ампициллин, азлоциллин и др.) и цефалоспорины 2-го поколения.

2. **Антибиотики узкого спектра действия** – препараты, действующие преимущественно на грамположительные или грамотрицательные кокки (стафилококки, стрептококки, менингококки, гонококки), некоторые грамположительные микробы (коринебактерии, клостридии).

К этим препаратам относятся бензилпенициллин, бициллины, феноксиметилпенициллин, пенициллиназоустойчивые пенициллины (оксациллин, метициллин), цефалоспорины 1-го поколения, макролиды, ванкомицин, линкомицин.

Антибиотики с преимущественной активностью в отношении грамотрицательных палочек (полимиксины, цефалоспорины 3-го поколения).

Противотуберкулезные антибиотики (стрептомицин, рифампицин, флоримицин).

Противогрибковые антибиотики (нистатин, леворин, гризеофульвин, амфотерицин В, кетоконазол, анкотил, дифлюкан и др.).

VI. Классификация антибиотиков по направленности действия:

1. **Антибактериальные препараты** это группа соединений природного или синтетического происхождения эффективная в отношении микробных агентов (н-р, сульфаниламиды, хинолоны, производные нитроимидазола, производные нитрофурана, диаминопиримидины и др.).

2. **Противопаразитарные препараты** – различные по химической структуре соединения, применяющиеся при инфекциях, вызванных одноклеточными простейшими: малярийными плазмодиями, лямблиями, амебами и др. (н-р, метронидазол, алимезол, трихопол и др.).

3. **Противогрибковые препараты** – лекарственные средства, которые обладают фунгицидным (уничтожение грибкового возбудителя) и фунгистатическим (подавление размножения грибкового возбудителя) действием и применяются для профилактики и лечения грибковых заболеваний (микозов) (н-р, гризеофульвин, азолы (имидазолы и триазолы) (н-р, клотримазол, миконазол, итраконазол, кетоконазол), фторцитозин (флуцитозин), аморолфин, аллиламины (нафтифин, тербинафин)).

4. **Противовирусные препараты** – лекарственные средства, предназначенные для лечения и профилактики различных вирусных заболеваний: гриппа, герпеса, ВИЧ-инфекции и др. (н-р, алпиразин, интерферон, бонафтон и др.).

5. **Противоопухолевые препараты** – механизм цитотоксического антрациклиновых антибиотиков связан с ингибированием синтеза нуклеиновых кислот (н-р, доксорубин, эпирубин, карубин и др.).

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам основано на двух основных принципах:

1) *диффузии препарата в агар из бумажных дисков, полосок или лунок* (в настоящее время существуют две основные *модификации диффузионного метода: дискодиффузионный и E-тест*);

2) *серийных (стандартных) разведений* в жидкой или плотной питательной среде.

Критериями активности того или иного препарата выступают *минимальная ингибирующая концентрация (МИК)* – наименьшая концентрация препарата, тормозящая рост тест-культуры и *минимальная бактерицидная концентрация (МБК)* – наименьшая концентрации препарата, вызывающая бактерицидный эффект.

Метод бумажных дисков (дискодиффузионный метод).

Метод наиболее прост и широко используется в клинической практике. Образование зоны ингибиции роста происходит в результате диффузии антибиотиков из носителя (диска) в питательную среду (рис. 28). Основным



Рис. 27 - Диффузионный метод с использованием бумажных дисков

результатом является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности.

Методика. Используют стандартные диски, содержащие определенное количество антибиотиков, и стандартную питательную среду, необходимую для роста данного вида микроорганизма.

Из суточной микробной культуры готовят взвесь на физиологическом растворе (1 млрд. микробных тел в 1 мл) и разводят ее в 10 раз. На поверхность чашки с плотной средой наносят 1 мл микробной культуры и покачиванием чашки или стерильным шпателем равномерно распределяют ее по всей поверхности среды. Остаток удаляют пипеткой или сливают в

дезинфицирующий раствор. Среду подсушивают 10-15 мин при комнатной температуре, после чего на поверхность газона стерильным пинцетом накладывают диски с антибиотиками (не более 6 на чашку диаметром 10 см) на расстоянии $>1,5$ см друг от друга и от краев чашки. Условия инкубации зависят от вида микроорганизма (для большинства видов – в термостате при 37°C в течение 24 ч.).

Учет результатов. Проводят определение диаметра зоны задержки роста (с учетом диаметра диска). Размеры зон, полученные в опыте, сравнивают с величинами зон задержки роста, указанными в инструкциях, прилагаемых к дискам. После чего исследуемую культуру относят к одной из трех категорий: *чувствительная, умеренно-чувствительная и устойчивая.*

Е-тест.

Е-тест (от англ. «*ellipse*» – эллипс, так как при наличии чувствительности образуется зона задержки роста эллиптической формы) – модификация метода дисков, но вместо последних используют полоски из фильтровальной бумаги, пропитанные различными концентрациями (от минимальных до максимальных) препаратов, каждая из этих зон имеет соответствующую маркировку.

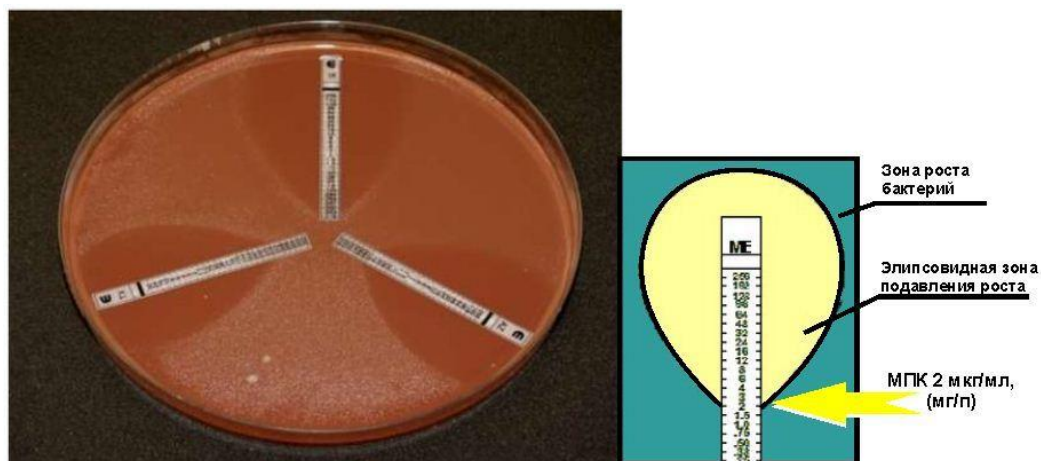


Рис. 28 - Метод Е-тестов

Методика. На чашку Петри, засеянную исследуемой культурой, наносят Е-тест полоски таким образом, чтобы участок с наименьшей концентрацией располагался ближе к центру, а участок с наибольшей концентрацией – ближе к периферии. Поскольку разные концентрации лекарственного средства вызывают образование зон задержки роста различной величины, образуется зона задержки роста, напоминающая эллипс

(рис. 29). Участок полоски, вокруг которого начинается зона задержки роста, соответствует МИК.

Учет результатов. Если бактерии чувствительны к действию препарата, вокруг участков полоски, содержащих его ингибирующие концентрации, образуется эллипсовидная зона. Её форма обусловлена действием сразу нескольких концентраций препаратов. МИК соответствует участок полоски, где её пересекает граница зоны задержки роста.

Методы серийных разведений

Позволяют количественно оценить чувствительность выделенного микроба к антибактериальным средствам и определить МИК препарата. Методы серийных разведений основаны на прямом определении величины МИК.

Для определения величины МИК заданные концентрации антибиотиков вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма. После инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

В зависимости от характера используемой питательной среды различают метод серийных разведений в бульоне, метод серийных разведений в агаре.

В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют также методы серийных макро – и микроразведений.

Разновидностью метода серийных разведений является также метод, основанный на использовании только двух концентраций антибиотиков или даже одной концентрации, соответствующих пороговым (то есть концентрациям, отделяющим чувствительные микроорганизмы от промежуточных и промежуточные от резистентных). Метод обеспечивает получение качественных результатов, позволяющих отнести исследуемый микроорганизм к определенной категории чувствительности, и часто используется в коммерческих тест-системах.

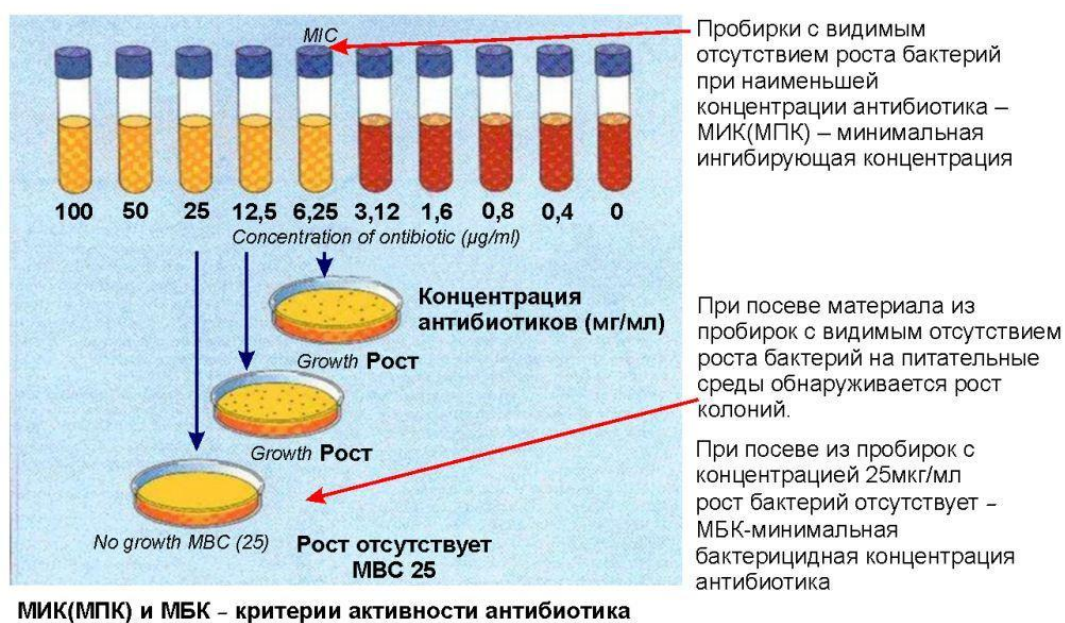
Метод серийных разведений в жидкой питательной среде.

Первоначально готовят основной раствор, содержащий определенную концентрацию антибиотиков в специальном растворителе. Из него готовят ряд убывающих разведений антибиотиков в пробирках с бульоном (чаще двухкратные) и добавляют испытуемую культуру (обычно 10^5 - 10^6 бактериальных клеток). Контролем служит пробирка с бульоном и культурой без антибиотиков. Сроки инкубации зависят от вида микроорганизма (чаще

сутки). Определяют МИК, которая соответствует концентрации препарата в последней пробирке с видимой задержкой роста (прозрачная питательная среда). Для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) из нескольких последних пробирок с задержкой роста делают посев петлей на сектора чашки Петри. За МБК, которая, как правило, на несколько разведений меньше МИК, принимают концентрацию препарата в последней пробирке, посев из которой не дал роста.

Исследования можно выполнять в различных объёмах питательной среды (1-10 мл). Используют жидкие питательные среды, соответствующие пищевым потребностям возбудителя. В пробирках (обычно восьми) готовят серию двойных разведений препарата на питательной среде. Концентрацию уменьшают соответственно от 128 до 0,06 мкг/мл (базовая концентрация может варьировать в зависимости от активности препарата). Конечный объём среды в каждой пробирке составляет 1 мл. Контролем служит пробирка, содержащая чистую питательную среду. В каждую пробирку вносят по 0,05 мл физиологического раствора, содержащего 10^6 /мл микробных клеток. Пробирки инкубируют 10-18 ч при 37°C (или до появления бактериального роста в контрольной пробирке). По истечении указанного срока результаты учитывают по изменению оптической плотности среды визуально или нефелометрически. Также можно применять модифицированный метод, используя среду, дополненную глюкозой и индикатором. Рост микроорганизмов сопровождается изменением рН среды и, соответственно, окраски индикатора.

Метод серийных разведений в плотной питательной среде.



Этот метод более чувствителен и точен, чем метод бумажных дисков. Каждый антибиотик испытывают, как правило, в трех концентрациях (исходя из уровней чувствительности микроорганизмов), которые добавляют к расплавленному и охлажденному агару. Агар с антибиотиками разливают в чашки Петри. Контролем служит чашка с агаром без антибиотиков. Посев производят петлей или лучше штампом-репликатором, который позволяет одновременно определить чувствительность к трем концентрациям антибиотиков 25-50 культур (в зависимости от числа лунок в штампе). Учет роста в термостате осуществляют спустя сутки.

Культура считается чувствительной, если на месте посева нет роста ни одной колонии.

Метод серийных разведений в плотных средах во многом аналогичен методу разведений в жидких средах, но определение МБК требует более

Рис. 29 - Определение чувствительности к антибиотикам методом серийных разведений

сложных манипуляций. Готовят двойные серийные разведения препарата от 1 : 10000 до 1 : 320000, затем вносят по 1 мл каждого разведения в пробирки, содержащие по 4 мл (или 9 мл) охлаждённого до 45°C агара.

Процедуру проводят одной пипеткой с перенесением препарата от меньшей концентрации к большей. Содержимое пробирок можно быстро внести в чашки Петри, либо пробирки «скашивают» до застывания агара. Затем агар засевают исследуемой стандартизированной тест-культурой (петлёй или специальным дозатором, засевающим чашку 36 видами различных микроорганизмов) и инкубируют 18-20 ч при 37° С.

После инкубации определяют МИК по отсутствию роста на чашках (пробирках), содержащих наименьшие концентрации препарата.

Оценка результатов:

чувствительные культуры – их рост подавлен всеми тремя концентрациями (можно применять антибиотики в средней терапевтической дозе);

среднечувствительные (можно применять антибиотики только в увеличенной дозе) – рост подавляют вторая и третья концентрация антибиотиков;

умеренно-устойчивые подавляет только третья наиболее высокая концентрация (антибиотики применяют только местно);

устойчивые (антибиотики применять нельзя по тестам *in vitro*) – растут на всех трех концентрациях.

Побочные эффекты действия антибиотиков

В процессе антибиотикотерапии нужно не только хорошо знать противомикробную активность применяемых для лечения препаратов, но и представлять возможность побочного их действия, формы проявления, профилактику и лечение. Побочные действия антибиотиков и химиопрепаратов, в основном, сводятся к аллергическим, токсическим реакциям или зависят от побочного химиотерапевтического эффекта: реакция бактериолиза, дисбактериоз, суперинфекции, поражения паренхимы печени, почек, органов кроветворения и др.

Клинические проявления аллергических реакций выражаются в виде анафилактического шока, поражения кожи, слизистых оболочек, отеке Квинке, астматического бронхита.

Проявление токсических реакций характеризуется четкой симптоматикой и возникает чаще аллергических. При приеме аминогликозидов они характеризуются невритом слухового нерва, поражением зрительного нерва, вестибулярными расстройствами, возможным развитием полиневрита, токсическим поражением почек.

Тетрациклины, рифампицин, эритромицин, сульфаниламиды обладают гепатотоксичным действием.

Патологическое влияние на кроветворную систему могут оказывать хлорамфеникол, рифампицин, стрептомицин.

Токсически действуют на желудочно-кишечный тракт тетрациклины, эритромицин, амфотерицин В и др.

К побочному эффекту антибиотиков, связанному с биологической активностью, следует отнести инфекционно-токсический шок, который обусловлен так называемым «токсинным ударом» в результате массивного бактериолиза. Инфекционно-токсический шок чаще развивается при инфекциях с напряженной бактериемией (менингококцемия, брюшной тиф, лептоспироз и др.), особенно в случаях применения антибактериальных препаратов бактерицидного действия.

Развитию шока препятствуют одновременное назначение глюкокортикостероидов (пульс-терапия), проведение инфузионно-детоксикационной терапии. По этой же причине лечение больных менингококцемией рекомендуется начинать с применения препарата бактериостатического действия – левомицетина.

Противомикробные препараты могут вызвать дисбактериоз, снижение напряженности иммунного ответа организма, что в конечном итоге

проявляется реинфекцией или суперинфекцией. Вследствие подавления нормальной микрофлоры кишечника может развиваться гиповитаминоз.

В основе профилактики побочных реакций от антибиотиков лежит радикальная терапия со знанием общих свойств лекарственного препарата, механизмов его действия, фармакокинетики и схем применения.

ТЕМА 10: ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

1. Ультрафиолетовое излучение.
2. Бактерицидное действие УФ-излучения.
3. Микробиологический метод оценки эффективности работы бактерицидных ламп.

К *естественным источникам УФ-излучения* относят Солнце, звёзды, туманности и др. космические объекты. Однако лишь длинноволновая часть УФ-излучения достигает земной поверхности. Более коротковолновое УФ-излучение поглощается озоном, кислородом и др. компонентами атмосферы на высоте 30-200 км от поверхности Земли, что играет большую роль в атмосферных процессах.

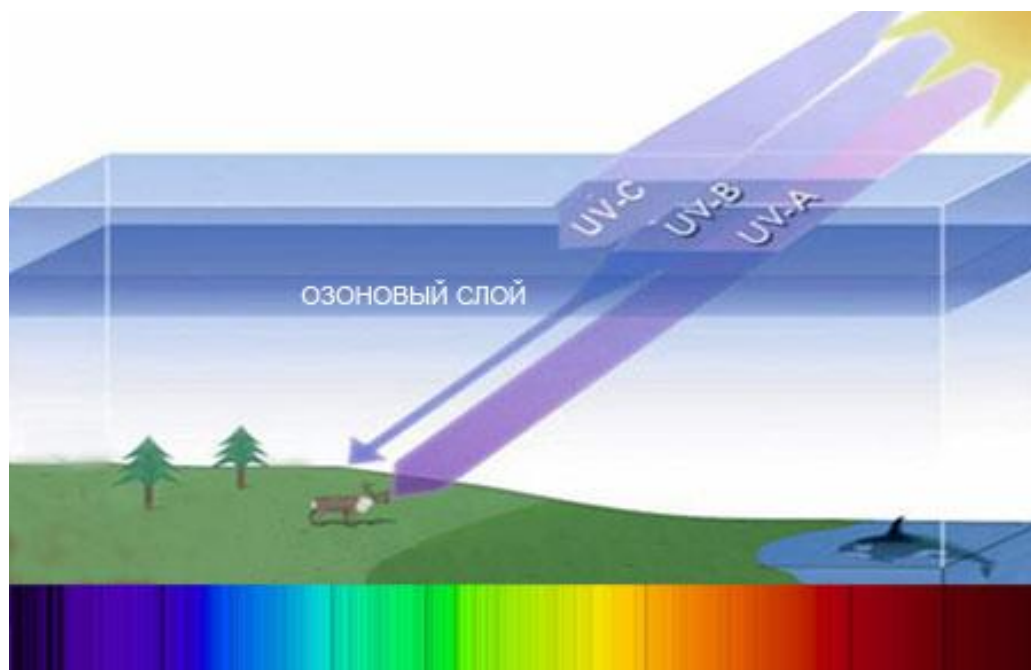


Рис. 30 - Длина волн УФ-излучения

Бактерицидное действие ультрафиолетовых (УФ) лучей было обнаружено около 100 лет назад.

Первые лабораторные испытания УФ-излучения в 1920-х годах были настолько многообещающими, что полное уничтожение воздушно-капельных инфекций казалось возможным в самое ближайшее время.

УФ-излучение стало активно применяться с 1930-х годов и в 1936 г. было впервые использовано для стерилизации воздуха в операционной комнате. В 1937 г. первое применение УФИ в вентиляционной системе одной из американских школ впечатляюще снизило уровень заболеваемости учащихся корью и другими инфекциями.

В настоящее время ультрафиолетовое бактерицидное излучение широко применяют как в гуманитарной, так и в ветеринарной медицине, в качестве профилактического санитарно-противоэпидемического средства, направленного на подавление жизнедеятельности микроорганизмов на поверхностях и в воздушной среде помещений. Ультрафиолетовое излучение применяют для обеззараживания воздуха в помещениях, поверхностей ограждений (потолков, стен, пола) и оборудования в помещениях с повышенным риском распространения воздушно-капельных и кишечных инфекций.

Эффективно его использование в операционных блоках ветеринарных клиник, отделениях интенсивной терапии, бактериологических и вирусологических лабораториях, в тамбурах боксов инфекционных отделений, в животноводческих помещениях, промышленных цехах и др.

Для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях промышленность выпускает искусственные источники УФ-излучения: бактерицидные лампы (длина волны 205-315 нм), бактерицидные облучатели, бактерицидные установки, разрядные ртутные лампы низкого и высокого давления, а также ксеноновые, водородные и др. лампы. В животноводческой практике также широко применяют установки ИКУФ-1, как источник ультрафиолетового и инфракрасного излучения.

Ультрафиолетовое излучение – это невидимое глазом электромагнитное излучение, занимающее спектральную область между видимым и рентгеновским излучениями в пределах длин волн 400-100 нм.

Ниже 100 нм – зона рентгеновского излучения.

Свыше 400 нм – зона видимого излучения.

Вся область УФ-излучения условно делится на 4 зоны:

1. длинноволновый диапазон (320-400 нм) – спектр ультрафиолета А;
2. средневолновый диапазон (280-320 нм) – спектр ультрафиолета В;
3. коротковолновый диапазон (180-280 нм) – спектр ультрафиолета С;

4. вакуумный (100-180 нм).

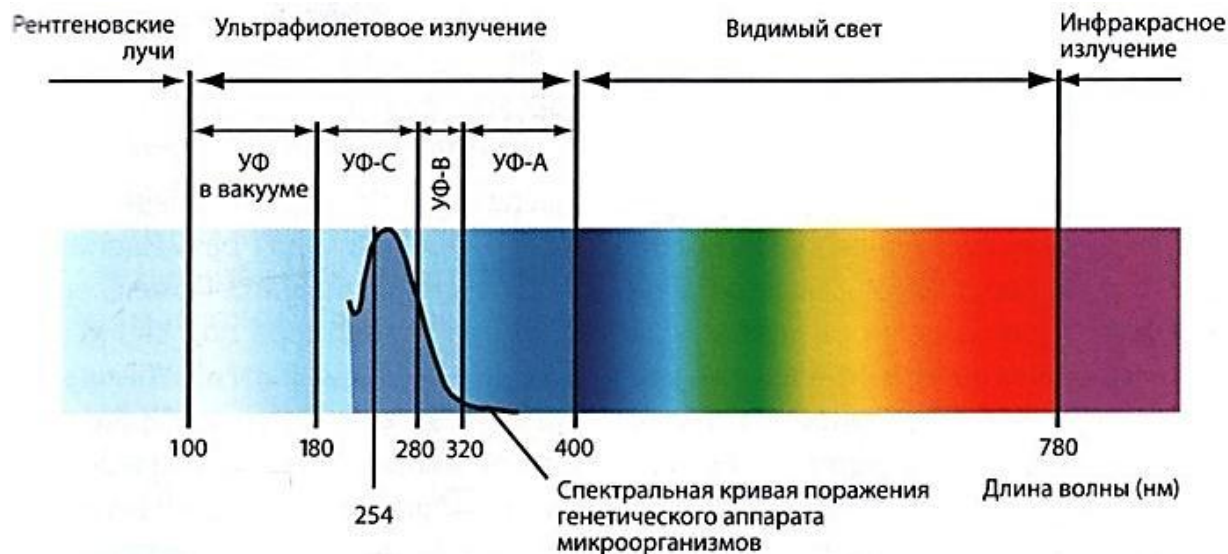


Рис. 31 - Спектральные области УФ-излучения

УФ-лучи обладают энергией, достаточной для воздействия на химические связи, в том числе и в живых клетках. УФ-излучение по способу воздействия на живые организмы подразделяют:

- **слабого биологического действия** (УФ-лучи длинноволнового диапазона);
- **противорахитического действия** (УФ-лучи средневолнового диапазона);
- **бактерицидного действия** (УФ-лучи коротковолнового диапазона).

Следует отметить, что максимум бактерицидного действия соответствует длине волн 264 нм.

Бактерицидное действие УФ-излучения обусловлено, в основном, фотохимическими повреждениями молекул ДНК и РНК микроорганизмов, что приводит к гибели микробной клетки в первом или последующем поколении. Более чувствительны к воздействию УФ-излучения вирусы и бактерии в вегетативной форме (палочки, кокки). Менее чувствительны грибы и простейшие микроорганизмы, а наибольшей устойчивостью обладают споровые формы.

Бактерицидный эффект от воздействия УФ-излучения связан с:

- уменьшением активности клеточных ферментов;
- разрушением нуклеиновых кислот;
- образованием в облучаемой среде перекиси водорода, озона и других соединений.

Степень инаktivации микроорганизмов, бактерицидная эффективность УФ-облучения зависит от вида микрофлоры, пропорциональна энергии и экспозиции излучения. При оценке бактерицидной эффективности УФ-облучения в качестве санитарно-показательного микроорганизма принимается *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк).

***Микробиологический метод оценки эффективности работы
бактерицидных ламп.***

В день исследования на чашку Петри с питательной средой (МПА, Эндо или ЖСА) засеивается газон соответственно бактериологической петлей суточная агаровая культура тест-штамма кишечной палочки или золотистого стафилококка. После снятия крышки одна половина чашки Петри с засеянной культурой тест-штамма прикрывается листом черной бумаги. Затем чашку размещают перпендикулярно падающему бактерицидному потоку ультрафиолетового излучения на расстоянии 1 м от источника на 15-20 мин. По истечении времени облучения чашка Петри помещается в термостат при температуре 37°C на 24 ч.

Учет результатов. Работа бактерицидной лампы признается удовлетворительной при отсутствии роста тест-штамма культуры на облученной УФ-потоком половине чашке Петри (допускается рост единичных – до 10 колоний) и наличии роста на другой – контрольной, затененной части чашки Петри.

Библиография

1. Госманов Р.Г. Микробиология: Учебное пособие/ Р.Г.Госманов, А.К.Галиулин, А.Х. Волков и др.- СПб:Лань, 2019.-496 с
2. Кисленко В.Н. Часть 1. Общая микробиология. В 2-х т. Ветеринарная микробиология и иммунология: Учебник/ В.Н.Кисленко, Н.М.Колычев.- М.: Инфа-М, 2017.- 624 с.
3. Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и микология: Учебник/ Н.М.Колычев, Р.Г.Госманов.- СПб.: Лань, 2018.-632 с.
4. Дональд К. Фармакологические препараты в ветеринарной медицине / К. Дональд Пламб., М.: «Аквариум ЛТД», 2002. – 856 с.
5. Донецкая Э.Г.-А. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. — М. : ГЭОТАР Медиа, 2011. — 480 с.
6. Общая медицинская микробиология: учебно-методическое пособие / Ж.Г. Шабан, Т.А. Канашкова, И.А. Крылов, В.А. Молочко. – Минск: БГМУ, 2011. – 320 с.
7. Справочник Видаль Ветеринар. – М.: Астра-Фарм Сервис, 2011.
8. McFarland L.V. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile infection. Anaerobe, 2009, 15: 274-280.