

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ

Д.Ю. Ильин, Г.В. Ильина, С.А. Сашенкова

МИКРОБИОЛОГИЯ

*Практикум
для студентов технологического факультета*

Квалификация бакалавр



Пенза 2021

УДК 619:579
ББК 36-1. (я7)
И 46

Рецензент – канд. биол. наук, доцент кафедры «Ветеринария»
А.В. Остапчук

Печатается по решению методической комиссии
технологического факультета от 4 октября 2021 г., протокол
№4

Ильин, Д.Ю.
И 46 Микробиология: практикум / Ильин Д.Ю., Ильина Г.В.,
Сашенкова С.А. – Пенза: РИО ПГАУ, 2021 – 310 с.: ил.

В пособии приводится теоретический материал, необходимый для усвоения дисциплины студентами технологического факультета направления подготовки 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза, квалификация бакалавр. Содержатся задания для лабораторных работ, примеры, иллюстрации, упрощающие восприятие тем и отдельных вопросов.

© ФГБОУ ВО
Пензенский ГАУ, 2021
© Д.Ю. Ильин,
Г.В. Ильина,
С.А. Сашенкова, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Общие вопросы микробиологии.....	4
2 Принципы систематики микроорганизмов.....	11
3 Морфология, физиология и генетика бактерий	15
3.1 Морфология бактерий	15
3.2 Структура бактериальной клетки	18
3.3 Физиология микроорганизмов.....	21
3.4 Химический состав бактерий.....	22
3.5 Питание бактерий.....	25
3.6 Ферменты и их роль в обмене веществ.....	29
3.7 Дыхание бактерий	31
3.8 Пигменты микроорганизмов.....	33
3.9 Светящиеся и ароматообразующие микроорганизмы.....	35
3.10 Рост и размножение бактерий.....	36
3.11 Организация генетического материала у бактерий. Генотип и фенотип	39
4 Понятие о патогенности и вирулетности микроорганизмов	46
5 Культивирование микроорганизмов	51
5.1 Питательные среды для культивирования микроорганизмов	51
5.1.1 Приготовление питательных сред	54
5.2 Методы стерилизации питательных сред, посуды и инструментов	56
5.3 Методы и условия культивирования микроорганизмов	66
5.3.1 Способы культивирования аэробных микроорганизмов	69
5.3.2 Способы культивирования анаэробных микроорганизмов	73
6. Выделение и идентификация чистой культуры	77
6.1 Морфологические признаки микроорганизмов	84
6.2 Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов.....	91
7. Методические указания для лабораторных работ	99
Лабораторная работа №1 Устройство микробиологической лаборатории (4 часа)	99
Лабораторная работа №2	111
Посуда и приборы в лаборатории (4 часа).....	111
Лабораторная работа №3 Питательные среды для микроорганизмов (4 часа).....	136

Лабораторная работа №4 Стерилизация и дезинфекция (4 часа)	147
Лабораторная работа №5 Морфология микроорганизмов (4 часа) ...	160
Лабораторная работа №6 Способы окраски микробных препаратов (4 часа)	165
Лабораторная работа №7 Влияние биотических и абиотических факторов на микроорганизмы	177
Лабораторная работа №8 Микробиологическое исследование продуктов растительного происхождения, кормов, кормовых добавок (4 часа)	188
Лабораторная работа №9 Определение микрофлоры окружающей среды и продуктов питания (6 часов)	193
Лабораторная работа №10 Смывы с поверхностей (4 часа)	213
Лабораторная работа №11 Возбудители бактериальных инфекций животных, при которых убой животных для пищевых целей запрещен (6 часов)	220
Лабораторная работа №11 Возбудители инфекций животных, при которых убой животных для пищевых целей запрещен	230
Лабораторная работа №13 Иммунодиагностика основных инфекционных заболеваний животных (2 часа)	242
Приложение 1	253
Методы окраски микропрепаратов	253
Словарь терминов	295
Список рекомендуемой литературы	312

1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ МИКРОБИОЛОГИИ

Микробиология (от греч. *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – наука) – наука о микроскопически малых существах, называемых микроорганизмами. Микробиология изучает морфологию, физиологию, биохимию, систематику, генетику и экологию микроорганизмов, их роль и значение в круговороте веществ, патологии человека, животных и растений.

К микроорганизмам относятся преимущественно одноклеточные организмы – бактерии, микроскопические грибы и водоросли, простейшие, а также организмы с неклеточной организацией – вирусы. Предметом изучения микробиологии традиционно служат в основном бактерии, а также в общем плане организации рассматриваются вирусы.

Микроорганизмы в таксономическом отношении очень неоднородная группа, представители которой отличаются друг от друга морфологией, строением, физиологией, типами конструктивного и энергетического метаболизма, а также особенностями питания клетки, но общим их признаком являются малые размеры особей. Например, в среднем линейные размеры бактерий находятся в пределах 0,5–3,0 мкм, но есть среди бактерий свои «гиганты» и «карлики». В частности, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 500 мкм; длина клеток бактерии *Achromatium oxaliferum* составляет 15–100 мкм при поперечнике примерно 5–33 мкм, а продольные размеры клеток спирохет могут достигать 250 мкм. Самые мелкие из известных бактерий – микоплазмы, диаметр клеток которых составляет 0,1–0,15 мкм. Размеры клеток дрожжей, мицелиальных грибов, простейших и водорослей находятся в пределах 10–100 мкм.

У микроорганизмов из-за малых размеров очень велико отношение площади поверхности клетки к ее объему, что создает благоприятные условия для активного обмена

с внешней средой. Показано, что метаболическая активность микроорганизмов в расчете на единицу биомассы намного выше, чем у более крупных клеток растений и животных.

Одной из наиболее существенных особенностей микроорганизмов является высокая пластичность их метаболизма, что приводит к быстрому приспособлению к меняющимся условиям окружающей среды. Указанное свойство также связано с малыми размерами клеток. Клетки микроорганизмов могут вместить в себя только несколько сотен тысяч белковых молекул. Поэтому ненужные в данных условиях существования ферменты не могут в клетках микроорганизмов содержаться про запас. Они синтезируются только тогда, когда соответствующее питательное вещество (субстрат) появляется в среде. Такие ферменты называются индуцибельными, они могут составлять до 10 % общего белка, содержащегося в клетке в данный момент времени. Таким образом, для микроорганизмов характерно большее разнообразие ферментных систем и более мобильные способы регуляции обмена веществ, чем для макроорганизмов.

Другим следствием высокой пластичности метаболизма микроорганизмов является, по определению В.И. Вернадского, их «всюдность». Микроорганизмы можно обнаружить в арктических областях, горячих источниках, высоких слоях атмосферы, шахтах с большим содержанием сероводорода, и этим они отличаются от всех растений и животных, которые часто распространены лишь на отдельных континентах или в географических зонах.

Отличительным свойством микроорганизмов является также их способность к быстрому размножению. В оптимальных условиях, например, бактерии *Escherichia coli* могут делиться каждые 20 мин.

У микроорганизмов отсутствует дифференцировка на ткани и органы, что также делает их непохожими на растения и животные.

В соответствии с современными принципами классификации все микроорганизмы в зависимости от строения клетки делятся на эукариотические (истинноядерные) и прокариотические (доядерные) (табл. 1).

К эукариотическим микроорганизмам относятся водоросли, грибы и простейшие, к прокариотическим – бактерии.

Кроме строения клетки, прокариотические и эукариотические микроорганизмы различаются и по другим признакам:

- прокариотические микроорганизмы морфологически относительно слабо дифференцированы, поэтому основными формами бактерий, за немногими исключениями, считаются кокки, прямые и изогнутые палочки;

- многие группы прокариот способны существовать только в анаэробных условиях (без молекулярного кислорода), получая необходимую для роста энергию в результате брожения или анаэробного дыхания;

- значительное количество бактерий может специфически получать энергию путем окисления неорганических веществ;

- большая группа бактерий (фототрофные) обладает способностью использовать энергию солнечного света и строить необходимые им вещества либо из органических соединений, либо из углекислого газа;

- среди бактерий различных таксономических групп широко распространена способность к фиксации молекулярного азота;

- у подавляющего большинства бактерий размножение осуществляется путем бинарного поперечного деления, приводящего к образованию двух одинаковых дочерних клеток. Деление клеток бактерий начинается, как правило, после завершения цикла репликации ДНК. У большинства грамположительных бактерий и нитчатых цианобактерий

деление происходит путем синтеза поперечной перегородки, идущего от периферии к центру.

Таблица 1 – Различия в строении клеток прокариот и эукариот

Признак	Прокариотическая клетка	Эукариотическая клетка
Организация генетического материала	Нуклеоид, состоящий чаще всего из одной замкнутой в кольцо или линейной хромосомы. Имеются гистоподобные белки. Гены не несут интронов (за исключением архебактерий). Гены организованы в опероны	Ядро, содержащее обычно более одной хромосомы. Есть белки гистоны. Гены имеют экзонно-интронную организацию. Опероны отсутствуют
Локализация ДНК	В нуклеоиде и плазмидах	В ядре и некоторых органеллах
Цитоплазматические органеллы	Отсутствуют (кроме рибосом)	Имеются
Рибосомы в цитоплазме	70S-типа	80S-типа
Движение цитоплазмы	Отсутствует	Имеется
Жгутики	Состоят из одной фибриллы, построенной из субъединиц белка флагеллина	Состоят из микротрубочек, собранных в группы
Компартментализация клеток	Слабо выражена	Клетка разделена мембранами на отдельные отсеки
Клеточная стенка (там, где она имеется)	Содержит пептидогликан муреин (за исключением архебактерий)	Пептидогликан муреин отсутствует

Поперечная перегородка формируется из цитоплазматической мембраны и пептидогликанового слоя. Расхождение образовавшихся дочерних клеток происходит в результате лизиса срединного слоя поперечной перегородки с помощью ферментов автолизиннов. Клетки большинства грамотрицательных бактерий делятся путем перетяжки, которая формируется при сужении в центральной части клетки цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Диаметр клетки в центре постепенно уменьшается, отверстие

между образовавшимися отсеками становится уже, пока не исчезнет совсем, и перетяжка не разделит клетку на две части.

Повсеместное распространение, быстрое размножение и особенности метаболизма микроорганизмов накладывают отпечаток на жизнь всей планеты. Процессы, в которых принимают участие микроорганизмы, прежде всего являются определяющими и необходимыми звеньями круговорота таких элементов, как углерод, азот, сера, фосфор, а также других биогенных элементов. Без микроорганизмов приостановился бы круговорот веществ в природе, и жизнь на Земле стала бы невозможной. Особую роль в формировании и поддержании плодородия почвы играют бактерии, участвующие в круговороте азота в природе. Это азотфиксирующие бактерии, которые превращают недоступный для растений молекулярный азот атмосферного воздуха в связанный, обогащая тем самым почву соединениями азота. Микроорганизмы-редуценты – «санитары» природы. Они осуществляют разложение растительных и животных остатков и превращают их в минеральные вещества. Минерализация органических веществ имеет большое значение, так как при этом необходимые зеленым растениям элементы переходят из недоступной для них формы в доступную. Микроорганизмы принимают активное участие в биологическом самоочищении водоемов, выполняя функцию по обезвреживанию и окислительной переработке поступающих в водоем загрязняющих веществ. Широко используются микроорганизмы и в системах биологической очистки сточных вод. В настоящее время в связи с высоким уровнем развития промышленности и огромным количеством образующихся сточных вод создаются специальные сооружения аэробной биологической очистки – биотенки, биофильтры и аэротенки.

Человек с древних времен интуитивно использовал уникальные особенности микроорганизмов, даже не

подозревая об этом. С давних пор процессы брожения применялись при приготовлении теста для хлеба, пива, вина, уксуса, кисломолочных продуктов, росяной мочке льна. Изучение биосинтетической деятельности микроорганизмов позволило установить их способность к синтезу самых разнообразных соединений, имеющих большое народнохозяйственное значение. В настоящее время с помощью микроорганизмов в промышленных масштабах получают микробный белок, аминокислоты (глутаминовую, треонин, лизин, пролин, глутамин), витамины (В12, рибофлавин), ферменты (амилазы, пектиназы, протеазы, целлюлазы, липазы, изомеразы, трипсины, стрептокиназы, диастазы), интерферон, инсулин, гормон роста человека, органические кислоты (лимонную, молочную, масляную, уксусную, глюконовую), этанол, глицерин, ацетон, бутанол, пропанол, бутандиол, полисахариды (декстраны, ксантаны, пуллулан, альгинаты), средства защиты растений, антибиотики, стероиды, каротиноиды, рибонуклеотиды, кортизон, преднизолон, гидрокортизон и другие ценные продукты.

Достижения микробиологии находят практическое применение в металлургии для извлечения различных металлов из руд. Микробиология внедрилась в такие традиционно небιологические производства, как получение энергетического сырья (биогаз метан), добыча нефти, что вносит существенный вклад в решение топливно-энергетической проблемы. Микроорганизмы способны повышать прочность бетона. Установлено, что при добавлении на тонну бетона нескольких килограммов биомассы микроорганизмов повышается прочность и пластичность строительного материала.

Успехи в области микробиологии открыли новые возможности в профилактике и лечении многих инфекционных заболеваний, в борьбе с которыми ранее медицина и ветеринария были бессильны. За сравнительно

небольшой период времени почти полностью ликвидированы такие заболевания, как чума, оспа, холера, малярия, являющиеся в прошлом бичом человечества. В настоящее время внимание микробиологов сосредоточено на проблеме злокачественных опухолей, птичьего гриппа и синдроме приобретенного иммунодефицита. Изучение свойств патогенных микроорганизмов позволило получать в промышленных масштабах вакцины, сыворотки и другие лечебные препараты.

Таким образом, микробиология вносит существенный вклад в решение многих практических задач, проблем здравоохранения и сельского хозяйства, способствует развитию определенных отраслей промышленности.

2 ПРИНЦИПЫ СИСТЕМАТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Систематика (таксономия) бактерий является одним из наиболее важных и сложных, но менее разработанных разделов микробиологии.

Задачами систематики являются классификация, номенклатура и идентификация организмов.

Классификация – распределение множества организмов по группам (таксонам).

Номенклатура – присвоение названий отдельным группам и видам микроорганизмов. В систематике бактерий, так же, как и в ботанике, зоологии, принята бинарная номенклатура, согласно которой бактериям присваивается название, состоящее из двух слов: первое – определяет их принадлежность к конкретному роду, второе – к виду. Например, *Clostridium botulinum* и *Clostridium tetani* – два различных вида бактерий, относящихся к одному роду. Названия бактериям присваивают в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий.

Основной таксономической категорией является вид. Виды объединяются в роды, роды – в семейства, семейства – в порядки, далее следуют классы, отделы, царства. В микробиологии существуют также более мелкие таксономические единицы, чем вид: подви́д (*subspeciens*), разновидность. Подвиды могут различаться по физиологическим (*biovar*), морфологическим (*morphovar*) или по антигенным (*serovar*) свойствам.

Большое значение в микробиологии имеют такие понятия, как клон – чистая культура, полученная из одной клетки, и штамм – культуры бактерий одного вида, выделенные из различных источников либо из одного источника в разное время или полученные в ходе генетических манипуляций. Разные штаммы одного и того же

вида бактерий могут отличаться друг от друга по целому ряду свойств, например по чувствительности к антибиотикам, способности к синтезу токсинов, ферментов и др.

Идентификация устанавливает принадлежность микроорганизмов к определенному таксону на основании наличия конкретных признаков. В большинстве случаев идентификация заключается в определении родовой и видовой принадлежности микроорганизмов.

К миру микробов относятся следующие категории:

1. Представители надцарства эукариотов:

1.1. Подцарство простейших царства животных.

1.2. Представители царства растений (в частности, микроскопические водоросли).

1.3. Представители царства грибов (в частности, микроскопические грибы).

2. Надцарство прокариотов:

2.1. Царство бактерий:

Отдел I – Gracilicutes (грациликуты, бактерии с тонкой клеточной стенкой, тонкокожие) объединяет грамотрицательные бактерии.

Отдел II – Firmicutes (фирмикуты, бактерии с толстой клеточной стенкой, толстокожие) объединяет грамположительные бактерии.

Отдел III – Tenericutes (тенерикуты, бактерии без клеточной стенки, нежнокожие) включает микоплазмы.

Отдел IV – Mendosicutes (мендосикуты, бактерии с дефектной клеточной стенкой без пептидогликана) включает археобактерии (бактерии, обитающие в экстремальных условиях – экстремальные термофилы, экстремальные галофилы и др.).

3. Царство вирусов.

Термин “бактерии” ввел в употребление в 1828 году немецкий естествоиспытатель, основатель микропалеонтологии Х.Г. Эренберг. Определение бактерий до

вида важно не только с позиции чисто познавательной, общебиологической, но и связано с решением ряда прикладных и научных задач. Особенно это важно для медицинской, ветеринарной и промышленной микробиологии, где действующими объектами являются микроорганизмы, и мельчайшие неточности в определении вида могут привести к нежелательным последствиям.

В настоящее время в микробиологии приняты два различных подхода к систематике, обуславливающих существование двух систем классификации: филогенетической (естественной) и фенотипической (искусственной). В основу филогенетической классификации положена идея создания системы прокариот, объективно отражающей родственные отношения между разными группами бактерий и историю их эволюционного развития. Фенотипическая классификация преследует, в первую очередь, практические цели, заключающиеся в том, чтобы быстрее установить принадлежность микроорганизма к определенному таксону. Наиболее четко последняя получила свое выражение в Определителе бактерий Берджи (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology), периодически издаваемом Обществом американских бактериологов с привлечением к его написанию крупных специалистов из других стран, изучающих те или иные группы бактерий. Первое издание Определителя было выпущено в 1923 году группой американских бактериологов под руководством Д. Берджи; девятое издание в русском переводе вышло в 1997 году.

При классификации бактерий учитывается большое количество различных свойств и признаков. Свойства и признаки, характерные для всех бактерий данной группы и нехарактерные для микроорганизмов других групп, называют критериями систематики. Чем больше общих признаков имеют сравниваемые организмы, тем больше и оснований для включения их в одну таксономическую

группу. В связи с тем, что количество признаков, используемых для классификации микроорганизмов, значительно возросло, в конце 50-х годов XX в. возникла нумерическая (численная) таксономия, основанная на принципах классификации французского ботаника М. Адансона (1757). В основе нумерической таксономии лежит принцип сопоставления организмов по возможно большему количеству учитываемых признаков при допущении, что все они для систематики равноценны. Однако допущение о равнозначности всех признаков является и основным недостатком нумерической таксономии.

При идентификации бактерий приоритетным является использование генетических (молекулярно-биологических), фенотипических и серологических подходов и критериев систематики. Наиболее объективными и дающими представление о филогенетических связях между микроорганизмами являются генетические (молекулярно-биологические) критерии. К ним относятся определение относительного содержания ГЦ-пар в ДНК, гибридизация нуклеиновых кислот, определение нуклеотидных последовательностей в молекулах ДНК или РНК, применение генетических зондов (ДНК-зондов), рестрикционный анализ ДНК, методы генетического анализа (изучение переноса генов, генетических скрещиваний, картирование хромосом бактерий и др.).

3 МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

3.1 Морфология бактерий

Морфология бактерий (греч. *bacteria* – палочка) – один из таксономических признаков бактерий, учитываемый при их идентификации. При установлении видовой принадлежности оценивают форму и взаимное расположение клеток, размер, особенности строения клеточной стенки и поверхностных структур (наличие жгутиков, капсулы), способность к спорообразованию, окраску.

Основные формы бактерий (рис. 1.):

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

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

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

– пневмококки – ланцетовидные;

– нейссерии (гонококки и менингококки) – бобовидные;

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

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

д) стрептококки (греч. *streptos* – цепочка) – овальные, делятся в одной плоскости, но при этом не отделяются друг от друга и образуют цепочки. Среди стрептококков много

патогенных микроорганизмов: возбудители ангины, скарлатины, гнойных воспалительных процессов, кариеса;

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

2. Палочки. Различаются по следующим признакам:

а) размеру:

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

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

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

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

в) взаимному расположению:

– энтеробактерии – прямые, располагаются беспорядочно;

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

– клостридии (лат. *clostridium* – веретено) – располагаются беспорядочно;

имеют веретенообразную форму благодаря терминально или субтерминально расположенной споре;

– бациллы (имеют эндоспоры) – располагаются цепочками.

г) способности к спорообразованию:

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

– бациллы – спорообразующие аэробы, диаметр эндоспоры обычно не превышает ширины клетки;

– клостридии – спорообразующие анаэробы, диаметр споры больше поперечника вегетативной клетки, в связи с этим клетка напоминает веретено или теннисную ракетку.

3. Извитые бактерии:

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

– спирохеты (трепонемы, лептоспиры, боррелии) – тонкие и длинные, имеют

различное число завитков, специфический для различных представителей характер движения и особенности строения (особенно концевых участков);

– кампилобактерии и спириллы – длинные извитые клетки, образуют 2-3 изгиба из одного или нескольких оборотов;

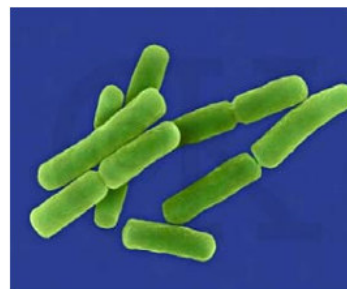
– актиномицеты (греч. *actis* – луч, *mykes* – гриб) – ветвящиеся клетки.



A



B



C

Рисунок 1 – Микрофотографии клеток бактерий: А- кокки, В – извитые формы, С – палочковидные формы

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

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

3.2 Структура бактериальной клетки

Бактерии – одноклеточные организмы, имеющие довольно сложную структуру, отвечающую многообразию их функциональной деятельности. Бактериальная клетка обладает рядом принципиальных особенностей, касающихся ее ультраструктурной и химической организации.

Структуры, расположенные снаружи от ЦПМ (КС, капсула, слизистый чехол, жгутики, пили), называют поверхностными структурами. Оболочка микробной клетки состоит из трех слоев: капсульного слоя, КС и ЦПМ. ЦПМ вместе с ЦП называется протопластом. ЦПМ имеет инвагинации – мезосомы – аналог митохондрий эукариот. В ЦП располагаются нуклеоид, плазмиды, рибосомы и включения. В неблагоприятных условиях среды некоторые бактерии (бациллы и клостридии) образуют эндоспоры. Обязательными органеллами бактериальной клетки являются нуклеоид, ЦПМ, мезосомы, ЦП, рибосомы. Факультативные органеллы бактериальной клетки – капсула, КС, плазмиды, цитоплазматические включения, жгутики, пили, эндоспоры.

Капсула имеется у некоторых бактерий и является поверхностным слизистым образованием, располагающимся снаружи КС. Капсулы – результат биосинтеза бактериями органических полимеров и отложения их вокруг клеток. В зависимости от степени выраженности капсулы

подразделяют на макрокапсулы, микрокапсулы и слизистые слои (чехлы). Между этими структурами обнаружено много переходных форм, так что иногда нельзя четко отграничивать капсулу от слизистых клеточных выделений или капсулу от чехла.

Функции капсулы:

1. Играет защитную роль во внешней среде: предохраняет бактерии от механических повреждений, высыхания, создает дополнительный осмотический барьер, т.к. гидрофильна и хорошо связывает воду.

2. Является источником запасных питательных веществ.

3. Выполняет адгезивную функцию: обеспечивает прикрепление бактерий к различным поверхностям, в т.ч. к рецепторам клетки хозяина.

4. Является фактором патогенности: подавляет различные этапы фагоцитарной реакции (переваривание, а иногда даже распознавание и поглощение).

5. Препятствует действию бактериофагов.

6. Определяет антигенную специфичность, это К-антиген. У некоторых бактерий (пневмококков) – определяет вирулентность.

Выявление капсулы:

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

2. В серологических реакциях с противокapsульными сыворотками.

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

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

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

Около половины известных видов бактерий на поверхности имеют органы движения – волнообразно изогнутые жгутики. Масса жгутиков составляет до 2 % сухой массы бактерии. Длина жгутика больше длины тела микроорганизма и составляет 3–12 мкм; толщина жгутика 0,02 мкм, причем полярные жгутики более толстые, чем перитрихиальные. Жгутики состоят из белка флагеллина (лат. *flagella* – жгутик), который по своей структуре относится к сократительным белкам типа миозина. В составе жгутика имеется либо одна гомогенная белковая нить, либо 2-3 нити, плотно свернутые в косу. Нить жгутика – жесткая спираль, закрученная против часовой стрелки; шаг спирали специфичен для каждого вида бактерий.

Число, размеры и расположение жгутиков являются признаками, постоянными для определенного вида, и учитываются при систематике. Однако у некоторых бактерий могут образовываться жгутики разных типов. Кроме того, наличие жгутиков зависит от условий внешней среды: на твердых средах при длительном культивировании бактерии могут утратить жгутики, а на жидких – вновь приобрести. Количество и расположение жгутиков у одного и того же вида может определяться стадией жизненного цикла. Следовательно, не стоит переоценивать таксономическое значение этого признака.

Классификация бактерий по числу и расположению жгутиков:

1. Атрихи – жгутики отсутствуют.
2. Монотрихи – один жгутик, расположенный на одном из полюсов клетки (род *Vibrio*) – монополярное

монотрихальное расположение жгутиков, самые подвижные бактерии (рис. 2).

3. Политрихи – много жгутиков:

– лофотрихи – пучок жгутиков на одном полюсе клетки (роды *Pseudomonas*, *Burkholderia*) – монополярное политрихальное расположение жгутиков;

– амфитрихи – на каждом полюсе клетки расположено по пучку жгутику (род *Spirillum*) – биполярное политрихальное расположение жгутиков;

– перитрихи – жгутики расположены без определенного порядка по всей поверхности клетки (сем. *Enterobacteriaceae* (роды *Escherichia*, *Proteus*), *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*), число жгутиков от 6 до 1000 на клетку в зависимости от вида бактерий.

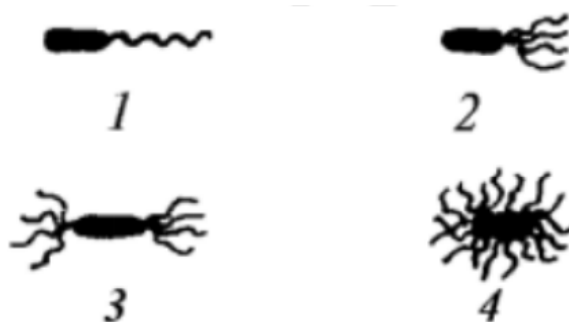


Рисунок 2 – Варианты расположения жгутиков у бактерий:
1 – монотрих, 2 – лофотрих; 3 – амфитрих;
4 – перитрих

3.3 Физиология микроорганизмов

Физиология изучает жизненные функции микроорганизмов: питание, дыхание, рост и размножение. В основе физиологических функций лежит непрерывный обмен веществ (метаболизм).

Сущность обмена веществ составляют два противоположных и вместе с тем взаимосвязанных процесса: ассимиляция (анаболизм) и диссимиляция (катаболизм).

В процессе ассимиляции происходит усвоение питательных веществ и использование их для синтеза клеточных структур. При процессах диссимиляции питательные вещества разлагаются и окисляются, при этом выделяется энергия, необходимая для жизни микробной клетки. В результате распада питательных веществ происходит расщепление сложных органических соединений на более простые, низкомолекулярные. Часть из них выводится из клетки, а другие снова используются клеткой для биосинтетических реакций и включаются в процессы ассимиляции. Все процессы синтеза и распада питательных веществ совершаются с участием ферментов.

Особенностью микроорганизмов является интенсивный обмен веществ. За сутки при благоприятных условиях одна микробная клетка может переработать такое количество питательных веществ, которое в 30-40 раз больше ее массы.

3.4 Химический состав бактерий

Для понимания процессов обмена веществ необходимо знать химический состав микроорганизмов. Микроорганизмы содержат те же химические вещества, что и клетки всех живых организмов.

Важнейшими элементами являются органогены (углерод, водород, кислород, азот), которые используются для построения сложных органических веществ: белков, углеводов и липидов. Микроорганизмы содержат также зольные или минеральные элементы. Большая часть их химически связана с органическими веществами, остальные присутствуют в клетке в виде солей.

В количественном отношении самым значительным компонентом клетки является вода, которая составляет 75-85%; на долю сухого вещества, которое состоит из органических (белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды) и минеральных соединений, приходится 15–25%.

Вода. Значение воды в жизнедеятельности клетки велико. Все вещества поступают в клетку с водой, с ней же удаляются продукты обмена. Вода в микробной клетке

находится в свободном состоянии как самостоятельное соединение, но большая часть ее связана с различными химическими компонентами клетки (белками, углеводами, липидами) и входит в состав клеточных структур.

Свободная вода принимает участие в химических реакциях, протекающих в клетке, является растворителем различных химических соединений, а также служит дисперсной средой для коллоидов. Содержание свободной воды в клетке может изменяться в зависимости от условий внешней среды, физиологического состояния клетки, ее возраста. Так, у споровых форм бактерий значительно меньше воды, чем у вегетативных клеток. Наибольшее количество воды отмечается у капсульных бактерий.

Белки (50–80 % сухого вещества) определяют важнейшие биологические свойства микроорганизмов. Это простые белки – протеины и сложные – протеиды. Большое значение в жизнедеятельности клетки имеют нуклеопротеиды – соединение белка с нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК). Кроме нуклеопротеидов, в микробной клетке содержатся в незначительных количествах липопротеиды, гликопротеиды, хромопротеиды.

Белки распределены в цитоплазме, нуклеоиде, они входят в состав структуры клеточной стенки. К белкам принадлежат ферменты, многие токсины (яды микроорганизмов).

Видовая специфичность микроорганизмов зависит от количественного и качественного состава белковых веществ.

Нуклеиновые кислоты в микробной клетке отвечают за те же функции, что и в клетках животного происхождения. ДНК содержится в ядре (нуклеоиде) и обуславливает генетические свойства микроорганизмов. РНК принимает участие в биосинтезе клеточных белков, содержится в ядре и цитоплазме. Общее количество нуклеиновых кислот колеблется от 10 до 30 % сухого вещества микробной клетки и зависит от ее вида и возраста.

Углеводы (12–18 % сухого вещества) используются микробной клеткой в качестве источника энергии и углерода. Из них состоят многие структурные компоненты клетки

(клеточная оболочка, капсула и другие). Углеводы входят также в состав тейхоевой кислоты, характерной для грамположительных бактерий.

Клетки микроорганизмов содержат простые (моно- и дисахариды) и высокомолекулярные (полисахариды) углеводы. У ряда бактерий могут быть включения, по химическому составу напоминающие гликоген и крахмал, они играют роль запасных питательных веществ в клетке. Углеводный состав различен у разных видов микроорганизмов и зависит от их возраста и условий развития.

Липиды (0,2-40% сухого вещества) являются необходимыми компонентами цитоплазматической мембраны и клеточной стенки, они участвуют в энергетическом обмене. В некоторых микробных клетках липиды выполняют роль запасных веществ.

Липиды состоят в основном из нейтральных жиров, жирных кислот, фосфолипидов. Общее количество их зависит от возраста и вида микроорганизма. Например, у микобактерий туберкулеза количество липидов достигает 40%, что обуславливает устойчивость этих бактерий к воздействию факторов внешней среды.

В клетках микроорганизмов липиды могут быть связаны с углеводами и белками, составляя сложный комплекс, определяющий токсические свойства микроорганизмов.

Минеральные вещества - фосфор, натрий, калий, магний, сера, железо, хлор и другие - в среднем составляют 2-14% сухого вещества.

Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, многих ферментов, а также АТФ (аденозинтрифосфорной кислоты), которая является аккумулятором энергии в клетке. Натрий участвует в поддержании осмотического давления в клетке. Железо содержится в дыхательных ферментах. Магний входит в состав рибонуклеата магния, который локализован на поверхности грамположительных бактерий.

Для развития микроорганизмов необходимы микроэлементы, содержащиеся в клетке в очень малых количествах. К ним относят кобальт, марганец, медь, хром, цинк, молибден и многие другие. Микроэлементы участвуют в синтезе некоторых ферментов и активируют их. Соотношение отдельных химических элементов в микробной клетке может колебаться в зависимости от вида микроорганизма, состава питательной среды, характера обмена и условий существования во внешней среде.

3.5 Питание бактерий

Всем микроорганизмам для осуществления процессов питания, дыхания, размножения необходимы питательные вещества.

В качестве питательных веществ и источников энергии микроорганизмы используют различные органические и неорганические соединения, для нормальной жизнедеятельности им требуются также микроэлементы и факторы роста.

Процесс питания микроорганизмов имеет ряд особенностей: во-первых, поступление питательных веществ происходит через всю поверхность клетки; во-вторых, микробная клетка обладает исключительной быстротой метаболических реакций; в-третьих, микроорганизмы способны довольно быстро адаптироваться к изменяющимся условиям среды обитания. Разнообразие условий существования микроорганизмов обуславливает различные типы питания.

Типы питания определяются по характеру усвоения углерода и азота. Источником других органоенов – водорода и кислорода – служит вода. Вода необходима микроорганизмам и для растворения питательных веществ, так как они могут проникать в клетку только в растворенном виде.

По усвоению углерода микроорганизмы делят на два типа: автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы (от греч. *autos* – сам, *trophe* – питание) способны синтезировать сложные органические вещества из простых неорганических соединений. Они могут использовать в качестве источника углерода углекислоту и другие неорганические соединения углерода. Автотрофами являются многие почвенные бактерии (нитрифицирующие, серобактерии и др.).

Гетеротрофы (от греч. *heteros* – другой, *trophe* – питание) для своего роста и развития нуждаются в готовых органических соединениях. Они могут усваивать углерод из углеводов (чаще всего глюкозы), многоатомных спиртов, органических кислот, аминокислот и других органических веществ.

Гетеротрофы представляют обширную группу микроорганизмов, среди которых различают сапрофитов и паразитов.

Сапрофиты (от греч. *sapros* – гнилой, *phyton* – растение) получают готовые органические соединения от отмерших организмов. Они играют важную роль в разложении мертвых органических остатков, например бактерии гниения и др.

Паразиты (от греч. *parasites* – нахлебник) живут и размножаются за счет органических веществ живой клетки растений, животных или человека. К таким микроорганизмам относятся риккетсии, вирусы и некоторые простейшие (см. главу 11).

По способности усваивать азот микроорганизмы делятся также на две группы: аминокавтотрофы и аминокететротрофы. Аминокавтотрофы для синтеза белка клетки используют молекулярный азот воздуха (клубеньковые бактерии, азотобактер) или усваивают его из аммонийных солей. Аминокететротрофы получают азот из органических соединений – аминокислот, сложных белков. К ним относят все патогенные микроорганизмы и большинство сапрофитов.

По источникам энергии среди микроорганизмов различают фототрофы, использующие для биосинтетических реакций энергию солнечного света (пурпурные серобактерии) и хемотротрофы, которые получают энергию за

счет окисления неорганических веществ (нитрифицирующие бактерии и др.) и органических соединений (большинство бактерий, в том числе и патогенные для человека виды).

Однако резкой границы между типами питания микробов провести нельзя, так как есть такие виды микроорганизмов, которые могут переходить от гетеротрофного типа питания к автотрофному, и наоборот.

В настоящее время для характеристики типов питания введена новая терминология: гетеротрофы называют органотрофами, а автотрофы – литотрофами (от греч. *litos* – камень), так как подобные микроорганизмы способны расти в чисто минеральной среде.

Факторы роста. Микроорганизмы для своего роста и размножения нуждаются в особых веществах, которые сами синтезировать не могут и должны получать их в готовом виде. Эти вещества называют факторами роста, и нужны они микробным клеткам в небольших количествах. К ним относят различные витамины, некоторые аминокислоты (необходимые для синтеза белка), пуриновые и пиримидиновые основания (идущие на построение нуклеиновых кислот) и др. Многие факторы роста входят в состав различных ферментов и играют роль катализаторов в биохимических процессах.

Знание потребностей микроорганизмов в питательных веществах и факторах роста очень важно, в частности, для создания питательных сред, применяемых для их выращивания.

Транспорт питательных веществ. Питательные вещества могут проникать в цитоплазму микробных клеток только в виде небольших молекул и в растворенном виде.

Сложные органические вещества (белки, полисахариды и др.) предварительно подвергаются воздействию ферментов, выделяемых микробной клеткой, и после этого становятся доступными для использования. Транспорт питательных веществ в клетку и выход из нее продуктов метаболизма осуществляется в основном через цитоплазматическую мембрану.

Питательные вещества проникают в клетку несколькими способами:

1. Пассивная диффузия, т. е. перемещение веществ через толщу мембраны, в результате чего выравниваются концентрация веществ и осмотическое давление по обе стороны оболочки. Таким путем могут проникать питательные вещества, когда концентрация в среде значительно превышает концентрацию веществ в клетке.

2. Облегченная диффузия – проникновение питательных веществ в клетку с помощью активного переноса их особыми молекулами-переносчиками, называемыми пермеазами. Это вещества ферментной природы, которые локализованы на цитоплазматической мембране и обладают специфичностью. Каждая пермеаза адсорбирует соответствующее питательное вещество на наружной стороне цитоплазматической мембраны, вступает с ним во временную связь и диффундирует комплексно через мембрану, отдавая на внутренней стороне ее транспортируемое вещество в цитоплазму. Этот процесс совершается без использования энергии, так как перемещение веществ происходит от более высокой концентрации к более низкой.

3. Активный транспорт питательных веществ осуществляется также с помощью пермеаз, но этот процесс требует затраты энергии. В этом случае питательное вещество может проникнуть в клетку, если концентрация его в клетке значительно превышает концентрацию в среде.

4. В ряде случаев транспортируемое вещество может подвергаться химической модификации, и такой способ переноса веществ получил название переноса радикалов или транслокации химических групп. По механизму передачи транспортируемого вещества этот процесс сходен с активным транспортом.

Выход веществ из микробной клетки осуществляется или в виде пассивной диффузии, или в процессе облегченной диффузии с участием пермеаз.

3.6 Ферменты и их роль в обмене веществ

Ферменты – это вещества белковой природы, вырабатываемые живой клеткой. Они являются биологическими катализаторами и играют важную роль в обмене веществ микроорганизмов.

По химическому строению, свойствам и механизму действия ферменты микробов сходны с ферментами, образующимися в клетках и тканях животных и растений. Ферменты микробной клетки локализуются в основном в цитоплазме, некоторые содержатся в ядре и клеточной оболочке. Микроорганизмы могут синтезировать самые разнообразные ферменты, относящиеся к шести известным классам: **оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы.**

Характерным свойством ферментов является специфичность действия, т. е. каждый фермент реагирует с определенным химическим соединением или катализирует одну, или несколько близких химических реакций. Например, фермент лактаза расщепляет лактозу, мальтаза – мальтозу.

Активность ферментов зависит от температуры среды, pH и других факторов. Для многих патогенных микроорганизмов оптимальное значение pH 7,2–7,4, а оптимальная температура находится в пределах 37–50 °C.

Ферменты микроорганизмов классифицируются на экзоферменты и эндоферменты. Экзоферменты, выделяясь во внешнюю среду, расщепляют макромолекулы питательных веществ до более простых соединений, которые могут быть усвоены микробной клеткой. Так, к экзоферментам относят гидролазы, вызывающие гидролиз белков, жиров, углеводов. В результате этих реакций белки расщепляются на аминокислоты и пептоны, жиры – на жирные кислоты и глицерин, углеводы (полисахариды) – на дисахариды и моносахариды. Распад белков вызывают ферменты протеазы, жиров – липазы, углеводов – карбогидразы. Эндоферменты участвуют в реакциях обмена веществ, происходящих внутри клетки.

У микроорганизмов различают также конститутивные и индуктивные ферменты. Конститутивные ферменты постоянно находятся в микробной клетке независимо от условий существования. Это в основном ферменты клеточного обмена: протеазы, липазы, карбогидразы и др. Индуктивные (адаптивные) ферменты синтезируются в клетке только под влиянием соответствующего субстрата, находящегося в питательной среде, и когда микроорганизм вынужден его усваивать. Например, если бактерии, не вырабатывающие в обычных условиях фермента амилазы, расщепляющей крахмал, засеять на питательную среду, где единственным источником углерода служит крахмал, то они начинают синтезировать этот фермент. Таким образом, индуктивные ферменты позволяют микробной клетке приспособиться к изменившимся условиям существования.

Наряду с ферментами обмена многие патогенные бактерии вырабатывают также ферменты агрессии, которые служат для преодоления естественных защитных барьеров макроорганизма и являются факторами патогенности. К таким ферментам относятся гиалуронидаза, дезоксирибонуклеаза, лецитовителлаза и др. Например, гиалуронидаза расщепляет межклеточное вещество соединительной ткани (гиалуроновую кислоту) и тем самым способствует распространению возбудителя в макроорганизме.

Выделение микроорганизмами различных ферментов определяет их биохимические свойства. Ферментный состав любого микроорганизма является достаточно постоянным признаком, а различные виды микроорганизмов довольно четко различаются по набору ферментов. Поэтому изучение ферментативного состава имеет важное значение для дифференциации и идентификации различных микроорганизмов.

Издавна человек использовал ферментативную активность дрожжей в пивоварении и виноделии. Применение ферментов в пищевой промышленности позволяет значительно интенсифицировать технологический процесс, повысить выход и улучшить качество готовой

продукции. Ферменты, выделенные из определенных видов микроскопических грибов, используются в процессе изготовления пшеничного теста, что позволяет увеличить объем, пористость выпеченного хлеба, улучшить его свежесть, аромат, вкус. Ферментные препараты некоторых микроорганизмов применяют для ускорения процессов выделения соков из плодов и ягод.

С целью получения высококачественных кормов для сельскохозяйственных животных процессы микробного синтеза используются при силосовании зеленых трав; благодаря ферментативной активности дрожжей, размножающихся на отходах нефти (парафинах), получают белково-витаминные концентраты, которые являются ценным питательным веществом – их добавляют к грубым кормам для животных.

Ферменты позволяют некоторым микроорганизмам усваивать метан, и эти виды бактерий используют для борьбы с метаном в шахтах. Известно, что ферменты бактерий (в частности, сенной палочки) широко применяются в качестве биодобавок к стиральному порошку "Ока" и стиральной пасте "Био". Эти препараты удаляют белковые загрязнения, так как ферменты расщепляют белки до водорастворимых веществ, легко смываемых при стирке.

В медицинской промышленности с помощью ферментов микроорганизмов получают витамины, гормоны, алкалоиды.

3.7 Дыхание бактерий

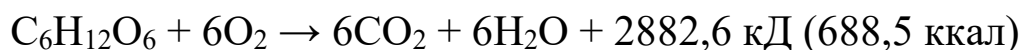
Дыхание (или биологическое окисление) микроорганизмов представляет собой совокупность биохимических процессов, в результате которых освобождается энергия, необходимая для жизнедеятельности микробных клеток.

Все физиологические процессы, такие как движение, рост и размножение, образование спор и капсул, выработка токсинов, могут осуществляться при постоянном притоке энергии. Микроорганизмы добывают энергию за счет

окисления различных химических соединений: углеводов (чаще глюкозы), спиртов, органических кислот, жиров и т.д. Сущность окисления состоит в том, что окисляемое вещество отдает электроны, а восстанавливаемое получает их.

По типу дыхания все микроорганизмы разделяются на облигатные (строгие) аэробы, облигатные анаэробы и факультативные (необязательные) анаэробы.

Облигатные аэробы (микобактерии туберкулеза и др.) живут и развиваются при свободном доступе кислорода, т.е. реакции окисления осуществляются у них при участии молекулярного кислорода с высвобождением большого количества энергии. Примером может служить окисление глюкозы в аэробных условиях:



Существуют и микроаэрофилы, которые нуждаются в малых количествах кислорода (некоторые лептоспирры, бруцеллы).

Облигатные анаэробы (клостридии столбняка, ботулизма и др.) способны жить и размножаться только в отсутствие свободного кислорода воздуха. Дыхание у анаэробов происходит путем ферментации субстрата с образованием небольшого количества энергии. Так, при анаэробном разложении 1 моль глюкозы энергии выделяется значительно меньше, чем при аэробном дыхании:



Наличие свободного кислорода для облигатных анаэробов является губительным. Это связано с тем, что в присутствии кислорода конечным продуктом окисления органических соединений оказывается перекись водорода. А поскольку анаэробы не обладают способностью продуцировать фермент каталазу, расщепляющую перекись водорода, то она накапливается и оказывает токсическое действие на бактерии.

Факультативные анаэробы могут размножаться как при наличии молекулярного кислорода, так и при отсутствии его. К ним относят большинство патогенных и сапрофитных бактерий.

Процессы разложения органических веществ в бескислородных условиях, сопровождающиеся выделением энергии, называют также брожением. В зависимости от участия определенных микроорганизмов и конечных продуктов расщепления углеводов различают несколько типов брожения: спиртовое, осуществляемое дрожжами; молочнокислое, вызываемое молочнокислыми бактериями; маслянокислое, обусловленное маслянокислыми бактериями и др.

Выделение тепла при дыхании микроорганизмов можно наблюдать при выращивании культур в сосудах, защищенных от потери тепла, – температура питательной среды будет постепенно повышаться. С выделением избыточного тепла при дыхании некоторых микроорганизмов связаны процессы самовозгорания торфа, навоза, влажного сена и хлопка.

Биохимические механизмы дыхания более подробно изложены в учебниках биологической химии.

3.8 Пигменты микроорганизмов

Некоторые микроорганизмы (бактерии, грибы) в процессе обмена веществ образуют красящие вещества – пигменты. По химическому составу и свойствам пигменты неоднородны. Они подразделяются на растворимые в воде (синий пигмент – пиоцианин, выделяемый синегнойной палочкой); растворимые в спирте и нерастворимые в воде (красный пигмент – продигиозан, выделяемый чудесной палочкой); нерастворимые ни в воде, ни в спирте (черные и бурые пигменты дрожжей и плесеней).

Нерастворимые в воде пигменты (липохромы) обычно окрашивают колонии бактерий (например, желтый, золотистый, палевый пигменты стафилококков),

а растворимые – окрашивают питательную среду (синегнойная палочка).

Образование пигментов у микробных клеток происходит на свету при достаточном доступе кислорода и определенном составе питательной среды.

Пигментообразование в ряде случаев является стойким признаком микроорганизмов, что позволяет использовать его в качестве теста для идентификации некоторых бактерий (например, стафилококки, синегнойная палочка).

Пигментообразование у микроорганизмов имеет определенное физиологическое значение. Пигменты защищают микробную клетку от природной ультрафиолетовой радиации, принимают участие в процессах дыхания, некоторые обладают антибиотическим действием (продигиозан).

Особый интерес представляет история чудесной палочки *Serratia marcescens*, которая образует на хлебе, картофеле и других продуктах, содержащих крахмал, красные колонии, похожие на капли свежей крови. Древнеримский историк Квинт Курций Руф в своей книге "История Александра Македонского" описал одну из его побед при покорении Малой Азии, связанную с этим удивительным микробом. В 332 г. до н. э. при осаде города Тироса в армии Александра Македонского произошло неприятное событие – в хлебе появились большие красные пятна, напоминающие пятна крови, и солдат охватил страх. Они посчитали это плохим предзнаменованием. Однако хитрый придворный мудрец Александра истолковал это "знамение" так: "Кровавые пятна действительно знак богов, но поскольку они находятся внутри запеченного хлеба, то это означает гибель войск, находящихся внутри осажденных стен города. Боги указывают на свою благосклонность войскам Александра и дают понять, что его победа обеспечена". Толкование мудреца так подняло дух армии, что солдаты с воодушевлением атаковали стены города и в скором времени захватили его.

Появление подобных красных пятен на продуктах во времена религиозных предрассудков и мракобесия

средневековья широко использовалось церковниками для пропаганды "кары божьей" за неверие и служило основанием для жестокой расправы с вольнодумцами.

3.9 Светящиеся и ароматообразующие микроорганизмы

Среди микроорганизмов (бактерий, грибов) встречаются такие, которые обладают способностью светиться (люминесцировать). Свечение бактерий возникает в результате интенсивных процессов окисления, сопровождающихся выделением энергии. Свечение морской воды, чешуи рыб, тела мелких ракообразных, сгнившего дерева объясняется присутствием на них светящихся бактерий или фотобактерий.

Все светящиеся бактерии относятся к аэробам. Большая часть их видов обитает в морской воде, так как они лучше размножаются при повышенной концентрации соли (галофильные микробы). Могут светиться пауки, муравьи, термиты, живущие в симбиозе с фотобактериями. Светящиеся бактерии излучают зеленый или голубоватый свет, хорошо заметный в темноте. Ночью светятся и грибы, например осенние опенки.

Светящиеся бактерии не вызывают процессов гниения, для большинства видов оптимальная температура жизнедеятельности – 15–18 °С. Они хорошо растут на рыбных и мясных субстратах, что и обуславливает свечение мяса, рыбы.

В начале XX века пытались использовать светящиеся бактерии в практических целях, их предлагали применять для "безопасных ламп" в пороховых погребах.

Выявлены микроорганизмы, способные вырабатывать ароматические вещества, например уксусно-этиловый, уксусно-амиловый эфиры. Запахи некоторых микробов определяют ароматические свойства вин, молока, масла, сливок, сыров и т. д. Ароматообразующие бактерии широко используют при приготовлении различных пищевых продуктов.

Некоторые микроорганизмы в процессе жизнедеятельности образуют вещества с неприятным запахом (индол, скатол, сероводород), что связано с разложением органических веществ.

3.10 Рост и размножение бактерий

Одним из важнейших проявлений жизнедеятельности микроорганизмов являются рост и размножение их.

Рост определяется как увеличение размеров отдельной особи и упорядоченное воспроизведение всех клеточных компонентов и структур.

Под размножением понимают способность микроорганизмов к самовоспроизведению, в результате чего увеличивается число особей в популяции. Основным способ размножения у бактерий поперечное деление. Перед делением у бактериальных клеток, достигших определенного возраста, происходит удвоение молекул ДНК. Каждая дочерняя клетка получает копию материнской ДНК. Процесс деления считается законченным, когда цитоплазма дочерних клеток разделена перегородкой (рис. 3).



Рисунок 3 – Ультратонкий срез делящейся клетки E. coli

В образовании перегородки принимает участие цитоплазматическая мембрана и клеточная стенка. Если перегородка формируется в середине делящейся клетки, то

появляются дочерние клетки одинаковой величины (изоморфное деление). Иногда перегородка образуется ближе к одному из концов, тогда дочерние клетки имеют неодинаковый размер (гетероморфное деление).

Деление бактерий (кокков) может происходить в различных плоскостях с образованием многообразных сочетаний клеток: цепочки стрептококков, парные соединения (диплококки), тетрады кокков, тьюки (сарцина), гроздя (стафилококки). Палочковидные и извитые формы делятся поперечно и только в одной плоскости.

У некоторых бактерий размножение происходит путем образования почки (микобактерии туберкулеза, клубеньковые бактерии), которая по величине меньше исходной клетки.

Скорость размножения бактерий велика, что обусловлено интенсивностью их обмена. У большинства бактерий каждая клетка делится в течение 15–30 мин. Подсчитано, что за 24 ч у бактерий сменяется столько поколений, сколько у человека за 5000 лет. Есть виды бактерий, которые делятся медленно, 1 раз в сутки, например микобактерии туберкулеза.

Для каждого вида бактерий скорость размножения может быть различной и зависит от возраста культуры, питательной среды, температуры, значения рН и многих других факторов.

Размножение бактерий в жидкой питательной среде обладает рядом особенностей и происходит в несколько последовательных фаз (рис. 4).

Фаза 1 – исходная стационарная (латентная): микробные клетки адаптируются к питательной среде, при этом повышается интенсивность обменных процессов, увеличивается размер клеток. Бактерии начинают размножаться лишь к концу первой фазы.

Фаза 2 – логарифмического роста: бактерии энергично размножаются, вследствие чего количество клеток возрастает в геометрической прогрессии. В этой фазе бактерии обладают наибольшей биохимической и биологической активностью.

Фаза 3 – стационарная: концентрация бактериальных клеток в среде остается постоянной. Это обусловлено тем, что число вновь появившихся бактерий почти равно числу отмирающих клеток. Длительность этой фазы у разных бактерий различна.

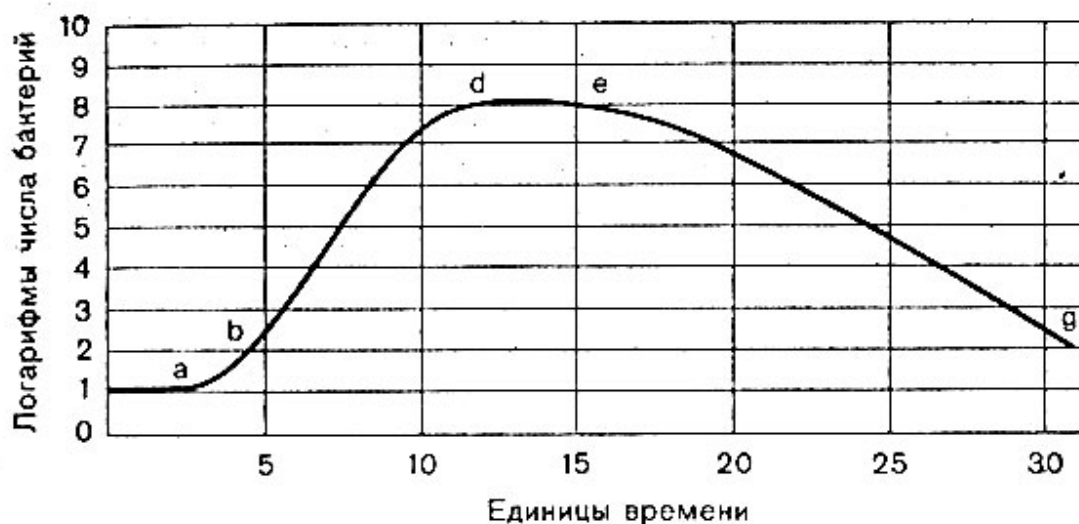


Рисунок 4 – Фазы размножения бактерий. *ab* – исходная стационарная; *bd* – фаза логарифмического роста; *de* – стационарная фаза; *eg* – стадия отмирания

Фаза 4 – отмирания: жизнеспособных клеток бактерий становится все меньше, и постепенно они погибают. Причинами гибели клеток могут быть истощение питательной среды, накопление в ней вредных продуктов обмена. В этой фазе у бактерий могут изменяться морфологические, биохимические и другие свойства. Фаза отмирания у различных видов бактерий неодинакова. Полная гибель культуры может наступить через несколько дней, недель или месяцев.

Увеличение количества размножившихся в жидких питательных средах бактерий можно наблюдать через 18–24 ч появляется либо помутнение среды, либо образование пленки или осадка. При этом характер изменения среды зависит как от вида и возраста

бактериальной культуры, так и от состава самой питательной среды.

При размножении на плотных питательных средах бактерии образуют на поверхности среды и внутри нее типичные для каждого микробного вида колонии. Каждая колония – это популяция микроорганизмов, развившаяся из одной клетки определенного вида бактерии. Колонии бактерий различаются по размеру, форме, строению, консистенции и цвету. Внешний вид колоний у некоторых бактерий настолько характерен, что может служить дифференциальным признаком для идентификации микроорганизмов.

3.11 Организация генетического материала у бактерий.

Генотип и фенотип

Материальной основой наследственности бактерий является ДНК. По сравнению с геномом эукариотов геном бактерий устроен более просто – это молекула ДНК, замкнутая в кольцо, которое прикреплено к одной из мезосом. В отличие от парных хромосом эукариотов, у бактерий одна хромосома, то есть гаплоидный набор генов, поэтому у них нет явления доминантности.

Кроме хромосомы, у бактерий имеются внехромосомные генетические элементы – плазмиды. Это молекулы ДНК, которые или находятся вне хромосомы, в автономном состоянии, в виде колец, прикрепленных к мезосомам, или встроены в хромосому (интегрированное состояние). Плазмиды придают бактерии дополнительные наследственные признаки, но не являются обязательными для нее. Плазида может быть элиминирована (удалена) из бактерии, что не влияет на ее жизнеспособность. В настоящее время известно свыше 20 типов плазмид у бактерий. Назовем некоторые из них:

F-плазида, фактор фертильности (лат. *fertilis* – плодovitый), или половой фактор, определяет способность бактерий к образованию половых ворсинок и к конъюгации;

R-плазмиды определяют резистентность бактерий к лекарственным средствам. Передача R-плазмид от одних бактерий к другим приводит к быстрому распространению лекарственноустойчивых бактерий.

Col-плазмиды кодируют синтез бактериоцинов – антибактериальных веществ, вызывающих гибель других бактерий того же или родственных видов. Впервые они были обнаружены у *Escherichia coli*, отсюда и их название – колицины. Известны бактериоцины стафилококков (стафилоцины), палочек чумы (пестицины) и других бактерий. Наличие плазмиды бактериоциногенности придает бактериям селективные преимущества в биоценозах. Это может иметь для организма человека положительное значение, если колицины кишечной палочки губительно действуют на патогенные энтеробактерии, и отрицательное, если бактериоцины продуцируются патогенными микробами.

Ent-плазмиды определяют продукцию энтеротоксина. Hly-плазида – гемолитическую активность.

Дополнительными генетическими элементами являются также профаги – геномы умеренных фагов, которые, встраиваясь в хромосому бактерии, могут придавать ей определенные свойства. Например, tox-гены, кодирующие образование экзотоксинов коринебактерий дифтерии, клостридий ботулизма и др.

Генотип – это общая сумма генов микроба. В отношении микроорганизмов "генотип" означает то же, что "геном".

Фенотип – это весь комплекс свойств микроба, проявление генотипа в определенных, конкретных условиях существования.

Генотип – это возможные способности клетки, а фенотип - видимое их проявление.

Гены, ответственные за синтез какого-то соединения, обозначают строчными буквами латинского алфавита по названию соединения, например, при наличии гена, кодирующего синтез лейцина, – *leu*⁺, при отсутствии – *leu*⁻. Гены, ответственные за резистентность к лекарственным

средствам, бактериофагам, ядам, обозначают буквой г (лат. *resistentia*), а чувствительные – буквой s (лат. *sensitiv* – чувствительный). Например, чувствительность к стрептомицину обозначают str5, резистентность strr. Фенотип бактерий обозначается теми же знаками, но с прописной буквы: соответственно Leu+, Leir, Str1, Str8.

Наследственность – способность сохранения постоянства специфических свойств организма на протяжении ряда поколений, то есть способность воспроизводить себе подобных.

Изменчивость – различие в свойствах между особями одного вида. Различают изменчивость наследственную и ненаследственную.

Ненаследственная или фенотипическая изменчивость (модификации) не затрагивает геном микроба, не передается по наследству. Модификации возникают в ответ на изменяющиеся условия окружающей среды. При устранении фактора, вызвавшего модификацию, изменение исчезает. Например, кишечная палочка только в присутствии лактозы продуцирует ферменты, разлагающие этот углевод. Стафилококки образуют фермент, разрушающий пенициллин, только в присутствии этого антибиотика. Примером модификаций является также образование L-форм бактерий под действием пенициллина и возврат к исходной форме после прекращения его действия.

Наследственная или генотипическая изменчивость возникает в результате изменения самого генома. Изменение генома может наступить в результате мутаций или рекомбинаций.

Мутации (лат. *mutatio* – изменение) – изменение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, в результате которого происходит появление или потеря признака. Таким признаком может быть способность синтезировать какую-либо аминокислоту или резистентность к антибиотику.

По происхождению мутации могут быть спонтанными или индуцированными. Индуцированные мутации получают в эксперименте под влиянием мутагенов: радиации,

некоторых химических веществ. Спонтанные мутации возникают под влиянием естественных факторов. Частота спонтанных мутаций невелика, в среднем 1 на 10 млн. Образовавшиеся клетки называют мутантами. Если возникшая мутация выгодна для микроба и создает для него преимущества в определенных условиях среды, то мутанты выживают и дают многочисленное потомство. Если же мутация не создает преимуществ, мутанты погибают.

Мутации микроорганизмов могут иметь важное практическое значение. Получены штаммы-мутанты грибов и актиномицетов, являющиеся продуцентами антибиотиков во много раз более активных, чем исходные культуры. Из мутантов с ослабленной вирулентностью могут быть получены вакцинные штаммы для получения живых вакцин.

Диссоциация бактерий (лат. *dissociatio* – расщепление) – одно из проявлений мутаций. В популяции микроорганизмов появляются особи, вырастающие при посеве на плотную питательную среду в виде гладких S-форм и шероховатых R-форм колоний (англ. *smooth* – гладкий, *rough* – шероховатый). S-формы колоний - круглые, влажные, с гладкой блестящей поверхностью, с ровными краями. R-формы колоний неправильной формы, сухие, с изрезанными краями и шероховатой поверхностью.

Процесс диссоциации, то есть расщепления особей в популяции, обычно протекает в одном направлении: от S- к R-форме, иногда через промежуточные формы. У большинства видов бактерий вирулентными являются S-формы. Исключение составляют возбудители чумы, сибирской язвы, туберкулеза.

Генетические рекомбинации - (лат. *recombinatio* – перестановка) у бактерий – это передача генетического материала (ДНК) от клетки-донора к клетке-реципиенту, в результате появляются рекомбинанты с новыми свойствами.

Известны три типа генетических рекомбинаций: трансформация, трансдукция, конъюгация (рис. 5).

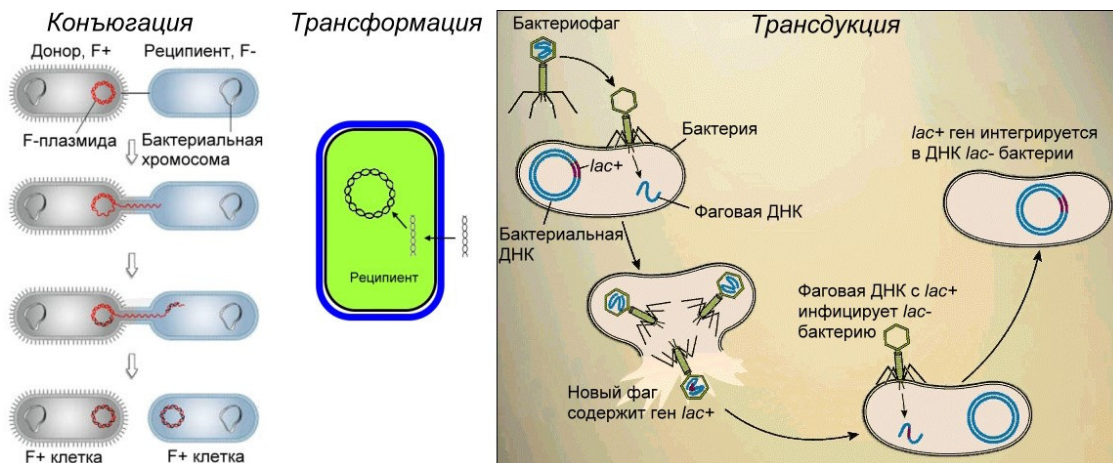


Рисунок 5 – Генетические рекомбинации у бактерий.

Трансформация (лат. *transformatio* – превращение) – передача ДНК в виде свободного растворимого вещества, выделенного из клетки донора в клетку реципиента. При этом рекомбинация происходит, если ДНК донора и реципиента родственны друг другу, и может произойти обмен гомологичных участков своей и проникшей извне ДНК. Впервые явление трансформации открыл Ф. Гриффите в 1928 году. Он ввел мышам живой неvirulentный бескапсульный штамм пневмококка и одновременно убитый virulentный капсульный штамм пневмококка. Мыши погибли, из их крови была выделена живая культура virulentного капсульного пневмококка. Сам Гриффите считал, что трансформация произошла путем поглощения неvirulentным пневмококком капсульного вещества virulentного штамма. Позже, в 1944 году О. Эвери, К. Маклеод и М. Маккарти доказали, что трансформирующее вещество – это ДНК, которая является носителем генетической информации. Так впервые была доказана роль ДНК как материального субстрата наследственности.

Трансдукция (лат. *transductio* – перенос) – передача ДНК от бактерии-донора к бактерии-реципиенту с помощью бактериофага. Различают неспецифическую трансдукцию, специфическую и abortивную. При неспецифической трансдукции может быть перенесен любой фрагмент ДНК донора. При этом ДНК донора попадает в головку

бактериофага, не включаясь в его геном. Принесенный бактериофагом фрагмент ДНК донора может включиться в хромосому реципиента. Таким образом, бактериофаг в этом случае является только переносчиком ДНК, сама фаговая ДНК не участвует в образовании рекомбинанта.

При специфической трансдукции гены хромосомы донора замещают собою некоторые гены бактериофага. В клетке реципиента ДНК бактериофага вместе с фрагментом хромосомы донора включается в строго определенные участки хромосомы реципиента в виде профага. Реципиент становится лизогенным и приобретает новые свойства.

Трансдукция называется абортивной, если фрагмент ДНК, принесенный бактериофагом, не вступает в рекомбинацию с хромосомой реципиента, а остается в цитоплазме и может кодировать синтез какого-то вещества, но не реплицируется при делении, передается только одной из двух дочерних клеток и затем утрачивается.

Конъюгация (лат. *conjugatio* – соединение) – это переход ДНК из клетки-донора ("мужской") в клетку-реципиент ("женскую") через половые пили при контакте клеток между собой. Донором является "мужская" клетка (F⁺-клетка), она содержит F-фактор – половой фактор, который кодирует образование половых пилей. Клетки, не содержащие F-фактора (F⁻-клетки), являются женскими. При конъюгации клетки-доноры соединяются с клетками-реципиентами с помощью F-пилей, через которые происходит переход ДНК. Если клетка-реципиент получает F-фактор, она становится "мужской" F⁺-клеткой.

Если F-фактор включен в хромосому, то бактерии способны передавать фрагменты хромосомы и называются Hfr-клетками (англ. *high frequency of recombination* – высокая частота рекомбинации). При конъюгации хромосома разрывается в месте нахождения F-фактора и реплицируется, причем одна нить ДНК передается в клетку реципиента, а копия остается в клетке донора. F-фактор включается в хромосому в определенном ее участке, поэтому перенос отдельных генов хромосомы совершается в строго определенное время. Таким образом, прерывая процесс

конъюгации через разные промежутки времени путем встряхивания взвеси бактерий, можно выяснить, какие признаки передаются за это время. Это позволяет построить карту хромосомы, то есть последовательность расположения генов в хромосоме. Перенос всей хромосомы может длиться до 100 минут. F-фактор при этом переносится последним.

4 ПОНЯТИЕ О ПАТОГЕННОСТИ И ВИРУЛЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Способность микроорганизмов вызывать патологические процессы в макроорганизме, т.е. заболевания, называется патогенностью (от лат. *pathos* – страдание, *genos* – рождение). Микроорганизмы, обладающие этой способностью, называются патогенными. Патогенность – это генетически обусловленный видовой признак. Для большинства патогенных микроорганизмов характерна специфичность – способность данного вида микробов вызывать определенное заболевание. Например, холеру вызывает холерный вибрион, гонорею – гонококк и т.д.

Разные штаммы одного и того же вида могут обладать различным по патогенности действием. Степень или мера патогенности называется вирулентностью.

Вирулентность, как и всякое свойство микроорганизма, может изменяться. Эти изменения носят либо фенотипический характер, либо являются результатом нарушений в геноме клетки – тогда они передаются по наследству. Фенотипические изменения, ведущие к ослаблению вирулентности, возникают тогда, когда микроорганизмы попадают в неблагоприятные условия, например при воздействии на них различных физических и химических факторов. Эти изменения восстанавливаются, вирулентность снова повышается при попадании микробов в благоприятные условия существования. Стабильное снижение вирулентности можно получить при длительном действии различных веществ. Так, Кальметт и Герен получили БЦЖ – живую вакцину из туберкулезных бактерий. Ученые 13 лет пересеивали культуру на среды, содержащие бычью желчь. При этом имела место селекция (отбор) авирулентных бактериальных клеток, обладающих высокой устойчивостью к желчи. Количество их в исходной культуре было невелико (их свойства в популяции не проявлялись).

Вирулентность можно усиливать при пассировании микроорганизмов через чувствительных к ним животных. При этом имеет место селекция вирулентных особей популяции.

Вирулентность микроорганизмов обусловлена их способностью к адгезии (прилипанию), колонизации (размножению), инвазии (проникновению в ткани, клетки макроорганизма) и подавлению фагоцитоза.

Адгезия – способность адсорбироваться на определенных, чувствительных к данному микробу клетках организма хозяина. Она обусловлена, с одной стороны, поверхностными структурами микробной клетки (пили и пр.), с другой – наличием рецепторов клетки макроорганизма, способных вступать в соединение с микробной клеткой.

Колонизация может быть на поверхности клеток, к которым прилипли микробы (например, холерные вибрионы размножаются на энтероцитах), или внутри клеток, в которые проникают прилипшие микробы (например, дизентерийные палочки размножаются в клетках толстого отдела кишки).

Инвазивность связана со способностью микробов продуцировать ферменты, нарушающие (повышающие) проницаемость соединительной и других тканей. К таким ферментам относятся:

а) гиалуронидаза (фактор распространения), которая разрушает гиалуроновую кислоту соединительной ткани и тем самым способствует проникновению микробов в ткани;

б) нейраминидаза, отщепляющая нейраминовую кислоту от гликопротеидов, гликолипидов, полисахаридов, входящих в состав разных тканей, и таким образом повышающая их проницаемость.

Подавление фагоцитоза осуществляют капсулы бактерий. Вещества, входящие в состав капсул различных микроорганизмов, неодинаковы, и их функции тоже различны. Так, полипептид капсул возбудителя сибирской язвы предохраняет его от захвата фагоцитами; полисахарид

синегнойной палочки угнетает и захват, и внутриклеточное переваривание бактерий.

Кроме перечисленных факторов, микробы защищаются от фагоцитоза некоторыми ферментами. Например, коагулаза стафилококков способствует свертыванию плазмы, что приводит к образованию защитного "чехла" вокруг микробной клетки; фибринолизин растворяет фибрин, способствуя этим распространению микробов.

Особое значение в вирулентности имеет способность микроорганизмов синтезировать токсины (яды). Токсины, образуемые микроорганизмами, делят на две группы – экзотоксины и эндотоксины (табл. 2).

Таблица 2 – Сравнительная характеристика экзо- и эндотоксинов

Экзотоксины	Эндотоксины
Белковой природы	Липополисахаридопротеиновый комплекс
Диффундируют из клетки в окружающую среду	Связаны с телом микробной клетки
Высокотоксичны	Малотоксичны
Избирательно действуют на органы и ткани (специфичны)	Вызывают общие явления интоксикации
Термолабильны	Термостабильны
Под действием формалина переходят в анатоксин	Под действием формалина частично обезвреживаются
Образуются в основном грамположительными бактериями	Образуются в основном грамотрицательными бактериями

Экзотоксины являются продуктами метаболизма микробов, секретируемыми в окружающую среду. Они имеют белковое происхождение, что обуславливает их малую устойчивость к внешним воздействиям. Исключение

составляют нейротоксин палочки ботулизма, энтеротоксины стафилококка, холерного вибриона, которые выдерживают кратковременное кипячение.

Микроорганизмы, образующие экзотоксин, обычно локализируются в месте проникновения (во входных воротах), а продуцируемый ими экзотоксин циркулирует в макроорганизме, например столбнячный, дифтерийный и др.

Экзотоксины характеризуются высокой токсичностью и выраженной специфичностью – органотропностью. Каждый вид токсина поражает определенные органы или ткани. Например, столбнячный токсин поражает нервную систему, а дифтерийный токсин – мышцы сердца и т.д.

По своей биологической активности токсины неодинаковы: некоторые из них полностью определяют клиническую картину заболевания, например столбнячный, дифтерийный, ботулинический токсины. Другие принимают более ограниченное участие в инфекционном процессе, вызывают нетипичные по клиническим проявлениям реакции, например гемолитические токсины стафилококков, кишечной палочки и др.

Экзотоксины диффундируют в окружающую среду. Их получают, засевая токсигенную культуру в жидкую питательную среду и выращивая ее в условиях максимального накопления токсина. После фильтрации через бактериальные фильтры получают фильтрат, содержащий экзотоксин.

В настоящее время ряд экзотоксинов получены в чистом виде и хорошо изучены. Очищенные токсины обладают более высокой токсичностью.

Токсическое действие экзотоксинов снимается, если блокировать активный центр яда, воздействуя на него химическими и физическими факторами. При действии 0,4 % формалина, выдерживании в условиях 39-40 °С температуры в течение 3-4 недель экзотоксины утрачивают токсические свойства, но сохраняют антигенные. Такие препараты готовят как вакцинные и называют анатоксинами.

Эндотоксины – липополисахаридопротеиновый комплекс, тесно связанный с клеткой микроорганизма. Они не специфичны. Клиническая картина, вызываемая эндотоксинами разных микроорганизмов, однотипна: реакция организма сопровождается обычно общими явлениями интоксикации – лихорадкой, головной болью и т.д.

Тесная связь эндотоксина с клетками микроорганизма обуславливает его устойчивость к температурному и другим внешним факторам. Для получения эндотоксина необходимо разрушить клетку микроорганизма.

Действие токсина определяют на чувствительных к данному токсину животных. Например, дифтерийный токсин испытывают на морских свинках, ботулинический – на белых мышах и т.д.

Для определения вирулентности и силы токсина (токсичности) микробов пользуются условными обозначениями: DLM, DCL, LD50.

DLM (*Dosis letalis minima*) – наименьшая доза микробов или токсина, которая убивает большинство подопытных животных. DCL (*Dosis certe letalis*) – наименьшая доза микробов или токсина, которая убивает всех животных, взятых в опыт. LD50 (*Dosis letalis*) – доза микробов или токсина, которая приводит к гибели 50 % подопытных животных.

Дозы, определяющие вирулентность или силу токсина, зависят от вида и штамма микроба, вида токсина, а также от способа введения. Для определения силы токсина из исследуемого материала делают ряд последовательных разведений, каждое из них испытывают на группе животных, чувствительных к данному виду токсина. Для получения сравнительных результатов при определении доз (DLM, DO, LD50) исследование проводят на животных одного вида и пола, имеющих одинаковую массу тела.

5 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

5.1 Питательные среды для культивирования микроорганизмов

В лабораторных условиях микроорганизмы культивируются на питательных средах, поэтому питательная среда должна содержать все вещества, необходимые для их роста. Конструктивные и энергетические процессы у микроорганизмов разнообразны, поэтому разнообразны и их потребности в питательных веществах. Из этого следует, что универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех микроорганизмов, не существует.

Основными компонентами любой питательной среды для культивирования микроорганизмов являются соединения углерода и азота, именно эти соединения определяют специфичность большинства питательных сред. Помимо источников углерода и азота многие микроорганизмы требуют наличия в среде так называемых факторов роста, к которым относятся витамины, аминокислоты и азотистые основания. Примерами смесей, содержащих различные факторы роста, могут служить дрожжевой автолизат, дрожжевой и кукурузный экстракты. Для построения веществ клетки микроорганизмам необходимы также сера, фосфор, калий, натрий, железо и другие элементы. Потребности микроорганизмов в этих элементах удовлетворяются обычно за счет минеральных солей. Таким образом, "минеральный фон" сред для культивирования многих микроорганизмов может быть близким по составу. Питательные среды должны быть сбалансированы по составу, изотоничными по концентрации растворенных веществ, иметь оптимальные влажность, вязкость, реакцию среды (pH), окислительно-восстановительный потенциал.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов принято классифицировать по ряду

признаков. По составу среды делят на две группы: натуральные (естественные) неопределенного состава и синтетические.

Натуральными называются среды, состоящие из продуктов растительного и животного происхождения: овощные, фруктовые соки, молоко, животные ткани, разведенная кровь, экстракты, полученные из природных субстратов. На натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в этих средах имеются, как правило, все компоненты, необходимые для их роста и развития. Однако данные среды мало пригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку они имеют сложный и непостоянный химический состав. Примерами натуральных сред неопределенного состава, которые широко применяются в лабораторной практике, служат мясопептонный бульон (МПБ), неохмеленное пивное сусло, дрожжевая и картофельная среды, почвенная вытяжка, кукурузный экстракт.

Синтетическими называют среды, в состав которых входят только определенные химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Эти среды наиболее удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов. В настоящее время микробиологи располагают синтетическими средами, не уступающими по своему составу натуральным.

По назначению различают элективные, дифференциально-диагностические (индикаторные) среды и универсальные (основные или стандартные). К универсальным средам относят среды, благоприятные для выращивания многих видов микроорганизмов: мясопептонный бульон, неохмеленное пивное сусло и другие. Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов и менее пригодны или даже совсем не пригодны для развития других. Эти среды применяют для выделения микроорганизмов из мест их

естественного обитания или для получения накопительных культур. Индикаторные среды позволяют достаточно быстро отличить один вид микроорганизмов от других. Эти среды применяются в клинической бактериологии, при генетических исследованиях, а также для идентификации микроорганизмов.

По консистенции различают жидкие, плотные и сыпучие среды. Жидкие применяются для выяснения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена; плотные – для выделения чистых культур (получения изолированных колоний), для хранения культур, количественного учета микроорганизмов и т.д.; сыпучие (разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанный питательным раствором) – в микробиологической промышленности.

Для уплотнения сред употребляют агар-агар, желатину, кремнекислый гель (селикагель). Агар-агар используют особенно часто. Это сложный полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей. Большинство микроорганизмов не используют его в качестве питательного субстрата. В воде агар-агар образует гели, плавящиеся при 100 °С, а затвердевающие при 40 °С. Чаще всего агар-агар добавляют к средам в количестве 2 %. Среду с внесенным в нее агаром нагревают на кипящей водяной бане до полного расплавления агара. Если микроорганизмы необходимо выращивать на скошенной агаризованной среде в пробирках, то расплавленную агаризованную среду разливают в пробирки (до 1/3 ее высоты), стерилизуют, затем "скашивают". Для этого пробирки с расплавленной средой устанавливают в наклонном положении и дают среде застыть. Расстояние от среды до ватной пробки должно составлять 5-6 см. Среду, предназначенную для выращивания микроорганизмов в чашках Петри, стерилизуют, а затем стерильно разливают в стерильные чашки по 20–30 мл.

Желатина – это белок, получаемый при вываривании костей и хрящей животных. Желатиновый гель плавится при

температуре 23–26 °С (эта температура ниже температуры культивирования многих микроорганизмов: 30–37 °С). Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами, выделяемыми некоторыми микроорганизмами в среду. Эти свойства желатины ограничивают ее применение в качестве уплотнителя сред. Желатину добавляют к жидким питательным средам в количестве 10–15 %. Ее используют главным образом для выявления протеолитической активности микроорганизмов.

Кремнекислый гель (силикагель) применяют как твердую основу для синтетических сред. Приготавливают его путем смешения равных объемов соляной кислоты (удельная масса 1,1) и жидкого стекла (Na_2SiO_3 или K_2SO_3) с последующей разливкой по 25–30 мл в чашки Петри и выдержкой в течение 1-2 ч. Образовавшийся гель отмывают сначала проточной, затем горячей дистиллированной водой для удаления хлоридов.

5.1.1 Приготовление питательных сред

Для приготовления питательных сред применяют чистую посуду, не содержащую посторонних веществ. Лучше пользоваться стеклянной посудой (колбы, флаконы, стаканы, матрасы, пробирки и другие). Новую стеклянную посуду моют и погружают на 8–10 ч в 1–2 %-ный раствор соляной или серной кислоты, или кипятят в подкисленной воде, затем тщательно прополаскивают дистиллированной водой и сушат. Бывшую в работе посуду моют ершами или щетками в теплой воде, применяя кальцинированную соду, мыльный раствор, полужидкое мыло или синтетические моющие средства, прополаскивают сначала проточной водопроводной, затем дистиллированной водой. Очень загрязненную посуду со следами жира обрабатывают хромовой смесью и тщательно промывают водой. Сушат посуду при комнатной температуре

или в сушильном шкафу, закрывают ватными пробками с бумажными колпачками и хранят в защищенном от пыли месте.

Жидкие питательные среды фильтруют через бумажный или полотняный фильтр и разливают в пробирки при помощи воронок с короткой резиновой трубкой, зажимом Мора и стеклянным наконечником. Для уплотнения жидких сред в них вносят необходимое количество агара и нагревают на кипящей водяной бане до полного растворения. Расплавленные агаризованные среды фильтруют через ватно-марлевые фильтры и разливают через металлические двустенные воронки для горячего фильтрования. Для получения скошенного агара пробирки заполняют на $1/2$ их высоты, для залива чашек – на $2/3$ (лучше использовать пробирки большего объема), после чего стерилизуют. Можно, не разливая по пробиркам, стерилизовать среду в колбах. Пробирки и колбы перед стерилизацией закрывают ватными пробками. После стерилизации пробирки для скошенного агара устанавливают в наклонном положении и оставляют для застывания. Среда не должна доходить до ватной пробки на 5-6 см.

Добавляемую в жидкие питательные среды желатину оставляют для набухания на 10-15 мин, после чего нагревают на водяной бане до полного растворения.

Стерилизуют среды с желатиной при 0,05 МПа в течение 15 мин, избегая повторных стерилизаций, особенно при pH среды ниже 6,0 или выше 7,3.

Хранят стерильные питательные среды в прохладном, умеренно сухом помещении, в плотно закрытых шкафах, защищающих от действия света и высыхания. В сырых помещениях ватные пробки впитывают влагу, что приводит к развитию мицелиальных грибов, которые впоследствии могут попасть внутрь колб и пробирок. Каждую колбу со средой снабжают этикеткой с обозначением ее состава (или названия) и датой приготовления.

5.2 Методы стерилизации питательных сред, посуды и инструментов

Стерилизация – один из важнейших приемов в микробиологической практике. Под стерилизацией понимают уничтожение всех микроорганизмов. Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах.

Стерилизацией (*sterilis* – бесплодный) называют полное уничтожение вегетативных клеток микроорганизмов и их спор в каком-либо материале (питательной среде, посуде, приборе, инструменте, перевязочном материале и т. д.). Выбор способа стерилизации зависит от свойств стерилизуемого объекта. От стерилизации следует отличать частичное обеспложивание (пастеризацию при которой погибают в основном вегетативные клетки микроорганизмов).

Асептика – система мероприятий, предупреждающих внесение (попадание) посторонних микроорганизмов из окружающей среды в материал для исследования, в питательные среды и культуры микроорганизмов при лабораторных исследованиях. Асептика предусматривает стерилизацию инструментов и материалов, соблюдение особых санитарно-гигиенических правил и приемов работы.

Антисептика – комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов, способных вызвать инфекционный процесс. В качестве антисептиков используются различные химические соединения, оказывающие антимикробное действие: 70%-ный этиловый спирт, 5%-ный спиртовой раствор йода, 0,5-2%-ный раствор хлорамина, различные детергенты.

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

распространенным дезинфицирующим веществам относятся хлорная известь (0,1–10%-ный раствор), хлорамин (0,5–5%-ный раствор), фенол или карболовая кислота (3–5%-ный раствор).

Существует много способов стерилизации, целесообразность применения каждого из них определяется особенностями материала, подлежащего стерилизации, его физическими свойствами, химическим составом, целью исследования.

Полная или частичная стерилизация осуществляется с помощью влажного жара, сухого жара, фильтрации, облучения или различных химических агентов.

Автоклавирование – наиболее надежный способ стерилизации питательных сред. Он основан на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного (табл. 3). Создание избыточного давления возможно только при высокой температуре. Совместное действие высокой температуры и давление пара обеспечивает высокую эффективность данного способа (погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов).

Таблица 3 – Температура насыщенного пара при различных давлениях

Давление	Т°С	Давление	Т°С
0,00	100	0,15	128
0,05	112	0,20	134
0,10	121	0,30	144

Стерилизацию паром под давлением осуществляют в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах – автоклавах, представляющих собой металлический двустенный резервуар (рис. 6).

Автоклав работает при высоких давлениях и температурах, и к его обслуживанию допускают только

специально подготовленных лиц. При работе с автоклавом строго соблюдают правила, указанные в прилагаемой к аппарату инструкции. Подготовку автоклава к работе и процесс стерилизации осуществляют следующим образом. Тщательно проверяют исправность аппарата. В водопаровую камеру через воронку заливают дистиллированную воду до тех пор, пока ее уровень не дойдет до верхней метки водомерного стекла. После этого кран перекрывают. Питательные среды в пробирках или колбах, закрытых ватными пробками с бумажными колпачками, завернутую в бумагу посуду и другой стерилизуемый материал помещают на решетчатую подставку и накрывают бумагой. Автоклав закрывают крышкой, равномерно завинчивают зажимы, не допуская перекосов и неплотностей. Открывают спускной кран пароотводной трубы, включают автоклав в электрическую сеть и начинают прогрев. Образующийся пар должен вытеснить из автоклава весь воздух, так как температура чистого насыщенного пара выше температуры смеси пара с воздухом. После полного удаления воздуха и влажного пара непрерывную струю свистящего сухого пара выпускают еще 10–15 мин и перекрывают спускной кран. Пар выпускают через резиновый шланг, надетый на пароотводную трубу и опущенный в сосуд с водой. За повышением рабочего давления в автоклаве следят по манометру. Время стерилизации отсчитывают с момента установления необходимого давления.

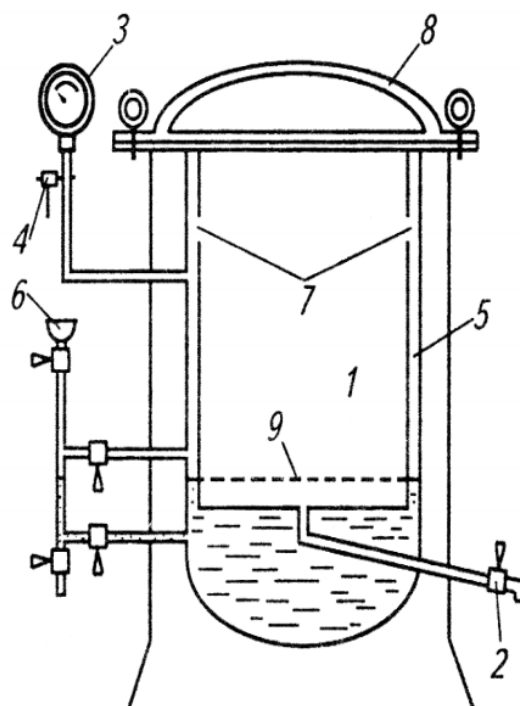


Рисунок 6 – Схема автоклава: 1 – стерилизационная камера; 2 – кран для выхода воздуха; 3 – манометр; 4 – предохранительный клапан; 5 – водопаровая камера; 6 – воронка для заполнения автоклава водой; 7 – отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; 8 – крышка автоклава; 9 – подставка для размещения стерилизуемых материалов

По истечении времени стерилизации автоклав выключают из электрической сети, нагревание прекращают и ждут момента, когда давление по манометру упадет до нуля. Только после этого можно открыть спускной кран, осторожно выпустить из автоклава остаток пара, затем отвинтить и откинуть крышку. Если спускной кран открыть раньше, чем стрелка займет нулевое положение, может произойти бурное вскипание жидких сред и смачивание ватных пробок. Резкое снижение давления может привести к выталкиванию пробок и даже выплескиванию жидкости из сосудов. Нельзя

преждевременно отвинчивать и открывать крышку, так как вырывающиеся струи пара могут вызвать ожоги обслуживающего персонала и окружающих. Автоклав дают несколько остыть и вынимают простерилизованный материал. Оставлять автоклав закрытым до полного охлаждения не рекомендуется, так как пар конденсируется, и влага пропитывает ватные пробки. В нерабочем состоянии автоклав держат открытым и свободным от воды. Для проверки стерильности питательные среды помещают на 2–3 суток в термостат при 30 °С, и, если обнаруживают рост микроорганизмов, среды готовят заново. Для контроля соответствия показаний манометра температуре внутри автоклава пользуются веществами, имеющими определенную точку плавления. Например, бензонафтол плавится при 110 °С, антипирин – при 113 °С, резорцин и сера – при 119 °С, бензойная кислота – при 120 °С. В стеклянную ампулу или пипетку Пастера длиной 5-6 см, запаиваемую с одного конца, насыпают одно из указанных веществ и прибавляют несколько кристаллов сухого анилинового красителя (фуксина, сафранина или метиленового синего). Трубочку запаивают и помещают в автоклав между стерилизуемыми предметами. Если температура соответствует давлению, контрольное вещество расплавится и окрасится в цвет взятого красителя.

Температура и продолжительность автоклавирования определяются составом питательных сред и их рН. Субстраты, легко разрушающиеся при нагревании до 120 °С, стерилизуют при 0,05 МПа. При кислой реакции некоторые вещества, входящие в состав питательной среды, в процессе автоклавирования гидролизуются. Во избежание этих явлений, растворы некоторых компонентов (сахара, многоатомные спирты, витамины, аминокислоты) стерилизуют отдельно при значениях рН, обеспечивающих их устойчивость, и добавляют после стерилизации. Такой способ обеспложивания называется раздельной стерилизацией.

Стерилизация текучим паром (дробная стерилизация). Данный способ применяют для стерилизации питательных сред, изменяющих свой состав и свойства под действием температур выше 100 °С. Сущность дробной стерилизации состоит в том, что нагревание среды (или ее компонентов) проводят при 100 °С три раза по 30 мин трое суток подряд. Кратковременное прогревание среды кипячением уничтожает в основном термолабильные вегетативные клетки микроорганизмов. Поэтому между нагреваниями питательные среды выдерживают при комнатной температуре (или в термостате при 30 °С) и дают возможность прорасти оставшимся жизнеспособным спорам.

Образовавшиеся из термоустойчивых спор вегетативные клетки погибают при повторном кипячении. Продолжительность нагревания может быть увеличена до 45—60 мин, что зависит от объема жидкости. Дробную стерилизацию питательных сред проводят в аппарате Коха или в автоклаве с закрытой, но незавинченной крышкой. Так как нагревание ведут в парах кипящей воды, способ называют стерилизацией текучим паром. Дробной стерилизации подвергают среды, в состав которых входят сахара, многоатомные спирты, желатина. Стерилизация путем прерывистого нагрева была предложена английским физиком Джоном Тиндалем и получила название тиндализации. Среда, необратимо изменяющиеся при кипячении, осторожно прогревают при более низкой температуре: при 60–80 °С в течение 5 суток подряд по 30–60 мин или при 56–58 °С на протяжении 6-7 суток, в первые сутки – 2 ч, в последующие – по 1 ч. Температурную обработку сред ведут на водяной бане или в ультратермостате, где температура автоматически поддерживается на определенном уровне с помощью специального устройства. В промежутках между нагревами среды выдерживают в обычном термостате при 30 °С.

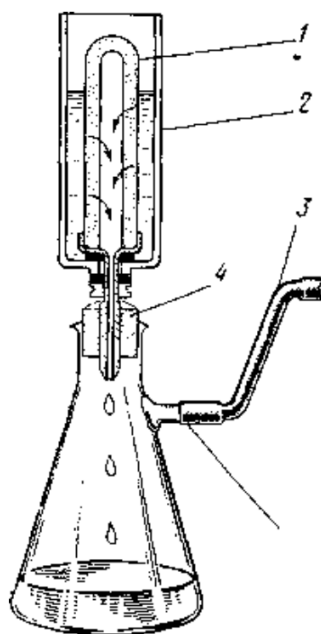
Пастеризация, или неполная стерилизация, предложена Луи Пастером. Она предназначена для уничтожения

в основном аспорогенных микроорганизмов однократным прогреванием при температуре 60–75 °С и выдержке 15–30 мин или при 80 °С в течение 10–15 мин. Пастеризации подвергают продукты и среды, которые при воздействии более высоких температур претерпевают глубокие изменения, теряют качество и питательную ценность. Пастеризацию широко применяют в пищевой промышленности.

Стерилизацию жидких питательных сред, не выдерживающих даже незначительного нагревания, проводят фильтрованием через специальные бактериальные фильтры. На бактериальных фильтрах задерживаются механические взвешенные примеси, в том числе и клетки микроорганизмов. Исключение составляют вирусы и фаги. Фильтрованию подвергают среды с белками, антибиотиками, витаминами, летучими веществами, а также культуральные жидкости с целью освобождения от клеток и сохранения всех продуктов метаболизма в неизменном виде. Фильтры изготовляют из положительно заряженных материалов. Поэтому на стенках пор фильтров возникает соответствующий заряд. Вследствие того, что большинство микроорганизмов в водных растворах несет на своей поверхности электроотрицательный заряд, при фильтрации имеет место не только механическая задержка клеток, но и их адсорбция.

Бактериальные фильтры изготовляют различной формы, из разного материала и с разным диаметром пор, что указывается на упаковке. Для стерилизации фильтрованием используют асбестовые фильтры Зейтца, мембранные нитроцеллюлозные фильтры и керамические свечи (рис. 7). Свечи Шамберлана изготовляют из каолина с примесью кварцевого песка, отечественные фильтры ГИКИ – из каолина, свечи Берке-Фельда – из инфузорной земли и асбеста. Свечи прокаливают в специальных печах при определенном давлении и температуре. Мембранные и асбестовые фильтры используют однократно. Свечи после окончания фильтрования промывают дистиллированной водой,

просасывая ее в обратном направлении, заливают на ночь концентрированной серной кислотой с небольшим количеством нитрата натрия и хлорнокислого калия. На следующий день свечи вновь многократно промывают дистиллированной водой и кипятят для удаления растворенного воздуха. Для очистки от посторонних органических примесей свечи можно прокалывать в муфельной печи.



*Рисунок 7 – Фильтрация через керамические свечи:
1 – свеча; 2 – стеклянный сосуд; 3- трубка из
толстой резины; 4 – резиновая пробка;
5 – ватная пробка*

Для полной или частичной стерилизации применяют ультрафиолетовые, рентгеновские и гамма-лучи. В лабораторных условиях наибольшее значение имеют ультрафиолетовые лучи. УФ-облучение также применяют для стерилизации помещений. Ионизирующее излучение применяют для стерилизации пищевых продуктов и других компактных материалов.

Стеклянную посуду стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 165–170 °С в течение 1,5–2 ч или путем автоклавирования. Посуду перед стерилизацией тщательно моют и высушивают. Пробирки и колбы закрывают ватными пробками. Пробирки завертывают по 10–40 шт. в бумагу. На колбы надевают бумажные колпачки, предохраняющие горлышко от пыли. В концы пипеток, которые берут в рот, вставляют ватные тампоны. Пипетки заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4–5 см и помещают в специальные металлические или картонные пеналы с крышкой. При работе пипетки вынимают из пакета только за верхний конец, где вставлен тампон. Чашки Петри завертывают в бумагу каждую отдельно или вместе по 2–3 шт. Подготовленную посуду размещают на решетчатых полках в сушильном шкафу или загружают в автоклав, но не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию горячего воздуха или сухого насыщенного пара и равномерный нагрев посуды. Сушильный шкаф должен быть плотно закрыт. Если шкаф не снабжен терморегулятором, необходимо все время следить за температурой. Повышать температуру более 175 °С не следует, так как бумага и пробки начинают разрушаться. Чтобы предохранить посуду от растрескивания, по окончании стерилизации сушильный шкаф охлаждают до 100–70 °С, после чего посуду можно вынимать. Для сохранения стерильности посуду разворачивают непосредственно перед работой.

Существует несколько видов стерилизации посуды и инструментов. Стерилизация кипячением - наиболее простой и доступный способ. Режим такой стерилизации – 100 °С, 40 минут. Стерилизация путем прокаливания (фломбирование) осуществляется путем выдерживания металлических инструментов в пламени горелки.

Стерилизация текущим паром производится в текучепаровом аппарате Коха, представляющем собой металлический полый цилиндр с двойным дном (это

пространство заполнено водой) и крышкой конической формы.

Стерилизуемый материал загружают в камеру аппарата неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта его с паром. Стерилизацию текучим паром производят несколько раз, поскольку одно – кратное подогревание до температуры 100° не обеспечивает полной стерильности. Такая стерилизация называется дробной. Она применяется для сред, разрушающихся при температуре выше 100°. Отработку стерилизуемого материала текучим паром производят в течение 3 дней по 30 минут ежедневно. Стерилизация горячим воздухом (сухим паром) является основным способом стерилизации стеклянной посуды. Она осуществляется в сушильных шкафах при температуре 160-165 °С в течение двух часов. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Сушильные шкафы изготавливаются из термостойких материалов (обычно из металла и асбеста). В шкафу имеется отверстие, в котором укреплен термометр. Поддержание необходимой температуры обеспечивается терморегулятором. Мелкие металлические инструменты (петли, иглы, пинцеты, ножницы) стерилизуют прокаливанием в пламени непосредственно перед использованием. Изделия из резины (резиновые пробки, перчатки, шланги) стерилизуют автоклавированием. Предметы, изготовленные из термостабильных пластмасс, например, центрифужные пробирки, стерилизуют УФ-лучами, окисью этилена.

Для полной и частичной стерилизации применяют ультрафиолетовые, рентгеновские и гамма-лучи. В лабораторных условиях наибольшее значение имеют ультрафиолетовые лучи.

Химические методы применяются в основном при дезинфекции. Ряд химических агентов замедляет или полностью тормозит рост микроорганизмов. Гибель микроорганизмов при дезинфекции происходит в основном в

результате гидролиза компонентов клетки, коагуляции белков, инактивации клеточных ферментов.

К группе антисептиков относят органические и неорганические вещества. Из неорганических антисептиков широко используются неорганические кислоты, щелочи и соли, хлорная известь, йод; из органических – этиловый и бутиловый спирты, альдегиды, органические кислоты и растворители.

В лабораторной практике методы дезинфекции применяют для обезвреживания рабочего стола, рук, камер для посева (боксов).

5.3 Методы и условия культивирования микроорганизмов

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется культивированием (*cultur* по латыни – выращивание). Культивирование можно проводить поверхностным или глубинным, периодическим или непрерывным методами, в аэробных или анаэробных условиях. Способ культивирования существенно влияет на применяемые лабораторные модели и приемы. Большое значение имеет конечная цель культивирования: накопление биомассы или получение определенного метаболита (спирта, кислоты, антибиотика, фермента, аминокислоты и т.д.).

Одной из особенностей микроорганизмов является зависимость их роста от условий окружающей среды. Из-за малых размеров клеток микроорганизмы имеют тесный контакт со средой, поэтому они активно реагируют на изменение условий среды. Для жизнедеятельности микроорганизмов существенное значение имеют не только состав питательной среды, но и такие факторы, как аэрация, температура, кислотность среды, влажность, свет. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных пределах

каждого фактора, причем для различных групп микроорганизмов эти пределы часто неодинаковы (рис. 8).

Большое влияние на развитие микроорганизмов оказывает аэрация среды. Микроорганизмы, которые развиваются только при условии постоянного притока молекулярного кислорода, называют облигатными (обязательными) аэробами. Энергетическим процессом у них является аэробное дыхание. Микроорганизмы, развивающиеся только в отсутствие кислорода, называют облигатными анаэробами; получение энергии у них не связано с использованием молекулярного кислорода. Кроме облигатных аэробов и анаэробов существуют еще микроаэрофилы, которые нуждаются в кислороде, но лучше растут при парциальном давлении, меньшем, чем в воздухе и факультативные анаэробы, которые достаточно хорошо растут как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Неодинаковые потребности микроорганизмов в свободном кислороде определяют различия в способах их культивирования.

Одним из важных условий для проявления жизнедеятельности микроорганизмов является активная кислотность среды, которую выражают величиной pH – отрицательным логарифмом концентрации водородных ионов. Значение pH от 0 до 14 характеризует степень кислотности или щелочности раствора. Большинство бактерий лучше всего растет при pH , близком к 7,0, микроскопические грибы предпочитают слабокислые среда. Поэтому в приготовленных средах всегда следует определять значение pH . Автоклавирование питательных сред часто приводит к значительным сдвигам pH , поэтому после стерилизации его следует проверить и довести, если это требуется, до нужного значения стерильными растворами кислоты или щелочи.

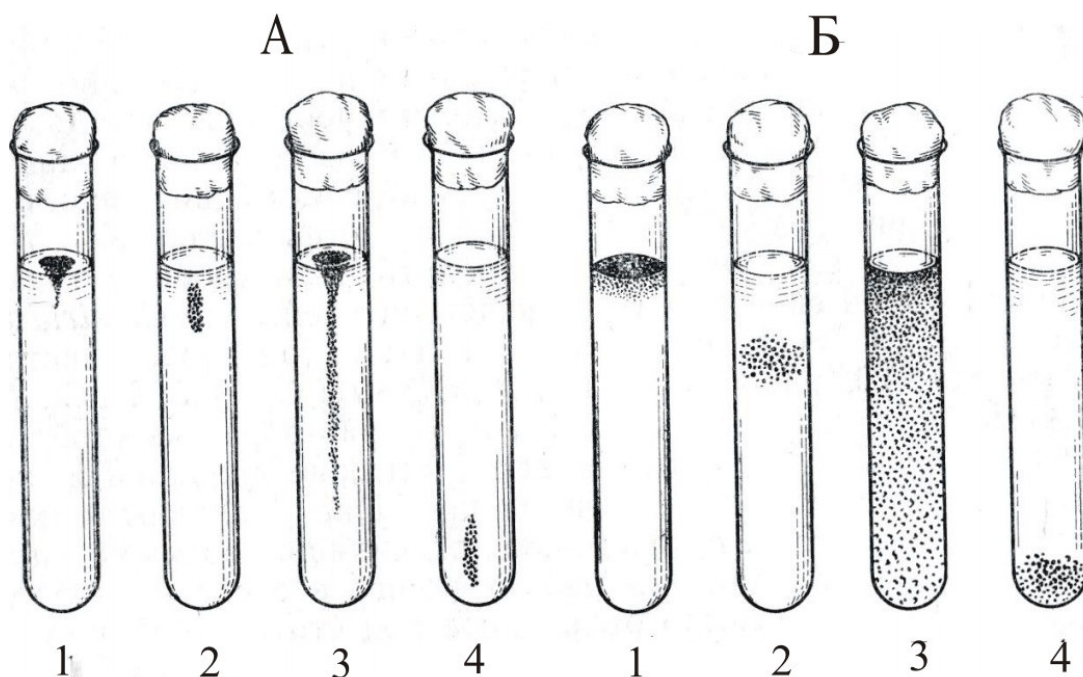


Рисунок 8 – Рост микроорганизмов при посеве уколом (А) и при посеве в расплавленную плотную среду (Б): 1 – аэробы; 2 – микроаэрофилы; 3 – факультативные анаэробы; 4 – облигатные анаэробы

Измеряют рН электрометрическим методом на потенциометре. В тех случаях, когда нет необходимости в высокой точности измерений, значение рН можно определить с помощью раствора индикаторного красителя или индикаторной бумаги. Активная кислотность питательной среды, благоприятная для начального роста, часто меняется в процессе культивирования микроорганизмов в результате образования продуктов метаболизма или неравномерного потребления компонентов среды. Даже небольшие изменения активной кислотности среды заметно влияют на рост и обмен веществ микроорганизмов.

Чтобы не допустить чрезмерного изменения рН и удержать его на необходимом уровне, используют различные приемы. Грубо рН культуры поддерживают с помощью добавления к среде буферов. При культивировании

микроорганизмов, рост которых сопровождается образованием большого количества кислот, в среды вводят избыточные количества мела, который нейтрализует образующиеся кислоты.

Тонкий контроль значений pH достигается благодаря автоматической подаче в среду культивирования кислоты или щелочи; при этом необходимо постоянно контролировать значение pH среды. В современных ферментерах для этой цели предусмотрены специальные автоматические устройства.

Температура культивирования значительно влияет на интенсивность роста бактерий, так как она воздействует на скорость всех клеточных реакций. По отношению к температуре микроорганизмы разделяют на три группы: для термофилов температурный оптимум лежит в интервале от 45 °С до 60–70 °С, для мезофилов – от 25°С до 37°С, для психрофилов – от 5 °С до 10 °С.

Микроорганизмы выращивают в термостатах или специальных термостатированных комнатах, где с помощью терморегуляторов поддерживается соответствующая оптимальная температура.

5.3.1 Способы культивирования аэробных микроорганизмов

Поверхностное культивирование аэробов проводят на плотной или сыпучей среде, а также в тонком слое жидкой среды в стеклянной посуде с широким дном: чашках Петри, колбах Виноградского, матрацах, кюветах. Засеянные сосуды выращивают при постоянной температуре в термостатах или термостатных комнатах (термокамерах). Микроорганизмы развиваются на поверхности среды и используют кислород непосредственно из воздуха. На жидких средах облигатные аэробы растут в виде обильных пленок. Факультативные

аэробы (анаэробы) развиваются как в толще жидкой среды, образуя суспензии, хлопья, осадок, так и на поверхности в виде тонкой пленки. На плотных средах микроорганизмы растут в виде отдельных колоний или сплошным газоном. Поверхностное культивирование в лабораторных условиях широко применяют для получения накопительных и чистых культур, их хранения, изучения морфологических, культуральных и биохимических признаков микроорганизмов. В промышленности метод выращивания поверхностных культур на жидких средах используют для получения лимонной кислоты, а на сыпучих – для производства ферментных препаратов.

Глубинное культивирование микроорганизмов может быть периодическим и непрерывным. При периодическом процессе весь объем питательной среды засевают посевным материалом, и выращивание ведут в оптимальных условиях определенный промежуток времени, пока не накопится нужное количество биомассы или целевого продукта. Для обеспечения роста аэробных культур в глубоких слоях жидкости необходимо поступление кислорода. Для аэрации жидких культур пользуются обычным стерильным воздухом либо смесью кислорода, азота и диоксида углерода. Принудительную аэрацию часто комбинируют с механическим перемешиванием. Простым и доступным способом периодического глубинного культивирования является выращивание аэробных культур в суспендированном состоянии в жидкой среде, разлитой в небольших объемах в пробирки или колбы различной вместимости, которые после засева помещают на качалки в термокамеры. Качалки обеспечивают непрерывное встряхивание или вращение сосудов частотой 100–300 об/мин. Степень аэрации культуральной жидкости регулируют изменением частоты вращения (встряхивания) качалки, объемом среды в сосудах и применением специальных колб с 4–8 вдавленными внутрь отростками-отбойниками для разбрызгивания жидкости.

Выращивание культур в колбах применяют в лабораторной практике для изучения физиологических свойств, установления закономерностей их роста в зависимости от состава компонентов среды, выяснения влияния факторов внешней среды на жизнедеятельность клеток, определения продуктов метаболизма.

Непрерывное глубинное культивирование ведут в лабораторных ферментерах (рис. 9).

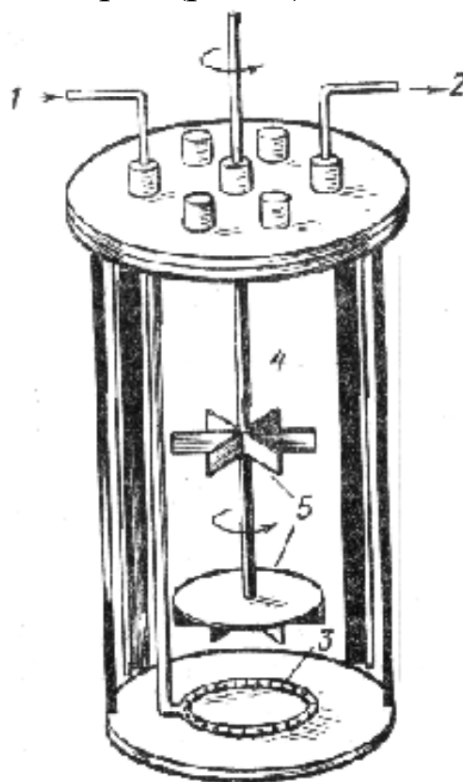


Рисунок 9 – Схема ферментера для глубинного культивирования аэробных микроорганизмов: 1 – вход воздуха; 2 – выход воздуха; 3 – барбатер; 4 – отбойники; 5 – мешалка

Это стеклянные аппараты емкостью от 1 до 10 л, в которых обеспечивается непрерывная подача стерильной питательной среды, аэрация культуральной жидкости стерильным воздухом, автоматическое регулирование температуры, pH, пеногашения и других условий роста. Из аппарата непрерывно вытекает готовая культуральная

жидкость. Процесс непрерывного выращивания в ферментаторе осуществляется по типу хемостата или турбидостата, которые различаются способом поддержания культуры в состоянии динамического равновесия. В режиме хемостата рост культуры регулируют концентрацией лимитирующего фактора, в качестве которого могут быть использованы источники углерода, азота, фосфора, ростовых веществ, кислород, рН, температура. В режиме турбидостата поддерживают постоянную концентрацию биомассы, но фотометрический контроль плотности клеток требует применения прозрачных сред, что выполнимо только в лабораторных условиях. Процесс глубинного культивирования может быть гомо- или гетерогенно непрерывным. При гомогенно-непрерывном процессе в ферментаторе, где идет интенсивное перемешивание, все параметры (концентрация питательных веществ, клеточный титр и др.) постоянны во времени. При гетерогенно непрерывном процессе применяют несколько ферментаторов, последовательно соединенных между собой. Питательная среда поступает в первый ферментатор, готовая культуральная жидкость вытекает из последнего. В этом случае имеет место непрерывный поток питательной среды, но клетки не обеспечены постоянными условиями роста (сколько аппаратов, столько и условий культивирования). В нашей стране выпускают лабораторные установки АНКУМ-2, АНКУМ-2М, АК-3 и АК-Ю, ФС-5 и ФУ-6. Лабораторные установки ФУ и ФС предназначены для непрерывного культивирования микроорганизмов по гомо- или гетерогенной схеме. В случае необходимости можно проводить и периодическое выращивание. Такие стенды применяют в научно-исследовательских и заводских лабораториях, где изучают процессы размножения микроорганизмов с целью получения биомассы или биосинтеза метаболитов.

5.3.2 Способы культивирования анаэробных микроорганизмов

Выращивание анаэробов ведут на питательных средах в обычных или специальных пробирках, трубках, чашках Петри в отсутствие кислорода. Активному росту анаэробов способствует внесение в питательную среду некоторого количества диоксида углерода.

Создать анаэробные условия можно физическими, химическими, биологическими и комбинированными методами. Физические методы – это удаление кислорода из жидкой или плотной питательной среды непосредственно перед засевом культуры, что достигается кипячением или прогреванием пробирок на кипящей водяной бане в течение 15-20 мин и быстрым охлаждением под струей холодной воды. После засева поверхность среды, разлитой высоким слоем, заливают слоем стерильной смеси вазелинового масла и парафина. Культивирование анаэробов можно вести в специальных пробирках (рис. 10), из которых после засева откачивают воздух с помощью вакуум-насоса.

Пробирки с культурами анаэробных микроорганизмов, предназначенные для хранения, запаивают в узком месте. Выращивание анаэробов на питательном агаре в чашках Петри или в пробирках ведут в анаэростатах. Анаэростаты – это вакуумные металлические или стеклянные эксикаторы, хорошо сохраняющие высокое разрежение в течение продолжительного времени. Стеклянные вакуумные эксикаторы снабжены хорошо пришлифованной крышкой с краном на шлифах для откачки воздуха (рис. 11).

Пришлифованные поверхности во избежание проникновения воздуха покрывают специальной вакуумной смазкой. На дно эксикатора для поглощения избытка влаги помещают 20–30 г хлорида натрия и 5–6 г хлорида кальция.

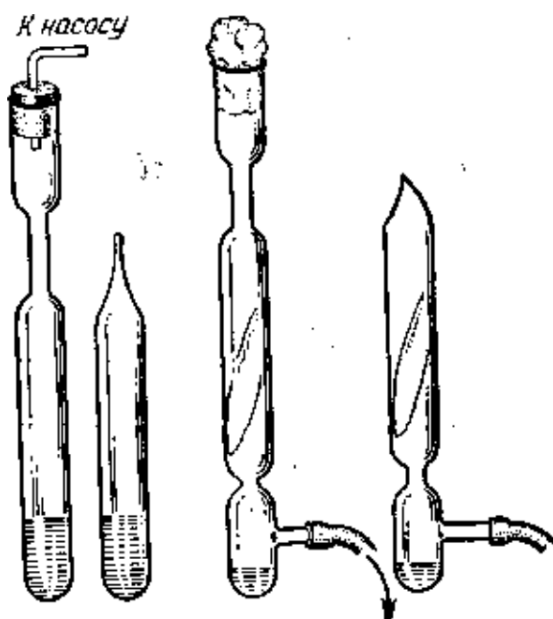


Рисунок 10 – Пробирки для культивирования анаэробов

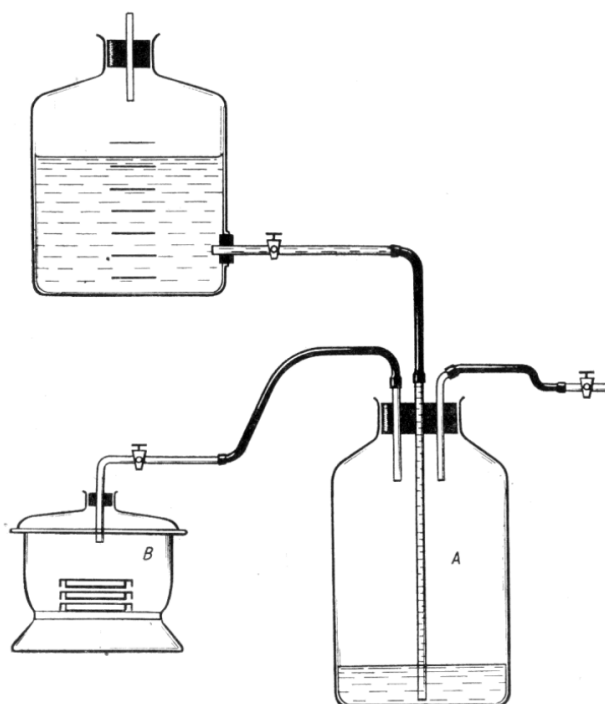


Рисунок 11 – Газометр (А) и анаэростат (В)

Создать анаэробные условия в анаэростатах или эксикаторах можно путем замены воздуха индифферентным газом (аргоном, гелием, водородом, диоксидом углерода, азотом), пропущенным для стерилизации через фильтры.

Химические методы предполагают связывание свободного кислорода, содержащегося в среде или в сосуде для выращивания анаэробов, производят с помощью химических веществ. Некоторые из них помещают вне среды, другие вводят в качестве восстановителей непосредственно в питательные среды. Химическими поглотителями кислорода являются растворы пирогаллола с Na_2CO_3 , щелочной раствор гидросульфита натрия (дитионита), металлическое железо и другие реактивы. Слегка увлажненные химические поглотители насыпают на дно больших пробирок, в которые на специальных подставках помещают засеянные анаэробной культурой обычные пробирки (рис. 12). Открытые чашки Петри со слегка увлажненным пирогаллолом с содой или гидросульфитом натрия с содой ставят на дно эксикатора.

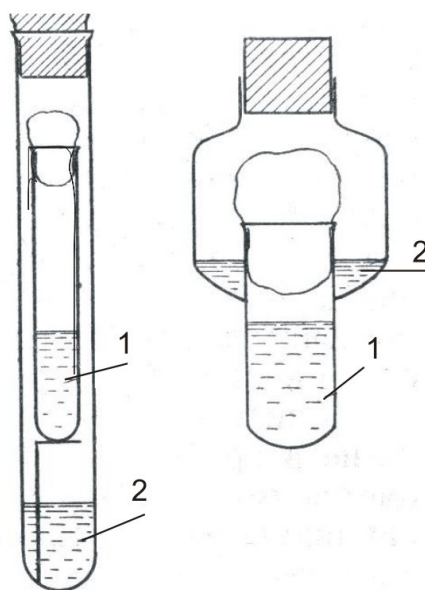


Рисунок 12 – Сосуды для выращивания анаэробов: 1 – бактериальная культура; 2 – химический поглотитель молекулярного кислорода

В качестве восстановителей, добавляемых в питательные среды для культивирования анаэробов, используют органические и неорганические соединения: редуцирующие сахара (глюкозу), вещества с сульфгидрильной группой (цистеин, глутатион), аскорбиновую кислоту, пирокатехин,

муравьинокислый натрий, сульфиды, сероводород, гидросульфит натрия, цитрат титана, а также некоторые сложные компоненты – пептон, кусочки печени, мышц, картофеля, яичного белка.

Используют также биологические методы создания анаэробных условий. Некоторые анаэробные микроорганизмы можно выращивать при доступе кислорода совместно с аэробами. В герметически закрытый сосуд помещают 10–15 пробирок с посевами аэробных культур и одну пробирку с анаэробами. Аэробные микроорганизмы активно поглощают кислород, выделяют CO_2 и создают условия для роста анаэробов. Совместное выращивание симбиотических видов аэробов и анаэробов ведут на поверхности плотной среды по методу Фортнера. В чашки Петри толстым слоем наливают кровяной агар. После застывания среды стерильным пинцетом по диаметру чашки вырезают бороздку шириной 4–6 мм. Одну половинку агаровой пластинки засевают культурой аэробов (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), другую – культурой анаэробов. Чтобы прекратить доступ кислорода в чашку, щель между дном и крышкой замазывают парафином, воском или пластилином. Чашки помещают в термостат. Вначале развивается аэробный микроорганизм. Когда растущие клетки поглотят из чашки весь кислород, начинается рост анаэроба.

Существуют также комбинированные методы, представляющие собой сочетание вышеуказанных способов удаления кислорода.

6. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

Выделение чистой культуры микроорганизмов является обязательным этапом всякого микробиологического исследования. Чистые культуры микроорганизмов необходимы для изучения их физиологии и биохимии, для приготовления диагностических, лечебных и профилактических препаратов, получения в производственных условиях аминокислот, антибиотиков, ферментов, витаминов, органических кислот и т.п. В микробиологической практике широко используются как чистые культуры микроорганизмов, так и консорциумы.

Консорциумы – смешанные или ассоциативные культуры, состоящие из двух и более микроорганизмов, между которыми существуют различные формы взаимоотношений. Различают три основных типа консорциумов микроорганизмов:

- 1) искусственно созданные смеси микроорганизмов, которые называют смешанными культурами;
- 2) консорциумы, выделенные непосредственно из природных источников, как функционально неделимое целое (такие консорциумы называют ассоциативные культуры, или ассоциации микроорганизмов);
- 3) консорциумы, образовавшиеся в результате практической деятельности человека при приготовлении пищевых продуктов (это разного рода закваски).

Чистой культурой микроорганизмов называют культуру, состоящую из микроорганизмов одного вида. Чистая культура микроорганизмов, которая является потомством одной клетки, называется клоном. Загрязненная или инфицированная культура – чистая культура, в которую случайно попали посторонние микроорганизмы. Культуры микроорганизмов одного и того же вида, выделенные из различных источников или в разное время из одного и того же источника, называют

штаммами, которые обычно обозначаются номерами или какими-либо символами. Колония представляет собой изолированное скопление клеток микроорганизмов одного вида, выросших на плотной питательной среде в результате размножение одной клетки. Колонии бактерий разных видов отличаются друг от друга по своей морфологии, цвету и другим признакам.

Выделение чистой культуры включает три этапа: получение накопительной культуры, выделение чистой культуры и определение чистоты выделенной культуры.

Накопительными называют такие культуры, в которых преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов. С целью получения накопительных культур создаются элективные условия, обеспечивающие преимущественное развитие выделяемых микроорганизмов. Часто элективные условия создают, подбирая соответствующие среды, поскольку различные микроорганизма нуждаются в разных источниках питания. При создании элективных условий следует также учитывать неодинаковое отношение различных микроорганизмов к кислотности среды, температуре, аэрации. При получении накопительных культур следует учитывать и такие особенности выделяемых форм, как подвижность, спорообразование, устойчивость к антибиотикам. Например, получение накопительных культур спорообразующих бактерий производят из субстрата, который предварительно пастеризуют. Элективные условия для развития грамотрицательных бактерий или дрожжей иногда создают внесением в среду пенициллина, поскольку бактерии, относящиеся к грамположительным, при этом не развиваются или развиваются замедленно. Необходимо иметь в виду, что элективные условия далеко не всегда оптимальны для роста выделяемого микроорганизма, однако они лучше переносятся им, чем сопутствующими формами. О получении накопительной культуры судят визуально, по появлению

характерных признаков развития выделяемых микроорганизмов – помутнение среды, иногда сопровождающееся пигментацией, появление осадка, пузырьков газа.

Присутствие выделяемых форм определяют также путем микроскопирования культуральной жидкости. В некоторых случаях о получении накопительной культуры свидетельствуют характерные химические изменения в составе среды.

После того как получена накопительная культура, приступают к выделению чистой культуры. Чистые культуры микроорганизмов, как правило, выделяют внутри или на поверхности твердых питательных сред. Для выделения чистых культур микроорганизмов из объектов окружающей среды, содержащих обильную микрофлору, предложено много различных методов. Все они основаны на выделении из популяции одной клетки.

Метод разбавлений Пастера осуществляется следующим образом. Из суспензии, содержащей смесь микроорганизмов, делается ряд последовательных разведений в стерильной жидкой питательной среде. С каждым разведением количество микроорганизмов, попадающих в пробирку, будет уменьшаться и можно таким образом получить такие разведения, когда в объеме среды в пробирке будет находиться только одна клетка, из которой и разовьется чистая культура. Однако этот метод не всегда дает возможность получить чистую культуру и в настоящее время практически мало используется.

При выделении чистой культуры из одной клетки капельным методом предварительно подготавливается разведение культуры микроорганизма в питательной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле этой среды могли быть единичные клетки. Затем на поверхность стерильного стекла с помощью простерилизованной иглы и стеклянной палочки наносят ряды мелких капель среды, содержащей

микроорганизмы. Стекло перевертывают и помещают над лункой предметного стекла. Края лунки предварительно обмазывают вазелином. Затем все капли просматривают под микроскопом и отмечают те из них, в которых находится только одна клетка. Стекло помещают в чашку Петри, на дне которой находится увлажненная фильтровальная бумага, и ставят в термостат; клетка размножается, образуя микроскопическую колонию. Полученную колонию снимают стерильной фильтровальной бумагой, которую держат простерилизованным на пламени пинцетом, и переносят в пробирку с питательной средой. Выделение чистой культуры капельным методом используется при работе с крупными микроорганизмами (дрожжи, плесени).

При выделении чистой культуры одиночных микробных клеток и их посева под контролем микроскопа применяют специально оборудованные микроскопы микроманипуляторы. Отдельные микробные клетки в них вылавливаются из висячей микрокапли микропипеткой и микропетлей, перемещаемыми в поле зрения микроскопа с микронной точностью с помощью системы винтов и рычагов.

Для выделения аэробов наиболее распространен в микробиологической практике метод выделения чистой культуры с помощью твердых сред (метод Коха). Метод заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, выросшей на твердой питательной среде в результате размножения одной клетки. Метод основан на том, что при нанесении микроорганизмов из посевного материала на твердую среду отдельные клетки будут закрепляться (иммобилизоваться) в определенной точке твердой среды и, размножаясь, давать потомство (клон), представляющее чистую культуру микроорганизма. Для получения изолированных колоний на твердой среде исследуемый материал высевает на поверхность твердой питательной среды, наносят петлей или пипеткой каплю исследуемого материала. Рассев проводят либо методом

истощающего мазка, либо методом истощающего штриха. В первом случае шпателем равномерно распределяют нанесенную каплю по поверхности твердой среды. Тем же шпателем делают посев на поверхности второй пластинки и затем третьей, т.е. перенося последовательно на твердую среду клетки микроорганизмов, которые остались на шпателе. Таким образом, количество микроорганизмов, вносимых последовательно на пластинки, будет уменьшаться: на вторую – меньше, чем на первую; на третью – еще меньше, чем на вторую (рис. 13).

При использовании метода истощающего штриха исследуемый материал наносят петлей в верхнюю часть твердой среды в чашке Петри и аккуратно, зигзагообразно петлей по поверхности чашки. Существует множество методов нанесения штриха на поверхность плотной питательной среды (рис. 14). Затем посев проводят аналогично на второй и третьей чашке.

После посева чашки необходимо перевернуть вверх дном и поставить в термостат при температуре, благоприятной для данного микроорганизма. Инкубируют посевы обычно в термостате в течение 2-3 дней. В результате на поверхности среды вырастают колонии микроорганизмов. Для выделения чистых культур многих бактерий используют МПА, для дрожжей – сусло-агар.

Недостатком этого метода является то, что иногда получаются не чистые, а смешанные культуры. Это является результатом того, что колонии могут образоваться не из одной, а из двух или нескольких клеток, попавших в одну точку. Поэтому этот метод выделения чистых культур требует двух- или трехкратного повторения выделения культур из одной колонии. Для этого готовят суспензии культур микроорганизмов изолированных колоний в стерильной водопроводной воде.

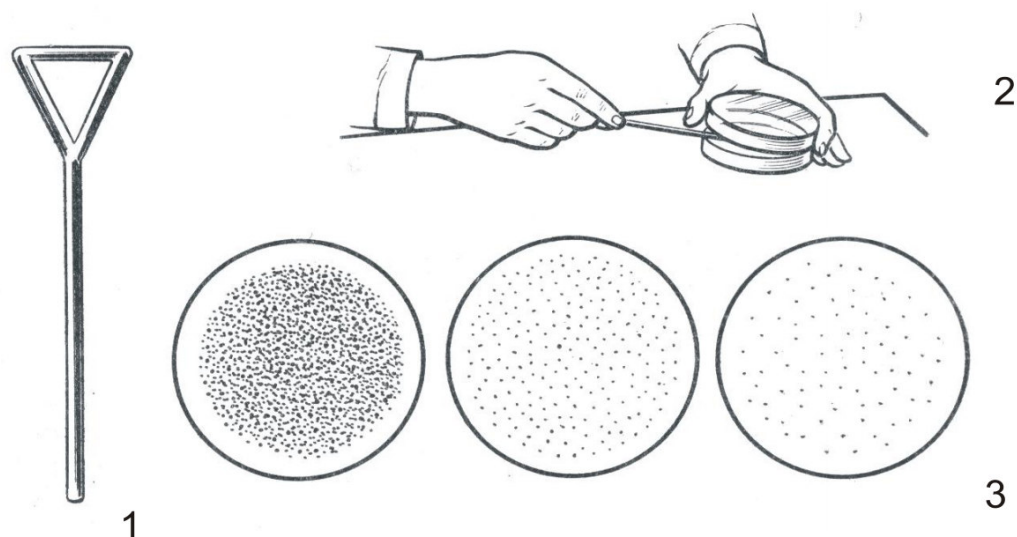


Рисунок 13 – Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем: 1 – шпатель Дригальского; 2 – рассев; 3 – рост микроорганизмов после посева

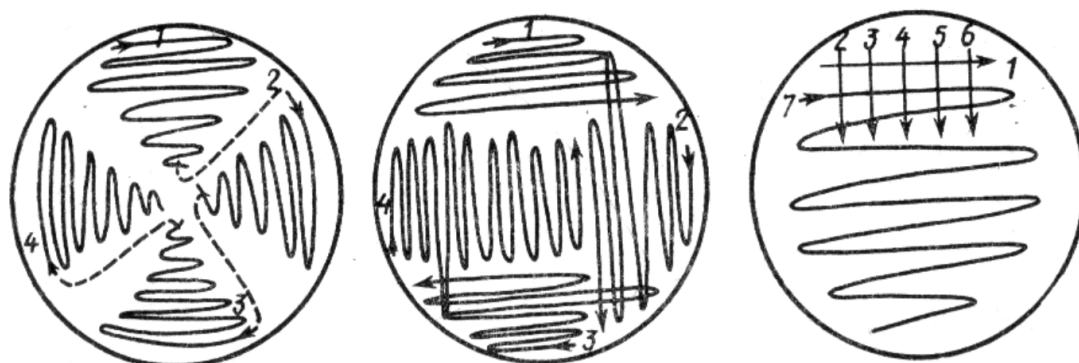
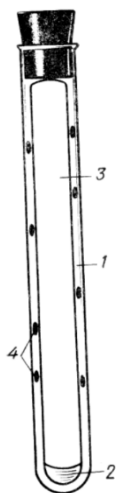


Рисунок 14 – Схема посева культуры микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды петлей

Из каждой суспензии стерильной пипеткой делают разведение в стерильной водопроводной воде (1 капля суспензии на 8–10 мл воды) и взвесь микроорганизмов засевают на поверхность плотной питательной среды в чашки Петри, которые помещают на 3–4 суток в термостат. Через 3–4 суток просматривают выросшие колонии и сверяют их признаки с отмеченными признаками при выделении культуры.

Однородность колоний и совпадение признаков с описанными ранее свидетельствуют о чистоте культуры. Изолированные колонии засевают в две пробирки на поверхность скошенной питательной агаризованной среды и помещают в термостат при определенной температуре, благоприятной для данного микроорганизма, на 2-3 суток. Изолированные колонии микроорганизмов, относящихся к факультативным анаэробам, обычно получают при глубинном посеве. Для выделения чистой культуры облигатных анаэробных микроорганизмов делают посев глубинным способом в пробирки с плотной питательной средой. Для уменьшения диффузии кислорода поверхность среды заливают стерильным вазелиновым маслом.

Другим методом выделения чистой культуры анаэробных микроорганизмов является посев в трубочки по методу Виньял-Вейона. В пробирки с 0,5 %-ным стерильным расплавленным и охлажденным агаром (40–45 °С) вносят культуру анаэробных микроорганизмов, затем содержимое пробирки набирают в пастеровскую пипетку, заполняя засеянной средой весь ее капилляр. После заполнения конец трубки запаивают. Для получения изолированных колоний облигатных анаэробных бактерий, характеризующихся особенно высокой чувствительностью к кислороду (экстремальные анаэробы), используют метод вращающихся пробирок Хангейта. Сущность этого метода заключается в следующем. Расплавленную агаризованную среду заражают при постоянном токе через пробирку инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку. Агаризованная среда при этом равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Применение тонкого слоя агаризованной среды в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом (рис. 15).



*Рисунок 15 – Изолированные колонии облигатных анаэробов в пробирках, заполненных газом (по Хангейту):
1 – агаризованная питательная среда; 2 – конденсационная вода; 3 – смесь газов H_2 и CO_2 ; 4 – колонии бактерий*

6.1 Морфологические признаки микроорганизмов

Чистота культуры выделенного микроорганизма должна быть обязательно проверена несколькими способами. Визуальный контроль проводят тогда, когда выделенная культура микроорганизмов высеяна на поверхность скошенного агара. Если культура чистая, то характер ее роста на скошенном агаре однороден по всему штриху. Если штрих не однороден, то культура считается загрязненной.

Проверка чистоты выделенной культуры обязательно включает макроскопический контроль. Для этого готовят препарат фиксированных окрашенных клеток и исследуют его с иммерсионной системой. Чистая культура, как правило, морфологически однородна, допустимо лишь незначительное варьирование размеров клеток. Необходимо помнить, что клетки некоторых микроорганизмов, например микобактерий, полиморфны, поэтому определение чистоты таких культур при микроскопировании затруднительно.

Посев на плотные питательные среды – наиболее надежный способ проверки чистоты культур. Культуру, подлежащую рассеиванию, пересевают в пробирку со свежей скошенной средой. Затем готовят суспензии этой культуры смывом стерильной водопроводной водой. Взвесь микроорганизмов из последнего разведения рассеивают на

поверхность плотных сред. Посевы помещают на 5–7 суток в термостат при 30–37 °С. Однородность колоний и совпадение их признаков с ранее описанными является свидетельством чистоты культуры.

Заключительным этапом получения чистой культуры является определение вида выделенного микроорганизма. Принадлежность микробной культуры к определенной систематической группе: семейству, роду, виду – устанавливают путем изучения ее морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков. Перечисленные признаки получили название таксономических.

Выросшие колонии сначала рассматривают невооруженным глазом, а затем при помощи лупы или при малом увеличении микроскопа. При описании колоний микроорганизмов отмечают следующие морфологические и культуральные признаки:

- размер колоний – их диаметр в мм (если колонии не превышают 1 мм, их называют точечными);
- форма колоний – округлая, неправильная, мицелиевидная, ризоидная, амёбовидная, складчатая, концентрическая, сложная или другая (рис. 16);
- цвет колоний – белый, желтый, розовый и т.д. Выявляют и способность выделять пигмент в среду;
- поверхность колоний – гладкая, складчатая, с радиальной или концентрической исчерченностью, шероховатая, бугристая или другая;
- оптические свойства – прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая и т.д.
- профиль колоний – плоский, слабовыпуклый, сильновыпуклый, вогнутый, кратерообразный или другой (рис. 17);
- край колоний – ровный, извилистый, зубчатый, лопастной, волнистый, неправильный, реснитчатый, нитчатый, ворсинчатый, ветвистый (рис. 18);

- консистенция колонии – маслянистая, тестообразная, вязкая, плёнчатая;

- структура колонии – однородная, мелкозернистая, волокнистая, крупнозернистая (рис. 19).

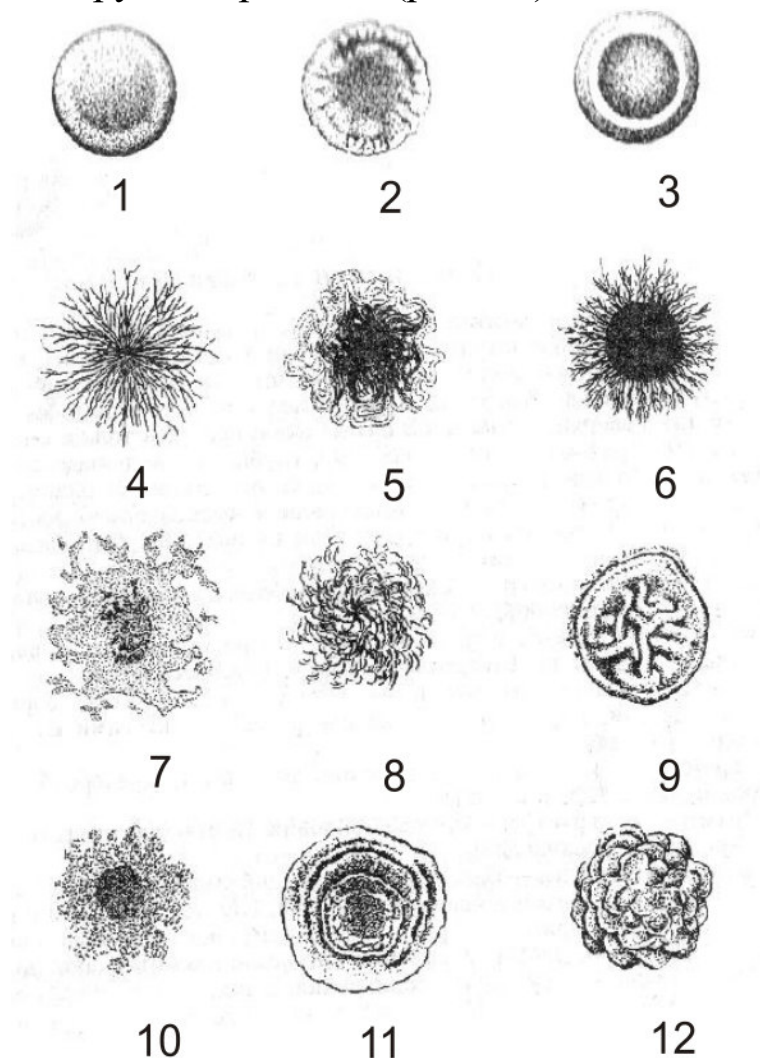


Рисунок 16 – Форма колоний: 1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4,5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная

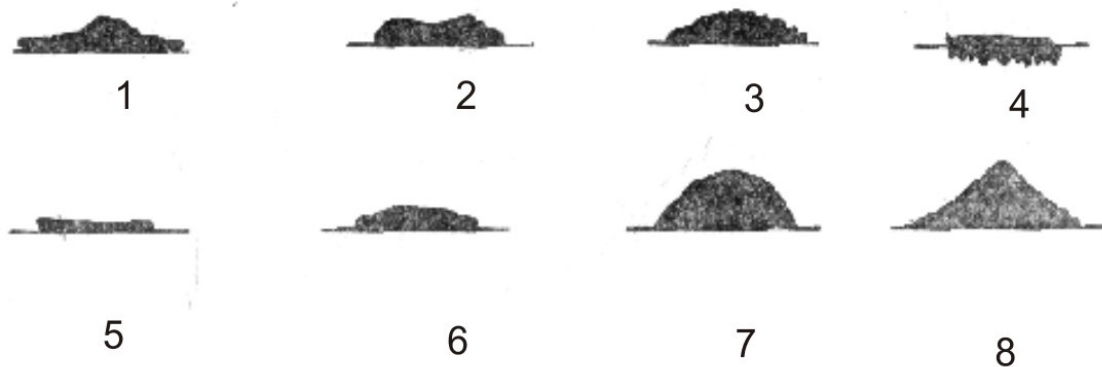


Рисунок 17 – Профиль колонии: 1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный

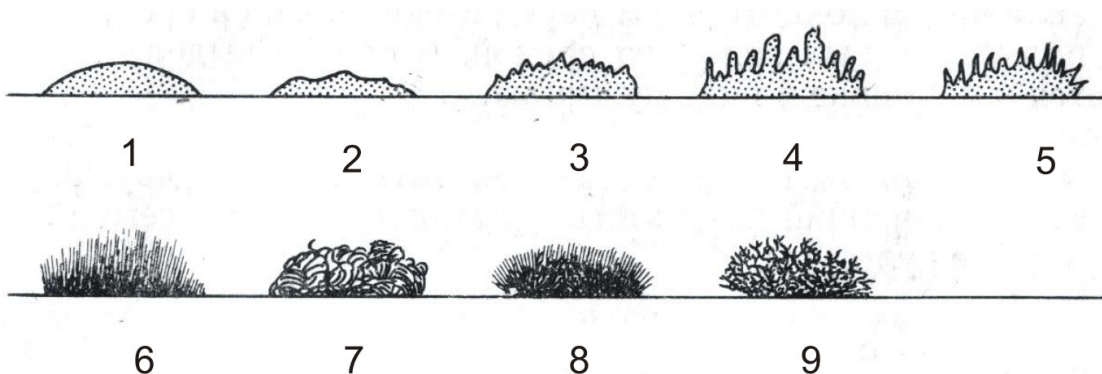


Рисунок 18 – Край колонии: 1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной; 5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

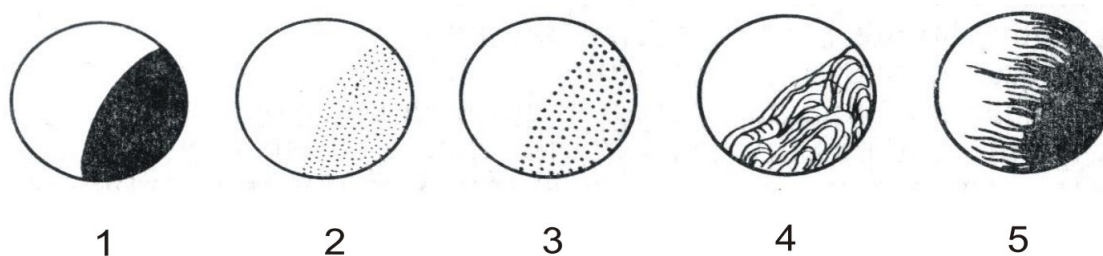


Рисунок 19 – Структура колонии: 1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая; 5 – волокнистая

Для описания колоний из имеющихся чашек Петри берут ту, на которой колонии достаточно изолированы друг от друга. В отобранной чашке выбирают хорошо изолированные и различающиеся внешним видом колонии, которые описывают, указав все характерные признаки их роста.

Из отобранных колоний готовят препараты, микроскопируют для проверки морфологической однородности клеток. При приготовлении препаратов необходимо соблюдать все правила стерильности (не открывать широко крышку чашки, хорошо простерилизовать петлю). Далее пересевают культуру из колонии в пробирку со скошенной плотной питательной средой МПА и помещают на 2-3 суток в термостат при 30–37 °С. Выросшие культуры хранят в холодильнике или при комнатной температуре.

Морфологические признаки микроорганизмов изучают при микроскопическом исследовании, как живых культур, так и окрашенных разными методами фиксированных препаратов.

Морфологические признаки описывают по следующей схеме: форма и размеры клеток, соединение клеток, подвижность, расположение и количество жгутиков, образование спор, вид спорообразования, образование капсул, запасные вещества, окраска по Граму. Культуральные свойства характерны для каждого вида микроорганизмов и поэтому являются важным диагностическим признаком.

Наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотной питательной среде является характер колонии. Для изучения свойств колоний бактерии культивируют на 2%-ном МПА в чашках Петри. При посеве клеток в толщу плотной питательной среды наряду с поверхностными колониями происходит образование глубоких и донных колоний. Глубокие колонии имеют вид чечевичек. Иногда они напоминают клочки ваты из-за нитевидных выростов в толщу среды. Если в процессе развития микроорганизмы выделяют газы, то образование глубоких колоний сопровождается разрывом плотной

среды. Донные колонии, образующиеся при соприкосновении агаризованной среды с дном чашки Петри, обычно имеют вид довольно крупных, бесцветных прозрачных налетов.

Описание колонии дополняют описанием роста микроорганизмов по штриху на поверхности, скошенной плотной питательной среды (рисунок 20).

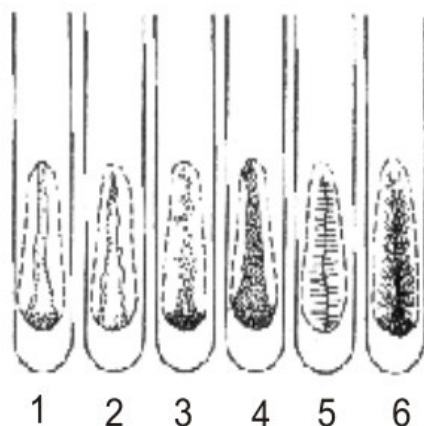


Рисунок 20 – Рост бактерий по штриху: 1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четко видный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный

Отмечают интенсивность роста по штриху (скудный, умеренный, обильный), и его особенности (надет сплошной с ровным или волнистым краем, в виде цепочек изолированных колоний, диффузный, древовидный и т.д.). Кроме того, характеризуют оптические свойства штриха, а также его цвет, поверхность, консистенция. При описании колонии и роста микроорганизмов по штриху обязательно указывают состав среды и возраст культуры, так как колонии одного и того же вида организма на различных средах могут отличаться рядом признаков.

На жидких питательных средах выявляются следующие виды роста бактерий:

- рост с равномерным помутнением среды;
- придонный рост бактерий, характеризующийся образованием на дне сосуда осадка, который может быть

скудным или обильным. По внешнему виду осадок может быть крошковидным, гомогенным, волокнистым или в виде крупных рыхлых хлопьев, по консистенции – вязким, слизистым, пастообразным. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Придонный рост характерен для бактерий с анаэробным типом дыхания;

- пристеночный рост бактерий, выраженный в том, что питательная среда остается совершенно прозрачной, поскольку бактерии в виде рыхлых хлопьев или компактных зерен прикрепляются к внутренней поверхности стенки;

- поверхностный рост бактерий, характеризующийся появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки, внешний вид и характер которой могут быть различными:

- а) пленка тонкая в виде едва заметного налета;

- б) пленка влажная толстая, имеющая вязкую слизистую консистенцию;

- в) пленка толстая сухая, снимаемая с усилием целиком в виде круглого диска, соответствующего диаметру сосуда.

Рост на полужидкой питательной среде выявления особенностей микробного роста на полужидкой питательной среде исследуемую культуру засевают в столбик 0,2–0,5 %-ого полужидкого агара. Для того чтобы особенности роста проявились наиболее четко, прокол делают в непосредственной близости от стенки пробирки. Посев ставят в термостат на 24 часа. Произведенный таким образом посев дает возможность выявить и отделить подвижные микроорганизмы от неподвижных. Неподвижные формы бактерий растут по линии укола, образуя небольшие выросты цилиндрической или конической формы. Окружающая среда при этом остается совершенно прозрачной. Подвижные микробы при таком посеве вызывают выраженное помутнение, распространяющееся более или менее равномерно по всей толщине среды.

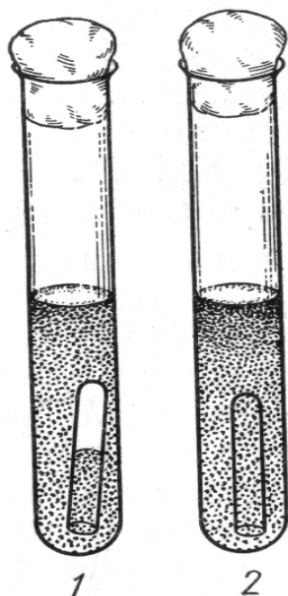
6.2 Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов

Для определения систематического положения бактерий кроме морфологических и культурных свойств необходимо изучить их физиолого-биохимические признаки, которые обусловлены набором конститутивных и индуцибельных ферментов. Эти свойства могут быть изучены качественными и количественными методами. В бактериологической практике большое таксономическое значение имеют сахаролитические и протеолитические признаки бактерий, которые определяют на дифференциально – диагностических средах.

Сахаролитические свойства определяются тем, что микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать различные углеводы и спирты в качестве единственных источников углерода и энергии. Чаще всего микроорганизмы используют такие углеводы, как арабиноза, ксилоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза, мальтоза, лактоза и такие спирты, как глицерин, маннит. Рост на средах, содержащих эти соединения, может приводить к накоплению органических кислот (вследствие чего изменяется рН среды), нейтральных продуктов или газов (вследствие чего на поверхности, среды образуется пена и среда вытесняется из поплавка) (рис. 21).

Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемую культуру микроорганизмов засевают на среды следующего состава (г/л): пептон – 5,0; K_2HPO_4 – 1,0; углевод – 10,0; водопроводная вода, содержащие в качестве источника углерода и энергии различные углеводы. Для обнаружения изменения рН к среде добавляют индикатор (бромтимоловый синий). Все среды с углеводами и спиртами засевают одновременно суспензией клеток изучаемого организма (0,2 мл) и ставят в термостат при 30–37 °С. Результаты регистрируют через 48 – 96 часов. О накоплении

органических кислот или нейтральных продуктов свидетельствует изменение цвета среды (при $pH=7,6$ индикатор бромтимоловый синий имеет синий цвет, а при $pH=6,0$ – желтый), о газообразовании – накопление газа в поплавке. Результаты сравнивают с контрольной средой.



*Рисунок 21. Накопление газа в поплавке:
1 – рост культуры
сопровождается
образованием газа; 2 – газ
не образуется*

Способность микроорганизмов использовать углеводы и многоатомные спирты можно определить и на плотных питательных средах. В этом случае стерильный раствор углевода или спирта добавляют в стерильную агаризованную расплавленную питательную среду, тщательно перемешивают ее и разливают в стерильные чашки Петри. После того, как агар застынет, дно чашки Петри с наружной стороны делят на секторы. Затем каждую из исследуемых культур высевая петлей, проводя радиальный штрих (рис. 22).

В качестве посевного материала используют густые суспензии клеток, которые готовят смывом культур с поверхности скошенного агара. Продолжительность культивирования 2 – 10 суток. О результатах судят по интенсивности роста культур в сравнении с ростом на контрольной среде, не содержащей испытываемых соединений углерода. Этот метод удобен тем, что позволяет

в одной чашке Петри одновременно проверить способность нескольких микроорганизмов использовать тот или иной источник углерода.

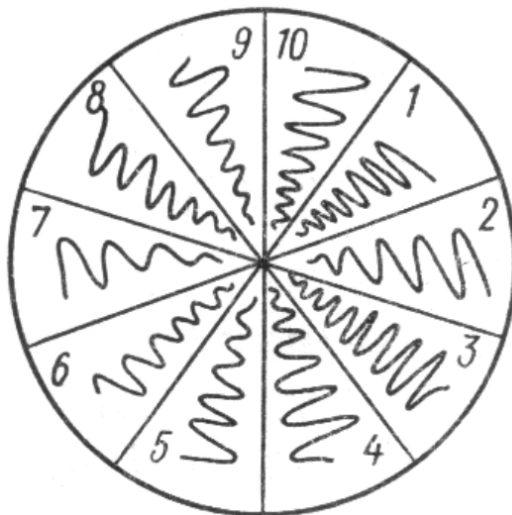


Рисунок 22 – Схема посева на плотную питательную среду различных микроорганизмов (1–10) для определения способности использовать углеводы

Отличительными чертами являются и способы утилизации углеводов (аэробное окисление и сбраживание). Различия в метаболизме углеводов важны при характеристике многих представителей гетеротрофных бактерий. Для выявления способа утилизации углеводов исследуемую культуру микроорганизмов засевают на среды следующего состава (г/л): углевод – 10,0; пептон – 2,0; NaCl – 5,0; K_2HPO_4 – 0,3; дистиллированная вода; pH среды 7,1. В качестве индикатора используют бромтимоловый синий. Для каждого углевода используют две пробирки. После посева поверхность среды в одной из пробирок заливают стерильным парафином (толщина слоя 0,8–10 мм). Продолжительность культивирования 8–10 суток при 30–37 °С. Образование кислоты регистрируют по изменению цвета индикатора. Организмы, осуществляющие брожение, развиваются в обеих пробирках.

Организмы, осуществляющие аэробное окисление, развиваются только в одной пробирке (не залитой парафином). Рост микроорганизмов вызывает подкисление среды и соответственно изменение цвета индикатора.

Гидролиз крахмала осуществляют микроорганизмы, образующие фермент амилазу и использующие продукты гидролиза крахмала как источник углерода и энергии. Для выявления этой способности изучаемых микроорганизмов готовят среду следующего состава (г/л): пептон – 10,0; KH_2PO_4 – 5,0; растворимый крахмал – 2,0; агар-агар – 20,0; pH среды – 6,8–7,0. Среду стерилизуют при 1 атм и разливают в стерильные чашки Петри. На застывающую среду высевают культуру штрихом по диаметру чашки. Продолжительность культивирования 7–10 суток при 30–37 °С.

Гидролиз крахмала обнаруживают по зоне просветления вдоль штриха после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Так как йод – индикатор на крахмал, среда окрашивается в синий цвет, за исключением зоны гидролиза крахмала, которая остается бесцветной или может приобрести красно-бурую окраску, если крахмал гидролизуется в основном до декстрина.

Для выявления способности к гидролизу целлюлозы у изучаемых микроорганизмов используют питательную среду Гетчинсона, следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 1,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaCl – 0,1; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; NaNO_3 – 2,5; агар-агар – 20,0; дистиллированная вода; pH среды – 7,2–7,3. Питательную среду стерилизуют при 1 атм. Из фильтровальной бумаги вырезают круги по диаметру чашки Петри и стерилизуют их в автоклаве. Затем питательную среду разливают в чашки Петри. Когда среда застынет, клетки изучаемого организма высевают штрихом по всей поверхности агаровой пластинки. Далее на поверхность опускают бумажный фильтр и стерильным пинцетом прижимают его к поверхности среды. Чашки с посевами помещают во влажную камеру, а ее – в термостат при 25–30 °С

на 10–14 суток. При разрушении клетчатки фильтровальная бумага ослизняется.

Некоторые микроорганизмы продуцируют и выделяют во внешнюю среду протеолитические ферменты – протеазы, катализирующие расщепление белка. Для определения таких протеолитических ферментов, как коллагеназы (желатиназы), производят посев культуры на мясо-пептонную желатину, которая готовится следующим образом. К МПБ добавляют 10–20 % желатины, оставляют на 20–30 мин, чтобы желатина набухла, затем смесь нагревают на водяной бане при 70–80 °С до полного растворения желатины и разливают в пробирки по 5–8 мл. Стерилизуют дробно при 0,5 атм. Посев проводят уколом. Продолжительность культивирования 7–10 суток при комнатной температуре. Разжижение МПЖ отмечают визуально (рис. 23).

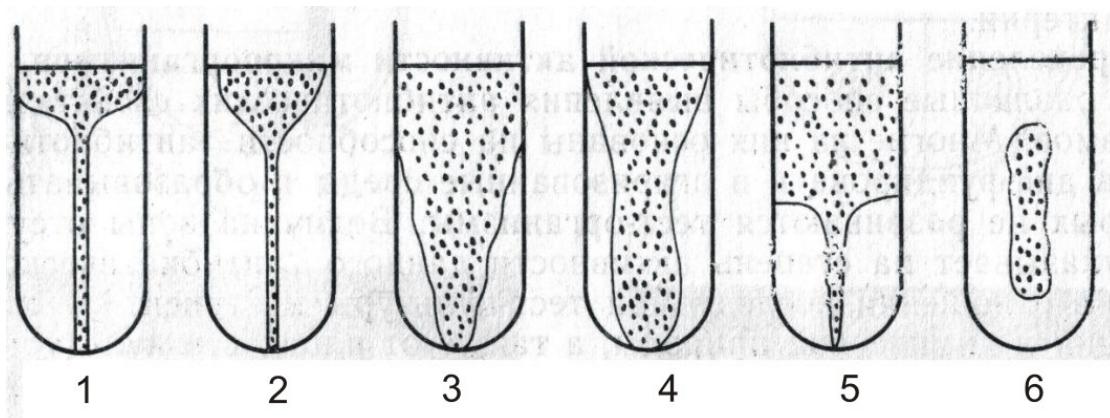


Рисунок 23 – Схема разжижения желатины микроорганизмами при посеве уколом: 1 – кратеровидное; 2 – реповидное; 3 – воронковидное; 4 – мешковидное; 5 – послойное; 6 – пузыревидное; 1–3 и 5 – разжижение вызвано аэробами; 4 – факультативными анаэробами; 6 – анаэробами

По характеру роста и форме области разжижения можно судить об отношении данного микроба к кислороду:

- в случае строгого аэробноз разжижение пойдет послойно, начинаясь с поверхности. Разжижение может иметь кратерообразный, реповидный или воронкообразный вид;

- факультативные анаэробы дадут мешковидное разжижение;

- строгие анаэробы дадут пузырьвидный рост в глубине питательной среды.

Для выявления таких протеолитических ферментов, как казеиназы, используют молочный агар по Эйкману, который готовится следующим образом: к 10 мл стерильного расплавленного агара добавляют, соблюдая стерильность, 2,5–3,0 мл снятого стерильного молока, смешивают и выливают в чашку Петри. Среда используется без дополнительной стерилизации, так как при совместной стерилизации молока и агара выпадают хлопья казеина. Посев делают петлей или шпателем Дригальского так, чтобы получить изолированные колонии. Чашки помещают в термостат на 28–30 °С. Культуры, продуцирующие протеолитические ферменты, обуславливают пептонизацию молочного белка – казеина, в результате чего вокруг колоний образуются прозрачные ореолы, четко выделяющиеся на общем молочно-мутном фоне среды.

Некоторые виды микроорганизмов с выраженной протеолитической активностью обладают способностью расщеплять белок и пептон до продуктов глубокого распада: аммиака, сероводорода, индола.

Образование аммиака свойственно микроорганизмам, дезаминирующим аминокислоты. Эту способность выявляют при их росте в МПБ. Для этого МПБ разливают в пробирки по 8–10 мл, стерилизуют при 1 атм и засевают суспензией клеток (0,2 мл) изучаемого организма. Образование аммиака обнаруживают по изменению окраски красной лакмусовой бумажки. Для этого после посева узкую полоску стерильной лакмусовой бумаги укрепляют между пробкой и горлышком пробирки так, чтобы она не соприкасалась с питательной

средой. Чтобы затруднить улетучивание NH_3 пробку пробирки заворачивают целлофаном. Посевы инкубируют при 28–30 °C 7–10 дней.

Конечным продуктом расщепления серосодержащих аминокислот (цистеина, цистина, метионина) является сероводород. Для обнаружения сероводорода после посева микроорганизмов в пробирки с МПБ между горлышком и пробкой помещают сухую стерильную полоску фильтровальной бумаги, ранее смоченную раствором уксуснокислого свинца (20 г уксуснокислого свинца, 1 г углекислой соды, 100 мл дистиллированной воды). Пробку пробирки заворачивают целлофаном, чтобы затруднить улетучивание сероводорода. Продолжительность культивирования 7–10 суток при 30–37 °C. Если в среде накапливается H_2S , то он вступает в соединение с бесцветным уксуснокислым свинцом, образуя сернокислый свинец, окрашивающий индикаторную бумажку в черно-бурый цвет.

Некоторые микроорганизмы в процессе развития, расщепляя сложную гетероциклическую кислоту триптофан, образуют индол. Образование индола связано с триптофаназной активностью и является важным диагностическим признаком. Существуют несколько способов обнаружения индола. Рассмотрим один из них, а именно способ Мореля. МПБ с 0,01 % триптофана разливают в пробирки по 8–10 мл, стерилизуют при 0,5 атм и засевают клетками изучаемого организма. После посева между стенкой пробирки и пробкой помещают сухую индикаторную бумагу, ранее пропитанную горячим насыщенным раствором щавелевоуксусной кислоты. Посевы инкубируют 48–72 ч при 28–30 °C. Пробку пробирки заворачивают целлофаном. Если при росте культуры в среде образуется индол, то бумажка краснеет. Обнаружение нитратредуктазной активности. Восстанавливать нитраты до нитритов способны микроорганизмы, образующие фермент нитратредуктазу и использующие нитраты в качестве источника азота.

Значительно реже у микроорганизмов встречается способность восстанавливать нитраты до молекулярного азота, что характерно для видов, использующих нитраты как акцептор водорода при окислении органических соединений. Способность микроорганизмов к восстановлению нитратов проверяют на среде, состоящей из МПБ и 0,2 %-ного раствора KNO_3 . Для этого среду разливают в пробирки, вставляют поплавки, стерилизуют при 1 атм и засевают суспензией клеток исследуемого организма. Через 7–10 дней регистрируют результаты. Для обнаружения нитратов к культуральной жидкости по стенке пробирки осторожно приливают реактив Грисса. Появление красного кольца свидетельствует о присутствии нитритов. О восстановлении нитритов до N_2 свидетельствует накопление газа в поплавке.

Для обнаружения фермента каталазы на предметное стекло наносят каплю 1–3 %-ного раствора перекиси водорода и вносят в нее петлю бактериальной культуры. Каталаза разлагает перекись водорода на воду и кислород. Выделение пузырьков кислорода свидетельствует о наличии у данного вида бактерий фермента каталазы.

На основании совокупности полученных признаков, изученные организмы идентифицируют, руководствуясь специальными определителями бактерий и актиномицетов и определителем Берджи.

7. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Лабораторная работа №1

Устройство микробиологической лаборатории (4 часа)

Правила техники безопасности при работе в микробиологических лабораториях

1. Работа в лаборатории ведется исключительно в халатах и сменной обуви или бахилах.
2. Верхняя одежда и сумки не должны находиться в лаборатории.
3. Запрещается принимать пищу и пить воду в лаборатории.
4. Работу с биологическим материалом проводить только предварительно обработанным инструментом.
5. При случайном попадании биологического материала на стол, руки или другие поверхности необходимо сразу же оповестить об этом преподавателя и провести обработку загрязненной поверхности дезинфицирующим раствором.
6. После работы необходимо тщательно вымыть руки с использованием дезинфекционных средств.
7. Рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и лишними вещами.
8. Студентам запрещается работать в лаборатории в отсутствие преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.
9. К выполнению каждой лабораторной работы нужно приступать только после получения инструктажа по технике безопасности, ознакомления с методиками и разрешения преподавателя.

10. Лабораторную работу необходимо проводить в точном соответствии с описанием в методических указаниях.

11. Для проведения работы пользоваться только чистой, сухой лабораторной посудой; для отбора объемов реактивов нужно иметь мерную посуду (пипетки, бюретки, мензурку, мерный цилиндр или мерный стакан); нельзя выливать избыток налитого в пробирку реактива обратно в емкость.

12. Если в ходе опыта требуется нагревание, надо следовать предусмотренным методическими указаниями способам нагрева: на водяной бане, на электроплитке или на спиртовке.

13. Нагревание предметного стекла в пламени спиртовки при приготовлении некоторых препаратов следует проводить равномерно.

14. Запрещается работать с неисправными электроприборами. О любых неисправностях следует незамедлительно информировать преподавателя.

15. По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: помыть посуду, протереть поверхность рабочего лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы.

Правила работы в микробиологических лабораториях

Стерильность – первое и основное условие работы в микробиологических лабораториях.

1. Снижение микробной обсемененности в целом обеспечивается надеванием халатов, сменной обуви/бахил, регулярной уборкой, облучением помещений и обработкой всех поверхностей дезинфицирующими средствами.

2. Стерильность на рабочем месте обеспечивается работой в ламинарных боксах, в которых производится

фильтрация входящего воздуха ламинарными (без завихрений) потоками воздуха внутри рабочей зоны (рис. 24).

Перед началом работы должна проводиться обработка бокса УФ-излучением в течение 15–30 мин, затем – обработка поверхностей 70 % этанолом. Один раз в месяц следует разбирать съемные детали, мыть бокс изнутри и также обрабатывать его 70 % этанолом. Также в зависимости от интенсивности работы один раз в 3–6 месяцев необходимо проводить дезинфекцию фильтров парами формальдегида.

3. Снижение микробной обсемененности рабочего пространства вне ламинарного бокса обеспечивается обработкой дезинфицирующими растворами рабочих поверхностей и работой газовых горелок/спиртовок. 15-сантиметровая (в среднем) зона вокруг пламени спиртовки является стерильной, и именно в ней необходимо проводить все работы.

4. Стерильность рабочего инструмента (микробиологических игл и петель) обеспечивается их прокаливанием в пламени спиртовки / газовой горелки. Также в пламени горелки обжигаются горлышки пробирок и колб до и после работы с ними.

5. Стерильность сред, остального инструмента и посуды обеспечивается их автоклавированием или обработкой сухим жаром.

6. Отбор культуры микроорганизмов проводится по следующему алгоритму:

- тремя пальцами правой руки (большим, указательным, средним) взять микробиологическую петлю и прокалить ее докрасна в пламени спиртовки;

- пробирку с культурой взять в левую руку и, не выпуская петли оставшимися пальцами правой руки (безымянным и мизинцем), вынуть пробку из пробирки и держать ее двумя пальцами во время всех дальнейших

манипуляций (ни в коем случае не следует касаться пробкой каких-либо предметов и уж тем более класть на стол!);

- одновременно с выниманием пробки следует обжечь горлышко пробирки/колбы во избежание ее загрязнения посторонней микрофлорой (нужно помнить, что все работы должны проводиться в непосредственной близости от пламени спиртовки);

- охладить петлю о внутренние стенки пробирки и отобрать из пробирки небольшое количество микроорганизмов, аккуратно извлечь петлю из пробирки;

- вновь обжечь горлышко пробирки и закрыть ее пробкой;

- проводить дальнейшие манипуляции с микроорганизмами;

- после проведения всех операций прокалить петлю.

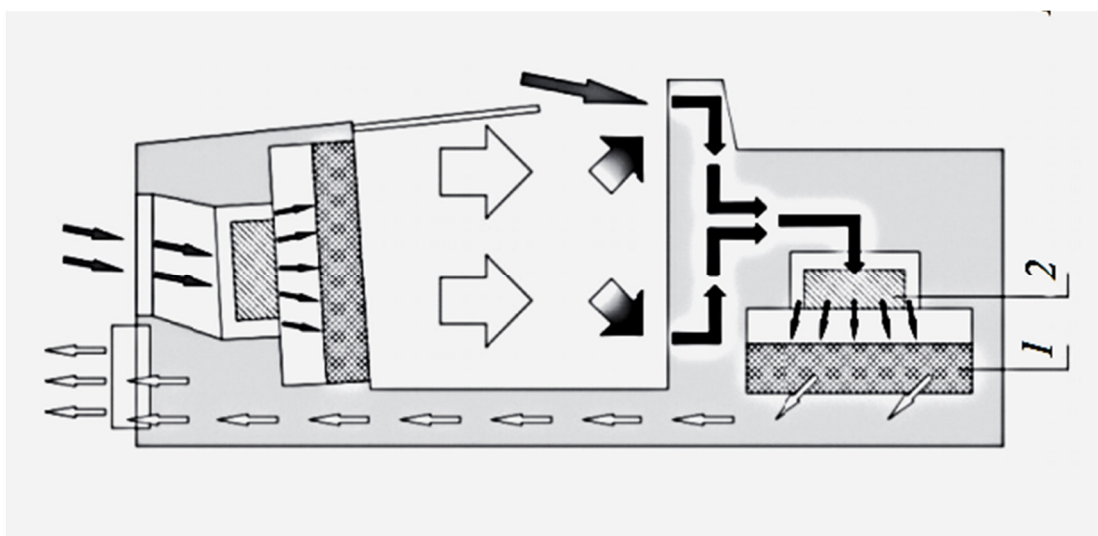


Рисунок 24 – Устройство ламинарного бокса: 1 – фильтр для очистки воздуха; 2 – вентилятор, белыми стрелками обозначены потоки стерильного воздуха, черными – загрязненного, серыми – внешнего

Оборудование микробиологических лабораторий

Лаборатории снабжены рядом обязательных приборов и аппаратов.

1. Приборы для микроскопии: биологический иммерсионный микроскоп с дополнительными приспособлениями (осветитель, фазово-контрастное устройство, темнопольный конденсор и др.), люминесцентный микроскоп.

2. Термостаты и холодильники.

3. Приборы для приготовления питательных сред, растворов и т.д.: аппарат для получения дистиллированной воды (дистиллятор), технические и аналитические весы, рН-метры, аппаратура для фильтрования, водяные бани, центрифуги.

4. Набор инструментов для манипуляций с микробами: бактериологические петли, шпатели, иглы, пинцеты и др.

5. Лабораторная посуда: пробирки, колбы, чашки Петри, матрацы, флаконы, ампулы, пастеровские и градуированные пипетки и др., аппарат для изготовления ватно-марлевых пробок.

Крупные диагностические комплексы имеют автоматические анализаторы и компьютеризированную систему оценки полученной информации.

В лаборатории выделено место для окраски микроскопических препаратов, где находятся растворы специальных красителей, спирт, кислоты, фильтровальная бумага и др. Каждое рабочее место снабжено газовой горелкой или спиртовкой и емкостью с дезинфицирующим раствором. Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, химическими реактивами, диагностическими препаратами и другими материалами.

В крупных лабораториях имеются термостатные комнаты для массового выращивания микроорганизмов, постановки серологических реакций. Для выращивания, хранения культур, стерилизации лабораторной посуды и других целей используют следующую аппаратуру.

1. *Термостат.* Аппарат, в котором поддерживается постоянная температура. Оптимальная температура для размножения большинства патогенных микроорганизмов 37 °С. Термостаты бывают воздушными и водяными.

2. *Микроанаэроустат.* Аппарат для выращивания микроорганизмов в анаэробных условиях.

3. *СО₂ -инкубатор.* Аппарат для создания постоянной температуры и атмосферы определенного газового состава. Предназначен для культивирования микроорганизмов, требовательных к газовому составу атмосферы.

4. *Холодильники.* Используют в микробиологических лабораториях для хранения культур микроорганизмов, питательных сред, крови, вакцин, сывороток и прочих биологически активных препаратов при температуре около 4 °С. Для хранения препаратов при температуре ниже 0 °С применяют низкотемпературные холодильники, в которых поддерживается температура –20 °С или –75 °С.

5. *Центрифуги.* Применяют для осаждения микроорганизмов, эритроцитов и других клеток, для разделения неоднородных жидкостей (эмульсии, суспензии). В лабораториях используют центрифуги с различными режимами работы.

6. *Сушильно-стерилизационный шкаф (печь Пастера).* Предназначен для суховоздушной стерилизации стеклянной лабораторной посуды и других жаростойких материалов.

7. *Стерилизатор паровой (автоклав).* Предназначен для стерилизации перегретым водяным паром (под давлением). В микробиологических лабораториях используют автоклавы

разных моделей (вертикальные, горизонтальные, стационарные, переносные).

Подготовка микробиологической лаборатории к работе. Обработка помещений микробиологической лаборатории

Микробиологическую лабораторию необходимо содержать в чистоте. В ней не должно находиться никаких лишних предметов. Следует регулярно проводить гигиеническую уборку лабораторных помещений. Обеспечить полную стерильность лаборатории практически невозможно, и это не всегда необходимо. В микробиологической практике с целью уничтожения микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях лабораторных помещений применяют различные способы дезинфекции. Слово "дезинфекция" означает обеззараживание, т.е. уничтожение возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды. Однако при дезинфекционной обработке погибают не только патогенные, но и сапрофитные бактерии. Иногда процесс дезинфекции оказывает стерилизующее действие.

Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории обрабатывают пылесосом и протирают растворами различных дезинфицирующих веществ. Обработка пылесосом обеспечивает освобождение предметов от пыли и удаление с них значительной части микрофлоры. Установлено, что при 4-кратном проведении щеткой пылесоса по поверхности предмета с него удаляется около 47% микрофлоры, а при 12-кратном – до 97 %. В качестве дезинфицирующих растворов чаще всего пользуются 2-3 %-м раствором соды (бикарбоната натрия), 3-5 %-м раствором фенола (карболовой кислоты) или лизола (препарат фенола с добавлением зеленого мыла), 0,5–3 %-м водным раствором хлорамина и некоторыми другими дезинфектантами.

Воздух в лаборатории наиболее просто дезинфицировать проветриванием. Продолжительная вентиляция помещения через форточку (не менее 30–60 мин) приводит к резкому снижению количества микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице в температуре между наружным воздухом и воздухом помещения. Более эффективный и наиболее часто применяемый способ дезинфекции воздуха - облучение ультрафиолетовыми лучами с длиной волны от 200 до 400 нм. Эти лучи обладают высокой антимикробной активностью и могут вызвать гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов.

Воздействие ультрафиолетовых лучей должно быть непосредственным и длительным. Это связано, прежде всего, с тем, что ультрафиолетовые лучи обладают слабой проникающей способностью. Они не проходят, например, через обычное стекло, легко поглощаются частицами пыли. Кроме того, некоторые предметы, такие как белая бумага, пластины из полированного алюминия или хрома, могут заметно отражать ультрафиолетовые лучи. Поэтому в зависимости от степени загрязненности воздуха для его стерилизации требуется облучение от 30 мин до нескольких часов.

В качестве источника ультрафиолетового излучения используются бактерицидные лампы. Излучателем в них служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления. Более 80% испускаемого ими спектра приходится на волны длиной 254 нм. Обычно бактерицидные лампы представляют собой трубки различного диаметра и длины, изготовленные из специального стекла, пропускающего излучение с длиной волны 254 нм. Конструктивное оформление корпуса бывает различным. Необходимо иметь в виду, что ультрафиолетовые лучи могут вызывать тяжелые поражения глаз. Поэтому при работе

с бактерицидными лампами нужно строго следить за тем, чтобы ни прямые, ни отраженные ультрафиолетовые лучи не попадали в глаза. В небольших помещениях при включенной бактерицидной лампе находиться нельзя. Следует также учитывать, что при длительной непрерывной работе бактерицидной лампы интенсивность излучения снижается. В этих случаях облучение целесообразно вести с перерывами.

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для протирания поверхности стола можно использовать растворы лизола и хлорамина, а также 70%-е (по объему) растворы изопропилового или этилового спиртов. Спирты весьма эффективны в отношении вегетативных форм микроорганизмов. Названные спирты можно также применять для дезинфекции рук. В тех случаях, когда поверхность стола имеет водоотталкивающее покрытие, особенно удобен лизол. Поверхность рабочего стола можно дезинфицировать и ультрафиолетовыми лучами. При этом следует учитывать, что бактерицидное действие лучей тем выше, чем ближе облучаемая поверхность к источнику излучения.

Посуду с культурами микроорганизмов, подлежащими выбрасыванию, следует автоклавировать, чтобы убить клетки, и только после этого мыть. Культуры на плотных питательных средах можно заливать на сутки дезинфицирующим раствором, после чего их выбрасывают и посуду моют. Неаккуратное обращение с культурами микроорганизмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля.

Основные виды инструментов и расходных материалов

Постоянно задействованные в практике работы с микроорганизмами инструменты и оборудование – это чашки Петри, пробирки в ватно-марлевыми пробками, предметные и покровные стекла, микробиологические иглы и петли, а также шпатели, металлические или изготовленные из стеклянных палочек (рис. 25).

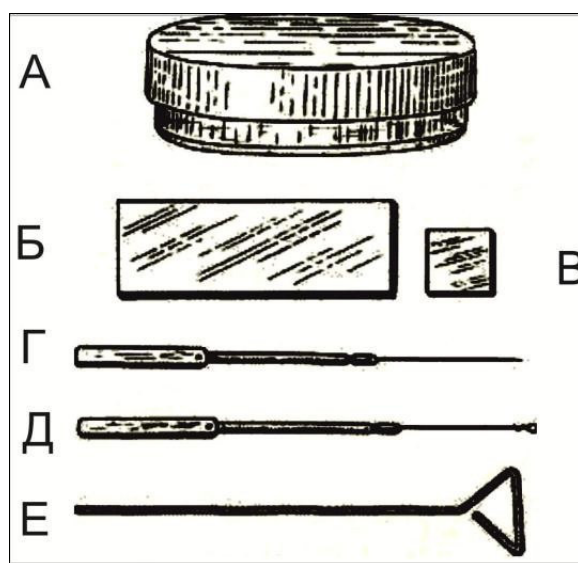


Рисунок 25 – Некоторые микробиологические инструменты и оборудование: А – чашка Петри; Б – стекло предметное; В – стекло покровное; Г – игла микробиологическая; Д – петля бактериологическая; Е – шпатель Дригальского

1. Предметные стекла. Служат для приготовления микробиологических препаратов (рис. 26). Предметные стекла имеют размеры 26x76 мм. Толщина стекла – 1 мм. Существуют модификации предметных стекол:

- стекло предметное с заточенным краем для растяжки мазков;
- стекло предметное с лункой для микроскопии препаратов «висячая капля»;

- стекло предметное с полосой для записи.

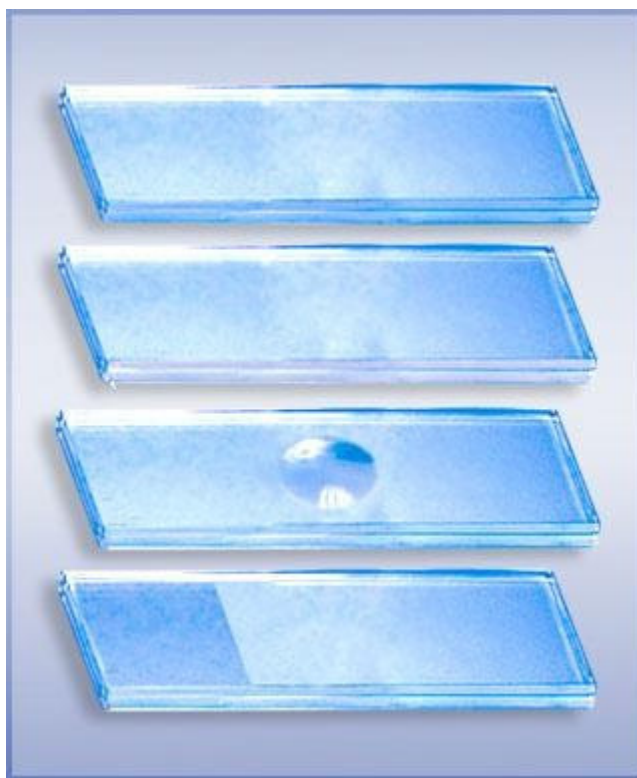


Рисунок 26 – Виды предметных стекол

2. Покровные стекла. Покровное стекло предназначено для защиты объектива микроскопа, а в случае получения препарата «висячая капля» на него наносится исследуемая культура микроорганизмов. Толщина стекла 0,2 мм. Размеры покровных стекол 18х18, 24х24, 24х48 мм.

Микроскопировать незафиксированные препараты, не защищенные покровным стеклом, категорически запрещается!

3. Бактериологическая петля. Состоит из петледержателя и собственно петли, изготовленной из нихромовой нити различного диаметра.

4. Чашка Петри (изобретена в 1877 г. немецким бактериологом Юлиусом Рихардом Петри, ассистентом Роберта Коха) обычно изготавливается из прозрачного стекла или пластмассы (прозрачный полистирол) и может иметь самые различные размеры. Наиболее часто используемые варианты имеют диаметр порядка 50–100 мм и высоту около 15 мм. Чашка широко используется в

микробиологии для культивирования колоний микроорганизмов. Для этой цели чашка Петри заполняется слоем питательной среды, на который производят посев культуры микроорганизмов. Стеклоянные чашки многоразовые, но требуют стерилизации перед повторным посевом. Чашки из пластических материалов поставляются стерильными, в герметичной упаковке.

5. Шпатель Дригальского предназначен для засева материала на плотные питательные среды. Выпускаются шпатели L- и T-формы. Гладкая поверхность рабочей части шпателя позволяет избежать повреждения питательной среды.

Задания к лабораторной работе:

1. Изучить правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории и расписаться в журнале техники безопасности.

2. Ознакомиться с бактериологической лабораторией, ее основным оборудованием.

3. Изучить методы микробиологического исследования.

4. Законспектировать вопросы:

- биологическая систематика или таксономия микроорганизмов;

- современная классификация микроорганизмов: бинарная номенклатура.

5. Перечислите отделы царства прокариот.

6. Опишите строение клетки прокариот.

7. Зарисуйте строение бактериальной клетки (зарисовать в тетради).

8. Ответьте на вопросы:

Какие аппараты необходимы в микробиологической лаборатории?

Каково назначение термостата?

Укажите режимы стерилизации посуды и приспособлений в стерилизаторе сухим жаром.

Каково назначение стерилизационной камеры (автоклава)?

Укажите режимы стерилизации питательных сред в автоклаве.

Какую посуду необходимо иметь в микробиологической лаборатории?

Какие приспособления используют в микробиологической лаборатории?

Лабораторная работа №2

Посуда и приборы в лаборатории

(4 часа)

Приборы микробиологической лаборатории

Лабораторное помещение оборудуется столами лабораторного типа, шкафами и полками для хранения необходимой при работе аппаратуры, посуды, красок и реактивов. В лабораторной комнате должно быть место для окраски микроскопических препаратов, где должны храниться растворы красок, спирт, кислоты, фильтровальная бумага и пр. Каждое рабочее место должно быть снабжено газовой горелкой или спиртовкой и банкой с дезинфицирующим раствором. Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, химическими реактивами и другими лабораторными материалами.

Весы аналитические и лабораторные используются для взвешивания образцов проб, питательных сред, аналитических фильтров (при бактериологическом анализе воздуха), реактивов (рис. 27). Весы желательно располагать на устойчивом основании или на специальном весовом столе. Выбор весов, строго заказчика не обязывает, но с точки зрения удобства и безопасности, особенно при работе с патогенными микроорганизмами высоких классов опасности, не лишним будет такая сервисная возможность как «бесконтактное

управление работой весов». Эта функция доступна для моделей весов фирм Ohaus или Mettler Toledo.



Рисунок 27 – Весы лабораторные фирмы Mettler Toledo

Автоклав обеспечивает стерилизацию горячим паром под давлением, при температуре не ниже $+121\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 28). Используется для уничтожения микроорганизмов, при стерилизации посуды инструментов, в некоторых случаях для обеззараживания отходов.



Рисунок 28 – Автоклав

Это герметичный котел с двойными металлическими стенками и крышкой. Пространство между стенками

(водопаровая камера) заполняется водой. Внутренняя часть (стерилизационная камера) снабжена манометром, предохранительными клапанами и краном для спуска воды и пара. Для создания герметичности автоклав плотно закрывается крышкой с резиновой прокладкой. Применяют для стерилизации питательных сред под давлением от 0,5 до 1,0 МПа в течение 20–30 мин.

Термостаты, которые бывают суховоздушными и водяными, применяются для поддержания постоянства температуры при выращивании культур микроорганизмов (рис. 29). Оптимальная температура для размножения многих микроорганизмов – 37 °С.

Если температура окружающего воздуха выше, чем необходимо выдерживать в камере, например, летом, в жарком климате, то может понадобиться термостат с охлаждением. В работе необходим для обеспечения некоторых методик выполнения измерений (МВИ) для выдерживания питательных сред, растворов.



Рисунок 29 – Термостат

Холодильник – необходим для хранения культур микроорганизмов, питательных сред, реактивов, а также проб образцов, в течение, оговоренного в нормативных документах срока (рис. 30). В некоторых случаях, для тех же целей, может

понадобиться морозильная камера, с температурой не выше 18 °С.



Рисунок 30 – Холодильник для микробиологической лаборатории

Водяная баня – для поддержания заданной температуры в помещенных в резервуар бани, лабораторных емкостях (колбы, чашки, сосуды), необходима для обеспечения технологического процесса при подготовке сред и суспензий (рис. 31).



Рисунок 31 – Водяная баня для микробиологической лаборатории

Сушильный шкаф (печь Пастера) используют для стерилизации сухим жаром посуды, инвентаря и сухих материалов, например, крахмала, мела. Стерилизуемый материал предварительно заворачивают в бумагу и помещают в шкаф так, чтобы он не касался стенок (рис. 32). Стерилизацию проводят при температуре 160 °С в течение двух часов или при температуре 180 °С в течение часа. Поднимать температуру выше 180 °С не рекомендуется: ватные пробки и бумага начинают разрушаться (буреют, становятся ломкими). Простерилизованный материал вынимают после отключения и охлаждения шкафа, лучше, когда температура в шкафу сравняется с комнатной. Принципиальные преимущества сухого жара заключаются в том, что при его применении не происходит коррозии металлов и инструментов, не повреждаются стеклянные поверхности; он пригоден для стерилизации порошков и не содержащих воды нелетучих вязких веществ. К недостаткам данного метода относятся медленная передача тепла и продолжительное время стерилизации; при использовании сухого жара более высокие температуры (выше 170 °С) могут неблагоприятно действовать на некоторые металлы, а также вызывать обугливание и возгорание ватных пробок и бумаги. Кроме того, если нет циркуляции воздуха, может происходить образование слоев воздуха с разными температурами.

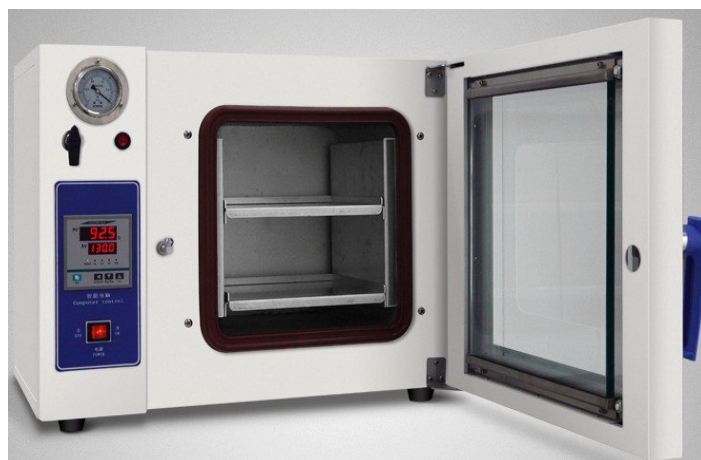


Рисунок 32 – Сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром

При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате окисления внутриклеточных компонентов. Споры бактерий более устойчивы к сухому жару, чем вегетативные клетки.

Дистиллятор – для получения дистиллированной воды. Для приготовления растворов, суспензий, разбавления реактивов (рис. 33).

Фильтровальная установка – для отбора проб воды на различные фильтры, для последующего анализа (рис. 34).

Центрифуги применяются для осаждения микроорганизмов и других клеток, для разделения неоднородных жидкостей (эмульсии, суспензии). В основе метода центрифугирования лежит принцип отделения крупных частиц с большей плотностью при низких скоростях. При повышении скорости центрифуг можно осадить все более мелкие частицы (рис. 35).



Рисунок 33 – Дистиллятор



Рисунок 34 – Прибор вакуумного фильтрования ПВФ



Рисунок 35 – Центрифуга лабораторная

Аппарат Коха применяют для стерилизации питательных сред, разрушающихся при температуре выше 100 °С (рис. 36). Он представляет собой металлический полый цилиндр с двойным дном и конусообразной крышкой, которая имеет отверстие для выхода пара. Аппарат покрыт теплоизолирующим материалом (асбестом или линолеумом). Сосуды с питательными средами ставят на подставку с отверстиями, находящуюся внутри аппарата неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта их с паром. Обработка стерилизуемого материала в аппарате Коха производится в течение трех дней по 30 мин ежедневно.

В перерывах между стерилизацией среду помещают на двадцать четыре часа в термостат при 28–30 °С.

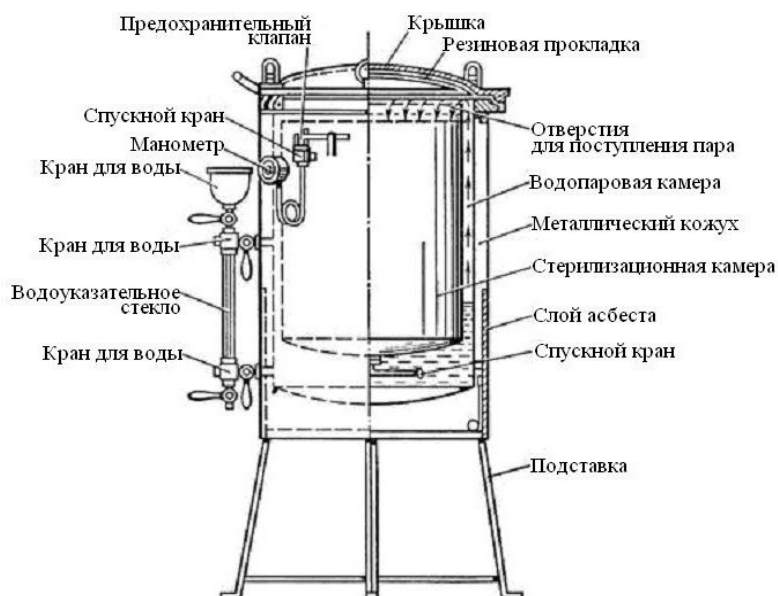


Рисунок 36 – Аппарат Коха

Микроскоп — для исследования культур микроорганизмов, их морфологии. Идеальным для микробиологической лаборатории будет микроскоп с наличием конденсора темного поля фазово-контрастного устройства. Стереомикроскопы, с небольшим увеличением, в свою очередь будут удобны для изучения колоний бактерий, в питательной среде.

С помощью светового микроскопа изучают морфологию и строение клеток микроорганизмов, их рост и развитие, проводят первичную идентификацию исследуемых организмов, ведут наблюдения за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах. С помощью электронного микроскопа в микробиологии исследуют субмикроскопическое строение клеток микроорганизмов, выявляют неизвестные ранее формы мельчайших микроорганизмов, ведут их учет.

В микробиологической практике применяют световые микроскопы отечественных марок: МБР-1, МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, Биолам Р-1 и др. Они предназначены для

изучения формы, структуры, размеров и других признаков различных микроорганизмов, величина которых не менее 0,2-0,3 мкм. Световой микроскоп состоит из двух частей – оптической и механической (рис. 37). К механической части относятся штатив, предметный столик, тубус.

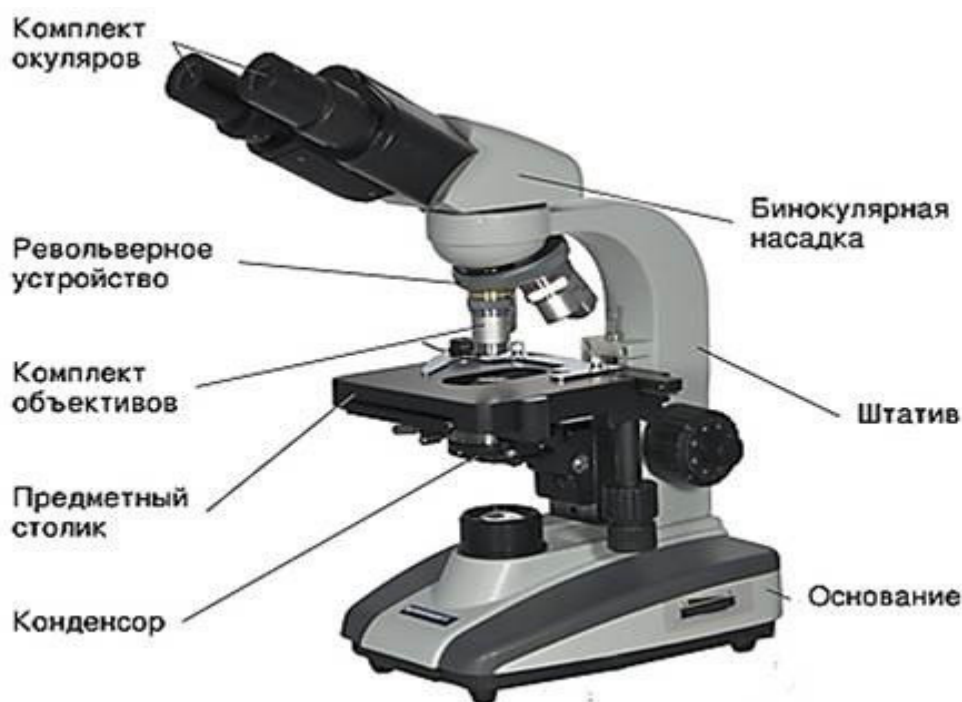


Рисунок 37 – Основные части светового микроскопа

Штатив состоит из основания и неподвижно привинченного тубусодержателя. К штативу примыкает коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции движения тубуса. Система приводится в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных соответственно для грубой и точной фокусировки на препарате. При вращении винтов по часовой стрелке тубус движется по направлению к препарату; при вращении против часовой стрелки – от препарата.

Предметный столик служит для размещения на нем препарата с объектом исследования. Предметный столик может перемещаться с помощью винтов в горизонтальной плоскости. В центре столика находится круглое отверстие для

освещения препарата снизу лучами света, направляемыми зеркалом микроскопа. На столике смонтированы два зажима (клеммы) – пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата.

Тубус (труба) – оправа, в которую заключены элементы оптической системы микроскопа. К нижней части тубуса прикрепляется револьвер (объективодержатель) с гнездами для объективов. В верхний конец тубуса вставляется окуляр. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус с дугообразным тубусодержателем, что обеспечивает горизонтальное положение предметного столика.

Оптическая часть микроскопа состоит из основного оптического узла (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы.

Конденсор представляет собой оптическую систему из двух-трех короткофокусных линз для усиления яркости освещения рассматриваемого объекта. Конденсор концентрирует лучи, идущие от плоского зеркала, и направляет их под большим углом на объект. Линзы конденсора вмонтированы в цилиндрическую оправу, соединяющуюся с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз вдоль оси микроскопа специальным винтом. При опускании конденсора поле зрения микроскопа затемняется, при поднятии – освещается. Для регулировки интенсивности освещения конденсор снабжен ирисовой (лепестковой) диафрагмой, состоящей из тонких непрозрачных серповидных пластинок. При передвижении рычага диафрагмы, расположенного в нижней части оправы конденсора, пластинки можно сдвигать и раздвигать, плавно меняя диаметр действующего отверстия. У многих современных видов микроскопов конденсор и источник света вмонтированы в микроскоп.

Окуляр (от лат. *oculus* – глаз) вставляется в верхний конец тубуса. Окуляр представляет собой систему двух плоско-выпуклых линз, обращенных выпуклостью в сторону

объектива. Линза, обращенная к глазу, называется глазной, а обращенная к препарату – полевой, или собирающей. Назначение полевой линзы – собирать лучи, идущие от объектива, таким образом, чтобы они проходили через маленькое отверстие глазной линзы. Глазная линза, подобно простой лупе, увеличивает действительное изображение, даваемое объективом.

Назначение окуляра состоит в прямом мнимом увеличении того действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив. Окуляры помечаются цифрами, показывающими их собственное увеличение $\times 5$, $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около $\times 1,5$) и снабжены коррекционными линзами. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах от 55 до 75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Работа с бинокулярной насадкой улучшает видимость объекта, снижает яркость изображения и тем самым сохраняет зрение.

Основные технические характеристики микроскопа. Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями.

Объективы (от греч. *objectum* – предмет исследования) являются наиболее важной частью микроскопа, от их качества зависит, в основном, изображение объекта. Они ввинчиваются в гнезда револьвера и состоят из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя, или фронтальная, линза объектива является самой маленькой и единственной, дающей увеличение. Остальные линзы в объективе только исправляют недостатки полученного изображения и называются коррекционными.

Объективы подразделяются на сухие и иммерсионные. При работе с сухими объективами между фронтальной линзой объектива и объектом исследования находится воздух. В случаях использования иммерсионных объективов между фронтальной линзой объектива и объектом исследования

должна находиться жидкость с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. Лучшим для этой цели является иммерсионное масло (кедровое) с коэффициентом преломления 1,515 (коэффициент преломления стекла 1,52).

В микроскопах МБР-1 и МБИ-1 два сухих объектива с увеличением $\times 8$, $\times 40$ и один иммерсионный с увеличением $\times 90$. Данные о каждом объективе имеются на его оправе:

а) $\times 8$, $\times 40$, $\times 90$;

б) числовая апертура (характеризует светособирательную способность объектива);

в) заводской номер.

Наряду с этими обозначениями иммерсионные объективы $\times 90$ имеют дополнительный буквенный индекс ОИ или МИ (объектив иммерсионный или масляная иммерсия), а также черную маркировочную линию в нижней части объектива.

Коэффициент увеличения микроскопа определяется произведением увеличения окуляра на увеличение объектива. Теоретически микроскоп может дать увеличение в 2000 и более раз. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличения микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают $\times 1400$. При превышении границ полезного увеличения возникают дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света, которые незаметны в пределах полезного увеличения, но приводят к оптическим ошибкам в зоне бесполезных увеличений.

Увеличение, которое дает возможность рассматривать объект под предельным углом зрения, и есть полезное увеличение. Оно обычно превышает числовую апертуру объектива в 500–1000 раз. Например, для объектива с увеличением $\times 40$, имеющего числовую апертуру 0,65, полезное увеличение составляет $\times 325$ –650. С помощью этого увеличения можно различить все структуры, разрешаемые

данным объективом. Поэтому для объектива $\times 40$ следует брать окуляр $\times 1,5$, чтобы получить увеличение в пределах полезного. Какие бы более сильные окуляры ни применялись, более тонких деталей структур выявить не удастся. Хуже того, повышение увеличения окуляра приведет к уменьшению количества света, попадающего в глаз наблюдателя, и к возрастанию искажений, вызываемых дефектами зрения.

Если объектив имеет увеличение $\times 90$ (числовая апертура 1,25), то полезное увеличение для него равно $\times 1250$. Следовательно, и здесь не надо применять окуляры с увеличениями более $\times 15$, чтобы не выходить за пределы полезного увеличения.

Бесполезные увеличения могут принести пользу лишь при подсчете мельчайших частиц в поле зрения, если при этом не требуется рассмотрение их структуры.

Четкость получаемого изображения характеризуется разрешающей способностью микроскопа. Эта характеристика микроскопа особенно важна при исследовании микрообъектов и их структур. Под разрешающей способностью микроскопа понимают минимальное расстояние между двумя точками, когда они ещё не сливаются в одну (видимые раздельно). Таким образом, чем больше разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины можно увидеть объект.

Основные правила работы с микроскопом

Место для микроскопа выбирается подальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью способствует меньшему утомлению глаз.

Рекомендуется смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. В случае работы с бинокулярной насадкой сначала регулируется расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров слились в одно.

Переносить микроскоп необходимо двумя руками: одной держать штатив, другой – основание микроскопа. Наклонять

микроскоп в сторону нельзя, так как при этом окуляр может выпасть из тубуса.

Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами типа кислот и щелочей. Нельзя касаться пальцами поверхности линз, зеркал и светофильтров. Не рекомендуется вынимать окуляр из трубы, чтобы не загрязнять пылью трубу и объективы. Во время работы желательно защищать микроскоп от дыхания, так как конденсация паров ведет к его порче. Микроскоп следует оберегать от пыли, сырости и хранить в футляре под стеклянным колпаком или покрывать материей.

При микроскопии препаратов с сухим объективом следует придерживаться определенного порядка в работе:

а) микроскоп размещают на рабочем столе тубусодержателем к себе на расстоянии 3–5 см от края стола;

б) ставят объектив с малым увеличением и при этом увеличении устанавливают наилучшее освещение; наилучшее освещение достигается при регулировке положения зеркала, конденсора и диафрагмы; при просмотре неокрашенных препаратов применяют суженную диафрагму и опущенный конденсор, при наблюдении окрашенных препаратов – открытую диафрагму и поднятый конденсор. Поле зрения микроскопа при правильной установке света будет иметь форму круга, хорошо и равномерно освещенного;

в) помещают препарат на предметный столик микроскопа, под объектив, и укрепляют зажимами;

г) опускают объектив вниз при помощи макрометрического винта осторожно, наблюдая за объективом сбоку, на расстояние около 0,5 см от предметного столика;

д) глядя в окуляр, медленно вращают макровинт на себя и поднимают тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение изучаемого объекта. После этого вращением микрометрического винта фокусируют объектив так, чтобы

изображение предмета было четким. Микрометрический винт во избежание порчи винтовой нарезки можно вращать не более чем на впол оборота в ту или другую сторону;

е) повернув револьвер, устанавливают объектив со средним увеличением ($\times 20$; $\times 40$; $\times 60$);

ж) после окончания работы следует снять препарат с предметного столика, опустить конденсор, поставить под тубус объектив с наименьшим увеличением, мягкой тканью протереть микроскоп и убрать его в футляр.

При работе с иммерсионным объективом необходимо соблюдать следующие правила и порядок работы:

а) установить зеркало плоской стороной, поднять конденсор и под малым увеличением микроскопа настроить свет;

б) на приготовленный и окрашенный мазок нанести небольшую каплю иммерсионного масла (не размазывая по стеклу) и поместить препарат на предметный столик;

в) повернуть револьвер до отметки иммерсионного объектива $\times 90$;

г) осторожно опустить тубус микроскопа до погружения фронтальной линзы иммерсионного объектива в каплю масла, при этом наблюдая сбоку;

д) глядя в окуляр микроскопа и действуя макровинтом, медленно поднять тубус микроскопа до появления в поле зрения изучаемого объекта;

е) провести окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, вращая его в пределах только одного оборота;

ж) по окончании микроскопирования поднимают тубус, опускают конденсор, переводят револьвер на малый сухой объектив, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива $\times 90$ сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой, а затем той же салфеткой, но слегка смоченной бензином или спиртом.

Кроме светооптической микроскопии к методам микроскопии относят: темнопольную, фазово-контрастную, люминесцентную и электронную микроскопии. В большинстве лабораторий широкое использование получили первые два вида.

Метод наблюдения в темном поле, разработанный австрийским ученым Зигмонди, дает возможность повысить разрешающую способность микроскопа в 10 раз. В основе метода лежит явление Тиндаля – освещение объекта косыми лучами света. Эти лучи, не попадая в объектив, остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит темным. В то же время оптически неоднородные клетки, находящиеся в поле зрения и попадающие в сферу прохождения лучей, отклоняют их в такой степени, что лучи попадают в объектив. Тогда наблюдатель видит в темном поле интенсивно светящиеся объекты, поскольку лучи света идут именно от них.

Темное поле зрения можно создать в светооптическом микроскопе, заменив обычный конденсор темнопольным (центральная часть, которого затемнена так, что прямые лучи от осветителя в объектив микроскопа не попадают) и применив для освещения источник сильного света. Объект освещается косыми боковыми лучами, и в объектив микроскопа попадают только лучи, рассеянные частицами, находящимися в препарате. Однако эффект темного поля может быть достигнут только в том случае, если апертура конденсора превышает на 0,2–0,4 единицы апертуру объектива. Для исследования в темном поле рекомендуется конденсор с апертурой около 1,2 и объективы с апертурой от 0,65 до 0,85.

Метод используется с целью исследования живых клеток микроорганизмов. При темнопольной микроскопии микроорганизмы выглядят ярко светящимися на черном фоне. При этом могут быть обнаружены мельчайшие организмы, размеры которых лежат за пределами разрешающей

способности микроскопа. Однако темнопольная микроскопия позволяет увидеть только контуры объекта, но не дает возможности изучить его внутреннюю структуру. С помощью темнопольной микроскопии изучают препараты типа «раздавленная капля». Предметные стекла должны быть не толще 1,1–1,2 мм, покровные – 0,17 мм, без царапин и загрязнений. При приготовлении препарата следует избегать наличия пузырьков и крупных частиц (эти дефекты будут видны ярко светящимися и не позволят наблюдать препарат).

Темнопольную микроскопию также возможно использовать для функционально-морфологического изучения крупных объектов типа дрожжей. Цитоплазма дрожжевых организмов (при условии яркого источника света и хорошего апохроматического иммерсионного объектива) слабо и равномерно опалесцирует. На ее фоне четко различаются черные оптически пустые вакуоли. Капли жира выделяются как сильно блестящие гранулы. Протопласт погибающих клеток опалесцирует молочно-белым цветом.

Метод фазово-контрастной микроскопии, предложенный голландским физиком Цернике для наблюдения за прозрачными объектами, основан на преобразовании фазовых изменений, претерпеваемых световой волной при прохождении через объект, в видимые амплитудные с помощью специального оптического устройства. Если в объектив обычного микроскопа вмонтировать специальный диск - фазовую пластинку с кольцом, а в конденсор – кольцевую диафрагму (непроницаемую для лучей света пластинку, в которой имеется прозрачная щель в виде кольца), так, чтобы через конденсор и объектив проходило лишь кольцо света, которое затем совмещается с кольцом фазовой пластинки объектива, то фазы проходящего светового луча сдвигаются и можно наблюдать эффект фазового контраста.

Для проведения исследований необходимо в дополнение к световому микроскопу иметь фазово-контрастное устройство (рис. 38), которое состоит из фазовых объективов,

конденсоров с набором кольцевых диафрагм и вспомогательного микроскопа (оптического устройства, помещаемого в тубус вместо окуляра при установке фазового контраста).

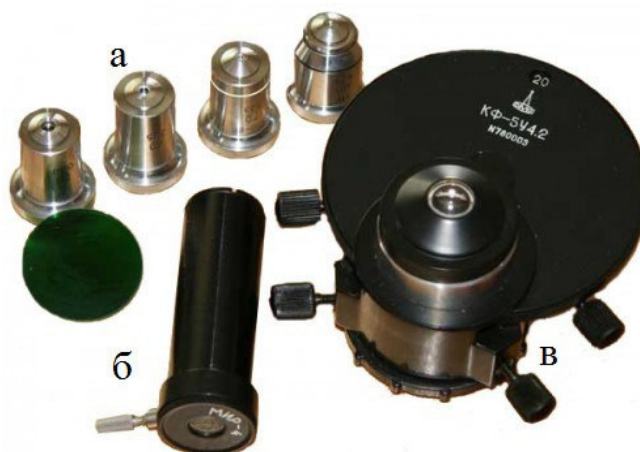


Рисунок 38 – Фазово-контрастное устройство: а – фазовые объективы; б – вспомогательный микроскоп; в – фазовый конденсор

Метод применяют для исследования живых клеток микроорганизмов, контрастность которых достигается оптическим путем без вмешательства в физиологические процессы изучаемых объектов.

Благодаря применению этого способа микроскопии, контраст живых неокрашенных микроорганизмов резко увеличивается, и они выглядят темными на светлом фоне (позитивный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (негативный фазовый контраст). Фазовоконтрастная микроскопия применяется также для изучения клеток культуры ткани, наблюдения действия различных вирусов на клетки и т. п.

Обращение с бактериальными культурами и методы посева на питательные среды

Посевом в микробиологической практике называется внесение в стерильную питательную среду какого-либо исследуемого материала для обнаружения в нем микроорганизмов.

Пересев – это перенос выращенных микроорганизмов в свежую стерильную питательную среду. При выполнении этих приемов требуется перенести тот или иной материал в питательную среду так, чтобы в нее из воздуха не попали посторонние микроорганизмы.

При посевах и пересевах с одной питательной среды на другую пользуются платиновой проволокой в виде петли или иглы, так как они допускают быструю стерилизацию на огне без повреждения металла. Платиновая проволочка накаливается очень быстро и так же быстро остывает. Над пламенем горелки иглу или петлю следует держать вертикально, чтобы проволока на всем протяжении была одновременно накаливаема докрасна. Затем слегка обжигают прилегающий к проволоке отрезок стеклянной или металлической палочки, в которую впаяна или заделана проволочка. Нужно строго следить за тем, чтобы до внесения в огонь стеклянная палочка была совершенно сухая, в противном случае стекло треснет и петля (или игла) из него выпадет. После нагревания до красного каления платиновая проволочка будет простерилизована. Лишь после такой стерилизации петлю или иглу можно вносить в пробирку с бактериальной культурой. Но, прежде чем захватить ею бактериальную культуру, петелькой или концом иглы касаются части среды, свободной от микробного налета (если имеют дело с твердой средой), или внутренней стенки пробирки с жидкой средой. Это делается для того, чтобы удостовериться, что прокаленная петля достаточно остыла. Если проволочка имеет еще высокую температуру, то среда на

данном участке расплавляется или кипит. Этим создается гарантия, что бактерии, снятые проволочкой, будут вполне жизнеспособны.

Посев на жидкую питательную среду производится с помощью петли и стерильных трубок или пипеток.

Прокаленной петлей или иглой, которую держат в руке между указательным, средним и большим пальцами (подобно карандашу или ручке), захватывают небольшое количество налета с поверхности сырья или каплю посевного материала из исследуемой жидкости, слегка погрузив в нее петлю. В левой руке держат пробирку (или колбочку) с питательной средой. На пламени горелки обжигают верхнюю часть пробирки (колбы) непосредственно у пробки. При этом сосуд со средой слегка наклоняют, но так, чтобы жидкость не выливалась и не смачивала пробки и краев посуды. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки вынимают пробку из пробирки и зажимают ее до конца посева между этими пальцами и ладонью так, чтобы входящая в пробирку часть пробки не прикасалась к руке. Все манипуляции производят над пламенем горелки. В открытую и наклоненную пробирку вводят петлю с посевным материалом, слегка погружая петельку в среду и размазывая внесенный материал по стенке пробирки, осторожно размещивают петлей питательную среду. Закончив посев, не изменяя наклонного положения пробирки, закрывают ее ватной пробкой, обжигая в пламени горелки конец пробирки и ту часть ватной пробки, которая входит в пробирку. Лишь после этого возвращают пробирку в вертикальное положение. По окончании посева петлю немедленно стерилизуют в пламени горелки.

Техника посева петлей бактериологического материала из одной пробирки в другую почти аналогична. Обе пробирки – с культурой и стерильной питательной средой – держат в наклонном положении между большим и остальными пальцами левой руки (рис. 39, а). При этом пробирку с культурой микробов следует держать ближе

к себе. Вся работа, как и в первом случае, выполняется под защитой пламени горелки, а наклонное положение пробирок предохраняет питательную среду от оседания в нее микроорганизмов из воздуха.

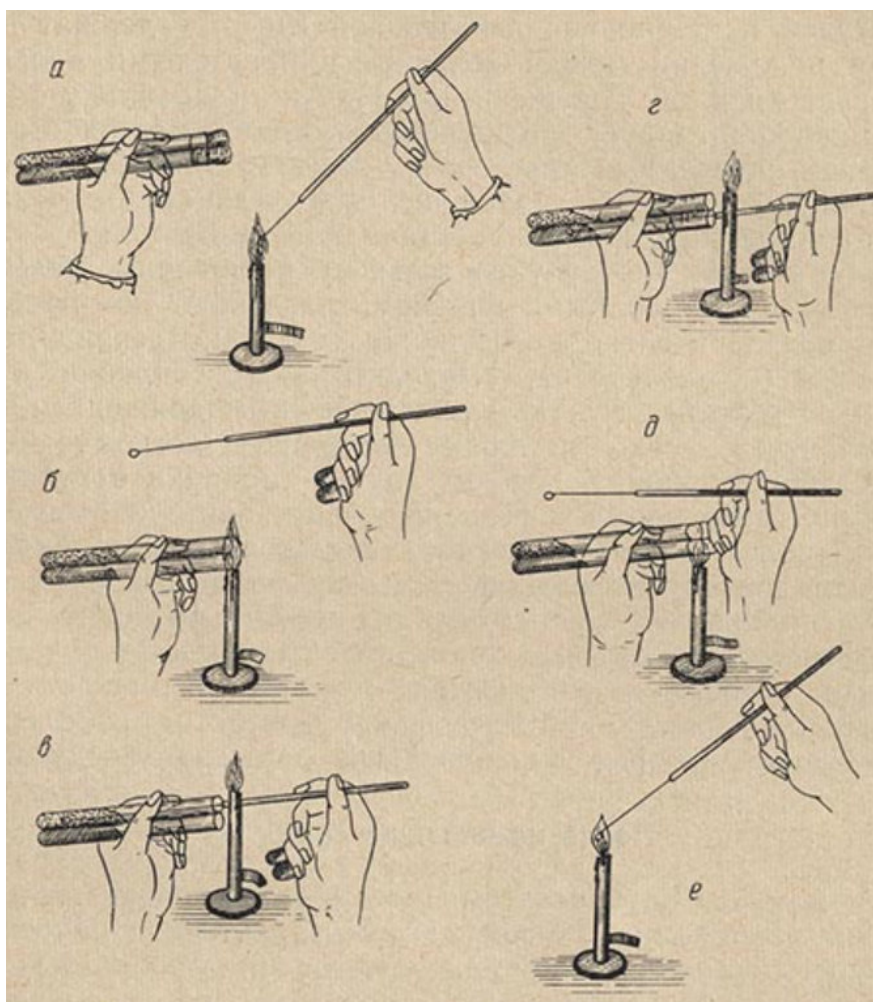


Рисунок 39 – Техника пересева культуры микроорганизма

Петлю держат между указательным и большим пальцами правой руки, а свободными пальцами извлекают из пробирок пробки, предварительно внося их на несколько секунд в пламя горелки (рис. 39, б). Извлекать ватные пробки нужно плавно, не рывком, а легким винтообразным движением.

Прокалив на огне петлю и подвергнув легкому обжигу верхние концы пробирок, вводят внутрь пробирки с культурой петлю, забирают петлей ничтожную часть бактериального

материала (рис. 39, в) и переносят его во вторую пробирку со стерильной средой (рис. 39, г). Когда посев закончен, края пробирок и нижние концы ватных пробок проводят сквозь пламя горелки и легким движением закрывают пробирки пробками (рис. 39, д). Петля стерилизуется и откладывается (рис. 39, е). Работать нужно быстро, но избегая резких движений, вызывающих усиленное движение воздуха.

Если необходимо произвести посев на твердую питательную среду, например на «косой агар», то материал наносят на поверхность среды при помощи легких зигзагообразных движений петли. В том случае, если производят посев анаэробов, делают укол иглой, зараженной микробами, в центральную часть среды, застывшей в виде столбика (рис. 40). Пробирку при этом держат в опрокинутом вверх дном положении или под углом, чтобы уменьшить опасность загрязнения среды из воздуха. Посев нужно делать именно уколом, а не разрывать поверхность среды и не касаться ее рукояткой иглы.

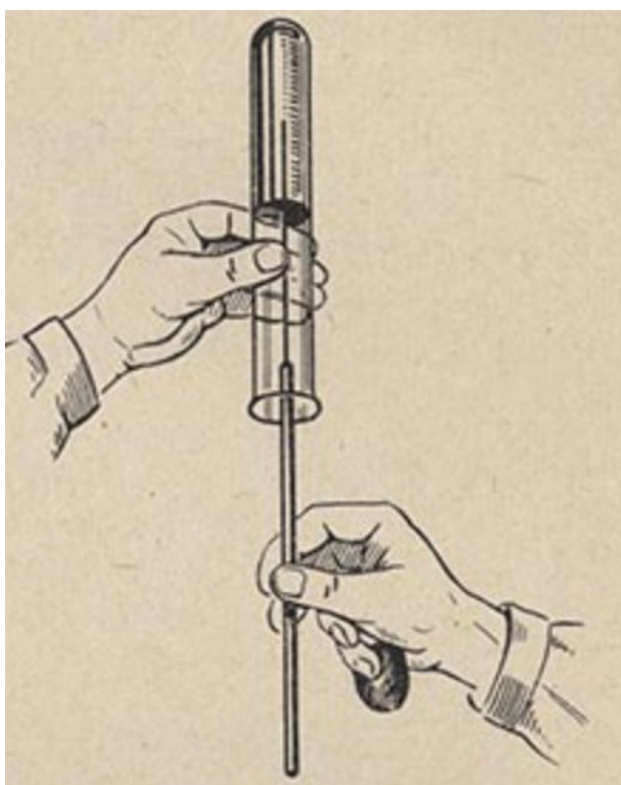


Рисунок 40 – Техника посева уколом

Посев уколом делают в желатиновые среды с целью выявления протеолитической способности микробов. Засеянные пробирки выдерживают 2-3 дня при температуре 22-23 °С, наблюдая за быстротой и формой разжижения столбика желатиновой среды. У различных видов микробов форма разжижения желатины различна: послойная, в форме гвоздя, чулка и пр. Затем пробирки опускают в холодную воду. Если среда в пробирке с микроорганизмом остается жидкой, а среда в контрольной пробирке застынет, это значит, что микроб обладает протеолитической способностью.

При посеве штрихом платиновой петлей забирают небольшое количество материала и легко проводят по поверхности агара, нанося ряд линий (штрихами) (рис. 41, а). Для более тонкого посева используют прием истощающего посева. Для этого микробный материал рассевают на поверхности среды в одном направлении, затем, не забирая новый материал, петлей наносят перпендикулярные штрихи, затем манипуляцию повторяют еще в двух перпендикулярных направлениях (рис. 41, б).

При посеве на твердую среду можно пользоваться и одной чашкой Петри, разделив ее на несколько секторов. Для этого на стекле с нижней стороны дна чашки наносят линии карандашом для стекла. Каждый отдельный сектор в данном случае будет заменять отдельную чашку Петри (рис. 41, в).

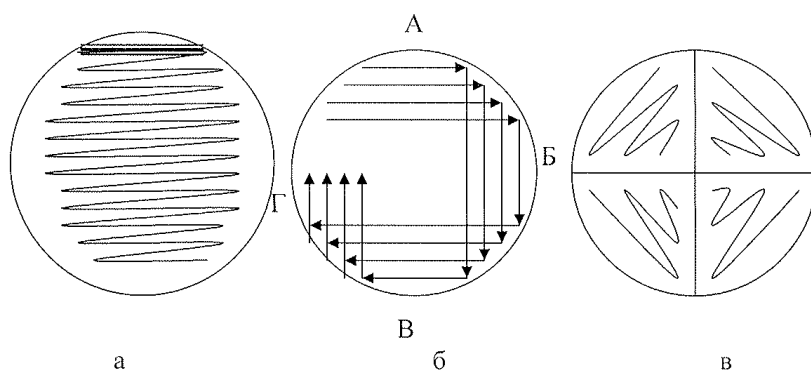


Рисунок 41 – Техника посева микробиологической петлей

При посеве шпателем на поверхность агаровой среды наносят платиновой петлей одну небольшую каплю исследуемого материала. Затем прокаленным и остуженным шпателем растирают эту каплю по всей поверхности среды, совершая легкие зигзагообразные движения во все стороны. Этим же шпателем засевают вторую и третью чашки.

При посеве жидких материалов на твердую среду в чашки Петри пипеткой определенный объем исследуемой жидкости (обычно 1 или 0,1 мл) вносят в стерильную чашку. Затем в эту же чашку вливают расплавленный и остуженный до температуры 45 °С мясопептонный агар и плавными движениями чашки на горизонтальной плоскости тщательно перемешивают среду с исследуемой жидкостью. После застывания агара чашку Петри, как обычно, переворачивают вверх дном и ставят в термостат. Выращивание микробов производят 24–48 ч при температуре, оптимальной для изучаемого вида микроорганизмов, чистую культуру которых выделяют.

После посева чашки ставят в термостат вверх дном на 24 ч и по истечении указанного срока рассматривают выросшие колонии микроорганизмов. В первой чашке, куда попало много материала, может получиться сплошной рост, во второй и третьей чашках вырастут единичные изолированные колонии. Каждая микробная клетка, а также спора, попавшая в питательную среду из посевного материала, при застывании среды оказывается закрепленной на одном месте, начинает развиваться и дает колонию. Каждая колония представляет собой обособленное скопление однородных микробов. Чем меньше колоний выросло на чашке и чем изолированнее одна от другой эти колонии, тем успешнее можно впоследствии выделить чистую культуру микроба. Поэтому при посевах желательно брать посевной материал, содержащий как можно меньше микроорганизмов.

Задания к лабораторной работе:

1. Изучите устройство и принцип работы автоклава.
2. Изучите устройство и принцип работы сушильного шкафа.
3. Изучите устройство и принцип работы термостата.
4. Изучите устройство и принцип работы микроскопа. Зарисуйте микроскоп, сделайте обозначения.
5. Осуществите рассев предложенной микробной культуры на плотную питательную среду при помощи микробиологической петли.
6. Проведите микроскопию готового микробного препарата. Освойте приемы работы с иммерсионным объективом микроскопа.
7. Зарисуйте изображение, обнаруженное при микроскопии препарата.
8. Ответьте на вопросы:
 - Какое основное оборудование и для каких целей используют в микробиологической лаборатории?
 - Какая аппаратура используется для стерилизации?
 - Расскажите устройство автоклава.
 - Перечислите основные инструменты и посуду, применяемые в микробиологической лаборатории. В чем их назначение?
 - Из каких частей состоит световой микроскоп?
 - Что относят к механической части микроскопа?
 - Каково назначение макро- и микрометрического винтов? Как ими пользоваться?
 - В чем особенности оптической системы микроскопа, из каких частей она состоит?
 - Что такое сухие и иммерсионные объективы?
 - Какое строение имеет окуляр и в чем его назначение?
 - Опишите устройство конденсора и правила работы с ним.
 - Что означают понятия «увеличительная способность микро- скопа» и «разрешающая способность микроскопа» и как их можно определить?

Перечислите основные правила работы с биологическим микроскопом.

Каков порядок работы при микроскопии препаратов с сухим объективом?

Перечислите правила и порядок работы с иммерсионным объективом.

На чем основан метод фазово-контрастной микроскопии?

Как превратить фазовый (неконтрастный) препарат в контрастный?

Лабораторная работа №3

Питательные среды для микроорганизмов

(4 часа)

Для культивирования микроорганизмов (выращивание в искусственных условиях *in vitro*) необходимы особые субстраты – питательные среды. На средах микроорганизмы осуществляют все жизненные процессы (питаются, дышат, размножаются и т. д.), поэтому их еще называют средами для культивирования. Питательные среды являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет результаты всего исследования. Среда должна создавать оптимальные (наилучшие) условия для жизнедеятельности микробов.

Требования, предъявляемые к питательным средам и их хранению

Среды должны соответствовать следующим требованиям:

1) быть питательными, т.е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. Ими являются источники органических и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. Минеральные вещества не только входят в структуру клетки и активизируют

ферменты, но и определяют физико-химические свойства сред (осмотическое давление, рН и др.). При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят факторы роста – витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать;

Внимание! Микроорганизмы, как все живые существа, нуждаются в большом количестве воды.

2) иметь оптимальную концентрацию водородных ионов – рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (рН 7,2–7,4). Исключение составляют холерный вибрион – его оптимум находится в щелочной зоне (рН 8,5–9,0) и возбудитель туберкулеза, нуждающийся в слабокислой реакции (рН 6,2–6,8).

Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать буферностью, т. е. содержать вещества, нейтрализующие продукты; обмена;

3) быть изотоничными для микробной клетки; т.е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5 %-ному раствору натрия хлорида;

4) быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, рН и др.);

5) плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию;

6) обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, т.е. соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Этот потенциал показывает насыщение среды кислородом. Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других – низкий. Например, анаэробы размножаются при RH_2 не выше 5, а аэробы – при RH_2 не ниже 10. Окислительно-восстановительный

потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов;

7) быть по возможности унифицированным, т.е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов. Так, среды для культивирования большинства патогенных бактерий должны содержать 0,8–1,2 г/л аминного азота NH_2 , т. е. суммарного азота аминогрупп аминокислот и низших полипептидов; 2,5–3,0 г/л общего азота N; 0,5 % хлоридов, в пересчете на натрия хлорид; 1 % пептона.

Желательно, чтобы среды были прозрачными – удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

Разновидности питательных сред и их классификация

Существует множество способов классификации питательных сред для микроорганизмов.

Классификация питательных сред по составу:

1. Простые среды (МПБ, МПА, желатин, пептонная вода). Мясо-пептонный бульон (МПБ) является белковой основой всех сред. Существует несколько способов приготовления МПБ:

а) на мясной воде с добавлением готового пептона (продукт неполного переваривания белка) – это так называемый мясопептонный бульон;

б) на переварах продуктов гидролиза исходного сырья при помощи ферментов (трипсина – бульон Хоттингера, пепсина – бульон Мартена).

Мясо-пептонный агар (МПА) – получают путем добавления к МПБ агар-агара (1,5–3 %). Если МПА распределен по диагонали пробирки или флакона – это скошенный агар. Если среда распределена в пробирке вертикально высотой 5–7 см, это агар столбиком. МПА, застывший в чашках Петри в виде пластинки – пластинчатый агар. Если среда имеет вертикальный слой высотой 2–3 см,

и диагональный слой такой же величины, это полускошенный агар.

2. Сложные среды готовятся на основе простых с определенными добавками (углеводы, кровь, желчь, яйца, сыворотка, молоко, соли, факторы роста и т.п.)

Классификация питательных сред по исходным компонентам:

1. Естественные питательные среды – это натуральный продукт животного или растительного происхождения. Могут быть: растительные (исходные продукты – соя, горох, картофель, морковь и т.п.); животные (исходные продукты – мясо, рыба, яйца, молоко, животные ткани, желчь, сыворотка крови и т.п.; смешанные (МПА, среда Левенштейна-Йенсена и т.п.).

2. Искусственные среды содержат переработанные естественные продукты (мясную воду, перевар), вещества, полученные из этих продуктов (пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты) и различные добавки. Это самая большая и разнообразная по составу наиболее часто применяемая группа сред. Их готовят по определенным рецептам из различных настоев или отваров животного или растительного происхождения с добавлением неорганических солей, углеводов и азотистых веществ.

3. Синтетические среды (известного химического состава) состоят из химически чистых соединений в точно установленных концентрациях (с добавлением углеводов, солей, аминокислот, витаминов и т.п.). На основе этих сред, добавляя к ним естественные или искусственные среды получают полусинтетические среды.

Классификация питательных сред по консистенции:

1. Жидкие (среды без агара) применяют для изучения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы и продуктов обмена.

2. Полужидкие (с агаром до 1 %) обычно используют для хранения культур.

3. Плотные (агаровые – 1,5–3,0 %) применяют для выделения микроорганизмов, изучения морфологии колоний, диагностических целей, количественного учета, определения антагонистических свойств и др.

Классификация питательных сред по целевому назначению:

1. Универсальные (основные) среды. Эти среды используют для культивирования большинства относительно неприхотливых микроорганизмов или применяют в качестве основы для приготовления специальных сред, добавляя к ним кровь, сахар, молоко, сыворотку и другие ингредиенты, необходимые для размножения того или иного вида микроорганизмов. К этой группе относятся: МПБ – мясо-пептонный бульон, МПА – мясо-пептонный агар, МПЖ – мясо-пептонный желатин и т.п.

2. Специальные среды предназначены для выделения и избирательного культивирования определенных видов микроорганизмов, которые не растут на простых средах. Различают следующие виды специальных сред: среды обогащения, элективные, дифференциально-диагностические, консервирующие и среды накопления.

а) Среда обогащения. Многие микроорганизмы не растут на обычных средах, поэтому для повышения питательной ценности среды в нее добавляют углеводы (сахарный бульон или агар) или белки (сывороточный агар и бульон, кровяной агар и бульон). Кровяной агар или кровяной бульон – получают путем добавления к питательной среде 5-10 % подогретой стерильной дефибринированной крови барана, кролика лошади, человека. Среда используется для выделения стрептококков, пневмококков и других бактерий, а также для изучения гемолитической активности.

Сывороточный бульон или сывороточный агар получают, путем добавления к простым средам 15-20 % лошадиной или бычьей сыворотки. Среда применяется для выделения пневмококков, менингококков.

б) Элективные (избирательные) среды. Эти среды предназначены для избирательного выделения и накопления микроорганизмов определенного вида из материала, содержащего несколько видов микробов. При посеве на них материала, содержащего смесь различных микроорганизмов, раньше всего будет проявляться рост того вида, для которого данная среда будет элективной. Избирательность среды достигается путем создания условий, оптимальных для культивирования определенных микробов (рН, Eh, концентрация солей, состав питательных веществ), т.е. положительной селекцией. Или путем добавления в среду веществ, угнетающих другие микроорганизмы (желчь, высокие концентрации NaCl, антибиотики и др.), т.е. отрицательной селекцией. Например, селенитовая среда является лучшей средой обогащения для сальмонелл и дизентерийных микробов Зонне. Селенит натрия, содержащийся в среде, стимулирует рост этих бактерий и подавляет рост сопутствующей флоры. Висмут-сульфит агар содержит соли висмута, бриллиантовую зелень. Сальмонеллы растут на этой среде в виде колоний черного цвета. Другие виды бактерий на этой среде роста не дают. Желточно-солевой агар (ЖСА) – среда для выделения стафилококков, содержит до 10 % хлорида натрия, что подавляет большинство бактерий, содержащихся в материале. Кроме того, эта среда является и дифференциально-диагностической, так как присутствие яичного желтка позволяет выявить фермент лецитиназу (лецитовителлазу), который образуют патогенные стафилококки. Лецитиназа расщепляет лецитин на фосфорхолины и нерастворимые в воде жирные кислоты,

поэтому среда вокруг лецитиназоположительных колоний мутнеет и появляется опалесцирующая зона в виде «радужного венчика». Желчный бульон элективен для сальмонелл, размножение которых стимулирует добавленная 10 %-я желчь, одновременно тормозящая рост сопутствующих микроорганизмов. Щелочной агар или щелочная пептонная вода элективны для холерных вибрионов, щелочная реакция среды (рН 9,0) не препятствует росту холерных вибрионов, но тормозит рост других микроорганизмов.

в) Дифференциально-диагностические среды применяют для изучения биохимических свойств и отличия (дифференцировки) одного вида микроорганизмов от другого по характеру их ферментативной активности. Состав этих сред подбирают с таким расчетом, чтобы четко выявить наиболее характерные свойства определенного вида микроорганизмов, основываясь на особенностях его обмена веществ. Дифференцирующие свойства данных сред создаются внесением субстрата, к которому определяется отношение микробов, их ферментативной активности и действие токсинов (среды Гисса, среды Эндо, Левина, Плоскирева, Олькеницкого, висмут-сульфит агар и т.п.).

г) Среды накопления, на которых происходит быстрый рост определенных видов микроорганизмов.

д) Консервирующие среды предназначены для сохранения микроорганизмов во время транспортировки к месту исследований. Эти среды, содержат добавки, предупреждающие размножение и гибель микробов, что способствует сохранению их жизнеспособности. Наибольшее применение нашли глицериновая смесь (среда Тига), гипертонический раствор, фосфатно-буферная смесь.

Стерилизация питательных сред

Все питательные среды независимо от их назначения разливают в чистую посуду и стерилизуют. Большинство сред стерилизуют автоклавированием, но при различных режимах в зависимости от их состава.

1. Синтетические среды и все агаровые среды, не содержащие в своем составе нативного белка и углеводов, стерилизуют 15–20 мин в автоклаве при температуре 115–120 °С и давлении 1–1,5 атмосферы.

2. Среда с углеводами и молоком (в состав которого входит лактоза), питательный желатин стерилизуют текучим паром при температуре 100 °С дробно или в автоклаве при 112 °С и давлении до 1 атмосферы.

3. Среда, в состав которых входят белковые вещества (сыворотка крови, асцитическая жидкость), обеспложиваются тиндализацией или фильтрованием.

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

Для контроля стерильности среды после стерилизации помещают в термостат при 37 °С на 3–5 сут. Жидкие среды должны оставаться прозрачными, а на поверхности и в толще плотных питательных сред не должны появляться признаки роста. Кроме контроля стерильности, производят химический контроль готовых сред, который заключается в том, что в нескольких образцах каждой серии определяют рН, количество общего и аминного азота и хлоридов.

Существует также биологический контроль сред. В этом случае несколько образцов среды засевают лабораторной культурой того микроба, для которого приготовлена среда, и изучают характер его роста. Только после того, как среды выдержали контроль, их можно использовать по назначению.

Приготовление сред

Посуда для приготовления сред не должна содержать посторонних веществ, например щелочей, выделяемых некоторыми сортами стекла, или окислов железа, которые могут попасть в среду при варке ее в ржавых кастрюлях. Лучше всего пользоваться стеклянной, эмалированной или алюминиевой посудой. Внимание! Посудой, предназначенной для приготовления сред, нельзя пользоваться в других целях, например для хранения химических реактивов или дезинфицирующих растворов – даже следы этих веществ могут помешать росту микроорганизмов.

Этапы приготовления сред: 1) варка; 2) установление оптимальной величины pH; 3) осветление; 4) фильтрация; 5) разлив; 6) стерилизация; 7) контроль.

Варят среды на открытом огне, водяной бане, в автоклаве или варочных котлах, подогреваемых паром.

Установление pH сред ориентировочно производят с помощью индикаторных бумажек.

Фильтрацию жидких и расплавленных желатиновых сред производят через влажный бумажный или через матерчатые фильтры. Фильтрацию агаровых сред можно заменить отстаиванием. Разливают среды в пробирки (по 3–5 мл или по 10 мл), флаконы, колбы, матрацы и бутылки не более чем на $\frac{2}{3}$ емкости, так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность. Среды, которые стерилизуют при температуре выше 100 °С, разливают в чистую сухую посуду. Среды, стерилизуемые при более низкой температуре, обязательно разливают в стерильную посуду. Посуду со средой обычно закрывают ватно-марлевыми пробками, поверх которых надевают бумажные колпачки. Важно, чтобы при разливе среда не смачивала края посуды, иначе к ним могут прилипнуть

пробки. К каждому сосуду обязательно прикрепляют этикетку с названием среды и датой ее приготовления.

При необходимости готовые застывшие среды во флаконах расплавляют на кипящей водяной бане. Сосуд со средой следует погружать в баню так, чтобы уровни среды и воды совпадали, или уровень среды был чуть ниже уровня воды в бане. Затем среде дают несколько остыть – до 50–60 °С и разливают ее в стерильные чашки Петри, установив их на горизонтальной поверхности. Техника розлива среды в чашки Петри следующая (рис. 42). Над пламенем горелки, слегка наклоняя сосуд, содержащий расплавленный агар, вынимают пробку и края сосуда обжигают. Лево́й рукой приподнимают с одной стороны крышку чашки и, вводя в образовавшийся просвет открытый конец сосуда со средой, выливают среду в чашку.



Рисунок 42 – Розлив питательной среды в чашки Петри

Совсем открывать чашку Петри нельзя. Ее лишь слегка приоткрывают, с одной стороны. Это предохраняет среду от оседания в нее микробов из воздуха. Опустив крышку и наклоняя чашку в разные стороны, распределяют налитый в нее агар ровным слоем по всему дну. Когда агар застынет, чашки ставят в термостат вверх дном для подсушивания

и удаления конденсационной воды. Посев на агаровые среды в чашки Петри производится штрихом при помощи платиновой петли или стеклянным шпателем.

Хранят среды при комнатной температуре в шкафах, желательно специально для них предназначенных. Некоторые среды, например, среды с кровью и витаминами, хранят в холодильнике.

Задания к лабораторной работе:

1. Составьте схему «Питательные среды».
2. Приготовьте из сухих порошков среды Эндо, ЭМС, Плоскирева, разлейте во флаконы и пробирки; простерилизуйте и разлейте их в чашки Петри.

3. Приготовьте скошенный агар.

4. Ответьте на вопросы:

Каким требованиям должны удовлетворять питательные среды?

Как классифицируют среды по исходным компонентам?

Какие вещества служат для уплотнения сред?

Какие среды являются простыми или общеупотребительными и для чего их применяют?

Какие среды называют сложными, что служит их основой?

Какие среды позволяют получить преимущественный рост одних микробов при одновременном подавлении других?

На каких средах изучают ферментативную активность микробов?

Каким должен быть рН сред для культивирования большинства патогенных микробов перед стерилизацией и почему?

При какой температуре плавятся и застывают агаровые среды?

Как должна быть подготовлена посуда, в которую разливают среды с углеводами и белками?

Лабораторная работа №4
Стерилизация и дезинфекция
(4 часа)
Физические и химические способы
стерилизации и дезинфекции

К противомикробным мероприятиям, оказывающим прямое повреждающее действие на микробы, относят стерилизацию, дезинфекцию, антисептику и химиотерапию.

Стерилизация – совокупность физических и химических способов полного освобождения объектов внешней среды от вегетативных и покоящихся (споровых) форм патогенных, условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов.

Цель стерилизации: предупреждение заноса микроорганизмов в организм человека при медицинских вмешательствах; создание и поддержание асептической и безмикробной (гнотобиотической) среды; исключение микробного обсеменения питательных сред, культур клеток, реагентов при микробиологических исследованиях; предупреждение микробиологической биodeградации (разрушения) лекарственных, диагностических, продовольственных и других материалов.

Стерилизации подвергают медицинский инструментарий и аппаратуру, лекарственные и диагностические препараты, перевязочный и шовный материал, белье, предметы ухода за больными, питательные среды, лабораторную посуду.

Процесс стерилизации объектов состоит из следующих этапов: дезинфекция; очистка; сборка, группировка

и размещение в стерилизаторе; собственно стерилизация; сушка; контроль за стерилизацией; хранение стерилизованных материалов.

Самый надежный способ стерилизации – автоклавирование. Стерилизующее действие автоклава обусловлено контактом насыщенного пара под давлением с более холодными объектами, что приводит к конденсации пара в воду и сопровождается выделением тепла, повышающего температуру стерилизуемого объекта. Но обезвоживания при этом не происходит.

В зависимости от стерилизуемых материалов температура насыщенного пара устанавливается от 110 °С до 138 °С, давление от 0,4 до 2,5 атмосфер, экспозиция от 30 до 60 минут. Простые питательные среды, физиологический раствор, дистиллированную воду, текстильные изделия в свертках стерилизуют при режиме 1 атмосфера (121 °С) 15–30 минут. Чувствительные к температуре материалы стерилизуют при более низком давлении (0,4-0,5 атм.).

Сухой жар в 170 °С и экспозиции в 60 минут высокоэффективен как стерилизующий агент, но обладает разрушающим действием на объект. Этим способом стерилизуют предметы, плохо проницаемые для пара и не изменяющие свойств под действием высокой температуры (стекло, смазки, гидрофобные вещества). При температуре 180° происходит возгонка жирных кислот и смолистых веществ из ваты и обугливание бумаги, поэтому более 180 °С температуру повышать нельзя.

Термолабильные материалы (главным образом жидкие) стерилизуют 3-4-кратным (дробным) прогреванием текучим паром при 100 °С по 1 часу с перерывом 1 сутки, в течение которых материал находится в термостате (37 °С) для прорастания спор.

Дробная стерилизация (тиндализация) при 56–70 °С по 1 часу в течение 5 дней используется для сред или лекарственных форм с белками, витаминами. При

невозможности температурной стерилизации используют фильтрование через антибактериальные фильтры. Для стерилизации воздуха в операционных, боксах и т.д. используют УФ-лучи.

Крупногабаритные изделия, предметы из термолабильных разнородных материалов стерилизуют в герметических контейнерах парами формальдегида или этиленоксида, а также растворами формалинизопропана при экспозиции 6-24 часа (химическая стерилизация).

В заводских условиях медицинские изделия (в основном одноразовые) часто стерилизуют γ -лучами 0,2–4,5 Мрад (лучевая стерилизация). Необходимо отметить, что микробицидные дозы γ -излучения очень высоки, что приводит к быстрому разрушению объекта и требует создания сложных систем защиты персонала от радиации. Эффективность стерилизации проверяют бактериологическим посевом.

Кипячение является наиболее простым и легкодоступным методом стерилизации, пригодным для устранения вегетативной формы микробов. Для уничтожения спороносной микрофлоры оно не件годно.

Стерилизация прокаливанием. Бактериологические петли, сделанные из платиновой или нихромной проволоки, стерилизуют в пламени спиртовой или газовой горелки. Такой способ получил название прокалывания или фламбирования.

Дезинфекция – это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение определенного вида патогенного или условно-патогенного микроорганизма в объектах внешней среды с помощью химических антисептиков, физических, биологических воздействий.

Химические антисептики (дезинфицирующие вещества) применяют в определенной концентрации с таким расчетом, чтобы они действовали на определенный вид микроба за определенное время.

Основная цель дезинфекции – прервать звенья эпидемиологической цепи, то есть оказать воздействие в момент нахождения микроба во внешней среде при его транспортировке от больного к здоровому организму.

Дезинфекция бывает заключительная, текущая, профилактическая.

Заключительная дезинфекция проводится в очагах инфекционных заболеваний. Цель заключительной дезинфекции – обезвредить микроорганизм после госпитализации больного, то есть прервать пути передачи инфекции здоровым людям, уничтожить возбудителя во всех объектах и во всех местах, куда они могли попасть во время пребывания больного на дому.

Текущая дезинфекция проводится, когда больной остается в очаге на какой-то период времени.

В больницах ежедневно проводится профилактическая дезинфекция, цель которой – резкое снижение численности популяции всех потенциально патогенных для человека микробов на всех объектах помещения.

Наиболее достоверный контроль за проведенной дезинфекцией – бактериологический. Выпускаются бактериологические тесты (кишечной палочки, стафилококка, антракоида) в специальной упаковке, их помещают в объекты, которые подвергают обработке, а далее из тестов делают посев на стерильность.

Антисептика – совокупность способов подавления роста и размножения условно-патогенных для человека микробов на интактных или поврежденных (раневых) поверхностях кожи, слизистых оболочках и в полостях. С целью антисептики используют химические и биологические антисептики (бактериофаги и препараты из бактерий-антагонистов); физические и механические факторы (хирургическая обработка, промывание, дренирование, сорбция).

Антисептики не должны обладать общетоксическим, органотропным, аллергическим, мутагенным, онкогенным,

тератогенным и раздражающим действием; антисептики должны обладать высокой противомикробной активностью, т.е. подавлять жизнедеятельность микроорганизмов в малых количествах; хорошо переноситься кожей и слизистыми оболочками; хорошо растворяться в липидах и плохо или умеренно – в воде, что препятствует их всасыванию во внутреннюю среду организма и способствует аккумуляции в коже; они должны локализовать инфекцию в ране и предупреждать его проникновение в лимфу и кровь; предупреждать адгезию микроорганизма, т.е. прилипание к тканям раневого ложа; подавлять факторы патогенности микробов; усиливать действие антибиотиков и различных физических факторов (например, ультразвука).

Антисептики относят к следующим классам химических веществ:

- поверхностно-активные вещества (ПАВ) – детергенты (анионного и катионного типа);
- галогены (препараты хлора, брома, йода);
- окислители (H_2O_2 , $KMnO_4$);
- соли тяжелых металлов (Mg, Hg, Cu);
- альдегиды (формальдегид);
- фенол, крезол и их производные;
- спирты (этиловый спирт);
- красители (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий);
- производные нитрофурана (фурациллин);
- производные хинолина (хинозол);
- фитонциды;
- антибиотики (грамицидин, неомицин);
- кислоты (бензойная, салициловая, борная);
- щелочи;
- высшие жирные кислоты.

По механизму действия различают: деструктивные антисептики – вызывают деструкцию белков и липидов ЦПМ

(спирты, фенолы, галогены, соли тяжелых металлов); окислители (H_2O_2 , KMnO_4). Так, H_2O_2 в тканях быстро распадается под влиянием тканевой каталазы на H_2O и O_2 , высвобождающиеся свободные радикалы оказывают бактерицидный эффект. В инфицированных тканях этот процесс усиливается. Мембраноатакующие антисептики (ПАВ) изменяют проницаемость клеточных мембран; антиметаболиты и антиферментные препараты блокируют ферментные системы микроорганизмов (например, 8-оксихинолин инактивирует металлосодержащие ферменты).

Перед применением антисептика выделяют возбудитель и проверяют чувствительность к препарату. Многие микроорганизмы могут выживать и размножаться в антисептиках. Например, *P. aeruginosa* может размножаться в ПАВ, так как микробы используют эти вещества в качестве источника углерода и энергии.

Асептика – это комплекс противомикробных мероприятий, направленных на предотвращение (предупреждение) попадания на объект, в полость, рану различных микробов, в том числе и патогенных. В комплекс асептических мероприятий входят различные методы стерилизации, механическая и химическая очистка, дезинфекция, герметизация, изоляция (кювез для новорожденных, бокс). Эти методы применяют при хирургических операциях, приеме родов, парентеральном введении лекарств, приготовлении стерильных лекарственных форм, стерилизации питательных сред.

В микробиологической практике асептика включает: забор материала для исследования стерильным инструментом и в стерильную посуду в условиях, исключающих микробную контаминацию посторонней микрофлорой; предупреждение контаминации материала во время его доставки в лабораторию; использование стерильных петель, пипеток, питательных сред, посуды; предупреждение контаминации микробных культур микрофлорой рук, волос, одежды

работника; работу в стерильных боксах, ламинарном потоке стерильного воздуха, в зоне пламени спиртовки.

Несоблюдение указанных мер приводит к неправильному заключению о виде выделенной культуры и ее свойствах, ошибочному диагнозу и неадекватным мерам терапии и профилактики.

Контроль качества стерилизации

Контроль стерилизации включает контроль работы стерилизаторов, проверку значений параметров режимов стерилизации и оценку ее эффективности. Контроль работы стерилизаторов проводят: физическим (с использованием контрольно-измерительных приборов), химическим (с использованием химических индикаторов) и бактериологическим (с использованием биологических индикаторов) методами.

Бактериологический метод контроля предназначен для контроля эффективности работы стерилизаторов на основании выявления гибели спор тест-культур. Бактериологический метод контроля работы стерилизаторов осуществляют с помощью биотестов. Биотест представляет собой дозированное количество тест-культуры на носителе (или в нем), помещенном в упаковку. Упаковка предназначена для сохранения целостности носителя со спорами и предупреждения вторичного обсеменения после стерилизации. Биотесты для контроля работы паровых стерилизаторов представляют собой стеклянные флаконы или чашечки из алюминиевой фольги, содержащие высушенные споры тест-культуры *Bacillus stearothermophilus* ВКМ В-718. Биотесты для контроля работы воздушных стерилизаторов представляют собой упакованные носители, содержащие высушенные споры тест-культуры *Bacillus licheniformis* штамм G. Упакованные биотесты нумеруют и размещают в контрольные точки паровых и воздушных стерилизаторов.

По окончании стерилизации биотесты вынимают из стерилизатора, с соблюдением правил асептических условий биотесты вынимают из упаковки. Во флаконы вносят 1 мл питательной среды и закрывают стерильными резиновыми пробками с целью предупреждения высыхания питательной среды (в случае отсутствия резиновых пробок во флаконы вносят 5 мл питательной среды и закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками), диски из фильтровальной бумаги и чашечки из фольги пинцетом, который обжигают в пламени, помещают в бактериологические пробирки с 5 мл питательной среды. Учет результатов бактериологического контроля проводят путем ежедневного визуального осмотра всех биотестов с питательной средой.

Бактериологический контроль осуществляется при помощи эталонных культур микроорганизмов.

Для контроля стерильности инструментов и материалов используют следующие питательные среды: сахарный бульон Хоттингера (0,5 и 1% глюкозы); тиогликолевую среду; бульон Сабуро. Обязателен посев изделий на 3 вышеуказанные среды. При посеве изделия или его части непосредственно в питательную среду количество среды в пробирке (колбе, флаконе и т.д.) должно быть достаточным для полного погружения изделия или его части.

Посевы в бульон Хоттингера и тиогликолевую среду выдерживают в термостате при температуре 30–35 °С, среду Сабуро – при температуре 20–25 °С.

Посевы инкубируют в термостате в течение 14 суток.

Посев исследуемого материала рекомендуется проводить в боксах с ламинарным потоком воздуха. Эти боксы размещают в отдельных помещениях бактериологической лаборатории. При отсутствии боксов с ламинарным потоком воздуха контроль стерильности проводят в боксированных помещениях (бокс с предбоксником).

В процессе посева в боксе регулярно проверяют обсемененность воздуха. Для этого на рабочий стол ставят 2

чашки с МПА, открывая их на 15 минут, затем чашки помещают в термостат при температуре $(37+1)^\circ\text{C}$ на 48 часов. Допускается рост не более трех колоний неспорообразующих сапрофитов; в случае роста на чашках более 3 колоний проведение дальнейших работ в данном боксе запрещается, в нем дополнительно проводят тщательную обработку дезинфицирующим средством.

Контроль стерильности изделий медицинского назначения проводят путем их погружения в питательные среды. В исключительных случаях, когда необходимо проверить стерильность инструмента больших размеров, пробы готовят методом смыва, стерильной марлевой салфеткой размером $5 \times 5 \text{ см}^2$, предварительно увлажненной стерильным физиологическим раствором или стерильной дистиллированной водой.

Хирургический инструментарий для оценки стерильности с помощью стерильного пинцета извлекают из бикса или мягкой упаковки и целиком погружают в пробирки с питательными средами. В случаях, если стерилизованные инструменты, находящиеся в одной упаковке, крупных размеров (иглодержатели, ранорасширители и т.д.), производят смыв с поверхности инструмента стерильной салфеткой, смоченной в стерильном физиологическом растворе или стерильной водопроводной воде, и погружают салфетку в пробирку с тиогликолевой средой. Аналогичные смывы с других инструментов засевают в пробирки со средой Хоттингера и Сабуро;

Для контроля на стерильность игл и шприцев отбирают шприцы малой емкости (1,0 или 2,0 мл) в условиях бактериологического бокса, с соблюдением правил асептики погружают в пробирки с питательными средами (отдельно цилиндр, поршень, иглы); при необходимости контроля стерильности шприцев большой емкости (10, 20 мл и более) исследование производят методом смыва, при этом стерильной салфеткой, смоченной в стерильных

физиологическом растворе или водопроводной воде, протирают с помощью пинцета внутренние части шприца и погружают салфетку в питательную среду.

Контроль стерильности зондов, катетеров, резиновых перчаток и других изделий из резины производят путем полного погружения мелких изделий в питательные среды, от более крупных, с помощью стерильного пинцета, стерильными ножницами отрезают небольшие кусочки (1-2 см) и погружают в питательные среды; посев на стерильность хирургического шовного материала – его перекладывают стерильным корнцангом или пинцетом в стерильный 10 % раствор гипосульфита натрия. Раствор гипосульфита натрия готовят на дистиллированной воде, разливают в пробирки (колбы) по 20-30 мл, стерилизуют при 120 °С 30 минут. Кетгут выдерживают в растворе гипосульфита в течение 24 часов при комнатной температуре (возможно помутнение раствора за счет выпадения серы), затем перекладывают в пробирки с 20-30 мл стерильной дистиллированной воды, где также выдерживают в течение 24 часов при комнатной температуре. Непосредственно перед посевом моток кетгута извлекают стерильным пинцетом и перекладывают в стерильную чашку Петри, с помощью пинцета и ножниц его разрезают на мелкие кусочки длиной 1-2 см и разъединяют для прорастания микроорганизмов внутри кетгута; посев производят в 2 пробирки с тиогликолевой средой, 2 пробирки со средой Сабуро и 2 пробирки со средой Хоттингера, помещая в каждую пробирку по 4-5 отрезков исследуемого материала; шелк (лавсан) перед посевом помещают на 24 часа в стерильную дистиллированную воду при комнатной температуре. Перед посевом моток шелка (лавсана) перекладывают в стерильные чашки Петри, разрезают на отрезки длиной 1-2 см. Посев шелка производят так же, как и кетгута.

Бинты, ватные шарики, марлевые салфетки, турунды и т.п. отбирают из разных мест бикса стерильным пинцетом.

Мелкие изделия целиком погружают в пробирки с питательными средами. От бинтов (внутренних частей) и крупных марлевых салфеток, с помощью стерильных ножниц, отрезают кусочки и погружают в пробирки с питательными средами. На каждый вид перевязочного материала используют по 2 пробирки каждой среды;

Учет результатов: материал стерилен при отсутствии роста во всех посевах, материал не стерилен при выявлении роста микрофлоры.

Способы утилизации микробных культур

Пробирки, чашки Петри с отработанным материалом сдают в стерилизационную для обеззараживания насыщенным паром при 126 °С под давлением 1,5 кгс/см² в течение 60 мин для неспорообразующих форм микроорганизмов и при 132 °С, давлении 2 кгс/см² в течение 90 мин для уничтожения споровых культур (СП 1.2.731-99).

Для предупреждения инфицирования окружающей среды перенос инфицированного материала (посуды и культур) для обеззараживания осуществляется в закрывающихся емкостях.

Все перечисленные мероприятия, не относящиеся непосредственно к основным микробиологическим операциям, но постоянно сопутствующие им и определяющие чистоту микробиологического исследования, а следовательно, и его достоверность, составляют комплекс мероприятий текущей дезинфекции, необходимый для микробиологических лабораторий.

Микробиологическая безопасность

Классификация инфекционных микроорганизмов по группе риска (ВОЗ)

- Группа риска 1 – не вызывают видимых, угрожающих для жизни болезней человека и животных. Низкая или отсутствует индивидуальная и общественная опасность.

- Группа риска 2 – патогены, вызывающие болезни человека и животных, но не являющиеся серьезной угрозой для лабораторных работников, населения, животноводства или окружающей среды. Лабораторный контакт может вызвать серьезную инфекцию, но эффективное лечение и превентивные меры, в том числе почти всегда вакцины, доступны, и поэтому риск распространения инфекции предельно ограничен. Умеренная индивидуальная и низкая общественная опасность.

- Группа риска 3 – патогены, вызывающие серьезные заболевания человека, но не передающиеся легко от одной особи к другой. Эффективное лечение и превентивные меры, включая вакцины – доступны. Высокая индивидуальная и низкая общественная опасность.

- Группа риска 4 – опасные патогены, обычно вызывающие серьезное заболевание людей или животных, с большой смертностью и/или большим эпидемическим потенциалом (легко передаются от одной особи к другой), как правило, не защищаемые вакцинами и без средств эффективной терапии.

Высокие индивидуальная и общественная опасность. ВОЗ в настоящее время не дает распределения патогенов по группам опасности, но дает принципы и рекомендации по этой проблеме. На их основе страны и регионы должны разработать национальные или региональные классификации микроорганизмов по группам риска, принимая во внимание:

1. Патогенность микроорганизма.

2. Способ его передачи и спектр хозяев в данной стране\регионе; существующий уровень иммунизации населения против этого патогена, плотность и интенсивность передвижения локального населения, наличие в природе специфических переносчиков и носителей, наличие и уровень в стране стандартов гигиены окружающей среды.

3. Локальная доступность эффективных протективных мер (иммунизация, вакцинация, пассивная иммунизация,

санитарные меры, контроль животных-резервуаров и переносчиков- членистоногих).

4. Локальная доступность эффективного лечения, включающего пассивную иммунизацию, вакцинацию сразу после заражения, и использования средств терапии, а также принимая во внимание вероятность появления MDR-штаммов.

Наиболее распространенные источники возможного заражения в биологической лаборатории:

- Прямой контакт с культурами микробов.
- Манипуляции с живыми микробами.
- Контакт с зараженными животными (опасности: укусы, царапины, манипуляции, вскрытие).
- Загрязненное оборудование (обращаются как с «чистым»).
- Поддержание порядка/уборка.

Задания к лабораторной работе:

1. Организуйте контроль эффективности лабораторного автоклава при помощи эталонных культур.

2. Проведите манипуляции по контролю стерильности шовного материала, полученного из Научно-образовательного центра ветеринарной медицины университета.

3. Ответьте на вопросы:

Перечислите этапы предстерилизационной обработки инструментария. Контроль качества предстерилизационной обработки.

Подготовка бикса к стерилизации. Контроль стерильности. Документация контроля стерильности.

Паровой и воздушный способы стерилизации, режимы.

Стерилизация растворами химических средств.

Виды упаковочного материала.

Контроль качества стерилизации.

Лабораторная работа №5

Морфология микроорганизмов

(4 часа)

Приготовление препарата для микроскопии

Для просмотра микроорганизмов в оптических микроскопах готовят препараты живых и фиксированных (убитых) клеток. Препараты готовят на предметных стеклах толщиной не более 1,2–1,4 мм. Более толстые стекла нарушают фокусировку конденсора и снижают четкость изображения. Покровные стекла имеют толщину 0,15–0,17 мм. Покровные стекла с большей толщиной ухудшают качество изображения. Предметные и покровные стекла должны быть чистыми и тщательно обезжиренными, что особенно важно при приготовлении фиксированных препаратов. Для проверки чистоты на поверхность стекла наносится капля воды, она должна равномерно расплываться по стеклу. Наиболее надежный способ обезжиривания – обработка стекол хромовой смесью с последующим ополаскиванием водой и спиртом. В повседневной работе для удаления жира предметные стекла натирают кусочком сухого мыла, после чего вытирают чистой хлопчатобумажной салфеткой. Хранят чистые предметные стекла в жидкости Никифорова (спиртово-эфирная смесь 1:1). Покровные стекла также должны быть хорошо вымыты, и высушены.

Препараты живых клеток

Микроорганизмы в живом состоянии рассматривают в препаратах «раздавленная капля», «висячая капля» и «отпечаток», применяя сухие системы объективов микроскопа.

Препарат «раздавленная капля» используется для установления формы клеток микроорганизмов, их размеров и взаимного расположения, способа спорообразования.

Препарат «висячая капля» используется для выявления подвижности микроорганизмов, для наблюдения за размножением, образованием, прорастанием спор и выявления воздействия химических веществ на жизнедеятельность микроорганизмов.

Для длительных наблюдений используют стерильные предметные и покровные стекла, а суспензию микроорганизмов готовят на питательной среде. Препарат отпечаток готовят для изучения естественного расположения в колонии микробных клеток.

Окрашивание живых клеток

Для выявления некоторых функциональных особенностей и дифференциации включений живых клеток применяют прижизненную окраску микроорганизмов. Ввиду токсичности красителей живые клетки окрашивают нейтральным красным, нейтральным фиолетовым, метиленовым синим, фуксином и др. в очень небольших концентрациях (0,001–0,0001 %). При приготовлении препарата «раздавленная капля» на предметном стекле каплю исследуемых микроорганизмов смешивают с каплей красителя, накрывают покровным стеклом и через 3 минуты микроскопируют.

Приготовление препарата «раздавленная капля»

На сухое, обезжиренное стекло наносят небольшую каплю воды, бульона или физиологического раствора (0,9 %-ный раствор NaCl). В нее вносят петлей культуру,

отобранную с плотной среды или другой исследуемый материал (дрожжи, диффузионный сок), размешивают до получения слабо мутной суспензии. Покровное стекло ставят на ребро у края капли с микроорганизмами и постепенно опускают, стараясь, чтобы между стеклами не образовались пузырьки воздуха, мешающие микроскопированию. Стеклянным концом бактериологической петли прижимают покровное стекло к предметному. Излишек жидкости, выступающий за края покровного стекла, удаляют полоской фильтровальной бумаги. Приготовленный препарат сразу же исследуют, так как жидкость высыхает, что затрудняет микроскопирование.

Приготовление препарата «висячая капля»

Для приготовления препарата используют предметные стекла с круглым отшлифованным углублением – лункой. Края лунки смазывают вазелином. На середину обезжиренного покровного стекла наносят маленькую каплю суспензии микроорганизмов, переворачивают его каплей вниз и осторожно прижимают к вазелиновому кольцу. Капля должна располагаться в центре лунки, не касаться ее краев и дна. В таком препарате капля подвешена к внутренней поверхности покровного стекла и находится в герметически закрытой камере. Это позволяет ее изучать в течение нескольких дней, наблюдать рост и размножение микроорганизмов.

Приготовление препарата «отпечаток»

Из агаризованной среды, на которой растут микроорганизмы, скальпелем вырезают кубик и переносят его на предметное стекло вверх той поверхностью, где растут микроорганизмы. Затем на эту поверхность накладывают

покрывное стекло, слегка надавливают на него пинцетом и снимают. После этого покрывное стекло отпечатком вниз помещают на предметное стекло в каплю воды или метиленового синего (1:40).

Препараты фиксированных клеток

Фиксированные окрашенные препараты используются для выявления ряда морфологических особенностей, количественного учета микроорганизмов, а также для проверки чистоты культуры. Эти препараты удобны и тем, что могут храниться долгое время. Приготовление фиксированных препаратов состоит из следующих этапов: приготовление мазка, высушивание, фиксация.

Приготовление мазка. Последовательность действий показана на рис. 43.

На обезжиренное предметное стекло наносят исследуемый материал, как для препарата – раздавленная капля, и равномерно распределяют его петлей или краем другого пришлифованного предметного стекла на площадь 1-2 см² в виде тонкого ровного слоя.

Высушивание мазка. Препарат сушат при комнатной температуре. Тонкий мазок сохнет очень быстро. Если высушивание протекает медленно, препарат мазком вверх высоко поднимают над пламенем спиртовки и осторожно сушат в теплом восходящем потоке воздуха без перегрева стекла, иначе клетки могут деформироваться.

Фиксация преследует несколько целей: умертвить клетки микроорганизмов и сделать их более безопасными, что особенно важно при работе с патогенными культурами; плотно прикрепить клетки к стеклу и тем самым предохранить препарат от смывания; сделать мазок более восприимчивым к окраске, поскольку мертвые клетки более проницаемы для

красителей. Наиболее распространенный способ фиксации является термическая обработка. Для этого препарат мазком вверх 3-4 раз проводят через наиболее горячую часть пламени спиртовки. Более длительная термическая фиксация может изменить структуру микробных клеток и их форму. Недостаточно хорошо зафиксированный мазок смывается со стекла при последующей обработке. Для исследования тонкого строения клетки используют фиксацию с помощью различных химических веществ. В этом случае фиксирующую жидкость наливают на мазок или же препарат на определенное время погружают в стакан с фиксатором. Наиболее часто применяются следующие химические фиксаторы: этиловый спирт (время фиксации 15–20 мин), метиловый спирт (время фиксации 3–5 мин), смесь равных частей этилового спирта и эфира (время фиксации 15–20 мин). По окончании фиксации препарат отмывают от фиксатора водопроводной водой.

Задания к лабораторной работе:

1. Приготовьте препарат «висячая капля».
2. Приготовьте препарат «отпечаток».
3. Приготовьте нативные микропрепараты из предложенных преподавателем колоний бактериальных клеток (не менее трех).
4. Ответьте на вопросы:
 - Какие морфологические группы бактерий вам известны?
 - Какими методами исследуются нативные препараты бактерий?
 - В чем состоит приготовление препарата «висячая капля»?
 - Как готовится препарат «раздавленная капля»?
 - В чем состоит прижизненная окраска бактерий?

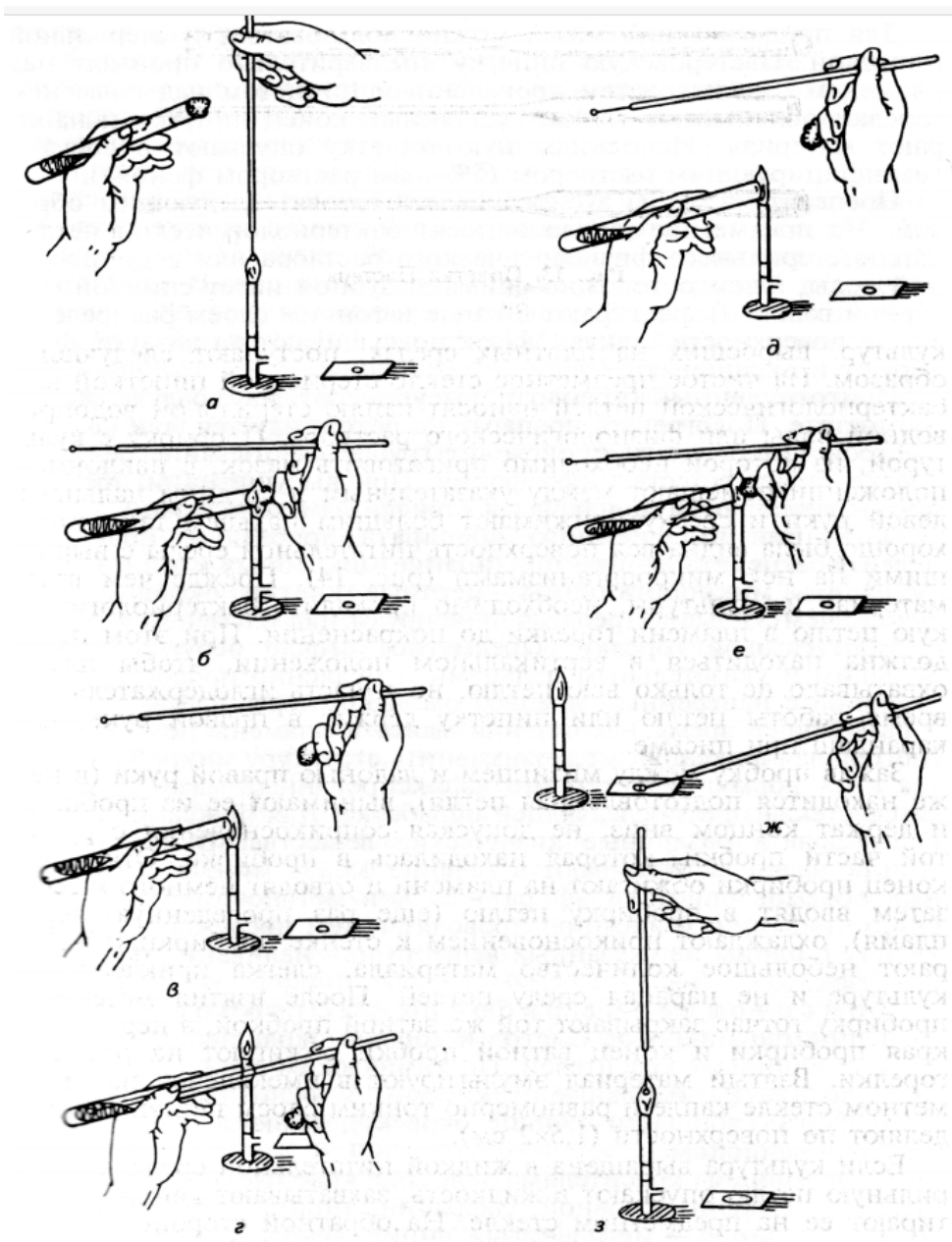


Рисунок 43 – Последовательность (а-з) приготовления мазка

Лабораторная работа №6

Способы окраски микробных препаратов (4 часа)

Методы окраски микроорганизмов

Исследование бактерий в окрашенном препарате дает возможность изучить не только их морфологию, но и позволяет судить о некоторых деталях их химического строения. Это достигается с помощью специальных красок.

Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. У кислых красителей ион, придающий окраску (хромофор), – анион, у основных – катион.

К кислым красителям относятся эозин, кислый фуксин, эритрозин и др. Они интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки.

Основные красители – метиленовый синий, основной фуксин, генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, сафранин – активнее соединяются с ядерными компонентами клетки. Высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетке бактерий делает ее более чувствительной к основным красителям. В микробиологической практике применяются только основные красители.

Интенсивность окрашивающей способности красителя зависит от рН среды: основные красители окрашивают объект тем интенсивнее, чем больше щелочи в среде, кислые – в более кислой. Различают простые и сложные (дифференциальные) способы окраски микроорганизмов.

Простые методы окраски

Простая окраска позволяет обнаружить в микроскопируемом материале микробов, определить их количество, быстро изучить морфологические особенности микроорганизмов. Для этого применяют основные и нейтральные анилиновые красители. Для простой окраски используют только один краситель, чаще всего красного цвета – раствор фуксина (окраска 10–30 сек), фиолетового – генцианвиолет (окраска производится в течение 1-2 мин) или синего – метиленовый синий (окраска 3–5 мин). Препараты для окрашивания готовят на предметных стеклах, толщина которых не должна превышать 1,1–1,4 мм.

При окраске мазков пользуются растворами красок или красящей бумагой, предложенной А.И. Синевым. Для этого на высушенный и фиксированный препарат кладут красящую бумагу размером 2х4 см и наносят несколько капель воды. Продолжительность окрашивания мазка определяется методом окраски. По окончании окраски бумагу снимают пинцетом, мазок промывают водопроводной водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Окраска разведенным фуксином.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) феноловый фуксин Циля;
- 3) вода;
- 4) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 5) спиртовка.

Техника окраски: на приготовленный на предметном стекле, фиксированный на пламени и остывший исследуемый препарат наливают/наносят на фильтровальную бумагу на 10-30 секунд разведенный (1:10) феноловый фуксин Циля. Затем препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Окрашивание метиленовым синим. Способ метахроматического выявления волутиновых зерен у коринебактерий и скоплений нуклеиновых соединений у бактерий.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) водно-спиртовый раствор метиленового синего;
- 3) спиртовка;
- 4) пипетка или фильтровальная бумага с краской;
- 5) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка.

Техника окраски: на приготовленный, высушенный и фиксированный мазок наливают пипеткой водно-спиртовой раствор метиленового синего на 3–5 минут, после чего препарат смывают водой, высушивают и микроскопируют.

Оценка результата. Протоплазма бактерий окрашивается в голубой цвет, волютиновые зерна – в темно-синий.

Окрашивание метиленовым синим по Леффлеру (метод Леффлера). Метиленовый синий относится к основным красителям, то есть хромофором является катион. Благодаря этому краситель интенсивно связывается с ядерными компонентами клеток за счет образования комплекса с анионами ДНК и рибосомальной РНК бактерий. Присутствие щелочи в растворе усиливает взаимодействие клеточных компонентов (ДНК и РНК) с хромофором.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) вода для промывания мазков;
- 3) ванночка и рельсы для окраски препаратов-мазков;
- 4) спирт этиловый 96 %-й для фиксации мазков;
- 5) спиртовка;
- 6) бактериологическая петля;
- 7) раствор метиленового синего по Леффлеру.

Техника окраски: исследуемый материал наносят на чистые обезжиренные предметные стекла, растирают его тонким равномерным слоем по поверхности стекла, высушивают на воздухе. Препарат фиксируют 3 мин в 96% этиловом спирте и высушивают. На высушенный препарат наносят каплю 1% щелочного раствора метиленового синего по Леффлеру и окрашивают в течение 3-10 минут. Промывают погружением в стакан с водопроводной водой. Высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой.

Оценка результата. При правильном окрашивании в микроскопируемом препарате видны голубые бактерии на бесцветном или слабо голубом фоне.

Сложные методы окраски

На препарат последовательно наносят определенные красители, различающиеся по химическому составу, цвету, протравы, спирты, кислоту и т.д.

Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать один вид микроорганизмов от других.

Метод окраски по Граму. Метод разработал в 19 веке датский бактериолог Ханс Христиан Грам (Gram, 1884). Предлагая в 1884 г. свой метод окраски бактерий в срезах и препаратах – отпечатках из органов, он не оценил крупнейшего дифференциально-диагностического значения этого метода, хотя указывал, что некоторые микроорганизмы, например, брюшнотифозная палочка, обесцвечиваются и окрашиваются в дополнительный цвет. Впервые на значение окраски по Граму для дифференцирования бактерий указал в 1886 г. Э. Ру.

Принцип метода. Восприимчивость к окраске по Граму определяется толщиной клеточной стенки и ее химической структурой. Клеточная стенка грамположительных бактерий представляет собой многослойный пептидогликан толщиной 20-60 нм. Микрофибриллы пептидогликана, переплетаясь между собой, образуют густую сеть, пронизанную порами. С пептидогликаном клеточной стенки ковалентно связаны тейховые и липотейховые кислоты, выступающие на поверхность клетки через поры пептидогликанового каркаса.

У грамположительных бактерий в клеточной стенке отсутствуют ароматические и серосодержащие аминокислоты, отмечается низкое содержание липидов,

у грамотрицательных, напротив, эти вещества содержатся в большом количестве (рис. 44). Кроме того, у грамположительных бактерий имеется магниевая соль рибонуклеиновой кислоты, у грамотрицательных она отсутствует. Она и образует прочный химический комплекс с белком, генцианвиолетом и йодом, который не разрушается при кратковременном действии спирта.

У грамотрицательных бактерий такой комплекс не образуется. Они легко обесцвечиваются под действием спирта. Фуксин докрашивает грамотрицательные микроорганизмы в красный цвет. Кроме того, структура пор пептидогликана грамположительных бактерий такова, что препятствует вымыванию красителя при обработке мазка бактерий спиртом.

Грамположительные



Грамотрицательные

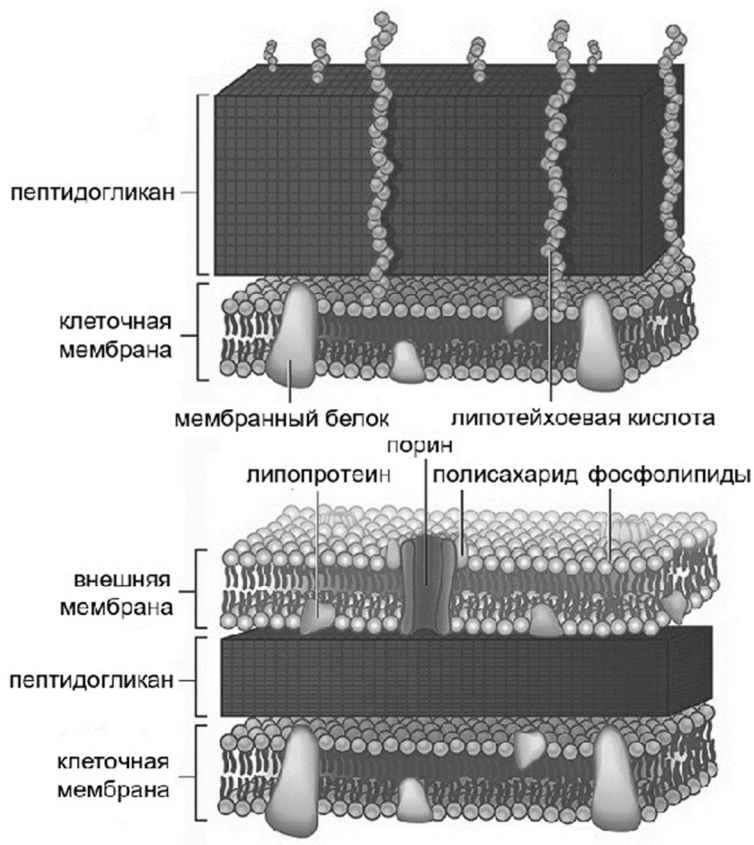


Рисунок 44 — Структура клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий содержит 1-2 слоя пептидогликана, толщина ее намного меньше (10-20 нм), чем у грамположительных микроорганизмов. В состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий входит наружная мембрана, связанная бимолекулярным слоем липидов поверхностного слоя пептидогликана. Наружная мембрана имеет мозаичную структуру, состоящую из молекул фосфолипидов, полисахаридов и белков. Белки наружной мембраны – «порины» - окружают гидрофильные поры, через которые проходят водные и другие молекулы массой до 800 Да. Грамотрицательные бактерии при обработке препарата спиртом вследствие недостаточного количества пептидогликанов в клеточной стенке утрачивают комплекс йода с кристаллическим фиолетовым, обесцвечиваются и затем приобретают контрастный цвет дополнительными красителями.

Часть клетки, вступающая в тройное соединение с красителем и протравой, – магниева соль рибонуклеиновой кислоты. При обработке взвеси грамположительных микробных клеток солями желчных кислот рибонуклеат магния извлекается, и клетка становится грамотрицательной. Прибавление к таким грамотрицательным клеткам извлеченного рибонуклеата магния возвращает им грамположительность.

Для получения достоверных результатов окраски препарат должен быть тоньше. В густых мазках, в которых клетки находятся в скоплениях («кучках»), часто выпадает осадок красителя, и труднее осуществляется обесцвечивание грамотрицательных организмов. Грамположительные клетки наоборот, в местах скоплений обесцвечиваются значительно скорее, чем одиночно расположенные клетки. Бактерии

в препарате должны находиться на возможно большем расстоянии одна от другой.

Выше было сказано, что положительная окраска по Граму связана с наличием в клетке рибонуклеата магния. Извлечение этого соединения лишает клетку ее грамположительности. К числу экстрагентов, обладающих способностью извлекать нуклеиновые кислоты и их соли из клетки, относится и физиологический раствор. Приготовление взвеси бактерий из культур на плотных средах в физиологическом растворе и длительное подсушивание могут привести к частичному извлечению из клеток рибонуклеата магния и частичному превращению их в грамотрицательные. Длительное хранение взвеси грамположительных клеток в физиологическом растворе, дистиллированной воде частично или полностью превращают их в грамотрицательные. Даже длительное подсушивание на стекле капли взвеси, приготовленной в физиологическом растворе, может привести к частичной утрате способности сопротивляться обесцвечиванию. Поэтому следует наносить на стекло минимальное количество жидкой культуры или взвеси клеток из плотной культуры петлей, распределять как можно более тонким слоем с целью максимального ускорения высыхания мазка. Быстрое подсушивание нагреванием на пламени не рекомендуется, так как это способствует извлечению рибонуклеата магния из клетки.

Травмирование клеток грамположительных бактерий может привести к утрате их способности противостоять обесцвечиванию. Слишком энергичное растирание петлей взвеси на стекле при приготовлении мазка может привести к частичному изменению отношения к окраске по Граму.

Фиксировать препарат для окраски по Граму можно только на пламени горелки/спиртовки. Применение прочих методов фиксации, в частности метиловым спиртом, смесью

этилового спирта с эфиром и др., может дать искаженную картину. Однако при фиксации жаром интенсивность нагревания мазка и интенсивность обесцвечивания грамположительных бактерий находится в прямой зависимости — чем больше грамположительные клетки подвергаются тепловому воздействию, тем больше обнаруживается среди них грамотрицательных особей. Поэтому фиксация на пламени горелки должна быть осторожной и щадящей.

Процедура окрашивания препарата должна быть начата лишь после того, как он полностью охладился. Не рекомендуется наливать раствор красителя на еще горячий после фиксации препарат.

Факторы, влияющие на результаты окраски по Граму. Воздействием на культуру различных веществ, культивированием в средах с примесью этих веществ можно добиться превращения грамотрицательных микробов в грамположительные и обратно.

Помимо создания таких необычных условий существования, и в физиологических условиях могут иметь место колебания в отношении к окраске по Граму. У каждого бактериального вида есть определенный максимальный возраст культуры, в котором наиболее четко выражено характерное отношение данного вида к окраске по Граму. Молодые культуры грамположительных бактерий более устойчивы к обесцвечиванию, чем старые, хотя есть указания, что 48-часовые культуры более устойчивы, чем 24-часовые. В самых ответственных случаях, особенно при определении отношения к окраске по Граму вновь описываемого микроба, рекомендуется готовить препараты для окраски по Граму из культур трех возрастов — 6–8-часовых, 12–24-часовых и 48-часовых.

Даже место на поверхности скошенного агара может влиять на результаты окраски по Граму. Препарат, приготовленный из газона, снятого с верхнего, уже подсыхающего участка агара, может дать совершенно иные результаты, чем приготовленный из нижней, более влажной части агара.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) карболовый раствор генцианового фиолетового или кристаллического фиолетового (1 г красителя, 10 мл спирта 96 %, 2 г кристаллической карболовой кислоты, 100 мл дистиллированной воды или 10 мл 4 %-го спиртового раствора красителя и 100 мл 2 %-ой карболовой кислоты);
- 3) раствор Люголя (в модификации Грама): 2 г йодида калия, 10 мл дистиллированной воды, 1 г кристаллического йода. Смесь настаивается сутки, после чего добавляют 300 мл дистиллированной воды;
- 4) 96 % этиловый спирт;
- 5) водный раствор фуксина;
- 6) вода для промывания препарата;
- 7) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 8) спиртовка.

Техника окраски (рис. 45):

1. Фиксированный мазок окрашивают карболовым раствором генцианового фиолетового в течение 1-2 минут.
2. Сливают остаток краски, не промывая препарат водой, наливают раствор Люголя на 1-2 минуты до почернения препарата.
3. Сливают раствор Люголя, окрашенный мазок обесцвечивают 96 %-м спиртом (препарат несколько раз помещают в стакан со спиртом до прекращения отхождения

фиолетовых струек). Обесцвечивание проводят не более 20–30 сек.

4. Препарат промывают водой.

5. Докрашивают мазок водным раствором фуксина 1–2 минуты.

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

Оценка результатов. Грамположительные бактерии окрашены в темно-фиолетовый или синий цвет, грамотрицательные – в красный или розовый.

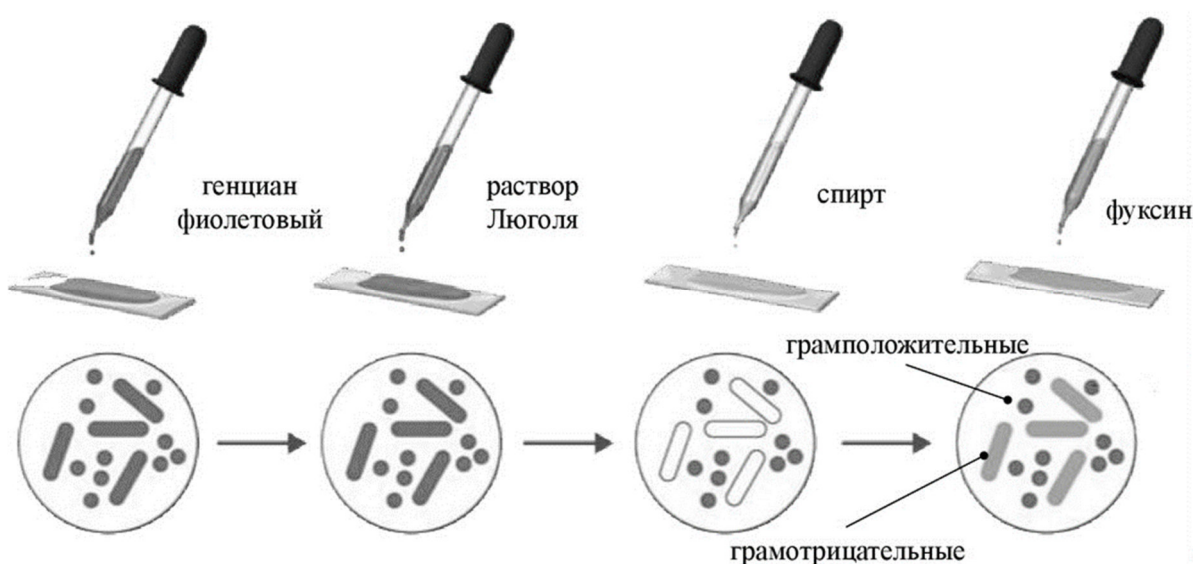


Рисунок 45 – Схема окраски по Граму

Окраска по Граму в модификации А.И. Синева. Для окраски применяются кусочки фильтровальной бумаги, пропитанные 1 %-м спиртовым раствором кристаллического фиолетового и высушенные. Для этого на листы фильтровальной бумаги, разложенные на стекле, наливают 1-2 %-й раствор (в 96% этиловом спирте) краски и затем окрашенную высушенную бумагу нарезают на кусочки размером 2х4 см и сохраняют в стеклянных темных банках с притертой пробкой. Подготовленные таким способом

бумажки не теряют окрашивающих свойств весьма продолжительное время.

Техника окраски:

1) на фиксированный препарат кладут полоску (квадрат) фильтровальной бумаги, пропитанную 1 %-м спиртовым раствором кристаллического фиолетового;

2) наливают несколько капель воды, окрашивают 1-2 минуты;

3) снимают полоску фильтровальной бумаги;

4) наливают на препарат раствор Люголя на 1 мин (до почернения краски);

5) сливают раствор Люголя;

6) прополаскивают мазок в 96 %-ом спирте 30 с–1 мин (до отхождения красителя);

7) промывают водой;

8) обесцвеченные элементы и клетки дополнительно окрашивают разведенным фуксином Пфейффера, нанесенным на фильтровальную бумагу, смоченную водой, и прижав ее к мазку, выдерживают 30 с–1 мин;

9) после окраски препарат тщательно промывают водой и высушивают;

10) микроскопируют с иммерсионной системой.

Оценка результатов. При микроскопии грамположительные бактерии – сине-фиолетового цвета, грамотрицательные – розово-красные.

Задания к лабораторной работе:

1. Осуществите фиксацию препаратов разными способами.

2. Используя простой метод окраски, приготовьте окрашенный микропрепарат.

3. Используя метод окраски по Граму, приготовьте окрашенный микропрепарат.

4. Проведите иммерсионную микроскопию окрашенных препаратов. Определите морфологию увиденных микробных клеток. Зарисуйте в тетради полученные под микроскопическим увеличением поля зрения.

5. Ответьте на вопросы:

Какие морфологические группы бактерий вам известны?

Какие способы окраски применяют для обнаружения капсул, спор, жгутиков?

Чем определяется грамположительность или грамотрицательность бактерий?

Лабораторная работа №7

Влияние биотических и абиотических факторов на микроорганизмы

Влияние температуры на рост микроорганизмов

Жизнедеятельность каждого микроорганизма ограничена определенными температурными границами. Эту температурную зависимость обычно выражают тремя основными точками: минимум – температура, ниже которой размножение микробных клеток прекращается; оптимум – наилучшая температура для роста и развития микроорганизмов; максимум – температура, выше которой жизнедеятельность клеток ослабляется или прекращается. Оптимальная температура обычно соответствует температурным условиям естественной среды обитания.

Все микроорганизмы по отношению к температуре подразделяются на психрофилы, мезофилы и термофилы.

Психрофилы (от греч. *psychros* – холодный, *phileo* – люблю), или холодолюбивые микроорганизмы, растут при относительно низких температурах: минимальная температура – 0 °С, оптимальная – 10–20 °С, максимальная –

30 ° С. Эта группа включает микроорганизмы, обитающие в северных морях и океанах, почве, сточных водах. Сюда же относятся светящиеся и железобактерии, а также микробы, вызывающие порчу продуктов на холоду (ниже 0° С).

Мезофилы (от греч. *mesos* – средний) – наиболее обширная группа, включающая большинство сапрофитов и все патогенные микроорганизмы. Оптимальная температура для них 28-37 °С, минимальная – 10 °С, максимальная – 45 °С.

Термофилы (от греч. *termos* – тепло, жар), или теплолюбивые микроорганизмы, развиваются при температуре выше 55 °С, температурный минимум для них 30 °С, оптимум – 50-60°С, а максимум – 70-75 °С. Они встречаются в горячих минеральных источниках, поверхностном слое почвы, самонагревающихся субстратах (навозе, сене, зерне), кишечнике человека и животных. Среди термофилов много споровых форм.

Высокие и низкие температуры оказывают различное влияние на микроорганизмы. Одни более чувствительны к высоким температурам. Причем, чем выше температура за пределами максимума, тем быстрее наступает гибель микробных клеток, что обусловлено денатурацией (свертыванием) белков клетки.

Вегетативные формы бактерий мезофилов погибают при температуре 60 °С в течение 30–60 мин, а при 80–100 °С - через 1-2 мин. Споры бактерий гораздо устойчивее к высоким температурам. Например, споры бацилл сибирской язвы выдерживают кипячение в течение 10–20 мин, а споры клостридий ботулизма – 6 ч. Все микроорганизмы, включая споры, погибают при температуре 165–170 °С в течение часа (в сухожаровом шкафу) или при действии пара под давлением 1 атм (в автоклаве) в течение 30 мин.

Действие высоких температур на микроорганизмы положено в основу стерилизации – полного освобождения разнообразных объектов от микроорганизмов и их спор.

К действию низких температур многие микроорганизмы чрезвычайно устойчивы. Сальмонеллы тифа и холерный вибрион длительно выживают во льду. Некоторые микроорганизмы остаются жизнеспособными при температуре жидкого воздуха (-190°C), а споры бактерий выдерживают температуру до -250°C .

Только отдельные виды патогенных бактерий чувствительны к низким температурам (например, бордетеллы коклюша и паракоклюша, нейссерии менингококка и др.). Эти свойства микроорганизмов учитывают в лабораторной диагностике и при транспортировке исследуемого материала – его доставляют в лабораторию защищенным от охлаждения.

Действие низких температур приостанавливает гнилостные и бродильные процессы, что широко применяется для сохранения пищевых продуктов в холодильных установках, погребах, ледниках. При температуре ниже 0°C микробы впадают в состояние анабиоза – наступает замедление процессов обмена веществ и прекращается размножение. Однако при наличии соответствующих температурных условий и питательной среды жизненные функции микробных клеток восстанавливаются. Это свойство микроорганизмов используется в лабораторной практике для сохранения культур микробов при низких температурах. Губительное действие на микроорганизмы оказывает также быстрая смена высоких и низких температур (замораживание и оттаивание) – это приводит к разрыву клеточных оболочек.

Влияние влажности

Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов необходима вода. Высушивание приводит к обезвоживанию цитоплазмы, нарушению целостности цитоплазматической мембраны, вследствие чего нарушается питание микробных клеток и наступает их гибель.

Сроки отмирания разных видов микроорганизмов под влиянием высушивания значительно отличаются. Так, например, патогенные нейссерии (менингококки, гонококки), лептоспиры, бледная трепонема и другие погибают при высушивании через несколько минут. Холерный вибрион выдерживает высушивание 2 сут, сальмонеллы тифа – 70 сут, а микобактерии туберкулеза – 90 сут. Но высохшая мокрота больных туберкулезом, в которой возбудители защищены сухим белковым чехлом, остается заразной 10 мес.

Особой устойчивостью к высушиванию, как и к другим воздействиям окружающей среды, обладают споры. Споры бацилл сибирской язвы сохраняют способность к прорастанию в течение 10 лет, а споры плесневых грибов – до 20 лет.

Неблагоприятное действие высушивания на микроорганизмы издавна используется для консервирования овощей, фруктов, мяса, рыбы и лекарственных трав.

Для хранения культур микроорганизмов, вакцин и других биологических препаратов широко применяют метод лиофильной сушки. Сущность метода состоит в том, что предварительно микроорганизмы или препараты подвергают замораживанию, а затем их высушивают в условиях вакуума. При этом микробные клетки переходят в состояние анабиоза и сохраняют свои биологические свойства в течение нескольких месяцев или лет.

Влияние света

В природе микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию солнечной радиации. Прямые солнечные лучи вызывают гибель многих микроорганизмов в течение нескольких часов, за исключением фотосинтезирующих бактерий (зеленых и пурпурных серобактерий). Губительное действие солнечного света обусловлено активностью ультрафиолетовых лучей (УФ-лучи). Они инактивируют ферменты клетки и повреждают ДНК. Патогенные бактерии более чувствительны к действию УФ-лучей, чем сапрофиты. Поэтому хранить микробные культуры в лаборатории лучше в темноте. В этом отношении демонстративен опыт Бухнера.

В чашку Петри с тонким слоем агара производят обильный посев какой-либо культуры бактерий. На наружную поверхность засеянной чашки наклеивают вырезанные из черной бумаги буквы, образующие, например, слово «typhus». Чашку, обращенную дном вверх, подвергают облучению прямыми солнечными лучами в течение 1 ч. Затем бумажки снимают, и чашку ставят на сутки в термостат при 37° С. Рост бактерий наблюдается лишь в тех местах агара, которые были защищены от действия УФ-лучей наклеенными буквами. Остальная часть агара остается прозрачной, т.е. рост микроорганизмов отсутствует (рис. 46).



Рисунок 46 – Действие света на бактерии

Велико значение солнечного света как естественного фактора оздоровления внешней среды. Он освобождает от патогенных бактерий воздух, воду естественных водоемов, верхние слои почвы.

Бактерицидное (уничтожающее бактерий) действие УФ-лучей используется для стерилизации воздуха закрытых помещений (операционных, перевязочных, боксов и т. д.), а также воды и молока. Источником этих лучей являются лампы ультрафиолетового излучения, бактерицидные лампы.

Другие виды лучистой энергии – рентгеновские лучи, α -, β -, γ -лучи оказывают губительное действие на микроорганизмы только в больших дозах, порядка 440–280 Дж/кг. Гибель микробов обусловлена разрушением ядерных структур и клеточной ДНК. Малые дозы излучений стимулируют рост микробных клеток. Микроорганизмы значительно устойчивее к радиоактивным излучениям, чем высшие организмы. Известны тионовые бактерии, обитающие в залежах урановых руд. Бактерии обнаруживали в воде атомных реакторов при концентрации ионизирующей радиации 20–30 кДж/кг.

Бактерицидное действие ионизирующего излучения используется для консервирования некоторых пищевых продуктов, стерилизации биологических препаратов (сывороток, вакцин и др.), при этом свойства стерилизуемого материала не изменяются.

В последние годы радиационным методом стерилизуют изделия для одноразового использования – полистироловые пипетки, чашки Петри, лунки для серологических реакций, шприцы, а также шовный материал – кетгут и др.

Ультразвук вызывает значительное поражение микробной клетки. Под действием ультразвука газы, находящиеся в жидкой среде цитоплазмы, активируются, и внутри клетки возникает высокое давление (до 10000 атм).

Это приводит к разрыву клеточной оболочки и гибели клетки. Ультразвук используют для стерилизации пищевых продуктов (молока, фруктовых соков), питьевой воды.

Влияние высокого давления

К механическому давлению бактерии и особенно их споры устойчивы. В природе встречаются бактерии, живущие в морях и океанах на глубине 1000–10000 м под давлением от 100 до 900 атм. Некоторые виды бактерий выдерживают давление до 3000–5000 атм., а бактериальные споры – даже 20000 атм.

Влияние химических факторов

Влияние химических веществ на микроорганизмы различно в зависимости от природы химического соединения, его концентрации, продолжительности воздействия на микробные клетки. В зависимости от концентрации химическое вещество может быть источником питания или оказывать угнетающее действие на жизнедеятельность микроорганизмов. Например, 0,5–2%-й раствор глюкозы стимулирует рост микробов, а 20–40%-е растворы глюкозы задерживают размножение микробных клеток.

Многие химические соединения, оказывающие губительное действие на микроорганизмы, используются в медицинской практике в качестве дезинфицирующих веществ и антисептиков.

Химические вещества, используемые для дезинфекции, называют дезинфицирующими. Под дезинфекцией понимают мероприятия, направленные на уничтожение патогенных микроорганизмов в различных объектах окружающей среды. К дезинфицирующим веществам относят галлоидные

соединения, фенолы и их производные, соли тяжелых металлов, некоторые кислоты, щелочи, спирты и др. Они вызывают гибель микробных клеток, действуя в оптимальных концентрациях, в течение определенного времени. Многие дезинфицирующие вещества оказывают вредное воздействие на ткани макроорганизма.

Антисептиками называют химические вещества, которые могут вызывать гибель микроорганизмов или задерживать их рост и размножение. Их используют с лечебной целью (химиотерапия), а также для обеззараживания ран, кожи, слизистых оболочек человека. Антисептическими свойствами обладают перекись водорода, спиртовые растворы йода, бриллиантового зеленого, растворы перманганата калия и др. Некоторые антисептические вещества (уксусная, сернистая, бензойная кислоты и др.) в дозах, безвредных для человека, применяют для консервирования пищевых продуктов.

По механизму действия химические вещества, обладающие противомикробной активностью, можно подразделить на несколько групп.

1. Поверхностно-активные вещества (жирные кислоты, мыла и прочие детергенты) вызывают снижение поверхностного натяжения, что приводит к нарушению функционирования клеточной стенки и цитоплазматической мембраны микроорганизмов.

2. Фенол, крезол и их производные вызывают коагуляцию микробных белков. Они используются для дезинфекции заразного материала в микробиологической практике и инфекционных больницах.

3. Окислители, взаимодействуя с микробными белками, нарушают деятельность ферментов, вызывают денатурацию белков. Активными окислителями являются хлор, озон, которые используют для обеззараживания питьевой воды.

Хлорпроизводные вещества (хлорная известь, хлорамин) широко употребляют в целях дезинфекции. Окисляющими свойствами обладают перекись водорода, перманганат калия, йод и др.

4. Формальдегид применяют в виде 40 %-го раствора (формалин) для дезинфекции. Он убивает вегетативные и споровые формы микроорганизмов. Формалин блокирует аминокруппы белков микробной клетки и вызывает их денатурацию.

5. Соли тяжелых металлов (ртуть, свинец, цинк, золото и др.) коагулируют белки микробной клетки, вызывая этим их гибель. Ряд металлов (серебро, золото, ртуть и др.) оказывают бактерицидное действие на микроорганизмы в ничтожно малых концентрациях. Это свойство получило название олигодинамического действия (от лат. *oligos* – малый, *dinamys* – сила). Доказано, что вода, находящаяся в сосудах из серебра, не загнивает, благодаря бактерицидному действию ионов серебра. Для профилактики бленнореи новорожденных долгое время применяли 1% раствор нитрата серебра. Коллоидные растворы органических соединений серебра (протаргол, колларгол) используют также в виде местных антисептических средств.

Сильным антимикробным действием обладают препараты ртути. Издавна для дезинфекции применяли бихлорид ртути, или сулему (в разведении 1:1000). Однако она оказывает токсическое действие на ткани макроорганизма и использование ее ограничено.

6. Красители (бриллиантовый зеленый, риванол и др.) обладают свойством задерживать рост бактерий. Растворы ряда красителей применяют в качестве антисептических средств, а также вводят в состав некоторых питательных сред для угнетения роста сопутствующей микрофлоры.

Губительное действие ряда физических и химических факторов на микроорганизмы составляет основу асептического и антисептического методов, широко используемых в медицинской и санитарной практике.

Влияние биологических факторов

В естественных условиях обитания микроорганизмы существуют не изолированно, а находятся в сложных взаимоотношениях, которые сводятся в основном к симбиозу, метабиозу и антагонизму.

Симбиоз – это сожительство организмов различных видов, приносящих им взаимную пользу. При этом совместно они развиваются лучше, чем каждый из них в отдельности.

Симбиотические взаимоотношения существуют между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями, между мицелиальными грибами и сине-зелеными водорослями (лишайниками): Симбиоз молочнокислых бактерий и спиртовых дрожжей используют для приготовления некоторых молочнокислых продуктов (кефир, кумыс).

Метабиоз – такой вид взаимоотношений, при котором продукты обмена одного вида микроорганизмов создают необходимые условия для развития других. Например, гнилостные микроорганизмы, расщепляющие белковые вещества, способствуют накоплению в среде аммонийных соединений и создают благоприятные условия для роста и развития нитрифицирующих бактерий. А развитие анаэробов в хорошо аэрируемой почве было бы невозможно без аэробов, поглощающих свободный кислород.

Метабиотические взаимоотношения широко распространены среди почвенных микроорганизмов и лежат в основе круговорота веществ в природе.

Антагонизм – форма взаимоотношений, при которой один микроорганизм угнетает развитие другого или может вызвать его полную гибель. Антагонистические взаимоотношения выработались у микроорганизмов в борьбе за существование. Повсюду, где они обитают, между ними идет непрерывная борьба за источники питания, кислород воздуха, среду обитания. Так, большинство патогенных бактерий, попав с выделениями больных во внешнюю среду (почву, воду), не выдерживают здесь длительной конкуренции с многочисленными сапрофитами и сравнительно быстро погибают.

Антагонизм может быть обусловлен прямым воздействием микроорганизмов друг на друга или действием продуктов их обмена. Например, простейшие пожирают бактерий, а фаги лизируют их. Кишечник новорожденных заселяют молочнокислые бактерии *Bifidobacterium bifidum*. Выделяя молочную кислоту, они подавляют рост гнилостных бактерий и этим защищают от кишечных Расстройств еще малоустойчивый организм грудных детей. Некоторые микроорганизмы в процессе жизнедеятельности вырабатывают различные вещества, оказывающие губительное действие на бактерии и другие микробы. К таким веществам относят антибиотики.

Задания к лабораторной работе:

1. Определите концентрацию водородных ионов предложенной преподавателем питательной среды и уровень окислительно-восстановительного потенциала (ОВП).

2. Подготовьте к стерилизации чашки Петри, градуированные пипетки, пастеровские пипетки, пробирки, колбы и флаконы.

3. Ответьте на вопросы:

Какие физические факторы оказывают влияние на жизнедеятельность микроорганизмов?

Какие вещества относят к дезинфицирующим и как они различаются по механизму воздействия на микроорганизмы?

Перечислите, какие взаимоотношения существуют между микроорганизмами?

Какими свойствами обладают ультрафиолетовые лучи?

В каких случаях прибегают к стерилизации методом ультрафиолетового излучения?

Лабораторная работа №8
Микробиологическое исследование
продуктов растительного происхождения,
кормов, кормовых добавок
(4 часа)

Свежие и сухие плоды, овощи, ягоды играют важную роль в питании человека, следовательно, как на этапе их заготовки, так и переработки, и хранения предусматривается санитарно-гигиенический контроль их качества. Свежие и сухие плоды, овощи, ягоды подвержены многим микробным заболеваниям, которые возникают в поле и могут проявиться в разные периоды хранения.

Корма и кормовые добавки для животных классифицируются следующим образом:

- сочные (зеленые корма, силос, сенаж, корне- и клубнеплоды и бахчевые культуры);
- грубые (сено, солома, отходы растениеводства и веточный корм, искусственно высушенные корма);
- корма микробиологического происхождения (кормовые дрожжи, микробный белок (БВК, паприн, меприн-Д), аминокислоты);

- кормовые добавки (ферментные препараты, кормовые антибиотики).

Микробиологический анализ сырья и продуктов растительного происхождения заключается в том, что овощи, фрукты, ягоды, грибы, продукты их переработки, специи анализируют по следующим показателям:

КМАФАнМ,

БГКП (коли-формы),

патогенные, в том числе *Salmonella*,

дрожжи и плесневые грибы,

Bacillus cereus.

Для проведения микробиологического анализа навеску фуражного зерна массой 5 г помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды. Взбалтывают колбу 10 минут. Из полученной вытяжки готовят последовательные разведения (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Затем делают высеv в стерильные чашки Петри, пипеткой, по капле из каждого разведения в пяти повторностях. Чашки инкубируют при температуре 30 °С. Учет проводят через 5–7 дней.

При учете подсчитывают для каждого образца число колониеобразующих единиц (КОЕ) одновременно на 5-ти чашках и пересчитывают на 1 г зерна по формуле:

$$A = \frac{a \times b \times c}{d \times g},$$

где а – количество КОЕ в 1 г сырого образца;

б – среднее количество КОЕ на одной чашке;

в – разведение, из которого сделан посев;

г – количество капель в 1 мл;

д – вес анализируемого образца.

Для определения качественного состава микрофлоры зерна (зернопродуктов) колонии группируют по культуральным признакам, данные заносят в таблицу 4.

Таблица 4 – Определение качественного состава микрофлоры зерна

Культуральные признаки (описание колоний)	Морфологические признаки (форма клеток и т.д.)	Окраска по Граму

На основании микробиологического анализа делают заключение о качестве фуражного зерна (зернопродуктов).

В посевах свежего доброкачественного зерна выделяют:

80 %	{	<i>Pseudomonas herbicola</i>	Образуют блестящие оранжевые колонии желтовато-зеленоватые
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	флуоресцирующие колонии непигментированные колонии неспорообразующих палочек.
20 %	{	Дрожжи	блестящие выпуклые колонии, окрашенные в розовые тона.

На зерне (зернопродуктах), хранившемся в условиях повышенной влажности, выделяются – несвежем:

- микрококки, образующие мелкие, белые, блестящие, плоские колонии;
- спорообразующие морщинистые палочки, матовые колонии;
- актиномицеты;
- грибы, главным образом *Penicillium*, *Aspergillus*.

Микробиология силоса

При силосовании кормов первостепенную роль играют молочнокислые микроорганизмы, входящие в состав эпифитной микрофлоры силосуемых растений. Состав групп микроорганизмов силосуемой массы приводится в таблице 5. В основе силосования кормов лежит молочнокислое брожение, следовательно, необходимым является создание анаэробных условий, благоприятных для развития молочнокислых бактерий, входящих в состав эпифитного микробоценоза. Такие условия создаются за счет уплотнения, а в процессе силосования выделяют 3 стадии:

- 1) развитие смешанной микрофлоры (до уплотнения);
- 2) развитие молочнокислых микроорганизмов, сопровождающееся накоплением молочной кислоты (консерванта) и изменением рН среды до 4,0–4,2. Гнилостные микроорганизмы погибают;
- 3) стадия консервирования.

Через 2 недели микробиологические процессы в основном заканчиваются.

Таблица 5 – Характеристика эпифитного микробоценоза силосуемой массы (средние данные)

Группа микроорганизмов	Видовая принадлежность	Относительное содержание, %
Гнилостные	<i>Pseudomonas herbicola</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	80
Молочнокислые	В том числе <i>Lactobacterium plantarum</i>	10
Споровые	<i>Bacillus</i>	2
Кишечной палочки	<i>E. coli</i>	2
Грибы, актиномицеты, дрожжевые грибы		5–6

Микробиологическое исследование силоса проводится не позднее суток после взятия пробы. Для приготовления препарата берут пинцетом силос и плотно прижимают его к предметному стеклу, чтобы на стекле остался отпечаток. Препарат сушат на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки и окрашивают метиленовым синим (2–3 мин). Микроскопируют с масляной иммерсионной системой и зарисовывают микроскопическую картину.

Микроскопическая картина на препарате силоса хорошего качества:

- молочнокислые бактерии;
- молочнокислые стрептококки.

Б. Микроскопическая картина на препарате силоса плохого качества:

- спорообразующие масляно-кислые бактерии;
- спорообразующие аэробные гнилостные бактерии;
- плесневые грибы.

Результаты проведенных исследований оформляют в виде выводов.

Задания к лабораторной работе:

1. Ознакомиться с методами микробиологического исследования продуктов растительного происхождения, кормов, кормовых добавок, биологически активных препаратов.

Ответьте на вопросы:

Что такое эпифитные микроорганизмы?

Что является источником формирования эпифитной микрофлоры?

Что является источником питания для эпифитных микроорганизмов?

Чем обусловлена порча зерна при хранении во влажных условиях?

Как с помощью микробиологического анализа дать оценку качества зерна?

Какой метод положен в основу выделения эпифитных микроорганизмов. В чем он заключается?

Какой микробиологический процесс лежит в основе силосования кормов? Роль эпифитных микроорганизмов силосуемых растений при заготовке силоса?

Лабораторная работа №9
Определение микрофлоры окружающей среды
и продуктов питания
(6 часов)

Основные санитарно-микробиологические методы включают как оригинальные методик, так и методы общей и медицинской микробиологии. Они направлены на определение общей микробной обсемененности (общее микробное число), обнаружение и титрование санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ), выявление патогенных микроорганизмов и их метаболитов, определение степени недоброкачества изучаемых объектов, обусловленной наличием микроорганизмов.

К санитарно-показательным микроорганизмам (СПМ) относят представителей облигатной микрофлоры организма человека и теплокровных животных, обитающих в кишечнике или воздушно-дыхательных путях. В качестве таковых выступают не все представители нормальной микрофлоры человека и животных, а лишь те, которые удовлетворяют следующим основным требованиям:

1. Микроорганизм должен постоянно обитать в естественных полостях человека и животных и постоянно выделяться во внешнюю среду.

2. Микроорганизм не должен размножаться во внешней среде, исключая пищевые продукты, или размножаться незначительно и короткое время.

3. Длительность выживания микроорганизма во внешней среде должна быть не меньше, а несколько больше, чем сроки выживания патогенных микроорганизмов, выводимых из организма теми же путями.

4. У микроорганизма не должно быть во внешней среде «двойников» или аналогов, с которыми его можно перепутать.

5. Микроорганизм не должен сколько-нибудь значительно изменять свои биологические свойства в окружающей среде.

6. Рост санитарно-показательных микроорганизмов на питательных средах не должен зависеть от влияния других присутствующих микроорганизмов.

7. В объектах внешней среды санитарно-показательные микроорганизмы должны быть по возможности распределены равномерно.

8. Методы обнаружения, идентификации и количественного учета должны быть современными, простыми и легко доступными.

Предполагается, что чем больше объект загрязнен выделениями человека и животных, тем больше будет обнаружено СПМ и тем вероятнее присутствие патогенных микроорганизмов. Для более точной оценки в число СПМ включают и некоторые сапрофитные бактерии, которые в естественных условиях обитают вне организма человека и животных: аммонифицирующие и нитрифицирующие бактерии, некоторые спорообразующие бактерии, актиномицеты, цианобактерии, целлюлозолитические бактерии, бделловибрионы, грибы и др. Выявление таких микроорганизмов может служить показателем процессов самоочищения.

Изучение микрофлоры почвы

Чашечный метод Коха широко используется для определения количества жизнеспособных микроорганизмов в почве и других естественных субстратах. Применение его позволяет не только учесть численность микроорганизмов, но и оценить их разнообразие по морфологии колоний.

Почвенные образцы берут с помощью стерильной ложки, исследование проводится в день взятия образцов. Сущность метода заключается в высеве исследуемой пробы почвы на плотную среду в чашки Петри и последующем подсчете выросших колоний. При этом считают, что каждая колония является результатом размножения одной клетки. Работа проводится в три приема: приготовление разведений, посев в чашки, подсчет выросших колоний.

Посев делают из разведений суспензии в зависимости от предполагаемого количества микроорганизмов в исследуемом субстрате. Разведения делают в стерильной водопроводной воде или изотоническом растворе хлористого натрия. В ходе опыта используют постоянный коэффициент разведения. Чаще всего делают десятичные разведения.

Образец анализируемой почвы (1–10 г) помещают в колбу со 100 мл стерильной воды и встряхивают. Затем переносят стерильной пипеткой 1 мл исследуемого материала в пробирку с 9 мл стерильной воды. Если исследуемый материал уже был разведен в 100 раз, получают разведение 1:1000. Суспензию этого разведения тщательно перемешивают, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Затем этой же пипеткой берут 1 мл полученного разведения и переносят его во вторую пробирку – получают разведение 1:10000. Таким же образом готовят и последующие разведения. Степень разведения устанавливается предполагаемым количеством микроорганизмов в образце:

число разведений тем больше, чем больше микроорганизмов в исходном субстрате.

Посев производят на агаризованные среды в чашки Петри. Для определения суммарной численности микроорганизмов используют мясопептонный или рыбопептонный агар (МПА, РПА), для определения содержания грибов в почве – сусло-агар (СА), для определения численности различных физиологических групп и санитарно-показательных микроорганизмов используют соответствующие питательные среды. В стерильные чашки Петри наливают расплавленную на водяной бане агаризованную среду, по 20–30 мл в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока не застынет агар. Стерильной пипеткой наносят определенный объем (обычно 0,1–0,5 мл) соответствующего разведения, предварительно тщательно перемешанного, на поверхность агаровой пластинки в чашку Петри. Данный объем распределяют по поверхности среды стерильным шпателем. Затем этим шпателем проводят по всей поверхности среды во второй и третьей чашке, куда посевной материал не вносили (метод истощающего посева).

Из каждого разведения делают 4–6 параллельных высевов. При параллельных посевах одного разведения можно пользоваться одной стерильной пипеткой и одним шпателем. Чашки с засеянными средами помещают в термостат, отрегулированный на температуру, благоприятную для развития выявляемых организмов. Подсчет бактерий производят при культивировании с температурой 30 °С через трое суток, при комнатной температуре – через семь суток. Подсчет дрожжей и грибов – при комнатной температуре через 3–10 суток (при температуре 25 °С срок наблюдения за грибами может быть сокращен до 2–3 дней).

Подсчитывают количество колоний, выросших в чашке Петри, и делают пересчет на 1 г. Результаты параллельных высевок суммируют и вычисляют среднее число колоний, выросших при высеве из этого разведения. Колонии считают, не открывая чашки Петри. Точность метода зависит от числа подсчитанных колоний, а не от числа повторений высевок. Лучшим разведением считают тот, при высеве из которого на плотной питательной среде возникает от 50 до 100 колоний. Если число выросших колоний меньше 10, то эти результаты отбрасывают и для расчета количества клеток в исходном субстрате не используют. Желательно, чтобы общее количество подсчитанных колоний при высеве из данного разведения было не менее 300.

Количество микроорганизмов в 1 г (1 мл) исходного субстрата вычисляют по формуле

$$T = a \times b \times c / d,$$

где T – количество микроорганизмов в 1 г, a – количество подсчитанных колоний, b – разведение, из которого произведен высев, c – 10 (если на чашки высевали 0,1 мл суспензии), d – масса субстрата (почвы), взятого для анализа.

Санитарно-микробиологическое исследование воды

Вода – естественная среда обитания микроорганизмов. Микрофлора природных вод различается по качественному и количественному составу. В большинстве это сапротрофы, но могут встречаться патогенные и условно патогенные виды. В основном это бактерии овальной и цилиндрической формы, среди которых преобладают пигментообразующие кокки, присутствуют микроорганизмы, встречающиеся в почве, где расположены водоемы. В морской воде и в иле пресноводных

водоемов от 10 млн. до 3 млрд. клеток в 1 мл. Основная масса расположена в прибрежных зонах. На глубине 1 км встречаются единичные представители, а до 4 км они практически отсутствуют.

В сточных водах содержится много биогенных фосфор-, углерод-, азотсодержащих соединений, которые попадают в водоемы. По мере удаления от населенных пунктов и предприятий, содержание органики и количество микроорганизмов в воде уменьшается. Этот процесс называется самоочищением воды. Основную роль в самоочищении вод от органических, синтетических веществ играют сапротрофные микроорганизмы, грибы, гидробионты, высшие растения.

При санитарно-микробиологическом исследовании воды определяют микробное число (численность микроорганизмов в 1 мл), коли-титр или коли-индекс в 1 л воды и наличие энтерококков в 50 мл воды. При специальном санитарно-микробиологическом исследовании воды наряду с этим учитывают патогенные микроорганизмы: возбудителей дизентерии, брюшного тифа, паратифа А, Б и холеры.

Установление микробного числа проводят методом культивирования или методом фильтрации с использованием мембранных фильтров. Последний является более точным. При определении микробного числа методом культивирования делают посев воды на МПА.

Водопроводную воду засевают в количестве 1 мл, из естественных водоемов для засева используют разведения 1:10, 1:100 и 1:1000. Посевы инкубируют при 37 °С в течение двух суток, ведут подсчет выросших колоний в чашках и делают пересчет количества микроорганизмов на 1 мл воды.

Вода считается хорошего качества, если число микроорганизмов менее 100 на 1 мл воды, сомнительной – 100–150 микроорганизмов на 1 мл, загрязненной – 150–500

микроорганизмов на 1 мл, грязной – более 500 микроорганизмов на 1 мл воды. Вода, содержащая в 1 мл 100 и более микроорганизмов, считается непригодной для питья.

После установления общего микробного числа определяют бактерии группы кишечной палочки. У нас в стране действуют следующие нормативы для питьевой воды централизованного водоснабжения СанПиН 2.1.4.1074-01, для питьевой воды нецентрализованного водоснабжения СанПиН 2.1.4.544-96, согласно которым допускается не более трех кишечных палочек на 1000 мл воды. По международному стандарту вода считается превосходной, когда в 100 мл воды нет ни одной кишечной палочки; удовлетворительной – одна – три кишечные палочки; сомнительного качества – четыре – десять и неудовлетворительного качества – более десяти кишечных палочек.

Кишечные палочки в санитарной микробиологии воды используются в качестве: показателя чистоты; индикатора фекального загрязнения воды; косвенного показателя загрязнения воды патогенными микроорганизмами – возбудителями кишечных инфекций.

После обнаружения кишечной палочки в воде определяют энтерококки. В качестве санитарно-показательных используется два вида стрептококков: *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*.

Через мембранный фильтр пропускают 50 мл воды и мембранные фильтры выкладывают на агаризованные диагностические среды. Для обнаружения энтерококков используют среды, содержащие 40 % желчи (pH 9,6–10,2) или среды с азидом натрия и азидом калия. На этих средах колонии энтерококков имеют черный цвет. По ГОСТу в питьевой воде не должно содержаться ни одного энтерококка в 50 мл воды.

Этот метод известен также под названием: «двухфазный бродильный метод». Для установления содержания

колиформных бактерий в воде исследуемые пробы засевают в глюкозо-пептонную среду (ГПС) для подращивания микроорганизмов. Объемы воды при этом определяются в зависимости от водоисточника и предполагаемой степени его загрязненности.

Важным показателем является количество БГКП в питьевой воде. На первом этапе исследования исходный объем воды делят на несколько порций, которые засевают в различные объемы питательной среды. Например, посев воды с исходным объемом 300 мл производят следующим образом: два объема по 100 мл засевают в два флакона с 10 мл питательной среды, а 10 объемов по 10 мл той же пробы воды засевают в 10 пробирок, содержащих по 1 мл питательной среды. Посевы инкубируют в термостате при 43°C в течение 7–12 ч. Указанная температура подавляет рост сапрофитных микроорганизмов, но не влияет на колиформные бактерии.

На втором этапе (2 фаза) из флаконов и пробирок, при наличии в них признаков роста (помутнение, газообразование) делают высевы петлей на чашки Петри со средой Эндо, разделенной на 3-4 сектора, и помещают их в термостат при 37°C на 18-20ч для того, чтобы получить рост изолированных колоний. Емкости с посевами воды в среде ГПС, на которых через 7–12 ч не было признаков роста, оставляют в термостате еще на 24 - 48 ч. Отсутствие роста в них через 48 ч свидетельствует об отсутствии в воде БГКП. При просмотре посевов на среде Эндо обращают внимание на колонии красного, розового, бледно-розового цвета с металлическим блеском. Делают из них мазки, окрашивают по Граму и проверяют оксидазную активность, позволяющую дифференцировать ОКБ от других грамотрицательных бактерий. Наличие палочек (грамотрицательных, оксидазоотрицательных) свидетельствует о наличии в воде БГКП. Для определения термотолерантных колиформных

бактерий по 2-3 лактозоположительные колонии из каждого сектора со среды Эндо засевают в пробирки с любой средой, содержащей лактозу, предварительно нагретой до 44 °С и помещают в термостат на 24 ч при той же температуре. Образование в пробирках кислоты и газа свидетельствует о том, что в исследуемой пробе присутствуют термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ). Это позволяет сделать вывод о свежем фекальном загрязнении воды.

Нормативы безопасности питьевой воды в эпидемическом отношении по микробиологическим и паразитологическим показателям (методические указания «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» МУК 4.2.1018-01)

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Воздух не является местом обитания микроорганизмов, но служит местом их повсеместного распространения: там, куда поступает воздух, могут быть и микроорганизмы. Обилие солнечных лучей приводит к их массовой гибели, а отсутствие источников питания исключает возможность размножения. Однако в атмосфере всегда содержится определенное количество жизнеспособных клеток, которые вместе с пылью поднимаются в воздух, а затем вновь оседают на поверхность земли.

Очень богат микроорганизмами воздух закрытых помещений, особенно таких, где неизбежно массовое хождение людей, сопровождающееся поднятием пыли.

Санитарная оценка воздуха помещения осуществляется по двум микробиологическим показателям: общему количеству бактерий и количеству санитарно-показательных

микроорганизмов в 1 м^3 воздуха. Для обнаружения микроорганизмов в воздухе предложено большое количество методов и приборов, позволяющих определять как общее количество, так и состав микрофлоры. В основу методов положены два принципа: оседание (седиментация) и засасывание (аспирация). Простейший – метод Коха, основанный на оседании микроорганизмов, капелек жидкости и пылинок под влиянием силы тяжести на поверхность агара открытой чашки Петри. Метод Кротова основан на ударно-прибивном действии струи исследуемого воздуха, проводится с помощью прибора Кротова (рис. 47).



Рисунок 47 – Аппарат Кротова (современная модификация)

Ни один из предложенных методов не позволяет уловить и подсчитать все микроорганизмы, лучше использовать сочетание нескольких методов. Бактериальная загрязненность воздуха определяется по количеству колоний, выросших в чашках Петри на МПА. В.Л. Омелянским установлено, что за 5 минут при спокойном состоянии воздуха на площадь в 100 см^2 оседает приблизительно столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха. Рассчитав площадь питательной среды в чашке и зная количество выросших на

ней колоний микробов, можно определить количество микроорганизмов, содержащихся в 1 м³ воздуха.

Критерии чистоты воздуха, следующие: в воздухе операционных не допускается присутствие микроорганизмов. Микробное число для пищевых учреждений – не более 500 клеток в 1 м³, для жилых помещений – до 1500 клеток в 1 м³.

Санитарно-показательными микроорганизмами для оценки чистоты воздуха служат гемолитические стрептококки и стафилококки – постоянные обитатели верхних дыхательных путей, слизистой носа и ротовой полости человека. Это *Streptococcus viridans* – зеленающий стрептококк, *Streptococcus haemolyticus* – гемолитический стрептококк и *Staphylococcus aureus* – золотистый стафилококк.

В качестве диагностической среды для их выявления используют кровяной агар. Зеленающий стрептококк имеет вокруг выросших колоний положительную зону неполного просветления с позеленением среды. Гемолитический стрептококк образует на поверхности кровяного агара колонии, окруженные зоной гемолиза.

Воздух считается чистым, если в 1 м³ воздуха содержится летом не более 4 стрептококков, зимой – не более 16. Загрязненным воздух считается, если в 1 м³ воздуха содержится летом более 32 стрептококков, зимой – более 56. Золотистый стафилококк используется в качестве санитарно-показательного микроорганизма в хирургических палатах и родильных домах. В 250 л воздуха не должно содержаться ни одного стафилококка.

Микробиологическое исследование молока

Молоко и молочные продукты являются благоприятной средой для размножения микроорганизмов. При изготовлении некоторых молочных продуктов: творога,

кефира, простокваши, ряженки и других используют специальную микрофлору, например молочнокислые стрептококки, молочно-кислые ацидофильные палочки и др. Микрофлора, используемая для приготовления этих продуктов, является для них специфичной и не учитывается. Неспецифической микрофлорой, встречающейся в молоке и молочных продуктах, являются аэробные бактерии: БГКП, стафилококки и др.

С молоком могут передаваться возбудители туберкулеза, бруцеллеза, сальмонеллеза, сибирской язвы, вирус полиомиелита, анаэробные бациллы и т.д. Обсеменение молока и молочных изделий неспецифической микрофлорой может произойти в момент удоя, транспортировки, хранения и т. д. Исследование молока и молочных продуктов проводят согласно ГОСТу 9225-68.

Микробиологическое исследование продукта должно производиться не позднее чем через 4 ч с момента отбора пробы. При транспортировке температура не должна превышать 6° С.

ГОСТ для молока и молочных изделий предусматривает определение общего числа бактерий в 1 г (мл) и определение титра цитратотрицательных (цитратнегативных) разновидностей БГКП (коли-титр).

Из молока и других молочных продуктов готовят десятикратные разведения (по общепринятой методике). Количество разведений для каждого вида продукта готовят с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения (табл. 6).

По 1 мл каждого разведения вносят в 2-3 стерильные чашки Петри и заливают 12–15 мл растопленного и остуженного до 45 °С питательного агара. Предварительно чашки маркируют. Сразу после заливки содержимое чашки перемешивают (путем легкого вращательного покачивания)

для равномерного распределения посеянного материала. Посевы ставят в термостат при 37 °С на 48 ч.

Таблица 6 – Разведение молока и молочных продуктов

Наименование продукта	Засеваемые разведения		
	1:10 000	1:100 000	1:1 000 000
Молоко и сливки сырые	1:10 000	1:100 000	1:1 000 000
Молоко и сливки пастеризованные	1:10	1:100	1:1000
Молоко сгущенное с сахаром, какао, кофе	1:10	1:100	1:1000
Масло сладкосливочное	1:100	1:1000	1:10 000
Мороженое	1:10	1:100	1:1000

По истечении срока инкубации чашки вынимают и подсчитывают число колоний при помощи счетчика. Число колоний, выросших на каждой чашке, умножают на соответствующее разведение. Полученные результаты по отдельным чашкам складывают, делят на количество чашек и получают среднее арифметическое, которое является показателем общего числа бактерий в 1 г (мл).

Соответствующие ГОСТы регламентируют качество продуктов, что устанавливают по допустимым показателям: общему числу микробов и коли-титру. Пример для двух видов продуктов представлен в табл. 7.

В кисломолочных продуктах (кефир, простокваша, творог, сметана и др.), содержащих обильную специфическую микрофлору, общее количество бактерий не определяют, а контролируют состав микрофлоры. Для этого из кисломолочных продуктов готовят препараты и красят метиленовым синим. В поле зрения препарата должны находиться только специфические для данного продукта микроорганизмы.

Таблица 7 – Показатели общего числа бактерий и коли-титра в молоке

Наименование продукта	ГОСТы	Допустимое число бактерий в 1 мл	Коли-титр не ниже (г)
Пастеризованное молоко:	ГОСТ 13277—67		
группа А		75 000	3
группа Б		150 000	0,3
Пастеризованные сливки:	ГОСТ 4964—75		
группа А		100 000	3
группа Б		200 000	0,3

Например, для простокваши – молочнокислые стрептококки и палочки; для кефира – молочнокислые стрептококки и палочки, единичные дрожжи. Микроскопия позволяет выявить микроорганизмы порчи (плесени и большое количество дрожжей).

Обсемененность молока и молочных продуктов бактериями группы кишечной палочки определяют бродильным методом. Бродильный титр – это такое наименьшее количество продуктов, выраженное в граммах или миллилитрах, в котором присутствует кишечная палочка. Согласно ГОСТу 9225-68 учитываются только цитратнегативные разновидности кишечной палочки (рис. 48).

Бродильный метод

Посев молока и молочнокислых продуктов производят в 6 пробирок с 5 мл среды Кесслер. В 3 пробирки засевают по 1 мл цельного продукта, в другие 3 пробирки по 1 мл из разведения 1:10 (0,1 мл). Посевы инкубируют в термостате при 43°С 18-24 ч.

Из каждой забродившей пробирки на второй день исследования производят посев на сектор среды Эндо и инкубируют при 37° С 18-24 ч.

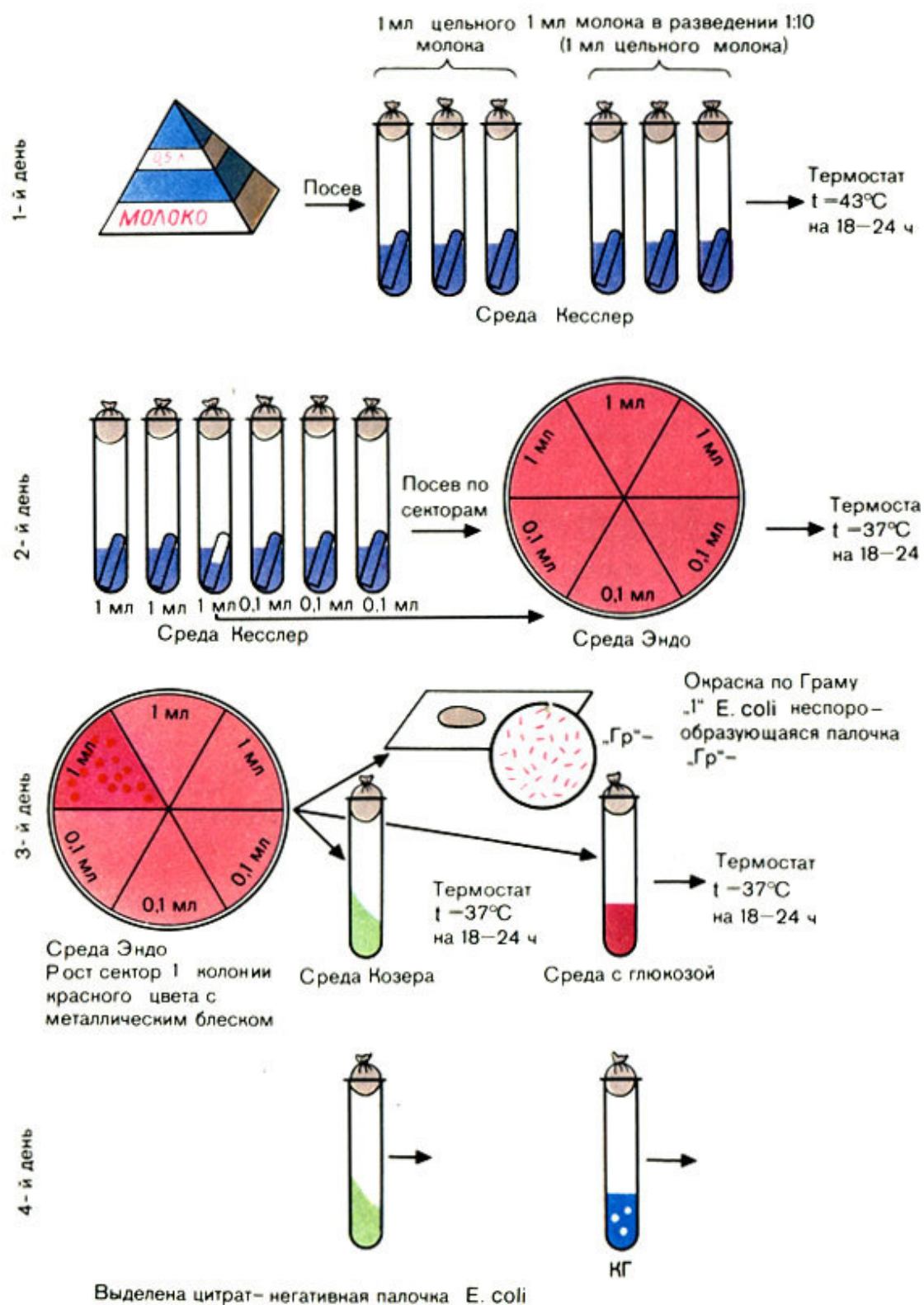


Рисунок 48 – Определение коли-титра молока

При отсутствии типичных для БГКП колоний Третий день исследования продукт считают незагрязненным кишечной палочкой.

При наличии типичных для БГКП колоний делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении грамтрицательных палочек ставят пробу на оксидазу и производят посев на среду с глюкозой и среду Козера.

На четвертый день исследования производят учет результатов. Наличие кислоты и газа на среде с глюкозой и отсутствие роста на среде Козера свидетельствует о наличии цитратнегативных разновидностей кишечной палочки. Колититр вычисляют по табл. 8.

Таблица 8 – Вычисление коли-титра в пастеризованном молоке, сливках, кефире, простокваше, ацидофильном молоке

Варианты	Кишечная палочка обнаружена в следующих объемах, мл						Коли-титр
	1	1	1	0,1	0,1	0,1	
а	–	–	–	–	–	–	>3
б	+	–	–	–	–	–	3
в	+	+	+	+	+	–	<3
	+	+	–	+	+	+	<3
	+	+	+	+	+	+	<3

Экспресс-метод оценки микробной загрязненности молока

Метод основан на восстановлении резазурина выделяемыми в молоко ферментами микроорганизмов. По продолжительности изменения окраски резазурина оценивают бактериальную обсемененность сырого молока.

В пробирки наливают по 1 см³ рабочего раствора резазурина и по 10 см³ исследуемого молока, закрывают резиновыми пробками и смешивают путем медленного трехкратного перевертывания пробирок. Пробирки помещают в редуктазник с температурой воды (37±1) °С.

Вода в редуктазнике после погружения пробирок с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше. Пробирки с молоком и резазурином на протяжении анализа должны быть защищены от света прямых солнечных лучей.

Время погружения пробирок в редуктазник считают началом анализа. Показания снимают через 20 мин и 1 ч. После снятия показаний через 20 мин пробирки с обесцвеченным молоком удаляют из редуктазника. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают. По истечении 1 ч оставшиеся пробирки вынимают из редуктазника, осторожно переворачивают.

В зависимости от продолжительности обесцвечивания или изменения цвета молоко относят к одному из четырех классов, указанных в табл. 9.

Бактериологическое исследование мяса

Исследования мяса и субпродуктов проводят во всех случаях при подозрении на инфекционные болезни, при желудочно-кишечных заболеваниях, удалении кишечника из

туши позднее 2 ч с момента обескровливания животных, подозрении на наличие сальмонелл, а также по требованию органов, осуществляющих ветеринарно-санитарный надзор.

В лаборатории готовят 2–10 мазков отпечатков из паренхиматозных органов (печени, почек, селезенки), лимфатических узлов туши или пораженных участков органов или тканей. Препараты высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают одновременно по Граму и 2 %-ным раствором сафранина. При бактериоскопии мазков обращают внимание на наличие возбудителя сибирской язвы. При окраске сафранином сибиреязвенные бациллы окрашиваются в кирпично-красный цвет, а капсулы – в светло-желтый (метод Ольта).

Таблица 9 – Результаты резазуриновой пробы

Класс молока	Время обесцвечивания или изменения окраски, ч	Ориентировочное количество бактерий в 1 см ³ молока, КОЕ	Окраска молока
Высший	1,5	До 300 тыс.	От серо-сиреневой до сиреневой со слабым серым оттенком
I	1	От 300 тыс. до 500 тыс.	То же
II	1	От 500 тыс. до 4 млн.	Сиреневая с розовым оттенком или ярко-розовая
III	1	От 4 млн. до 20 млн.	Бледно-розовая или белая

Бактериологическое исследование мяса и субпродуктов проводят для выявления в них возбудителей зооантропонозов (бацилл сибирской язвы, бактерий листериоза, рожи свиней и других возбудителей пищевых токсикоинфекций (бактерий рода эшерихия, сальмонелл, протейс), возбудителей токсикозов (токсигенных кокков) и анаэробов (патогенных и токсигенных клостридий).

При бактериологическом исследовании каждую пробу освобождают от жировой и соединительной ткани, погружают в спирт, затем вырезают стерильными ножницами из глубины различных мест кусочки 2,0–2,5 см, лимфатические узлы разрезают пополам. Затем все вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами.

Для посева составляют пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц лимфатических узлов, а вторая – из кусочков паренхиматозных органов. Из каждой пробы готовят взвесь с содержанием в 1 см³ 0,5 г продукта. Для выявления возбудителей зооантропонозов из верхней части надосадочной жидкости пастеровской пипеткой или бактериологической петлей на поверхность мясопептонного агара в чашках Петри вносят 1-2 капли взвеси, шпателем втирают их в поверхность среды по методу Дригальского. Можно сделать посев кусочком пробы (путем нанесения отпечатков разными сторонами пробы на поверхность среды).

Для выявления бактерий группы кишечных палочек проводят посев аналогичным методом на дифференциально-диагностическую среду Эндо, Плоскирева или Левина.

Бактерии рода *Proteus* определяют при наличии на средах вуалеобразного налета, при микроскопии которого обнаруживают палочки, окрашивающиеся по Граму отрицательно.

Исследование на присутствие анаэробов проводят только в том случае, когда есть подозрение на наличие анаэробных инфекций (эмкар, злокачественный отек и т.д.).

Задание к лабораторной работе

1. Определите общее микробное число для воды из водопроводной сети и аквариума.

2. Определите общее микробное число для воздуха в помещении методом Коха.

3. Проведите анализ выросших колоний: подсчитать количество бактерий и грибов, пигментированных бактерий, споровых и неспоровых форм.

4. Оцените свежесть мяса по органолептическим показателям.

5. Проведите микроскопию мазков-отпечатков из свежего, подозрительной свежести и несвежего мяса.

6. Сделайте посев на питательные среды (МПА) образцов мяса путем отпечатка.

7. Ответьте на вопросы:

Какие факторы оказывают влияние на развитие микроорганизмов в почве?

Какие факторы оказывают влияние на численность микроорганизмов в водоемах?

Как можно определить численность микроорганизмов в почве?

Как проводится санитарно-микробиологический анализ воды?

Какие микроорганизмы относятся к санитарно-показательным? Что они характеризуют?

Как определяют в молоке и молочных продуктах общее число микробов?

Как определяют коли-титр?

Какие микроорганизмы могут встречаться в молоке и молочных продуктах?

Каким образом определяют свежесть мяса органолептическим путем?

Каким образом определяют свежесть мяса на основании микроскопии?

В каких случаях проводят бактериологическое исследование мяса?

Какие показатели определяют при бактериологическом исследовании мяса?

Лабораторная работа №10

Смывы с поверхностей

(4 часа)

Осуществление микробиологического контроля пищевого производства.

Санитарно-бактериологическое исследование смывов с рук и предметов окружающей обстановки

Изучение бактериальной загрязненности рук и различных предметов обихода производится в целях оценки санитарно-гигиенического состояния исследуемого объекта, установления путей распространения инфекции при эпидемиологических заболеваниях, лабораторного контроля эффективности обработки кожи рук.

Ход работы:

Приготовление смывов. Для получения смывов пользуются стерильными ватными тампонами, которые перед употреблением смачивают в стерильном физиологическом растворе. Увлажненный тампон дают в руки обследуемому, предлагая протереть им обе руки, тщательно протирая ладони, межпальцевые промежутки и подноготные пространства. По окончании процедуры тампоны помещают в пробирку с физиологическим раствором, где они находились.

Смывы с поверхности предметов, имеющих большую поверхность, исследуемый участок ограничивают рамкой-

трафаретом площадью 25 см². При исследовании мелких предметов смыв делают со всей поверхности.

Затем тампон помещают в пробирку со стерильным физраствором, выдерживают там 5–10 минут и хорошо отмывают. При необходимости из исходного раствора готовят ряд последовательных десятикратных разведений. Затем в стерильную пустую чашку Петри вносят 1 мл раствора из пробирки и заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до 45 °С МПА. Посевы выдерживают в термостате при 37 °С в течение суток и 24 ч при комнатной температуре, после чего подсчитывают количество выросших колоний с учетом разведений.

Устанавливают количество микроорганизмов в 1 мл исходного разведения смыва, определяют количество микроорганизмов в 10 мл смыва, соответствующее общему числу микроорганизмов, находящихся на той площади, с которой произведен смыв и количество микроорганизмов на 1 см² исследуемой поверхности (для этого величину, характеризующую количество микроорганизмов в 1 мл смыва, делят на число квадратных сантиметров, с которых сделан смыв).

В практике государственного санитарного надзора за предприятиями с целью контроля эффективности санитарной обработки инвентаря, оборудования, посуды, тары для пищевых продуктов, санитарной одежды и рук персонала используется метод смывов. Отбор смывов должен производиться помощником врача гигиениста или врача-эпидемиолога, в необходимых случаях совместно с работниками лаборатории.

Непосредственно на предприятии при каждом обследовании устанавливают конкретные точки для взятия смывов. При повторных обследованиях берут смывы с тех же объектов и по возможности в те же часы.

При взятии смывов с оборудования, инвентаря, посуды, столовых приборов записывается: номер образца по порядку, место взятия смыва; при взятии смывов с рук записывается:

номер по порядку, фамилия, имя, отчество сотрудника, выполняемая работа (профессия и участок работы); составляется направление на исследование в лабораторию, подписывается лицом, отобравшим смывы, в присутствии представителя предприятия.

Доставка смывов должна производиться в термоконтейнерах с охлаждаемыми вкладышами. Время доставки смывов в лабораторию для осуществления исследования не должно превышать 2 ч.

Определение общего микробного числа в воздухе закрытых помещений

Для определения общего количества бактерий забирают две пробы (объемом по 100 л каждая) на чашки Петри с МПА при помощи любого прибора (чаще всего аппарата Кротова), либо седиментационным методом, расставляя чашки с питательной средой по принципу конверта. Чашки с посевом помещают в термостат на сутки, а затем на 48 ч оставляют при комнатной температуре. Экспозиция чашек с посевами на свету дает возможность подсчитать отдельно количество пигментных колоний (желтых, белых, розовых, черных, оранжевых и др.), количество спорообразующих бацилл, грибов и актиномицетов.

Подсчитывают количество колоний на обеих чашках, вычисляют среднее арифметическое и делают перерасчет на количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха. Количество каждой группы колоний (пигментных, беспигментных, плесеней, бацилл, актиномицетов) выражают в процентах по отношению к общему числу.

При определении микробного числа методом седиментации по Коху подсчитывают колонии выросшие на чашках Петри (площадь поверхности агара в чашке равна 75 см²) и расчет ведут по правилу В.Л. Омелянского: на поверхность площадью 100 см² за 5 мин оседает такое количество микробов, которое содержится в 10 л воздуха.

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{75 \text{ см}^2},$$

где X – количество микробов в 1 м³; А – количество колоний на агаре в чашке Петри.

Результаты получаются заниженными примерно в 3 раза по сравнению с данными, получаемыми при использовании аппарата Кротова.

Изучение результатов санитарно-бактериологического анализа проб воды, воздуха, смывов с рук

При текущем санитарном надзоре исследование смывов проводят на присутствие бактерий группы кишечных палочек (далее – БГКП). Исследование смывов на наличие *Staphylococcus aureus* проводят при обследовании кремово-кондитерских цехов столовых и ресторанов, молочных кухонь и других пищеблоков, обращая особое внимание на контроль рук персонала; общую микробную обсемененность определяют для установления эффективности санитарной обработки посуды в посудомоечных машинах, при оценке новых моющих и дезинфицирующих средств; при повторном обнаружении БГКП в значительном проценте смывов на объекте рекомендуется провести исследование смывов с инвентаря, оборудования и рук персонала на наличие энтеробактерий.

Определение БГКП (колиформных бактерий) основано на их способности сбраживать в среде Кесслера лактозу с образованием кислоты и газа. БГКП – это аэробные и факультативно-анаэробные грамотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 36±1 °С в течение 24 ч (бродильная проба), не обладающие оксидазной активностью: для определения БГКП в смывах с оборудования и рук

в пробирки, содержащие 5 см³ среды Кесслера или КОДА, опускают тампоны со смывом и туда же переносят оставшуюся смывную жидкость. Посевы инкубируют при температуре 36±1 °С. Через 18–24 ч из пробирок со средой Кесслера, в которых обнаружено газообразование, проводят пересев петлей на среду Эндо и инкубируют при температуре 36±1 °С в течение 24 ч. Со среды КОДА высев производят только в случае изменения окраски среды или ее помутнения; при наличии на среде Эндо колоний (красных с металлическим блеском и без него или розовых), характерных для БГКП, из изолированных колоний готовят препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамтрицательных без спор палочек делают заключение о присутствии БГКП. При обнаружении грамтрицательных, не образующих спор палочек, выполняют оксидазный тест. Для этого колонии со среды Эндо наносят штрихом на фильтровальную бумагу, предварительно смоченную реактивом для определения цитохромоксидазы. В месте нанесения бактериальной массы бумага не изменяет цвета, если оксидазный тест отрицательный, и синее в течение 1 мин, если бактерии имеют оксидазу.

При обнаружении грамтрицательных не образующих спор палочек и отрицательном тесте на оксидазу делают заключение о присутствии БГКП в смывах.

Определение общей микробной обсемененности основано на подсчете колоний, видимых при увеличении в 2 раза, выросших на питательных средах при инкубации посевов при 30 °С в течение 72 ч: в пробирку с тампоном добавляют 5 см³ 0,1%-й пептонной воды или изотонического раствора хлорида натрия. Тампон тщательно отмывают, после чего по 1 см³ смывной жидкости вносят в две параллельные чашки Петри, заливают расплавленным и остуженным до 45 °С мясопептонным агаром (далее – МПА) (15–20 см³), размешивают. После застывания агара чашки переворачивают и помещают в термостат при температуре 30 °С на 72 ч.

Предварительный учет колоний проводится через 48 ч, окончательный через 72 ч. Подсчитывают среднее арифметическое количество колоний, выросших на двух чашках, и умножают на 10 для определения количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемого предмета; если при посевах оказалось, что на засеянных чашках выросло менее 15 колоний, в результатах анализа рекомендуется написать: «Рост единичных колоний при посеве (указать количество засеянной смывной жидкости)». При отсутствии роста колоний результаты выражают таким образом: «Не обнаружено микроорганизмов в 1 см³ смывов». Если на чашках, более чем на 1/2 их площади, имеется рост спорообразующих микроорганизмов или за счет споровых микроорганизмов подсчет изолированных колоний невозможен, в результате анализа следует написать: «Рост спорообразующих микроорганизмов». Результаты выражают в колониеобразующих единицах – КОЕ (на 1 см³ смывов).

Определение *Staphylococcus aureus* основано на выявлении характерного роста бактерий на элективных средах, изучении морфологических свойств, постановке теста плазмокоагуляции, ферментации маннита. Тампон помещают в пробирку с 6–7 см³ солевого мясопептонного бульона (содержание хлорида натрия 6,5%). Пробирку инкубируют в термостате при температуре 36±1 °С 18–24 ч. Из солевого бульона производят высеивание на элективные среды: желточно- или молочно-солевой агар, маннитол-агар и др. Посевы инкубируют при температуре 36±1 °С 48 ч: подозрительные на патогенные стафилококки колонии (непрозрачные, золотистые, кремовые, эмалевые, лимонно-желтые имеют форму правильных дисков от 2 до 4 мм в диаметре, слегка выпуклые на молочно- и желточно-солевом агаре с радужным венчиком вокруг колоний). Готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют, отсеивают на скошенный мясопептонный агар (далее – МПА) и инкубируют при температуре 37 °С 18–24 ч. Число колоний, взятых для

идентификации, должно быть не менее пяти или все выросшие колонии. Стафилококки положительно окрашиваются по Граму, имеют шарообразную форму с диаметром 0,6–1 мк и располагаются часто в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда. Односуточную культуру проверяют на принадлежность к роду стафилококка и подтверждают вид *S. aureus* в реакции плазмокоагуляции и тесте ферментации маннита в анаэробных условиях; постановка реакции плазмокоагуляции: в пробирку с 0,5 см³ плазмы (лучше кроличьей), разведенной изотоническим раствором хлорида натрия в пропорции 1:5 (1 см³ плазмы + 4 см³ раствора), вносят петлю суточной культуры стафилококка. Для контроля одну пробирку с плазмой оставляют незасеянной, а в другую засевают суточную культуру *S. aureus*. Пробирки помещают в термостат при температуре 36±1 °С на 24 ч. При положительной реакции плазмокоагуляции (сгусток образовался в течение 24 ч) делают заключение о присутствии коагулазопозитивного патогенного стафилококка.

Задание к лабораторной работе

1. Проведите исследование воздуха помещений методом седиментации.
2. Произведите учет результатов.
3. Опишите способы оценки общей микробной загрязненности и наличия БГКП на предметах обихода и руках персонала.

Лабораторная работа №11
Возбудители бактериальных инфекций животных,
при которых убой животных
для пищевых целей запрещен
(6 часов)

Сибирская язва – это инфекционная особо опасная болезнь животных многих видов и человека, характеризующаяся явлениями септицемии, интоксикации или образованием карбункулов, поражениями кожи, кишечника, лёгких, лимфатических узлов и гибелью заболевших животных. На предприятиях мясной промышленности сибирскую язву обнаруживают довольно редко, однако большая опасность для человека, сложность и дороговизна ветеринарно-санитарных мероприятий, проведение которых необходимо при обнаружении этой болезни, обязывают проявлять особую бдительность в отношении этого заболевания.

Возбудитель (*Bac. anthracis*) – крупная аэробная неподвижная грамположительная палочка, образующая капсулы и споры (рис. 49).



Рисунок 49 – Bac. anthracis

Встречается в вегетативной и споровой формах. Устойчивость и длительность выживания вегетативных клеток и спор возбудителя сибирской язвы различны.

Устойчивость вегетативных клеток незначительна, споры обладают высокой резистентностью. В организме животного и на питательных средах с кровью или сывороткой крови возбудитель образует капсулу, а во внешней среде при 15–42 °С и доступе кислорода – споры. Вегетативные формы возбудителя при нагревании до 60 °С гибнут через 15 минут, до 70 °С – через 1 минуту, а при 100 °С – мгновенно; в замороженном мясе (-15 °С) сохраняются до 15 суток, в засоленном – до 1,5 мес.; в желудочном соке животных погибают за 30 минут. Прямой солнечный свет обезвреживает вегетативные формы бакцилл в течение нескольких часов. Споры разрушаются сухим жаром при 150 °С через 1 час, текущим паром при 100°С – через 15 мин., автоклавированием при 110°С – через 5-10 мин., кипячением – через 15-30 мин. Высушивание вообще не оказывает губительного действия на споры, так в высушенных агаровых и желатиновых культурах они остаются жизнеспособными и вирулентными даже через 55 лет. Установлено, что споры могут десятилетиями (50 и более лет) сохраняться во внешней среде, например, в почве, не теряя своих характерных свойств, в том числе вирулентность.

Мелиоидоз – инфекционная болезнь животных и человека, характеризующаяся септициемией, катарально-гнойным воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей, образованием абсцессов в легких, печени, селезенке, почках и других органах и высокой летальностью. К мелиоидозу восприимчивы лошади, ослы, свиньи, овцы, козы, кролики, собаки, кошки, крупный рогатый скот.

Возбудитель – *Pseudomonas pseudomallei* – подвижная грамотрицательная палочка, капсулы не имеет, спор не образует (рис. 50).

По морфологическим и культуральным свойствам близок к возбудителю сапа. Микроб чувствителен к нагреванию: при 56 °С погибает в течение 10 мин, при кипячении – немедленно. В почве, воде жизнеспособность

сохраняет в течение месяца, на холоде – 2-3 недели, в моче – 17 суток, в трупном материале – 8 суток.

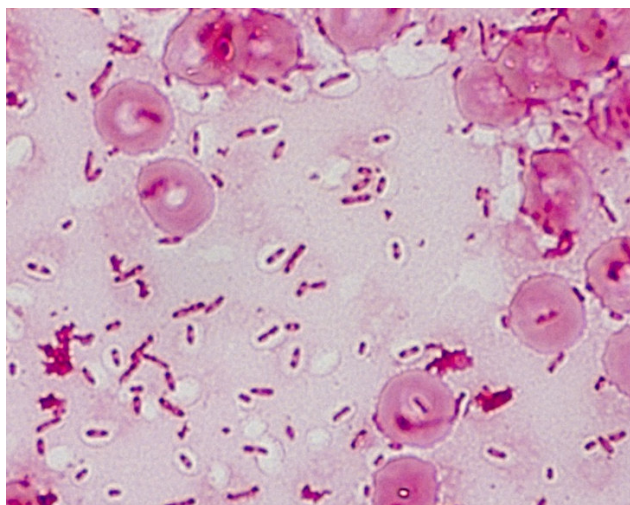


Рисунок 50 – *Pseudomonas pseudomallei*

Эмфизематозный карбункул – остропротекающая неконтагиозная токсико-инфекционная болезнь, поражающее крупный рогатый скот (редко овец и коз) и характеризующаяся образованием быстро увеличивающихся крепитирующих при надавливании газовых отеков в мышечной ткани. Болезнь поражает в основном молодняк до 3 лет. Возбудитель – *Clostridium chauvoei* – анаэроб, капсул не образует, образует споры, обладает протеолитическими свойствами (рис. 51).

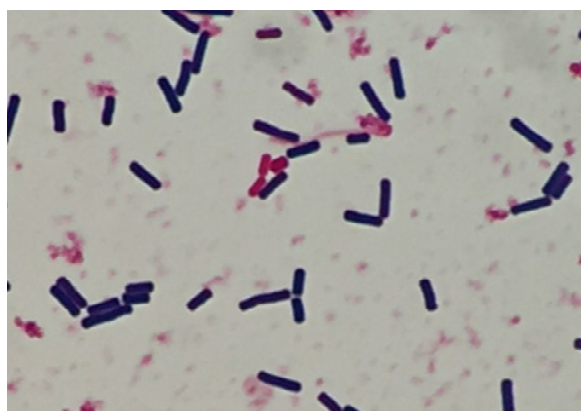


Рисунок 51 – *Clostridium chauvoei*

Молодые культуры по Граму окрашиваются положительно, старые – отрицательно. Иногда из патологического материала вместе с *Cl. chauvoei* выделяют *Cl. septicum* или *Cl. nevyi*. Вегетативные формы – *Cl. chauvoei* при нагревании до 80 °С погибают через 2 ч., до 100 °С – через 20 минут. Растворы формалина и гидроксида натрия убивают возбудителя. В солонине и высушенном мясе сохраняется несколько лет. Споровые формы возбудителя выдерживают нагревание текучим паром до 6 ч., а кипячение в воде – 2 ч. В навозе сохраняются до 6 месяцев.

У возбудителя эмкара выделен термолабильный гемотоксин. Заражение происходит при проникновении возбудителя в желудочнокишечный тракт животных. Источник возбудителя инфекции – больные животные, а фактор передачи – контаминированные спорами почва, корма, вода.

Злокачественный отек, или газовая гангрена – это острая септическая неконтагиозная раневая токсикоинфекция, протекающая при явлениях общей интоксикации и местных поражениях воспалительного, отеочного, геморрагического характера с обильным газообразованием в пораженных тканях и их некрозом. Восприимчивы к заболеванию все виды животных и человек. Наиболее восприимчивы лошади, овцы и свиньи, менее – крупный рогатый скот и козы.

Возбудители болезни – ассоциация анаэробов: *Cl. septicum*, *Cl. aedematiens*, *Cl. perfringens*, *Cl. histoliticum*. В раневом содержимом может обнаруживаться непатогенный микроб *Cl. sporogenes*, способствующий гнилостному распаду отмерших тканей (рис. 52).

Чаще возбудителями болезни у животных является *Cl. septicum*; у людей – *Cl. perfringens*. Микробы, вызывающие злокачественный отек, образуют споры, устойчивые к высокой температуре. Споры *Cl. perfringens* при кипячении разрушаются через 80–90 минут, высушивание инактивирует возбудителя за 1-2 суток. В мясе при минусовых температурах

микроб может сохранять свою жизнедеятельность в течение 33 месяцев.

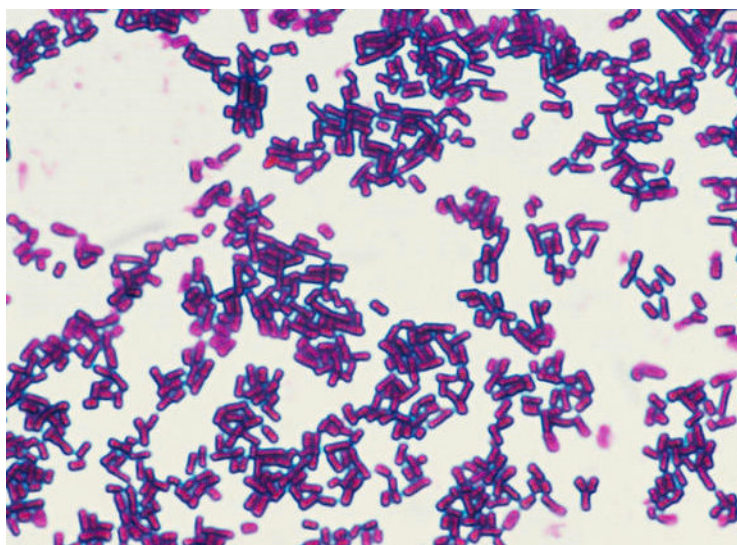


Рисунок 52 – *Clostridium septicum*

Варка, обжарка и тушение мяса обеспечивают полную гибель микроба. Аналогичными свойствами обладают и другие микробы, принимающие участие в развитии злокачественного отека.

Сап – это инфекционная болезнь, поражающая однокопытных, иногда верблюдов, оленей и протекающая преимущественно хронически. Она характеризуется развитием в легких и других внутренних органах, на слизистых оболочках и на коже специфических узелков, которые распадаются с образованием язв. Сап поражает также человека.

Возбудитель – сапная палочка *Burkholderia mallei*, грамотрицательная и подвижная (рис. 53).

Устойчивость возбудителя невелика. Нагревание убивает ее при температуре 53 °С в течение 110 минут, а при 100 °С она погибает мгновенно. Холод на сапные палочки не оказывает влияния. При высушивании она гибнет через 1-2 недели, гниение губит ее через 14. Устойчивость возбудителя невелика. Нагревание убивает ее при температуре 53 °С в течение 110 минут, а при 100°С она погибает мгновенно.

Холод на сапные палочки не оказывает влияния. При высушивании она гибнет через 1-2 недели, гниение губит ее через 14-25 суток. Возбудитель чувствителен к дезинфицирующим средствам.

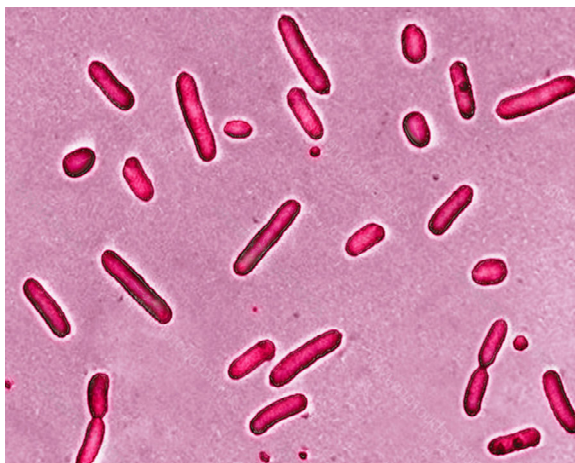


Рисунок 53 – *Burkholderia mallei*

Туляремия – природно-очаговая трансмиссивная инфекционная болезнь животных, грызунов, пушных зверей, сельскохозяйственных животных (чаще овец). Человек очень восприимчив к этому заболеванию. Проявляется геморрагической септициемией, лихорадкой, диареей, истощением, лимфаденитом, а также симптомами поражения нервной системы.

Возбудитель – *Francisella tularensis* – аэробная неподвижная с нежной капсулой грамотрицательная палочка (рис. 54).

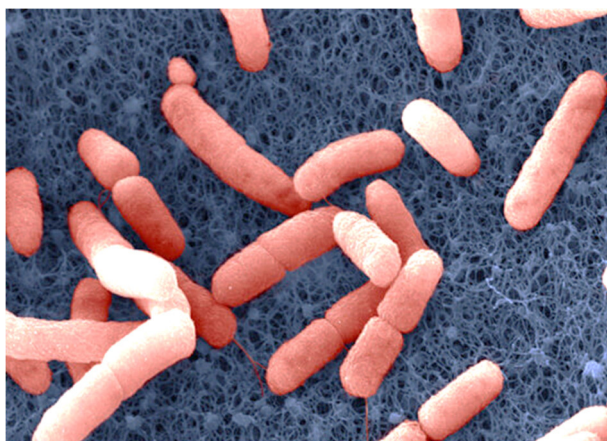


Рисунок 54 – *Francisella tularensis*

Возбудитель довольно устойчив по отношению к различным физическим и химическим факторам. В воде сохраняется до 90 суток, в шкуре различных грызунов до 45 суток, в охлажденном мясе до 35 суток, в замороженном – до 75 суток. Нагревание до 60 °С убивает его за 5 минут, до 100 °С – за несколько секунд. Человек заражается при контакте с больными животными или через продукты переработки (мясо, шкурки и др.).

Столбняк – раневая токсическая неконтагиозная инфекционная болезнь, проявляющаяся судорожным тоническим сокращением мышц (преимущественно разгибателей), обусловленным действием токсина возбудителя. Болезнь поражает сельскохозяйственных и диких животных всех видов, но наиболее чувствительны лошади, мелкий рогатый скот, а также человек. Возбудитель – *Clostridium tetani*, анаэробная спорообразующая тонкая подвижная палочка (рис. 55).



Рисунок 55 – *Clostridium tetani*

Споры округлой или овальной формы с видом барабанной палочки. Вегетативные формы столбнячной палочки слабоустойчивы – кипячение убивает их в течение 5 минут. Споры обладают исключительно высокой резистентностью, они выдерживают кипячение в течение

1-3 ч., а нагревание до 115 °С – в течение 5 минут. В почве, навозе сохраняются многие годы. Возбудитель вырабатывает наиболее сильный из известных ядов микробного происхождения, уступая лишь ботулинистическому токсину.

Контагиозная плеввропневмония крупного рогатого скота – контагиозное заболевание, характеризующееся фибринозным (крупозным) воспалением легких, сопровождающееся повышением температуры до 41-42 °С, потерей аппетита и жвачки, затрудненным дыханием и кашлем (вначале слабым сухим, а затем частым, влажным, болезненным). При хроническом течении болезни у животных наблюдают исхудание, слабость, кашель с выбрасыванием гнойных хлопьев, обширные отеки. Болезнь широко распространено в Африке, встречается в странах Южной Европы, Ближнего Востока и в Азии. К нему восприимчивы крупный рогатый скот, буйволы, яки и зебу. Дикие жвачные и верблюды к заболеванию устойчивы.

Возбудитель – *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides SC* (бычий биотип) (рис. 56).

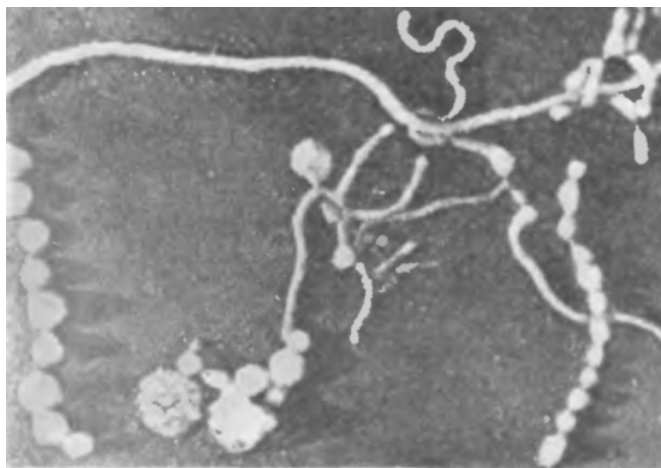


Рисунок 56 – *Mycoplasma mycoides* под электронным микроскопом (увеличение $\times 20000$)

Известен только один антигенный тип. Возбудитель чувствителен к кислой среде. Нагревание до 58 °С инактивирует его в течение 1 часа, в соленом растворе до

45 °С – за 120 минут, при 45 °С в лимфе он погибает за 240 минут, при 60 °С – за 2 минуты. В крови и паренхиматозных органах он сохраняется до 5-6 месяцев. Низкие температуры (замораживание) консервируют его (в кусках замороженного гепатизированного легкого возбудитель сохраняется от 3 до 12 месяцев).

Инфекционная энтеротоксемия овец – это заболевание, протекающее весьма остро, при коматозных или судорожных явлениях, и сопровождающееся высокой летальностью. Болезнь встречается у животных всех возрастов. Возбудитель болезни вызывается токсинами микроорганизмов *Cl. perfringens* типов С и Д, бурно размножающихся в кишечнике (рис. 57).

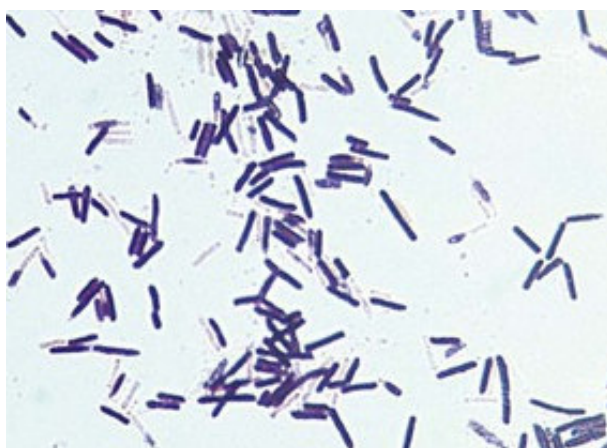


Рисунок 57 – *Clostridium perfringens*

Микробы имеют вид коротких неподвижных палочек, в организме и на питательных средах образуют капсулы, во внешней среде – споры. Кипячение убивает споры через 15–20 минут. Споры в почве сохраняются 16–20 месяцев, на поверхности шерсти, в шкуре – более 2 лет.

Брадзот овец – остро протекающая неконтагиозная болезнь, характеризующаяся геморрагическим воспалением сычуга и двенадцатиперстной кишки, тяжелой интоксикацией и гибелью животных.

Возбудитель болезни *Cl. septicum* является строгим анаэробом, имеет вид палочки с закругленными концами, капсул не образует, выделяет сильный экзотоксин и гемолизин (рис. 58).

В присутствии кислорода воздуха образует споры, устойчивые во внешней среде к воздействию физических и химических факторов: выдерживают кипячение до 60 минут, в почве выживает годами.

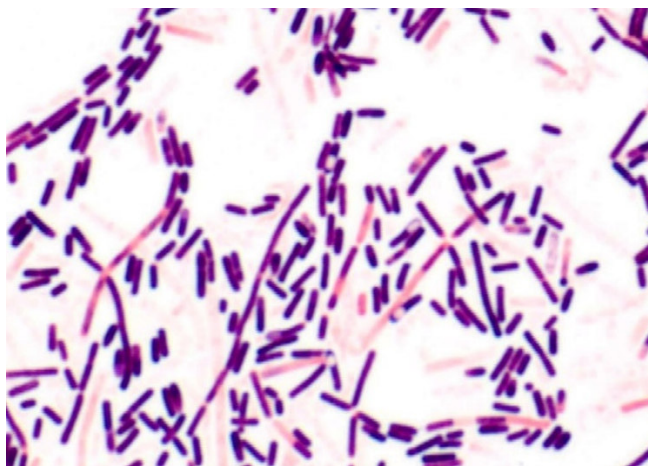


Рисунок 58 – *Clostridium septicum*

Задание к лабораторной работе

1. Изучите коллекционные фиксированные микропрепараты возбудителей рассмотренных инфекций.
2. Сделайте зарисовки возбудителей инфекционных заболеваний.
3. Заполните таблицу в рабочей тетради.

Характеристика возбудителей бактериальных инфекций, при которых убой животных для пищевых целей запрещен

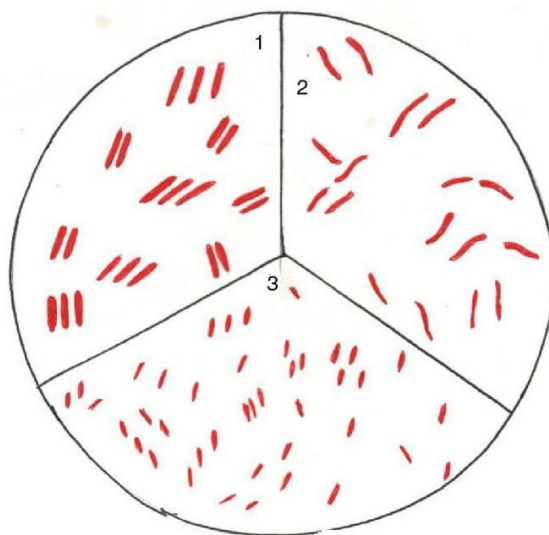
Наименование заболевания	Возбудитель	Морфология возбудителя	Тинкториальные свойства	Экология возбудителя

Лабораторная работа №11

Возбудители инфекций, при которых убой животных для пищевых целей разрешен

Туберкулез – хроническая инфекционная болезнь, характеризующаяся образованием в различных органах и тканях специфических узелков – туберкулов, склонных к творожистому распаду и обызвествлению. Восприимчивы к туберкулезу домашние и дикие животные, птицы и человек.

Возбудитель туберкулеза относится к микроорганизмам рода микобактерий (рис. 59).



Возбудитель туберкулеза:
I – *Mycobacterium tuberculosis*, II – *Mycobacterium avium*,
III – *Mycobacterium bovis* (окраска по Цель – Нильсену).

Рисунок 59 – Схематическое изображение возбудителей туберкулеза

Наибольшее значение в патологии животных и человека имеют три основных вида микобактерий: человеческий (*M. tuberculosis*), бычий (*M. bovis*), птичий (*M. avium*). Крупный рогатый скот более восприимчив к бактериям бычьего вида и менее – к бактериям человеческого и птичьего видов. Свиньи могут заражаться туберкулезом, вызываемым бактериями всех трех видов, но весьма редко человеческим. Овцы, козы и лошади относительно устойчивы к туберкулезу. Человек восприимчив в основном к бактериям человеческого вида, но может заражаться и бактериями двух других видов.

Возбудители трех основных типов по морфологии и культуральным свойствам близки между собой. Они имеют форму тонких, слегка изогнутых неподвижных палочек, спор и капсул не образуют. Микробы кислотоустойчивы, строгие аэробы, растут медленно и только на специальных средах. Туберкулезные бактерии содержат жировосковые вещества, которые придают им высокую устойчивость. Так, воздействие минусовых температур не оказывает вредного влияния на их жизнеспособность. В насыщенном растворе поваренной соли сохраняют жизнеспособность до 3 месяцев и более, в замороженном мясе – до года, в соленом – 45–60 суток, в сливочном масле – 45, в сыре – до 100 суток, в молоке – 10 суток, в воде – 5 месяцев, в почве – 7 месяцев. В вареной колбасе туберкулезная палочка погибает только в процессе варки при температуре не ниже 90–95°C в течение 1 часа. При диаметре батона 5–8 см – через 1,5 часа, при запекании в колбасном хлебе массой 2 кг – при достижении температуры внутри батона не ниже 85°C и температуре печи не ниже 120–130 °C.

Бруцеллез – инфекционная хронически протекающая болезнь домашних, диких животных, человека. Человек заражается при контакте с бруцеллезными животными и их продуктами, а также при употреблении в пищу необезвреженного мяса, молока, молочных продуктов от бруцеллезных животных. У крупного рогатого скота болезнь проявляется абортами, задержанием последа, эндометритами, маститами. У овец, коз, свиней и других животных наблюдаются артриты карпальных, путовых и других суставов. У самцов, кроме того, орхиты, эпидидимиты.

Возбудитель – бактерии рода *Brucella* (*Br. abortus*, *Br. suis*, *Br. melitensis* и др.). Это маленькая овальная аэробная бактерия кокковидной формы, неподвижная, спор не образует, грамотрицательная, хорошо красится анилиновыми красками (рис. 60).



Рисунок 60 – Бактерии рода Brucella

Бруцеллы устойчивы по отношению к различным факторам внешней среды: к нагреванию во влажной среде чувствительны – гибнут при 70 °С через 10 минут, при 100 °С – моментально. В охлажденном молоке, сливках микроб сохраняется до 4–7 суток, в сырах, масле, брынзе – до 67 суток, в соленом мясе – до 3 месяцев, в замороженном мясе – до 5 месяцев. В сырокопченых колбасах, приготовленных из мяса, содержащего бруцеллы, возбудители погибают в короткое время (до 3 недель). В техническом животном сырье (шкуры, шерсть), особенно от овец и коз, бруцеллы могут сохранять жизнеспособность до 1,5–4 месяцев.

Лептоспироз – инфекционная природно-очаговая болезнь многих видов животных, в том числе и птиц, проявляющаяся лихорадкой, гемоглобинурией, желтушным окрашиванием и некрозами слизистых оболочек и кожи, атонией желудочно-кишечного тракта, абортами и маститами. Лептоспирозом в естественных условиях болеют крупный рогатый скот, овцы, свиньи, лошади, а также куры. К лептоспирозу восприимчив человек. Резервуар инфекции – грызуны. Человек заражается через воду и реже через мясо, молоко от больных животных, а также инфицированных грызунов; может заразиться при убое и разделке туш больных и переболевших лептоспирозом животных.

Возбудитель – лептоспиры различных серологических вариантов, обладающие активной подвижностью (рис. 61).

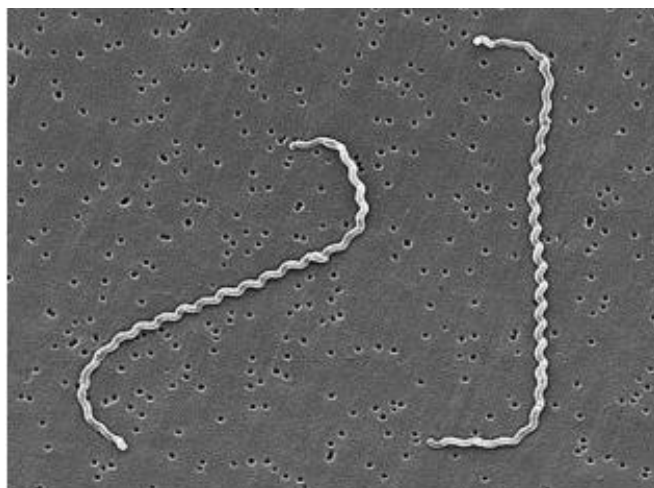


Рисунок 61 – Бактерии рода *Leptospira*

Устойчивость лептоспир по отношению к различным физическим и химическим агентам относительно небольшая. При нагревании до 100°C они погибают моментально. К низким температурам лептоспиры, напротив, устойчивы, сохраняя жизнеспособность в течение нескольких месяцев. В засоленном (содержание соли не менее 4,8%) мясе крупного рогатого скота лептоспиры погибают через 10 дней. На поверхности сырого мяса они выживают при 16–20 °C в течение 30 минут, а при 4–5 °C – 2 часа. На поверхности вареного мяса соответственно в течение 2 и 4 часов.

Актинобациллез – хроническая инфекционная болезнь, которая характеризуется лимфаденитами и лимфангитами в области головы и шеи. Актинобациллез выявляется у животных в зонах с обильными атмосферными осадками и умеренно высокой среднегодовой температурой. Наиболее часто актинобациллез диагностируют у молодняка крупного рогатого скота и у овец. Возбудитель – гриб *Actinomyces lignieresii* (рис. 62).

В содержимом гранулем представляет собой скопление коккоподобных клеток или палочек. Возбудитель грамотрицательный, спор и капсул не образует. Неустойчив: быстро погибает при нагревании до 50 °C, солнечные лучи убивают через 15 дней, в помещениях сохраняется до 40 суток.



Рисунок 62 – *Actinomyces lignieresii*

Листерия – природноочаговая зооантропонозная инфекционная болезнь, протекающая с признаками поражения центральной нервной системы или в виде общего лихорадочного заболевания с последующим образованием во внутренних органах гранул. Болезнь выявляют чаще у молодых животных. У овец листериоз может иметь массовый характер с высокими показателями падежа. Источником возбудителя инфекции являются больные и переболевшие животные, а резервуаром – грызуны и дикие животные. Болезнь регистрируют в разных регионах у овец, коз, телят, свиней, лошадей, кроликов, птицы, грызунов, диких животных. Болеет и человек. Установлено, что у переболевших животных длительное время сохраняется листерионосительство. Носительство листерий у овец, свиней и других видов сельскохозяйственных животных продолжается около 30 дней, у грызунов – до 260 дней. Однако при маститах листериозной этиологии возбудитель выделяется с молоком у овцематок до 90 дней, у коров – до 300 дней.

Возбудитель листериоза (*Listeria monocytogenes*) представляет собой аэробную грамположительную палочку, похожую на палочку рожи свиней (рис. 63).

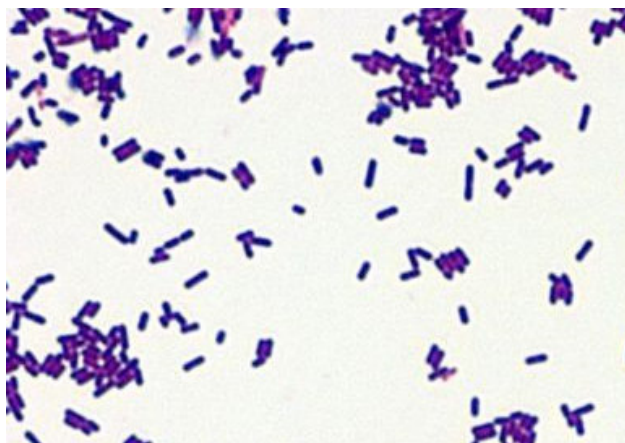


Рисунок 63 – *Listeria monocytogenes*

Спор и капсул возбудитель не образует, в молодых культурах подвижен. Устойчивость возбудителя к различным факторам внешней среды сравнительно высокая. Во внешней среде листерии сохраняются жизнеспособными до 3-4 месяцев, в почве – до 600 дней, на загрязненных поверхностях – 1–3 месяца. В охлажденном и замороженном мясе или в колбасных изделиях количество жизнеспособных листерий снижается, но полного отмирания возбудителя не происходит. В мясе и шкурах, консервированных хлористым натрием, возбудитель листериоза сохраняется до 60 суток и более. В отличие от других микроорганизмов листерии размножаются даже на мертвых субстратах, в том числе в не высушенных пищевых продуктах. В связи с этим в 1987 г. листериоз признан как пищевая инфекция. Заражение человека возможно через необезвреженные продукты, при контакте с больными животными и проявляется признаками сепсиса, у беременных поражением плода, высокой летальностью при нервной форме.

Пастереллез (геморрагическая септицемия) – инфекционная болезнь многих видов млекопитающих и птиц, характеризующаяся при остром течении симптомами септицемии, при подостром и хроническом – преимущественным поражением легких. Описаны случаи заболевания пастереллезом человека.

Возбудитель – *Pasteurella multocida* – небольшая грамотрицательная неподвижная и не образующая спор бактерия (рис. 64).

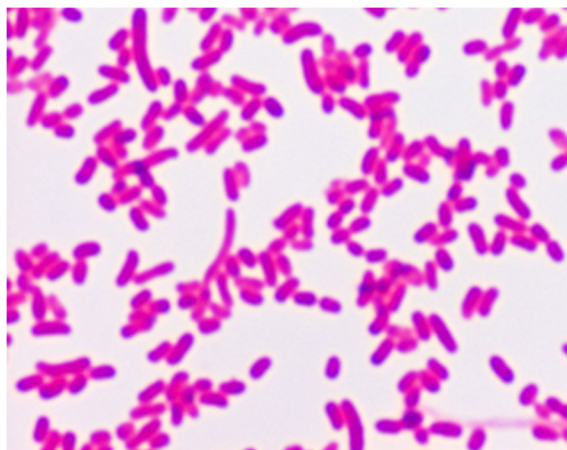


Рисунок 64 – *Pasteurella multocida*

Это факультативный аэроб, хорошо растущий на обычных питательных средах при 37 °С. В антигенном отношении *P. multocida* неоднородна, имеет 4 капсульных серотипа (А, В, Д, Е) и 12 соматических типов. В этиологии пастереллеза, особенно крупного рогатого скота и овец, играет роль и *P. haemolytica*. Устойчивость пастерелл невысокая, в естественных условиях они сравнительно быстро погибают. В навозе, воде пастереллы остаются жизнеспособными в течение 2-3 недель, в замороженных тушках птиц – в течение года. Нагревание до 70°С убивает пастерелл в течение 5–6 минут, кипячение – немедленно.

Стрептококкоз – инфекционная болезнь молодняка всех видов сельскохозяйственных животных, чаще телят и ягнят, реже поросят и жеребят, проявляющаяся при остром течении септициемией, а при подостром и хроническом – поражением легких, суставов, глаз и других органов. Наиболее восприимчивы животные в возрасте от 15 суток до 2,5 месяцев. Болезнь проявляется спонтанно или в виде небольших энзоотических вспышек. Возбудитель относится к семейству грамположительных кокков – стрептококков (рис. 65).

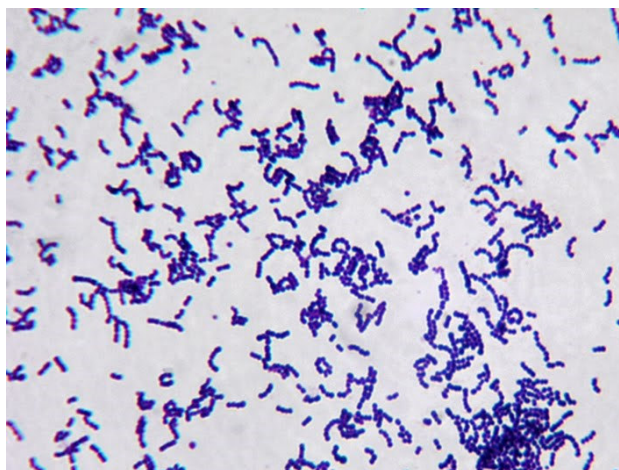


Рисунок 65 – Препарат стрептококков

В мазках из свежего патологического материала, окрашенных анилиновыми красками, стрептококки чаще расположены парами, но встречаются цепочки и отдельные экземпляры. Микробы неподвижны, хорошо растут на питательных средах с добавлением сыворотки или крови и на полужидком агаре с мальтозой. Температура 55 °С убивает их в течение 10 минут, кипячение – моментально.

Аденоматоз – медленно развивающаяся инфекционная болезнь, характеризующаяся длительным инкубационным периодом, безлихорадочным затяжным течением, метаплазией и прогрессирующим разрастанием эпителия альвеол и бронхиол, что обуславливает образование в легких железистоподобных опухолей (аденом, аденокарцином) разной величины. В настоящее время аденоматоз регистрируется во многих странах мира. К заболеванию восприимчивы лошади, ослы, крупный рогатый скот, козы, олени, кролики и другие животные. Подобная болезнь наблюдается и у человека.

Возбудителем аденоматоза является ретровирус, который чувствителен к нагреванию до 56 °С и выше, гибнет в кислой среде (рН=3), сохраняет жизнеспособность при минус 20 °С в течение 18–52 месяцев.

Рожь свиней – природноочаговая инфекционная болезнь, преимущественно свиней в возрасте от 3 до 12 месяцев, характеризующаяся при остром и подостром течениях септициемией и воспалительной эритемой кожи, а при

хроническом – дерматитом, бородавчатым или язвенным эндокардитом и серозно-фибринозными артритам. Заболевать рожей, кроме свиней, могут другие виды животных и птиц, а также человек. У людей болезнь протекает чаще доброкачественно, в редких случаях возбудитель рожи вызывает у человека нефрит и эндокардит.

Возбудитель – *Erysipelothrix rhusiopathiae* (рис.66). Это тонкая нежная прямая или слегка изогнутая палочка, неподвижная, грамположительная, спор и капсул не образует и не имеет жгутиков.

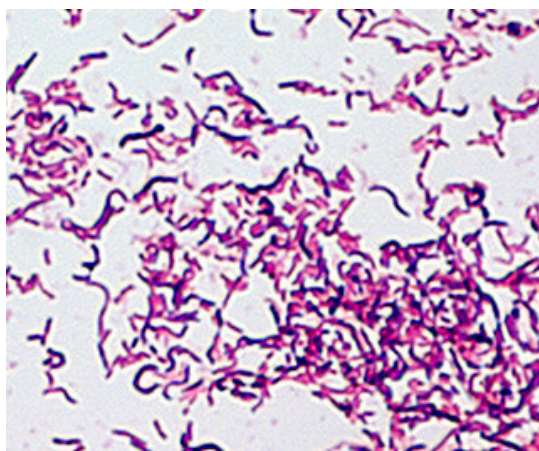


Рисунок 66 – *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Устойчивость бактерий во внешней среде очень высокая, что объясняется наличием на их оболочке восколипидных веществ. Они способны в течение трех недель переносить высушивание, до нескольких месяцев – замораживание; в почве и воде сохраняются до нескольких месяцев. Копчение и посолка, а также жарение не обезвреживают мясо, полученное от больных животных. При температуре +50 °С возбудитель погибает в течение 20 минут, при +70 °С за 5 минут, при +100 °С за 1 минуту.

Инфекционный атрофический ринит свиней – это хроническое респираторное заболевание, характеризующееся серозногнойно-некротическим ринитом, которое сопровождается деформацией лицевых костей и нарушением нормального прикуса. Наиболее восприимчивы поросята сосуны, у которых болезнь сопровождается пневмонией.

Возбудитель. В разные периоды были разные представления о причине болезни (наследственная, инфекционная, инфекционно-генетическая и др.). В настоящее время большинство исследователей считает, что основным возбудителем инфекционного атрофического ринита, имеющим этиологическое начало, является *Bordetella bronchiseptica* (рис. 67).

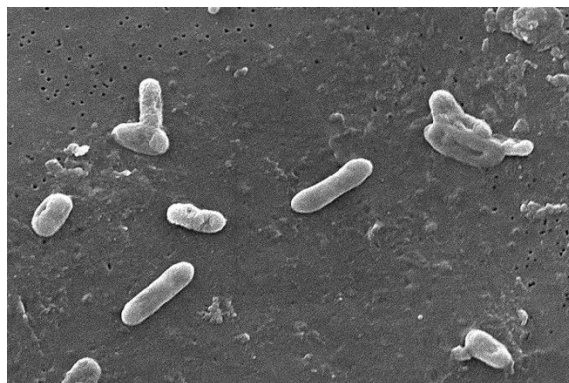


Рисунок 67 – *Bordetella bronchiseptica* под электронным микроскопом

Способствует развитию и проявлению заболевания *Pasterella multocida*. *B. bronchiseptica* – небольшая подвижная грамотрицательная палочка, спор и капсул не образует. Очень близка в таксономическом отношении к возбудителю коклюша у детей. Передается в основном воздушным путем – это типичная респираторная инфекция. Чувствителен к тетрациклину и сульфаниламидным препаратам. В животноводческих помещениях сохраняет жизнеспособность до 15 дней. Замораживание консервирует его до 4 месяцев.

Гемофилезный полисерозит (болезнь Глессера) – респираторное заболевание, сопровождающееся фибринозно-воспалительными процессами в серозных оболочках, а также серозно-фибринозным воспалением перикарда и суставов. Болеют свиньи младших возрастов.

Возбудитель – *Haemophilus parasuis* из семейства Brucellaceae – мелкая неподвижная грамотрицательная аэробная палочка, окружена капсулой, спор не образует,

обладает выраженным тропизмом к серозным оболочкам (рис. 68).

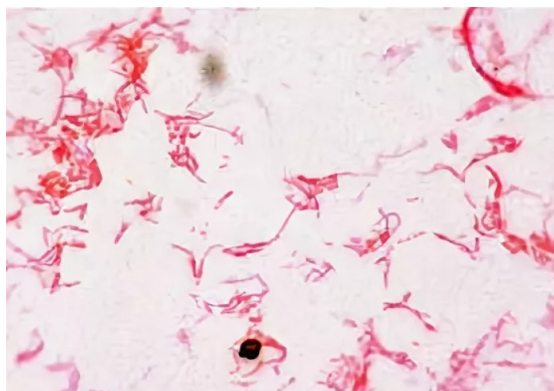


Рисунок 68 – *Haemophilus parasuis*

Хранение мяса, обсемененного возбудителем, в холодильнике при температуре +2-4 °С в течение 10 суток или в морозильной камере при температуре минус 18 °С в течение 97 дней не приводит к инаktivации возбудителя. Обеззараживание достигается после переработки мяса на вареные колбасные изделия при температуре внутри батона 75 °С.

Гемофилезная (актинобациллярная) плевропневмония свиней – инфекционная контагиозная болезнь свиней, характеризующаяся при остром течении геморрагическим воспалением легких и фибринозным плевритом, а при подостром и хроническом течениях – развитием очаговой гнойной некротизирующей плевропневмонии и фибринозным плевритом. Возбудитель – гемофилезные бактерии – *Haemophilus pleuropneumonia* (рис. 69).



Рисунок 69 – *Haemophilus pleuropneumonia*

Это грамотрицательные неподвижные коккобактерии и палочки. Спор не образуют, обладают выраженным тропизмом к легочной ткани. Хранение охлажденного мяса при температуре 4 °С не вызывает гибели возбудителя в течение 15 дней, в замороженном мясе он сохраняется в течение 6 месяцев. Общепринятые режимы изготовления вареных колбас (при достижении температуры +70 °С внутри батона) действуют на возбудителя губительно.

Некробактериоз – это хроническая инфекционная болезнь, характеризующаяся у животных и птиц язвенно-некротическими поражениями кожи и слизистых оболочек, а в ряде случаев – генерализацией процесса с поражениями внутренних органов (печень, легкие, почки, сердце) и серозных покровов; у человека – абсцессами на коже рук, в полости рта, легких.

Возбудитель некробактериоза *Fusobacterium necrophorum* – анаэробная бесспоровая неподвижная грамотрицательная палочка, малоустойчивая по отношению к физическим и химическим факторам (рис. 70).

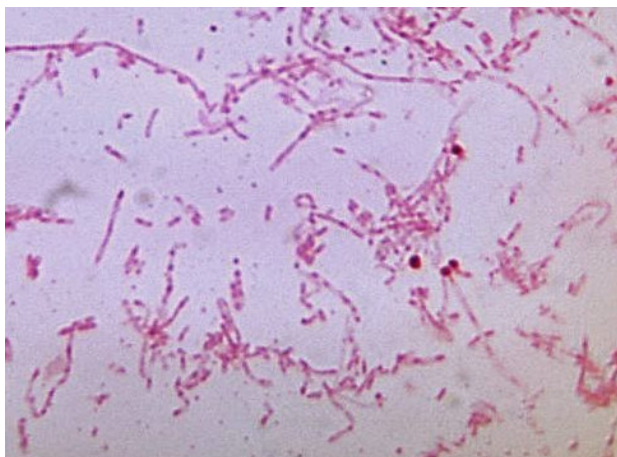


Рисунок 70 – *Fusobacterium necrophorum*

При 100 °С погибает через 1 мин., а при 60 °С – через 30 мин. При комнатной температуре сохраняется в течение месяца, под воздействием прямых солнечных лучей погибает через 8–10 ч., при высушивании на воздухе – через 24–48 ч., на поверхности почвы – 10–30 сут.

Задание к лабораторной работе

1. Изучите коллекционные фиксированные микропрепараты возбудителей рассмотренных инфекций.

2. Сделайте зарисовки возбудителей инфекционных заболеваний.

2. Заполните таблицу в рабочей тетради.

Характеристика возбудителей бактериальных инфекций, при которых убой животных для пищевых целей разрешен

Наименование заболевания	Возбудитель	Морфология возбудителя	Тинкториальные свойства	Экология возбудителя

Лабораторная работа №13

Иммунодиагностика основных инфекционных заболеваний животных (2 часа)

Иммунологическая диагностика инфекционных заболеваний основана на выявлении антител в организме пациента к возбудителю инфекции методами серологических исследований.

В основе всех серологических реакций лежит взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунных комплексов, которые можно обнаружить в тестах *in vitro*. Серологические реакции применяются в двух направлениях.

1. Обнаружение с диагностической целью антител в сыворотке крови обследуемого. В этом случае из двух компонентов реакции (антитела, антиген) неизвестным является сыворотка крови. Постановка реакции проводится

с заведомо известными антигенами (диагностикумами). Положительный результат реакции свидетельствует о наличии в крови антител, гомологичных применяемому антигену; отрицательный результат указывает на отсутствие таковых. Достоверные результаты получают при исследовании “парных” сывороток крови больного, взятой в первые дни болезни и через разные промежутки времени от начала заболевания. В этом случае удастся наблюдать динамику нарастания антител. При вирусных инфекциях лишь четырехкратное и большее повышение титра антител во второй сыворотке имеет диагностическое значение.

2. Установление родовой, видовой и типовой принадлежности микроба или вируса. В этом случае неизвестным компонентом реакции является антиген. Для этой цели используются диагностические иммунные сыворотки, полученные от животных после вакцинации соответствующими антигенами. Это серологическая идентификация микроорганизмов. При инфекционных заболеваниях серологические исследования для обнаружения специфических антител являются более доступным методом лабораторной диагностики, чем бактериологическое выявление возбудителя. В ряде случаев серологические исследования являются единственным методом диагностики инфекционных заболеваний.

Серологические реакции протекают *in vitro* в две фазы:

1) специфическая – фаза взаимодействия, в которой происходит комплементарное соединение активных центров антител и эпитопов антигена. Обычно эта фаза длится несколько секунд или минут;

2) неспецифическая – фаза проявления, характеризуется внешними признаками образования иммунных комплексов. Эта фаза может развиваться от нескольких минут до нескольких часов.

Реакции антиген-антитело в системе *in vitro* могут сопровождаться возникновением нескольких феноменов –

агглютинации, преципитации, лизиса. Внешние проявления реакции зависят от физико-химических свойств антигена (размеры частиц, физическое состояние), класса и вида антител (полные и неполные), а также условий опыта (консистенция среды, концентрация солей, рН, температура).

Характер и выраженность реакции зависят от количественного соотношения антигенов и антител. Наиболее интенсивно реакции проявляются в том случае, если реагенты находятся в эквивалентном соотношении. Агрегаты, способные выпадать в осадок, образуются при соединении антигенов с полными антителами. Неполные антитела (моновалентные) не вызывают образования сетевых структур и крупных агрегатов. Для выявления таких антител используются специальные методы, основанные на использовании антииммуноглобулинов. Серологические реакции, благодаря высокой специфичности и чувствительности, применяют для выявления и количественного определения антигенов и антител.

Реакции серологической диагностики

Реакцией **агглютинации** называют склеивание и осаждение корпускулярных антигенов под влиянием специфических антител. Эта реакция происходит только в присутствии электролитов и проявляется в появлении видимых невооруженным глазом зерен или хлопьев. У безжгутиковых бактерий, имеющих только соматический О-антиген, происходит склеивание непосредственно самих микробных клеток и агглютинация имеет тонкозернистый характер. Эта форма агглютинации (О-агглютинация) протекает медленно, в течение 18-24 часов при температуре 37°C. При наличии у бактерий жгутикового антигена (Н-антигена) клетки склеиваются жгутиками, при этом образуются крупные рыхлые хлопья и реакция протекает значительно быстрее – в течение 2 часов при температуре 37°C.

Ингредиентами для реакции агглютинации являются:

- 1) антиген в виде взвеси живых или убитых (диагностикум) микробных клеток,
- 2) антитела – агглютинины в сыворотке больного или полученные путем искусственной иммунизации животных соответствующими антигенами,
- 3) электролит в виде изотонического раствора хлорида натрия, которым пользуются для разведения сыворотки и антигена.

Существует несколько методов постановки реакции агглютинации. Наиболее распространенными методами являются: развернутая реакция агглютинации, которая ставится в пробирках с различными разведениями сывороток, реакция агглютинации на стекле и реакция непрямой гемагглютинации.

Для постановки реакции *непрямой гемагглютинации* (РНГА) бактериальный антиген, извлеченный из микробных клеток, адсорбируют на эритроцитах. Эритроцитарный антиген для постановки РНГА изготавливается производственными институтами. РНГА является весьма чувствительной реакцией и в последнее время находит все более широкое применение в диагностике инфекционных заболеваний.

Реакцией агглютинации широко пользуются с диагностическими целями в двух направлениях: а) для определения вида микроба, выделенного от больного, или из внешней среды, б) для обнаружения антител в сыворотке больного. В первом случае неизвестный антиген (микроб) определяют по известному антителу. Реакция агглютинации, применяемая для определения природы антигена по заведомо известным агглютинином в иммунной агглютинирующей сыворотке, называется реакцией агглютинации по идентификации микроба или реакцией агглютинации идентификации.

Положительный результат реакции указывает на то, что неизвестный микроб идентичен тому, который был взят в качестве антигена при приготовлении иммунной сыворотки.

Так, например, если культура, выделенная от больного с подозрением на брюшной тиф, дает положительную реакцию агглютинации с диагностической агглютинирующей брюшнотифозной сывороткой, значит, выделенный микроб является брюшнотифозной палочкой.

Для обнаружения антител, которые появляются в сыворотке больного в результате развития инфекционного заболевания, необходимо располагать известным антигеном в виде взвеси живой культуры бактерий или диагностикума. Например, для диагноза брюшного тифа широко применяют реакцию Видаля, для постановки которой у больного с подозрением на брюшной тиф берут кровь и с полученной сывороткой ставят реакцию агглютинации с брюшнотифозным диагностикумом. Положительная реакция укажет на наличие в исследуемой сыворотке антител к возбудителю брюшного тифа.

Для постановки диагностических реакций агглютинации выпускают специальные препараты – диагностические агглютинирующие сыворотки и диагностикумы.

Диагностические сыворотки готовят путем иммунизации животных (кролики, лошади) соответствующими антигенами. Полученные от иммунизированных животных сыворотки титруют (титром агглютинирующей сыворотки считают наибольшее ее разведение, дающее реакцию агглютинации), к ней прибавляют консервант и в стерильных условиях разливают в ампулы. Сыворотки выпускают в жидком и сухом виде.

Диагностикумы (антигены) представляют собой взвесь убитых бактерий определенного вида. Например, брюшнотифозный диагностикум – это взвесь убитых брюшнотифозных бактерий, сыпнотифозный – взвесь убитых риккетсий Провачека и др.

Ориентировочную реакцию агглютинации ставят на предметном стекле с небольшими разведениями сыворотки (1:10, 1:20). В капле разведенной сыворотки растирают петлей небольшое количество суточной культуры, выросшей на МПА, или вносят каплю бульонной культуры. При постановке ориентировочной реакции также следует ставить контрольную реакцию – антиген + физиологический раствор. Контроль ставят для исключения спонтанной агглютинации, которая возникает при применении недоброкачественных диагностикумов или живых культур, находящихся в R-форме. Учет результатов ориентировочной агглютинации производят через 3-5 минут после ее постановки.

Для постановки развернутой реакции агглютинации агглютинирующую сыворотку разводят физиологическим раствором, начиная с разведения 1:500. Из исходного разведения готовят ряд двукратных разведений (1:1000, 1:2000, 1:4000 и т.д.) до титра сыворотки, указанного на этикетке ампулы. Разведения сыворотки разливают в три ряда пробирок, каждое разведение в объеме 1 мл. Последняя пробирка каждого ряда должна содержать 1 мл физиологического раствора (контроль). Во все разведения первого ряда, включая контрольную пробирку, прибавляют по две капли специфического диагностикума (брюшнотифозного), в пробирки второго ряда – паратифозный В диагностикум и в пробирки третьего ряда – дизентерийный. После встряхивания штативы с пробирками помещают на 2 часа в термостат при температуре 37 °С, а затем выдерживают в течение суток при комнатной температуре. Через 2 часа, так как происходит Н-агглютинация, можно произвести предварительный учет результатов невооруженным глазом или при помощи агглютиноскопа. Окончательный результат регистрируют на следующие сутки.

При наличии агглютинации на дне пробирки появляется хлопьевидный осадок (рис. 71).

Степень реакции оценивается крестами:

++++ – полная агглютинация, жидкость прозрачна, большой хлопьевидный осадок,
 при встряхивании крупные, легко разбивающиеся хлопья;
 +++ – жидкость прозрачна, сильно выраженный осадок, при встряхивании хлопья меньшей величины;
 ++ – жидкость не вполне прозрачна, небольшой осадок, мелкие хлопья;
 + – очень слабая агглютинация, различимая при помощи агглютиноскопа или лупы;
 - – отсутствие агглютинации, жидкость равномерно мутна.

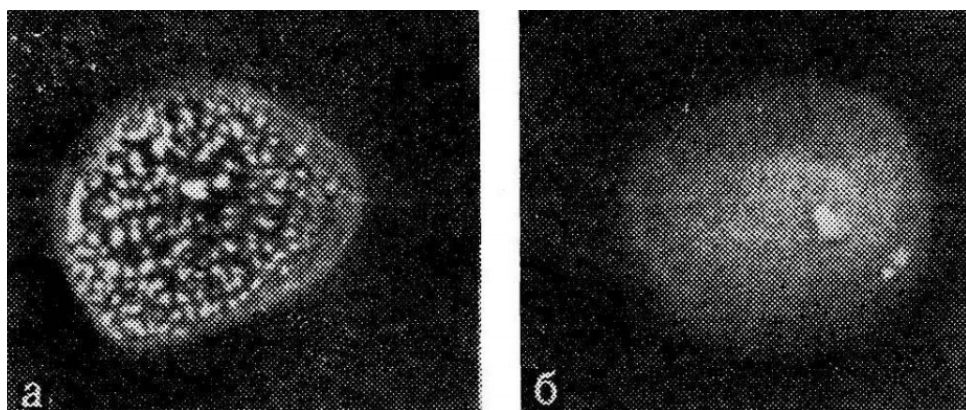


Рисунок 71 – Реакция агглютинации на предметном стекле:
 а – агглютинация, б – отсутствие агглютинации

Реакцию агглютинации следует записать. Если реакцию агглютинации ставят с сывороткой больного, то, как правило, титр не бывает высоким (1:400 – 1:1000).

приготавливаемые путем гипериммунизации животных иммунные агглютинирующие сыворотки обычно имеют очень высокие титры (1:10 000 – 1:20 000 и выше).

Развернутая реакция агглютинации дает возможность не только установить наличие антител в сыворотке, но и определить их количество (титр).

Преципитацией называется явление осаждения антигена из раствора под действием специфических антител, носящих название преципитинов. В качестве антигенов для реакции преципитации используют экстракты из различных субстратов (органы павших животных, пищевые продукты и пр.), а также бактериальные культуры после дезинтеграции их различными методами. Для разрушения бактериальной клетки используют механическое растирание их со стерильным песком, замораживание и оттаивание, действие ультразвука, воздействие протеолитических ферментов, автолиз, высушивание в ацетоне, кипячение.

В отличие от реакции агглютинации, антиген в реакции преципитации имеет характер коллоидного раствора с частицами ультрамикроскопической величины. В реакцию преципитации могут вступать не только белковые антигены, но также глюколипоидные комплексы и другие неполноценные антигены (гаптены). Характерной особенностью преципитиногена микробного происхождения является его высокая термоустойчивость, позволяющая ему выдерживать длительное нагревание при 100°C , а иногда и более высокую температуру.

В микробиологической практике реакция преципитации применяется обычно для определения природы антигена. Высокая специфичность и чувствительность реакции дает возможность обнаружить ничтожно малые количества антигена (1:100 000).

Обязательным условием для реакции преципитации является прозрачность антигена и сыворотки.

Реакция преципитации нашла широкое применение в судебно-медицинской практике для определения видовой принадлежности крови.

Существует несколько методов постановки реакции преципитации: кольцепреципитация, диффузная преципитация в геле и др.

Реакцию кольцепреципитации ставят в специальных узких (преципитационных) пробирках, в которые наливают 0,5 мл преципитирующей сыворотки, а затем осторожно при помощи пастеровской пипетки наслаивают соответствующий антиген. Оба ингредиента должны быть абсолютно прозрачными. При положительной реакции сразу или в течение 5 минут на границе обеих жидкостей образуется помутнение в виде кольца.

Реакцию преципитации следует рассматривать на темном фоне. Опыт сопровождается двумя контролями:

1) преципитирующая сыворотка + физиологический раствор;

2) нормальная сыворотка + исследуемый антиген.

В контролях преципитата быть не должно.

При постановке реакции диффузной преципитации в геле – преципитирующая сыворотка и исследуемый антиген вносятся в лунки, приготовленные в агаровом, крахмальном или полиакриламидном блоке.

Диффундируя в толщу среды, антиген и антитела встречаются и образуют преципитат (рис. 72).

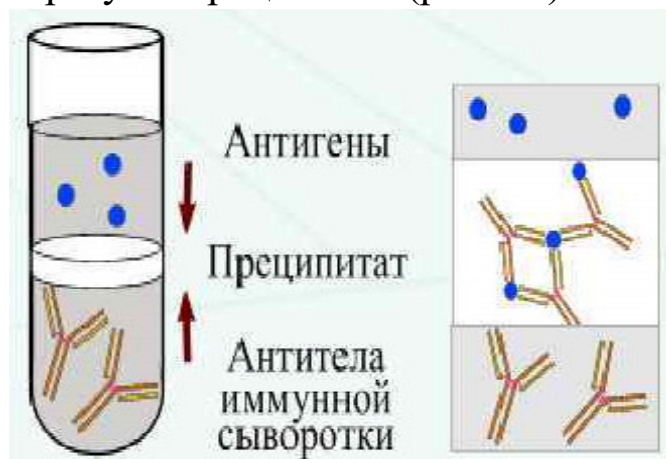


Рисунок 72 – Реакция преципитации

Метод диффузной преципитации очень широко используется в современной биохимии для изучения самых различных проблем.

Метод диффузной преципитации в геле позволяет детально изучить состав сложных антигенных смесей, одновременно определять антигены как общие для ряда субстратов, так и специфические только для данного объекта.

При преципитации, воспроизводимой в жидкой среде, образуется одно кольцо преципитации независимо от числа вступающих в реакцию пар антиген-антитело. В геле, где входящие в состав изучаемого экстракта антигены диффундируют навстречу соответствующим антителам с различной скоростью, точки эквивалентных соотношений между различными антигенами и соответствующими антителами располагаются в различных участках геля, где и образуются линии преципитации. Каждая из этих линий, следовательно, соответствует только одному комплексу антиген-антитело. Таким образом, сложные антигенные системы с помощью этого метода разлагаются на составные части.

Существует ряд методов диффузионной преципитации в геле. Наиболее распространенным является метод двойной диффузии в агаровом геле по Оухтерлони в чашках Петри или на пластинках. Первые результаты реакции можно учесть через 12 часов, однако обычно агаровые пластинки выдерживают до 2 недель. В зонах, где создаются оптимальные концентрации диффундирующих в гель антигена и антител, формируются линии преципитации. Если линии преципитации, относящиеся к двум антигенам, сливаются, то это свидетельствует об их полной серологической идентичности. Если же линии пересекаются, то это доказывает их полное антигенное различие – реакция неидентичности. Если образуется неполный перекрест и возникает так называемая шпора, это говорит о наличии как общих, так и частных антител – «реакция неполной идентичности».

Задание к лабораторной работе

1. Поставить реакцию агглютинации на стекле с культурой *Bacillus thuringiensis* с сыворотками различных серологических типов.
2. Поставить развернутую реакцию агглютинации с сывороткой, давшей положительный результат при ориентировочной пробе.
3. Произвести учет результатов развернутой реакции агглютинации и дать им оценку.

МЕТОДЫ ОКРАСКИ МИКРОПРЕПАРАТОВ

ПРОСТЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

Простая окраска позволяет обнаружить в микроскопируемом материале микробов, определить их количество, быстро изучить морфологические особенности микроорганизмов. Для этого применяют основные и нейтральные анилиновые красители. Для простой окраски используют только один краситель, чаще всего красного цвета - раствор фуксина (окраска 10–30 сек), фиолетового – генцианвиолет (окраска производится в течение 1-2 мин) или синего - метиленовый синий (окраска 3–5 мин). Препараты для окрашивания готовят на предметных стеклах, толщина которых не должна превышать 1,1–1,4 мм.

При окраске мазков пользуются растворами красок или красящей бумагой, предложенной А.И. Синевым. Для этого на высушенный и фиксированный препарат кладут красящую бумагу размером 2х4 см и наносят несколько капель воды. Продолжительность окрашивания мазка определяется методом окраски. По окончании окраски бумагу снимают пинцетом, мазок промывают водопроводной водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Окраска разведенным фуксином.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) феноловый фуксин Циля;
- 3) вода;
- 4) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 5) спиртовка.

Техника окраски:

На приготовленный на предметном стекле, фиксированный на пламени и остывший исследуемый препарат наливают/наносят на фильтровальную бумагу на 10-30 секунд разведенный (1:10) феноловый фуксин Циля. Затем препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Окрашивание метиленовым синим.

Способ метахроматического выявления воллютиновых зерен у коринебактерий и скоплений нуклеиновых соединений у бактерий.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) водно-спиртовой раствор метиленового синего;
- 3) спиртовка;
- 4) пипетка или фильтровальная бумага с краской;
- 5) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка.

Техника окраски:

На приготовленный, высушенный и фиксированный мазок наливают пипеткой водно-спиртовой раствор метиленового синего на 3–5 минут, после чего препарат смывают водой, высушивают и микроскопируют.

Оценка результата. Протоплазма бактерий окрашивается в голубой цвет, воллютиновые зерна – в темно-синий.

Окрашивание метиленовым синим по Леффлеру (метод Леффлера).

Метиленовый синий относится к основным красителям, то есть хромофором является катион. Благодаря этому краситель интенсивно связывается с ядерными компонентами клеток за счет образования комплекса с анионами ДНК и рибосомальной РНК бактерий. Присутствие щелочи в растворе усиливает взаимодействие клеточных компонентов (ДНК и РНК) с хромофором.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) вода для промывания мазков;
- 3) ванночка и рельсы для окраски препаратов – мазков;
- 4) спирт этиловый 96%-й для фиксации мазков;
- 5) спиртовка;
- 6) бактериологическая петля;
- 7) раствор метиленового синего по Леффлеру.

Техника окраски:

1. Исследуемый материал наносят на чистые обезжиренные предметные стекла, растирают его тонким равномерным слоем по поверхности стекла, высушивают на воздухе.

2. Препарат фиксируют 3 мин в 96 %-м этиловом спирте и высушивают.

3. На высушенный препарат наносят каплю 1%-го щелочного раствора метиленового синего по Леффлеру и окрашивают в течение 3–10 минут.

3. Промывают погружением в стакан с водопроводной водой.

4. Высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой.

Оценка результата. При правильном окрашивании в микроскопируемом препарате видны голубые бактерии на бесцветном или слабо голубом фоне.

СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

На препарат последовательно наносят определенные красители, различающиеся по химическому составу, цвету, спирты, кислоту и т.д. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать один вид микроорганизмов от других.

Метод окраски по Граму.

Метод разработал в XIX веке датский бактериолог Ханс Христиан Грам (Gram, 1884). Предлагая в 1884 г. свой метод окраски бактерий в срезах и препаратах – отпечатках из органов, он не оценил крупнейшего дифференциально-

диагностического значения этого метода, хотя указывал, что некоторые микроорганизмы, например, брюшнотифозная палочка, обесцвечиваются и окрашиваются в дополнительный цвет. Впервые на значение окраски по Граму для дифференцирования бактерий указал в 1886 г. Э. Ру.

Принцип метода. Восприимчивость к окраске по Граму определяется толщиной клеточной стенки и ее химической структурой. Клеточная стенка грамположительных бактерий представляет собой многослойный пептидогликан толщиной 20-60 нм. Микрофибриллы пептидогликана, переплетаясь между собой, образуют густую сеть, пронизанную порами. С пептидогликаном клеточной стенки ковалентно связаны тейховые и липотейховые кислоты, выступающие на поверхность клетки через поры пептидогликанового каркаса.

У грамположительных бактерий в клеточной стенке отсутствуют ароматические и серосодержащие аминокислоты, отмечается низкое содержание липидов, у грамотрицательных, напротив, эти вещества содержатся в большом количестве. Кроме того, у грамположительных бактерий имеется магниевая соль рибонуклеиновой кислоты, отсутствующая у грамотрицательных. Она и образует прочный химический комплекс с белком, генцианвиолетом и йодом, который не разрушается при кратковременном действии спирта. У грамотрицательных бактерий такой комплекс не образуется. Они легко обесцвечиваются под действием спирта. Фуксин докрашивает грамотрицательные микроорганизмы в красный цвет. Кроме того, структура пор пептидогликана грамположительных бактерий такова, что препятствует вымыванию красителя при обработке мазка бактерий спиртом.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий содержит 1-2 слоя пептидогликана, толщина ее намного меньше (10–20 нм), чем у грамположительных микроорганизмов. В состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий входит наружная мембрана, связанная бимолекулярным слоем липидов поверхностного слоя пептидогликана. Наружная мембрана имеет мозаичную

структуру, состоящую из молекул фосфолипидов, полисахаридов и белков. Белки наружной мембраны – «порины» – окружают гидрофильные поры, через которые проходят водные и другие молекулы массой до 800 Да.

Грамотрицательные бактерии при обработке препарата спиртом вследствие недостаточного количества пептидогликанов в клеточной

стенке утрачивают комплекс йода с кристаллическим фиолетовым, обесцвечиваются и затем приобретают контрастный цвет дополнительными красителями.

Часть клетки, вступающая в тройное соединение с красителем и протравой, - магниева соль рибонуклеиновой кислоты. При обработке взвеси грамположительных микробных клеток солями желчных кислот рибонуклеат магния извлекается, и клетка становится грамотрицательной. Прибавление к таким грамотрицательным клеткам извлеченного рибонуклеата магния возвращает им грамположительность.

Особенности приготовления препарата для окраски по Граму. В настоящее время в процессе приготовления препаратов для окраски по методу Грама обычно игнорируют все те методические детали, которым прежде придавали немаловажное значение. Такое пренебрежение во многих случаях приводит к нечетким и даже ошибочным результатам.

Концентрация бактерий. Для получения достоверных результатов окраски препарат должен быть тоньше. В густых мазках, в которых клетки находятся в скоплениях («кучках»), часто выпадает осадок красителя, и труднее осуществляется обесцвечивание грамотрицательных организмов. Наоборот, грамположительные организмы в местах скоплений обесцвечиваются значительно скорее, чем одиночно расположенные клетки. Бактерии в препарате должны находиться на возможно большем расстоянии одна от другой.

Подсушивание препарата. Выше было сказано, что положительная окраска по Граму связана с наличием в клетке рибонуклеата магния. Извлечение этого соединения лишает клетку ее грамположительности. К числу экстрагентов,

обладающих способностью извлекать нуклеиновые кислоты и их соли из клетки, относится и физиологический раствор. Приготовление взвеси бактерий из культур на плотных средах в физиологическом растворе и длительное подсушивание могут привести к частичному извлечению из клеток рибонуклеата магния и частичному превращению их в грамотрицательные. Длительное хранение взвеси бактерий в физиологическом растворе, дистиллированной воде частично или полностью превращают грамположительные клетки в грамотрицательные. Даже длительное подсушивание на стекле капли взвеси, приготовленной в физиологическом растворе, может привести к частичной утрате способности сопротивляться обесцвечиванию. Поэтому следует наносить на стекло минимальное количество жидкой культуры или взвеси клеток из плотной культуры петлей, распределять как можно более тонким слоем с целью максимального ускорения высыхания мазка. Быстрое подсушивание нагреванием на пламени не рекомендуется, так как это способствует извлечению рибонуклеата магния из клетки.

Распределение взвеси на стекле. Травмирование клеток грамположительных бактерий может привести к утрате их способности противостоять обесцвечиванию. Слишком энергичное растирание петлей взвеси на стекле при приготовлении мазка может привести к частичному изменению отношения к окраске по Граму.

Фиксация. Фиксировать препарат для окраски по Граму можно только на пламени горелки/спиртовки. Применение прочих методов фиксации, в частности метиловым спиртом, смесью этилового спирта с эфиром и др., может дать искаженную картину. Однако при фиксации жаром интенсивность нагревания мазка и интенсивность обесцвечивания грамположительных бактерий находится в прямой зависимости - чем больше грамположительные клетки подвергаются тепловому воздействию, тем больше обнаруживается среди них грамотрицательных особей. Поэтому фиксация на пламени горелки должна быть осторожной и щадящей.

Процедура окрашивания препарата должна быть начата лишь после того, как он полностью охладился. Не рекомендуется наливать раствор красителя на еще горячий после фиксации препарат.

Факторы, влияющие на результаты окраски по Граму. Воздействием на культуру различных веществ, культивированием в средах с примесью этих веществ можно добиться превращения грамотрицательных микробов в грамположительные и обратно.

Помимо создания таких необычных условий существования, и в физиологических условиях могут иметь место колебания в отношении к окраске по Граму. У каждого бактериального вида есть определенный максимальный возраст культуры, в котором наиболее четко выражено характерное отношение данного вида к окраске по Граму. Молодые культуры грамположительных бактерий более устойчивы к обесцвечиванию, чем старые, хотя есть указания, что 48-часовые культуры более устойчивы, чем 24-часовые. В самых ответственных случаях, особенно при определении отношения к окраске по Граму вновь описываемого микроба, рекомендуется готовить препараты для окраски по Граму из культур трех возрастов - 6-8-часовых, 12-24-часовых и 48-часовых.

Даже место на поверхности скошенного агара может влиять на результаты окраски по Граму. Препарат, приготовленный из газона, снятого с верхнего, уже подсыхающего участка агара, может дать совершенно иные результаты, чем приготовленный из нижней, более влажной части агара.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) карболовый раствор генцианового фиолетового или кристаллического фиолетового (1 г красителя, 10 мл спирта 96 %, 2 г кристаллической карболовой кислоты, 100 мл дистиллированной воды или 10 мл 4 %-го спиртового раствора красителя и 100 мл 2 %-ой карболовой кислоты);

3) раствор Люголя (в модификации Грама): 2 г йодида калия, 10 мл дистиллированной воды, 1 г кристаллического йода. Смесь настаивается сутки, после чего добавляют 300 мл дистиллированной воды;

4) 96 %-й этиловый спирт;

5) водный раствор фуксина;

6) вода для промывания препарата;

7) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;

8) спиртовка.

Техника окраски:

1. Фиксированный мазок окрашивают карболовым раствором генцианового фиолетового в течение 1-2 минут.

2. Сливают остаток краски, не промывая препарат водой, наливают раствор Люголя на 1-2 минуты до почернения препарата.

3. Сливают раствор Люголя, окрашенный мазок обесцвечивают 96 %-м спиртом (препарат несколько раз помещают в стакан со спиртом до прекращения отхождения фиолетовых струек). Обесцвечивание проводят не более 20–30 с.

4. Препарат промывают водой.

5. Докрашивают мазок водным раствором фуксина 1-2 минуты.

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

Оценка результатов. Грамположительные бактерии окрашены в темно-фиолетовый или синий цвет, грамотрицательные – в красный или розовый.

Окраска по Граму в модификации А.И. Синева. Для окраски применяются кусочки фильтровальной бумаги, пропитанные 1 %-м спиртовым раствором кристаллического фиолетового и высушенные. Для этого на листы фильтровальной бумаги, разложенные на стекле, наливают 1-2%-й раствор (в 96 %-м этиловом спирте) краски и затем окрашенную высушенную бумагу разрезают на кусочки размером 2х4 см и сохраняют в стеклянных темных банках с

притертой пробкой. Подготовленные таким способом бумажки не теряют окрашивающих свойств весьма продолжительное время.

Техника окраски:

1. На фиксированный препарат кладут полоску (квадрат) фильтровальной бумаги, пропитанную 1%-м спиртовым раствором кристаллического фиолетового.

2. Наливают несколько капель воды, окрашивают 1-2 минуты.

3. Снимают полоску фильтровальной бумаги.

4. Наливают на препарат раствор Люголя на 1 мин (до почернения краски).

5. Сливают раствор Люголя.

6. Прополаскивают мазок в 96 %-м спирте 30 сек. – 1 мин (до отхождения красителя).

7. Промывают водой.

8. Обесцвеченные элементы и клетки дополнительно окрашивают разведенным фуксином Пфейффера, нанесенным на фильтровальную бумагу, смоченную водой, и прижав ее к мазку, выдерживают 30 с – 1 мин.

9. После окраски препарат тщательно промывают водой и высушивают.

10. Микроскопируют с иммерсионной системой.

Оценка результатов. При микроскопии грамположительные бактерии - сине-фиолетового цвета, грамотрицательные - розово-красные.

Окраска по Граму в модификации К.Н. Аткинса. (Atkins K.N., 1920). Данный метод используют для улучшения окраски грамположительных бактерий, однако, состав красителей несколько отличается. Мазки, окрашиваемые по Аткинсу, более устойчивы к обесцвечиванию, так как фиксирующий раствор гораздо прочнее удерживает генцианвиолет. Это особенно важно для бактерий с повышенной чувствительностью к обесцвечиванию (*Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus spp.*).

Спиртовой раствор генцианвиолета:

- Кристаллический генцианфиолетовый (85–90 %-й) – 20 г;

- Спирт этиловый 96%-й – 200 мл;
- Аммония оксалат $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ – 8 г;
- Дистиллированная вода – 800 мл.

Растворить кристаллвиолет, растирая в ступке с добавлением спирта, а оксалат – в воде; смешать оба раствора и через сутки профильтровать готовый краситель.

Йодный раствор:

- Йод кристаллический – 20 г;
- Натрия гидроокись (раствор) – 100 мл;
- Дистиллированная вода – 900 мл.

Растворить йод в щелочи, добавить воду. Хранить при комнатной температуре в емкости из темного стекла. Для обесцвечивания используют чистый ацетон.

Раствор сафранина:

- Сафранин В (2,5%-й раствор в 95%-м этиловом спирте) – 25 мл;
- Вода дистиллированная – 75 мл.

Вначале готовят 2,5%-й спиртовой раствор сафранина, затем смешивают его в указанной пропорции с водой.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) спиртовой раствор генцианового фиолетового;
- 3) йодный раствор;
- 4) чистый ацетон;
- 5) раствор сафранина;
- 6) вода для промывания препарата;
- 7) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 8) спиртовка.

Техника окраски:

- 1) фиксированный мазок окрашивают спиртовым раствором генцианового фиолетового в течение 1-2 минут;
- 2) сливают остаток краски, не промывая препарат водой, наливают йодный раствор на 1-2 минуты до почернения препарата;

3) сливают йодный раствор, окрашенный мазок обесцвечивают чистым ацетоном (препарат несколько раз помещают в стакан с ацетоном), обесцвечивание длится не более 20–30 секунд;

4) препарат промывают водой;

5) докрашивают мазок раствором сафранина 1-2 минуты;

6) краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

Метод Аткинса не дает преимуществ при окрашивании грамтрицательных микроорганизмов, более того, выявление таких микроорганизмов может быть осложнено в некоторых материалах, например, мазках крови.

Окраска по методу Г.П. Калины. Профессор Г.П. Калина предложил специально для микроорганизмов группы нейссерий щадящий метод окраски, т. к. при окрашивании по Граму они неравномерно обесцвечиваются спиртом.

Материалы:

1) предметное стекло;

2) реактив Г.П. Калины;

3) 0,5% раствор бриллиантового зеленого;

4) физиологический раствор хлорида натрия;

5) вода для промывания препарата;

6) 5-10% водный раствор фуксина;

7) 30% этиловый спирт;

8) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;

9) спиртовка.

Техника окраски:

1) в небольшой капле физиологического раствора на предметном стекле суспендируют исследуемую культуру;

2) суспензию смешивают с одной каплей 0,5 %-го спиртового раствора бриллиантового зеленого, распределяют мазок равномерно тонким слоем;

3) подсушивают и фиксируют над пламенем спиртовки;

4) на фиксированный мазок наносят реактив Калины на 1,5-2 мин;

5) краску сливают и промывают водой, а затем 30 %-м этиловым спиртом до отхождения красителя;

6) снова промывают водой;

7) докрашивают препарат 10%-м водным раствором фуксина в течение 2 мин;

8) мазок промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Оценка результатов. При микроскопии грамположительные бактерии - зелено-черного или фиолетового цвета, грамотрицательные - розово-красные.

Метод окраски по Романовскому-Гимзе. Универсальный цитологический метод окраски простейших, бактерий, риккетсий, хламидий, спирохет, клеточных структур и тканей различных видов (в том числе крови) при световой микроскопии. Предложен в 1904 году Густавом Гимзой (Gimsa).

Сущность метода. В авторской версии название красителя - «Giemsa'sche Lösung für die Romanowsky färbung» (Раствор Гимзы для окраски по Романовскому). Краситель Романовского-Гимзы состоит из метиленового синего, эозина и азура, благодаря чему он окрашивает в разные цвета элементы микроорганизмов и форменные элементы крови.

Материалы:

1) предметное стекло;

2) дистиллированная вода;

3) метиловый спирт или 95% этиловый спирт для фиксации мазков;

4) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;

5) спиртовка;

6) стандартный раствор красителя Романовского-Гимзы.

Техника окраски:

1) мазки, фиксированные в метиловом спирте в течение 3 мин, высушивают на воздухе и окрашивают раствором красителя, который готовят непосредственно перед использованием (к 10 мл дистиллированной воды прибавляют 10 капель красителя Романовского-Гимзы, коммерческого);

2) Через час краситель сливают, препарат промывают водой и высушивают на воздухе, исследуют при иммерсии.

Оценка результата. Бактерии окрашиваются в фиолетово-красный цвет, цитоплазма клеток - в голубовато-синий, ядра - в фиолетово-красный.

При окрашивании простейших их цитоплазма приобретает голубой цвет, а ядра - красно-фиолетовый.

Окраска по методу Здродовского. Цитологический метод окраски риккетсий, предложенный Здродовским.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) дистиллированная вода;
- 3) разведенный фуксин Циля (в 10 мл дистиллированной воды добавить 10–15 капель фуксина Циля);
- 4) 0,5 %-й раствор лимонной кислоты или 0,01%-й раствор хлороводородной кислоты;
- 5) метиленовый синий;
- 6) бактериологическая петля;
- 7) спиртовка.

Техника окраски:

1. Окрасить мазок разведенным фуксином Циля (10–15 капель на 10 мл дистиллированной воды) в течение 5 минут.
2. Промыть водой.
3. Обработать мазок 0,5 %-м раствором лимонной кислоты или 0,01 %-м раствором хлороводородной кислоты.
4. Промыть водой.
5. Окрасить метиленовым синим в течение 1 мин.
6. Промыть водой и высушить препарат.
7. Микроскопировать с иммерсией.

Оценка результата. Риккетсии – красного цвета, цитоплазма клеток, в которых они паразитируют – голубые, ядра – синие.

Экспресс-метод определения грам- типа микроорганизмов. Метод основан на разрушении клеток грамотрицательных бактерий в щелочной среде (3%-м растворе КОН) и определении свободной ДНК. Образующаяся слизь свидетельствует о том, что КОН разрушает

бактериальную клеточную стенку, и ДНК остается свободной (слизистое образование).

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) 3 %-й раствор КОН;
- 3) бактериологическая петля;
- 4) спиртовка.

Техника окраски:

1) на предметное стекло наносят каплю 3%-го раствора КОН и 1 петлю 24-часовой исследуемой агаровой культуры, тщательно перемешивают;

2) через 5–10 с медленно приподнимают бактериологическую петлю на высоту 2–3 см.

Оценка результата. Грамотрицательные культуры через 5–7 с при движении петли вверх образуют слизистый след длиной 1–2 см; если слизь не образовывается, то тестируемая культура грамположительная.

Окраска по методу Циля-Нильсена. Впервые метод выявления кислотоустойчивых бактерий был предложен в 1882–1883 гг. немецкими медиками Францем Цилем и Фредериком Нильсеном и предназначен для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (возбудителей туберкулеза, лепры, некоторых актиномицетов, покоящиеся эндоспоры) от некислотоустойчивых.

Сущность метода. Клеточная стенка и цитоплазма кислотоустойчивых бактерий отличаются высоким содержанием липидов, воска и оксикислот с 50–100 атомами, которые делают клеточную стенку непроницаемой для кристаллвиолета и других красителей. Такие микроорганизмы плохо окрашиваются разведенными растворами красителей. Для облегчения проникновения красителя в клетки микроорганизмов применяют более концентрированные растворы красок в подогретом состоянии, добавляют в них детергенты и удлиняют сроки окраски. После того как краска введена в клетку, ее нельзя обесцветить обычными кислотными и спиртовыми растворителями.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) карболовый фуксин Циля;
- 3) 5 %-й раствор серной кислоты (H_2SO_4);
- 4) вода для промывания препарата;
- 5) водный раствор метиленового синего (раствор Леффлера);
- 6) 95 %-й этиловый спирт;
- 7) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 8) спиртовка.

Техника окраски:

1. На фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, не превышающий по размеру предметное стекло.

2. Наливают карболовый фуксин Циля (основной краситель) и осторожно нагревают мазок на горелке/спиртовке 3-5 минут до появления паров, после чего оставляют краситель, пока препарат несколько остынет.

3. Снимают бумагу с фуксином и промывают препарат водой.

4. Окрашенный препарат обесцвечивают 5 %-м раствором серной кислоты (дифференцирующее вещество) 3–5 с или смесью: 10 частей спирта и 1 части соляной кислоты в течение 1-2 мин, или 96 %-м этиловым спиртом, содержащим 3 % по объему хлористоводородной кислоты (HCl), несколько раз погружая предметное стекло с мазком в стаканчик с солянокислым спиртом, пока мазок на вид не станет бледно-розовым.

5. Препарат тщательно промывают водой.

6. Споласкивают его 96% этиловым спиртом (в лаборатории часто этот этап пропускают).

7. Снова ополаскивают водой.

8. Докрашивают 3–5 мин водным раствором метиленового синего Леффлера (дополнительный краситель).

9. Препарат промывают водой, подсушивают и микроскопируют.

Оценка результатов.

Кислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в рубиново-красный цвет, некислотоустойчивые – в синеголубой.

Окраска препарата из мочи по Цилю-Нильсену в модификации Хузе. В моче, наряду с кислотоустойчивым *M. tuberculosis*, могут встречаться кислотоустойчивые бактерии половой смазки *M. smagmatis*, отличающиеся от первых спиртоподатливостью. Хузе предложил использовать этот признак для их дифференциации. Модификация Хузе повторяет метод Циля-Нильсена, но после обработки мазка холодной 5%-ой H_2SO_4 и промывки водой, дополняется обработкой этанолом (20 с).

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) карболовый фуксин Циля;
- 3) 5 %-й раствор серной кислоты;
- 4) вода для промывания препарата;
- 5) раствор метиленового синего Леффлера;
- 6) 95 %-й этиловый спирт;
- 7) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 8) спиртовка.

Техника окраски:

1. Мазок окрашивают карболовым фуксином Циля (основной краситель) при нагревании 3–5 минут или окрашенной фуксином бумагой до появления паров, но, не доводя краситель до кипения.

2. Препарат остудить, снять бумагу, слить краситель и промыть водой.

3. Обесцвечивают 5 %-м раствором серной кислоты (дифференцирующее вещество) в течение 1-2 мин.

3. Остаток кислоты слить, препарат промыть водой и обработать этанолом 20 с.

4. Докрашивают 3–5 мин водным раствором метиленового синего Леффлера (дополнительный краситель).

5. Препарат промывают водой, подсушивают и микроскопируют.

Оценка результатов. *M. tuberculosis* к этанолу устойчивы и не обесцвечиваются, оставаясь красными. *M. Smagmatis* под влиянием спирта эту краску теряют, но при докраске метиленовой синью становятся синими.

Окраска по Бунге-Траутенроту. Этот метод применяется для окрашивания осадка мочи при дифференциации *M. tuberculosis* и *M. smagmatis*.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) абсолютный спирт;
- 3) карболовый фуксин;
- 4) 1N хромовая кислота (H_2CrO_4);
- 5) 10 %-й раствор серной кислоты;
- 6) вода для промывания препарата;
- 7) насыщенный раствор метиленового синего;
- 8) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка
- 9) спиртовка.

Техника окраски:

1. Стекло с нанесенным на него мазком погружают в абсолютный спирт на 3 ч для извлечения жирных кислот.
2. Затем на 15 мин погружают в хромовую кислоту.
3. Промывают препарат водой.
4. Окрашивают при подогревании карболовым фуксином.
5. В течение 3 мин обесцвечивают 10 %-й серной кислотой.
6. Докрашивают 5 мин насыщенным спиртовым раствором метиленового синего.

Оценка результата.

Кислотоустойчивые бактерии *M. tuberculosis* – малинового цвета, менее кислотоустойчивые *M. smegmatis* – синего цвета.

Окраска по Семеновичу-Марциновскому. Этот метод окраски предназначен для кислото- и спиртоустойчивых микроорганизмов.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) карболовый фуксин Циля;
- 3) раствор метиленового синего Леффлера;
- 4) вода для промывания препарата;
- 5) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 6) спиртовка.

Техника окраски:

1. Мазок окрашивают разведенным (1:3) карболовым фуксином Циля в течение 2 мин.
2. Препарат промывают водой.
3. Красят раствором метиленового синего Леффлера 3–5 мин.
4. Промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Оценка результата.

Кислото- и спиртоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в красный цвет, все остальные микробы – в синий.

Окраска по Баумгартену. Этот метод применяется для отличия лепрозных палочек (*M. leprae*) от *M. tuberculosis*.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) насыщенный спиртовый раствор фуксина;
- 3) 95 %-й этиловый спирт;
- 4) дистиллированная вода;
- 5) хлористоводородная кислота (НС1);
- 6) разведенный метиленовый синий;
- 7) вода для промывания препарата;
- 8) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 9) спиртовка.

Техника окраски:

1. Мазок окрашивают в растворе фуксина (5 капель насыщенного спиртового раствора фуксина и 5 мл дистиллированной воды) без подогревания в течение 5–7 мин.

2. Затем обесцвечивают в смеси 10 частей спирта и 1 части хлористоводородной кислоты 15 с.

3. Препарат промывают водой.

4. Докрашивают разведенным метиленовым синим.

5. Промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Оценка результата:

M. leprae окрашиваются в розово-красный цвет, *M. tuberculosis* – в синий.

Окраска по Муху. Метод применяется для выявления зернистой формы туберкулезных микобактерий (зерна Муха).

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) насыщенный спиртовый раствор метилового фиолетового;
- 3) 2 %-й водный раствор карболовой кислоты;
- 4) раствор Люголя;
- 5) 5 %-й раствор азотной кислоты;
- 6) 3 %-й раствор хлористоводородной кислоты;
- 7) 95 %-й раствор этилового спирта;
- 8) ацетон;
- 9) фуксин Пфейффера;
- 10) вода для промывания препарата;
- 11) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 12) спиртовка.

Техника окраски:

1. Препарат выдерживают 24 ч в смеси 10 мл насыщенного спиртового раствора метилового фиолетового и 100 мл 2 %-го водного раствора карболовой кислоты.

2. Затем обрабатывают раствором Люголя в течение 1-2 мин.

3. Сливают раствор Люголя и наносят на препарат 5 %-й раствор азотной кислоты на 1 мин.

4. Далее, на 10 с наносят 3 %-й раствор хлористоводородной кислоты.

5. Сливают раствор и помещают в смесь, состоящую из равных объемов спирта и ацетона.

6. Промывают препарат водой и докрашивают фуксином Пфейффера.

7. Промывают препарат водой, высушивают и микроскопируют.

Оценка результата.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет.

Окраска зернистых форм *M. tuberculosis* по методу Козлова.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) смесь Козлова;
- 3) раствор Люголя;
- 4) 0,1 %-й раствор сафранина;
- 5) вода для промывания препарата;
- 6) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 7) спиртовка.

Техника окраски:

1. Фиксированный мазок погружают в склянку со смесью Козлова на 45 мин.

2. Мазок промывают водопроводной водой.

3. Наносят на препарат раствор Люголя на 20 сек.

4. Промывают водопроводной водой 2-3 сек.

5. Докрашивают 0,1 %-м раствором сафранина 1-2 мин.

6. Промывают препарат водопроводной водой, высушивают и микроскопируют.

Оценка результатов.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, остальные микроорганизмы малиново-красные. В *M. tuberculosis* определяется выраженная зернистость.

Окраска по способу Гутштейна для выявления клеточной стенки.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) жидкость Буэна;
- 3) 10 %-й раствор танина;
- 4) вода;
- 5) 0,02 %-й спиртово-водный раствор кристаллического фиолетового;
- 6) бактериологическая петля;
- 7) спиртовка.

Техника окраски:

1. Приготовленный препарат высушивают на воздухе.
2. Фиксируют в жидкости Буэна 3 мин.
3. Протравливают 25 мин 10 %-м (вес/объем) водным раствором танина.
4. Промывают водопроводной водой.
5. Окрашивают 0,02 %-м спиртово-водным раствором кристаллического фиолетового 30–60 сек.
6. Остаток краски сливают и препарат, не промывая водой, высушивают и микроскопируют.

Оценка результатов.

Клеточные стенки имеют вид длинных тонких нитей темно-фиолетового или черного цвета, очерчивающих тела клеток с белой или светло-голубой цитоплазмой.

Окраска по методу Ожешко для выявления спор. Метод Ожешко сходен с методом Циля-Нильсена, но отличается использованием раствора соляной кислоты в качестве протравы, разрыхляющей оболочку споры, которая плохо воспринимает красители. После протравы соляной кислотой при нагревании в течение 2-3 мин мазок фиксируется и окрашивается по методу Циля-Нильсена: препарат окрашивают основным красителем, затем обесцвечивают кислотой и докрашивают дополнительно в контрастный цвет. Споры прочно удерживают карболовый фуксин и окрашиваются в красный цвет, цитоплазма бактерий

обесцвечивается 5 %-м серной кислотой и после докрашивания метиленовым синим, приобретает синий цвет.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) 0,5 %-м раствор хлористоводородной кислоты;
- 3) вода для промывания мазков;
- 4) карболовый фуксин Циля;
- 5) 5 %-й раствор серной кислоты;
- 6) метиленовый синий;
- 7) бактериологическая петля;
- 8) спиртовка.

Техника окраски:

1. На высушенный нефиксированный препарат (мазок готовится толстым и на краю стекла) наливают несколько капель 0,5 %-го раствора хлористоводородной кислоты (HCl) и подогревают 1-2 мин над пламенем горелки/спиртовки до закипания, после чего остатки кислоты сливают.

2. Препарат (остывший) промывают водой, подсушивают и фиксируют над пламенем горелки/спиртовки.

3. Мазок окрашивают карболовым фуксином Циля (основной краситель) при нагревании до появления паров.

4. Обесцвечивают 5 %-м раствором серной кислоты (дифференцирующее вещество) в течение нескольких секунд.

5. Промывают водой.

6. Докрашивают 3–5 мин метиленовым синим Леффлера (дополнительный краситель), высушивают и микроскопируют с иммерсией.

Оценка результатов.

Споры бактерий окрашиваются в красный цвет, цитоплазма приобретает синий цвет, вегетативные тела микробных клеток становятся голубого цвета.

Окраска по методу Пешкова. М. А. Пешков предложил окрашивать споры метиленовым синим Леффлера, причем для изменения устойчивости оболочки он применил кипячение. Споры и цитоплазма окрашиваются при нагревании. Промывание препарата водой ведет к обесцвечиванию цитоплазмы, тогда как спора прочно удерживает краситель.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) метиленовый синий Леффлера;
- 3) вода для промывания мазков;
- 4) 0,5 %-й водный раствор нейтрального красного;
- 5) бактериологическая петля;
- 6) спиртовка.

Техника окраски:

1. Приготовленный мазок фиксируют над пламенем спиртовки.

2. На фиксированный мазок наливают метиленовый синий Леффлера и кипятят над пламенем спиртовой горелки 20–30 секунд.

3. Остывший препарат промывают водой и докрашивают 0,5 %-м раствором нейтрального красного в течение 30–60 секунд.

4. Опять промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

5. Микроскопируют с иммерсией.

Оценка результатов. Споры окрашиваются в голубой или в синий цвет. Протоплазма вегетативного тела бактерий – розовая или красная.

Окраска по методу Шеффера и Фултона.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) 5 %-й водный раствор малахитового зеленого;
- 3) вода для промывания мазков;
- 4) 0,5 %-й раствор сафранина;
- 5) бактериологическая петля;
- 6) спиртовка.

Техника окраски:

1. На фиксированный мазок нанести 5 %-й водный раствор малахитового зеленого и 3–4 раза нагреть до появления паров (3–6 мин).

2. Промыть водой.

3. Докрасить 0,5% водным раствором сафранина в течение 30 с.

4. Промыть водой и высушить препарат на воздухе.

5. Микроскопировать с иммерсией.

Оценка результатов.

Споры бактерий окрашиваются в зеленый цвет, вегетативные клетки – в красный.

Окраска по методу Вертца-Канклина.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) 5 %-й водный раствор малахитового зеленого;
- 3) вода для промывания мазков;
- 4) 0,5 %-й водный раствор сафранина;
- 5) бактериологическая петля;
- 6) спиртовка.

Техника окраски:

1. Препарат фиксируют над пламенем спиртовки.
2. Фиксированный мазок окрашивают 5%-м водным раствором малахитового зеленого, 3–4 раза нагревая его до появления паров (3–6 мин).
3. Промывают мазок водой.
4. Докрашивают препарат 0,5%-м водным раствором сафранина.

Оценка результатов.

Тело бактерий окрашивается в красный цвет, споры – в зеленый.

Метод выявления спор негативным окрашиванием применяется при количественной оценке процесса спорообразования путем подсчета количества спор и вегетативных клеток в разных условиях роста бактерий.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) метиленовый синий или фуксин;
- 3) бактериологическая петля;
- 4) спиртовка.

Техника окраски:

1. На предметном стекле готовят тонкий мазок клеток спорулирующих бактерий, подсушивают на воздухе и фиксируют в пламени.

2. Затем на 3–5 мин наносят метиленовый синий или на 1–3 мин фуксин.

3. Препарат осторожно просушивают на воздухе.

4. Просматривают с иммерсией.

Оценка результатов.

Вегетативные клетки бактерий прокрашиваются, а споры, имеющие многослойную, труднопроницаемую оболочку – нет. Они видны как сферические или овальные образования, находящиеся в зависимости от стадии спорообразования внутри или вне клеток бактерий.

Метод окраски по Дюгиду. Самый простой и наиболее эффективный метод окраски капсул.

Материалы:

- 1) предметное и покровное стекла;
- 2) тушь;
- 3) фильтровальная/промокательная бумага;
- 4) бактериологическая петля;
- 5) спиртовка.

Техника окраски:

1. На чистое предметное стекло петлей нанести тушь и смешать ее с культурой.

2. На часть полученной бактериальной смеси поместить покровное стекло.

3. Промокательной бумагой сильно прижать покровное стекло к предметному стеклу до появления тонкого коричневого слоя жидкости между ними. Удалить излишки жидкости.

4. Препарат смотреть под большим увеличением, применяя безиммерсионные или иммерсионные объективы.

Оценка результатов.

Капсулы выглядят прозрачными зонами вокруг микроорганизмов на коричневатом-черном фоне.

Метод окраски по Бурри (Burri) является негативным методом: окрашивается фон, и не окрашиваются сами микроорганизмы. Для этого используют красители, не окрашивающие бактерии, например, тушь. Вместо туши

можно использовать 10 %-й раствор нигрозина или 20 %-й раствор колларгола, или 3 %-й раствор конго красного.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) тушь;
- 3) бактериологическая петля;
- 4) спиртовка.

Техника окраски:

1. На середину предметного стекла наносят каплю туши.
2. Эмульгируют в ней бактериальную петлю бульонной культуры или небольшую часть колонии, снятой с твердой питательной среды.

3. Ребром шлифованного стекла размазывают жидкость вдоль стекла.

4. Высушивают его на воздухе и, не фиксируя, микроскопируют с иммерсионной системой.

Оценка результатов.

Фон препарата окрашен в темно-дымчатый цвет, микробные тела и капсулы не окрашиваются тушью и остаются бесцветными.

Метод окраски по Бурри-Гинсу (Burri, Gins) используется для окраски капсульных бактерий и основан на том, что капсула не воспринимает красители. Капсулу выявляют негативным контрастированием фона по Бурри.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) тушь;
- 3) смесь Никифорова (этиловый спирт и др.);
- 4) вода для промывания мазков;
- 5) карболовый фуксин Циля;
- 6) бактериологическая петля;
- 7) спиртовка.

Техника окраски:

1. Черную тушь смешивают с культурой, делают мазок препарата, как мазок крови и высушивают препарат.

2. После этого проводят фиксацию препарата химическим способом: смесью Никифорова или другими смесями.

3. Промывают водой.
4. Окрашивают тела микробных клеток карболовым фуксином Циля, разведенным 1:3, в течение 3–5 минут.
5. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

Оценка результата.

На темном фоне препарата хорошо видны бесцветные капсулы, внутри которых находятся тела бактерий красного/ярко-малинового цвета. Иногда вокруг окрашенных бактерий, не образующих капсул, видны небольшие бесцветные зоны – ложные капсулы, которые появляются в результате неправильного высушивания или фиксации мазка.

Метод окраски по Ионе (Johns) – специальный метод для окраски капсул.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) дистиллированная вода;
- 3) 2 %-й водный раствор генцианвиолета или метилвиолета;
- 4) 1-2 %-я уксусная кислота;
- 5) бактериологическая петля;
- 6) спиртовка.

Техника окраски:

1. На приготовленный, высушенный и фиксированный мазок наливают пипеткой 2% водный раствор генцианвиолета (или метилвиолета) и нагревают 1-2 минуты, после чего препарат промывают водой.

2. Наносят 1-2 %-ю уксусную кислоту на 5–10 с, промывают в воде.

3. Микроскопируют в воде.

Способ «негативной» окраски.

Материалы:

- 1) предметное и покровное стекла;
- 2) тушь;
- 3) фуксин;
- 4) бактериологическая петля;

5) спиртовка.

Техника окраски:

1. Небольшое количество клеток с плотной среды помещают на предметное стекло в каплю разбавленного фуксина.

2. Смешивают с каплей туши.

3. Закрывают покровным стеклом и просматривают с объективом х40.

Оценка результатов.

На общем темном фоне препарата хорошо видны бесцветные капсулы, окружающие клетки микроорганизмов, окрашенные в розовый цвет.

Окраска нуклеоида бактерий ядротропным методом Фельгена. Особое место среди разнообразных методов окраски ядерного вещества занимает метод, основанный на специфической реакции фуксинсернистой кислоты с альдегидными группами дезоксирибонуклеиновой кислоты, предложенный в 1924 г. Фельгеном и Россенбеком.

Сущность метода. Дезоксирибонуклеиновая кислота содержит в числе азотистых оснований тимин, кроме того, в ее состав входит четыре остатка пятиатомного сахара дезоксирибозы. Подвергая ядерные нуклеопротеиды слабому кислотному гидролизу, вызывают отщепление пириновых и пиримидиновых оснований, что обнажает молекулы дезоксирибозы. При гидролизе дезоксирибоза переходит в β -гидроксилевулиновый альдегид, который взаимодействует ссернистой частью бесцветной фуксинсернистой кислоты (реактив Шиффа), выделяя фуксин, тем самым вызывает появление специфической красно-фиолетовой окраски.

Материалы:

1) предметное стекло;

2) жидкость Карнуа;

3) 80 %-й этанол;

4) 1 N HCl;

5) фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа);

6) вода дистиллированная;

7) бактериологическая петля;

8) спиртовка.

Техника окраски:

1. Приготовить препарат из бактериальной культуры или дрожжей.
2. Высушить, зафиксировать в жидкости Карнуа 7 мин.
3. Промыть 80 %-м этанолом.
4. Обработать 1 N HCl, подогретой до 60 °С, в течение 7 мин, затем опустить препарат на 1-2 мин в холодную 1 N HCl.
5. Обработать фуксинсернистой кислотой (реактив Шиффа) в течение 3-4 часов.
6. Промыть водой, высушить, микроскопировать с иммерсией.

Оценка результата. Ядерное вещество окрашено в фиолетовый цвет.

Окраска ядерного вещества по методу Романовского-Гимзы. Этот способ применяется главным образом при микроскопии мазков-отпечатков из органов, мазков крови. Краситель Романовского-Гимзы состоит из метиленового синего, эозина и азура, благодаря чему он окрашивает в разные цвета элементы микроорганизма и форменные элементы крови. Перед обработкой препарата краситель необходимо развести водой (рН 7,0–7,2) в 10–20 раз. Степень разведения меняется в зависимости от серии красителя и рН воды. Поэтому рекомендуется каждую новую серию красителя и воду проверять на мазках крови.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) жидкость Карнуа или смесь Никифорова;
- 3) коммерческий раствор Романовского-Гимзы;
- 4) дистиллированная вода;
- 5) бактериологическая петля;
- 6) спиртовка.

Техника окраски:

1. Приготовленный препарат высушивают на воздухе.
2. Фиксируют жидкостью Карнуа или смесью Никифорова.

3. Фиксированные мазки подсушивают на воздухе и окрашивают рабочим раствором Романовского-Гимзы (к 10 мл дистиллированной воды добавляют 10 капель коммерческого красителя Романовского-Гимзы), погружая стекло в стаканчик с красителем.

4. Через 1 ч краситель сливают, и препарат промывают дистиллированной водой.

5. Готовый препарат высушивают на воздухе и микроскопируют.

Оценка результатов.

ротоплазма форменных элементов ткани простейших окрашивается в голубовато-синий цвет, ядра клеток – в фиолетово-красный, тела микробных клеток приобретают фиолетово-красный цвет.

Элементы крови окрашиваются: эритроциты – в розовый цвет, ядра лейкоцитов – в фиолетовый, цитоплазма – в голубой, базофильная зернистость – в синий, эозинофильная – в красный, нейтрофильная – в сиреневый.

Метод Пикарского.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) 1N раствор HCl;
- 3) коммерческий раствор Романовского-Гимзы;
- 4) дистиллированная вода;
- 5) бактериологическая петля;
- 6) спиртовка.

Техника окраски:

1. Препарат обрабатывают 1N раствором HCl при подогревании до 60 °C в течение 7 мин.

2. Промыть препарат водой и дальше окрашивать по Романовскому-Гимзе.

Оценка результатов. Ядерные элементы темно-красные, цитоплазма – розовая.

Окраска зерен волютина. Волютин накапливается при избытке питательных веществ в окружающей среде. В клетке он выполняет роль запасных веществ для питания и энергетических потребностей. Зерна волютина обладают

метахромазией и легко выявляются при специальных методах окраски. Термин «волютин» предложен Мейером, обнаружившим его впервые у бактерий *Spirillum volutans*. Волютин – запасное фосфор- и азотсодержащее вещество, производное нуклеиновой кислоты. Характерное свойство волютина – его метахромазия – способность приобретать в иной цвет, чем цвет окрашивающего вещества (метиленовый синий окрашивает волютин в фиолетово-красный цвет).

1. Выявление зерен волютина с помощью метиленового синего.

Способ метахроматического выявления волютиновых зерен у коринебактерий и скоплений нуклеиновых соединений у бактерий.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) водно-спиртовый раствор метиленового синего;
- 3) вода для промывания мазков;
- 4) бактериологическая петля;
- 5) спиртовка.

Техника окраски:

1. На готовый зафиксированный мазок наносят 1-2 капли водноспиртового раствора метиленовой синьки. Красят 3–5 минут.

2. Сливают краску, ополаскивают водой, высушивают.

3. Микроскопируют с иммерсионной системой.

Оценка результатов.

На мазке – клетки голубого цвета с синими, почти черными зернами волютина (зависит от интенсивности действия красителя).

2. Выявление зерен волютина с помощью уксуснокислого метилового фиолетового. Используется для выявления гранул волютина при диагностике дифтерии. Вследствие высокой концентрации метафосфатов и других соединений фосфора гранулы волютина при окраске уксуснокислым метиловым фиолетовым имеют более интенсивный цвет по сравнению с цитоплазмой.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) уксуснокислый раствор метилового фиолетового (метиловый фиолетовый, генциановый или кристаллический фиолетовый – 0,25 г, 5%-й раствор уксусной кислоты – 100 мл);
- 3) вода для промывания мазков;
- 4) бактериологическая петля;
- 5) спиртовка.

Техника окраски:

1. На готовый зафиксированный мазок наносят 1-2 капли уксуснокислого раствора метилового/генцианового фиолетового. Красят 5–10 минут.

2. Сливают краску, ополаскивают водой, высушивают.

3. Микроскопируют с иммерсионной системой.

Оценка результатов.

На мазке - цитоплазма дифтерийных коринебактерий окрашивается в светло-сиреневый цвет, гранулы волютина – в темно-лиловый.

3. Метод окраски по Нейссеру (Neisser) используется для выявления зерен волютина. Мазок окрашивается уксуснокислым метиленовым синим, при этом происходит химическое взаимодействие красителя и волютина. При промывке водой тело клетки обесцвечивается и затем докрашивается везувином.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) уксуснокислая метиленовая синь Нейссера;
- 3) раствор Люголя;
- 4) вода для промывания мазков;
- 5) раствор везувина (хризоидина);
- 6) бактериологическая петля;
- 7) спиртовка.

Техника окраски:

1. Готовят мазок, высушивают, фиксируют жаром.

2. Наливают на мазок 1-2 капли уксуснокислого метиленового синего Нейссера, красят 1-2 минуты.

3. Краску сливают, наносят раствор Люголя на 1 мин.

4. Промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой.

5. Наносят раствор везувина (хризоидина) для окраски тела бактерии на 1-3 мин.

6. Смывают водой, высушивают, микроскопируют.

Оценка результатов.

В мазке цитоплазма бактерий окрашивается в желто-коричневый цвет, зерна волютина – от сине-зеленого до сине-черного цвета.

4. Окраска по Раскиной.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) карболовый фуксин Циля;
- 3) краситель Раскиной;
- 4) вода для промывания мазков;
- 5) бактериологическая петля;
- 6) спиртовка.

Техника окраски:

1. На препарат, высушенный на воздухе, предварительно нефиксированный, наливают краситель Раскиной.

2. Препарат подогревают на пламени до сгорания спирта.

3. Промывают водой и высушивают, микроскопируют с иммерсией.

Оценка результатов. Бактерии окрашиваются в светло-красный цвет, а зерна волютина – в черно-синий (темно-вишневый).

5. Окраска по Мейеру.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) метиленовый синий Леффлера;
- 3) 1 %-й раствор серной кислоты;
- 4) 40 %-й водный раствор КОН;
- 5) 0,25 %-й раствор светлого зеленого или хризоидина;
- 6) вода для промывания препаратов;
- 7) бактериологическая петля;
- 8) спиртовка.

Техника окраски:

1. Готовят параллельно два препарата, фиксируют их на пламени спиртовки.

2. В течение 10 минут окрашивают препараты метиленовым синим Леффлера.

3. Затем один препарат погружают на 5 мин в 1 %-й раствор серной кислоты (препарат №1), другой настолько же в 40 %-й водный раствор КОН (препарат №2).

4. Не промывая, препараты подсушивают фильтровальной бумагой и докрашивают 0,25 %-м раствором светлого зеленого или хризоидина.

5. Затем промывают водой и высушивают.

Оценка результатов.

На препарате №1 цитоплазма бактерий окрашена в желто-коричневый или зеленый цвет, включения волютина – в вишнево-красный.

На препарате №2 гранулы волютина обесцвечены и выглядят пустыми непрокрашенными на фоне слабо окрашенных бактерий.

6. Окраска по Омелянскому.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) фуксин Циля;
- 3) 1 %-й раствор серной кислоты (H_2SO_4);
- 4) метиленовый синий (1:40);
- 5) вода для промывания препаратов;
- 6) бактериологическая петля;
- 7) спиртовка.

Техника окраски:

1. Фиксированный препарат окрашивают раствором фуксина Циля в течение 30–60 сек.

2. Препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

3. Наносят на препарат 1%-ный раствор H_2SO_4 на 20–30 секунд.

4. Препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

5. Докрашивают препарат метиленовым синим 15–30 секунд.

6. Промывают его водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

7. Препарат микроскопируют в иммерсионной системе с объективом х90.

Оценка результатов. Гранулы волютина красного цвета, клетки – синего.

Окраска гликогена. Гликоген – углевод, животный крахмал (полисахарид). Часто он накапливается в клетках дрожжей, бацилл. Известно, что гликоген встречается у бактерий чаще, чем крахмал. Запасные полисахариды используются микроорганизмами в качестве источников углерода и энергии.

Материалы:

- 1) предметное и покровное стекла;
- 2) раствор йода в йодистом калии:
 - йод – 7 г;
 - йодистый калий – 20 г;
 - дистиллированная вода – 100–300 мл;
- 3) фильтровальная бумага;
- 4) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 5) спиртовка.

Техника окраски:

1. На чистое предметное стекло наносят небольшую каплю суспензии микроорганизма, и к ней добавляют такую же каплю раствора йода в йодистом калии (7 г йода и 20 г йодистого калия в 100–300 мл дистиллированной воды) на 2–3 минуты.

2. Сверху помещают покровное стекло, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой.

3. Препарат просматривают с масляной иммерсией (на покровное стекло наносят каплю масла) с объективом х40.

Оценка результатов.

Цитоплазма клеток окрашивается в светло-желтый цвет, а гранулы гликогена – в красно-бурый.

Окраска гранулезы. Гранулеза – углевод, подобное крахмалу вещество. В больших количествах накапливается в клетках маслянокислых бактерий (*Clostridium acetobutyricum*) перед спорообразованием.

Материалы:

- 1) предметное и покровное стекла;
- 2) раствор Люголя;
- 3) фильтровальная бумага;
- 4) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 5) спиртовка.

Техника окраски:

1. В небольшую каплю суспензии маслянокислых бактерий добавляют небольшую каплю раствора Люголя.
2. Закрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой.
3. На покровное стекло наносят каплю масла и просматривают с иммерсионной системой.

Окраска жира. Жир содержится в клетках практически всех микроорганизмов, особенно много его накапливается при старении культуры.

Материалы:

- 1) Судан III (0,1 г Судана III растворяют в 200 мл 90° спирта);
- 2) 40 %-й раствор формалина;
- 3) раствор метиленового синего (1:40);
- 4) предметное и покровное стекла;
- 5) бактериологическая петля или стерильная пастеровская пипетка;
- 6) спиртовка.

Техника окраски:

1. На предметное стекло наносят небольшую каплю 40 %-го раствора формалина.
2. Петлей в нее вносят культуру микроба. Формалин убивает клетку и разрыхляет ее оболочку.
3. Через 5 мин в эту же каплю добавляют небольшую каплю метиленового синего (1:40), а спустя 10 минут каплю

Судана III (растворимого в жире красителя, индикатора жироподобных веществ).

4. Образовавшуюся общую каплю накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой.

5. Микроскопируют препарат с иммерсией.

Оценка результатов.

Цитоплазма клеток окрашивается в синий цвет, включения жира - в розово-оранжевый.

Окрашивание поли-β-оксимасляной кислоты.

Запасным жироподобным веществом многих бактерий (например, рода *Pseudomonas*) является поли-β-гидроксимасляная кислота. Поли-β-гидроксимасляная кислота – хороший источник углерода и энергии.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) 0,3 %-й раствор Судана черного В, приготовленный на этиленгликоле;
- 3) ксилол;
- 4) 0,5 %-й водный раствор сафранина;
- 5) вода для промывания препаратов;
- 6) бактериологическая петля;
- 7) спиртовка.

Техника окраски:

1. Фиксированный нагреванием мазок на предметном стекле погружают в 0,3 %-й раствор Судана черного В, приготовленного на этиленгликоле. Окрашивают 5–15 мин (время подбирают экспериментально).

2. Препарат высушивают на воздухе.

3. Предметное стекло погружают несколько раз в ксилол, затем впитывающим материалом подсушивают препарат.

4. Окрашивают препарат в 0,5 %-ом водном растворе сафранина 5–10 с.

5. Промывают водой, высушивают на воздухе, микроскопируют.

Оценка результата.

Включения поли-β-оксимасляной кислоты – капельки черно-синего цвета, цитоплазма бактерий окрашивается в розовый цвет.

Окрашивание гранул полифосфата.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) раствор метиленового синего по Леффлеру или 1 %-й раствор толуидинового синего;
- 3) вода для промывания мазков;
- 4) бактериологическая петля;
- 5) спиртовка.

Техника окраски:

1. Мазок на предметном стекле фиксируют нагреванием.
2. Наносят на препарат на 10–30 секунд раствор метиленового синего по Леффлеру или 1 %-й раствор толуидинового синего.

3. Промывают препарат водой.

4. Высушивают на воздухе, микроскопируют.

Оценка результатов.

При окраске метиленовым синим - гранулы полифосфата в виде шариков синего или фиолетового цвета, цитоплазма окрашивается в светло-голубой цвет. Толуидиновый синий окрашивает метакроматически, гранулы имеют красный цвет на голубом фоне цитоплазмы.

Метод окраски по Морозову предназначен для обнаружения вирусов путем импрегнации серебром, а также выявления микроструктуры бактерий (в том числе риккетсий, спирохет), жгутиков, аргирофильных и аргентофильных включений и гранул.

Принцип метода состоит в том, что при обработке мазков таниновыми препаратами жгутики бактерий становятся более рыхлыми, объемистыми и доступными для воздействия на них азотистого серебра. Кроме того, при обработке препарата аммиачным раствором серебра эта соль восстанавливается в исследуемом объекте, и специфические ингредиенты объекта избирательно окрашиваются в коричневатый-черный цвет.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) дистиллированная вода;
- 3) преципитационная пробирка;
- 4) 1 %-й раствор формалина;
- 5) бактериологическая петля;
- 6) спиртовка;
- 7) реактивы:

- Реактив №1: 1 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл формалина, 100 мл дистиллированной воды.

- Реактив №2: 5 г танина, 1 мл жидкой карболовой кислоты, 100 мл дистиллированной воды.

- Реактив №3: 5 г кристаллического нитрата серебра растворяют в 100 мл дистиллированной воды, отливают 20 мл в другой сосуд, к оставшимся 80 мл раствора серебра по каплям добавляют раствор аммиака, пока не растворится образующийся осадок и не останется легкая опалесценция. Если аммиака будет слишком много, то из отлитых в другой сосуд 20 мл раствора серебра надо по каплям добавлять его до получения нужной слабой опалесценции.

Для окраски препарата раствор серебра разводят дистиллированной водой 1:10.

Техника окраски:

1. Прокаленной и охлажденной петлей слегка прикасаются к поверхности колоний или газонного роста микробной культуры, чтобы не вызвать механического повреждения жгутиков.

2. Полученный материал переносят в преципитационную пробирку, на дно которой налито 0,1-0,2 мл 1 %-го раствора формалина. Петлю оставляют в неподвижном состоянии на несколько минут. За это время часть микробов переходит с петли в раствор. Эту процедуру повторяют 2-3 раза, пока жидкость не станет слабо опалесцировать.

3. Приготовленную взвесь ставят на 1-2 ч в термостат при 37 °С для равномерного распределения микроорганизмов в жидкой среде.

4. Затем в пробирку с 1,5–2 мл дистиллированной воды вносят 1-2 капли формалиновой бактериальной взвеси. Через 10–15 мин, после того как бактерии относительно равномерно распределятся по всему объему жидкости, наносят 5-6 капель полученной взвеси на предметное стекло, не касаясь его петлей.

5. Капли высушивают на воздухе, не размазывая.

6. Для лучшего протравливания обрабатывают их реактивом №1 (ледяная уксусная кислота с формалином) в течение 1 мин.

7. Остатки протравы сливают, мазок промывают водой.

8. После подсыхания мазка на препарат наливают реактив №2, подогревают на легком пламени до появления паров (1 мин).

9. Тщательно промывают водой (1-2 мин).

10. На подсушенный после промывания препарат наносят реактив №3 и выдерживают его до появления темно-коричневой окраски мазка.

11. Тщательно промывают водой.

12. Высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

Оценка результатов. Тела микробных клеток окрашиваются в коричневато-черный (угольно-черный) цвет, жгутики приобретают различные оттенки коричневого цвета и отчетливо видны на окрашенном в слабозелтый цвет фоне.

Метод окраски по Грю основан на искусственном увеличении жгутиков за счет нанесения протравы.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) вода для промывания мазков;
- 3) карболовый фуксин Циля;
- 4) бактериологическая петля;
- 5) спиртовка;
- 6) реактивы:

• Реактив №1: насыщенный водный раствор калийных квасцов – 5 мл, 20%-й водный раствор танина – 2 мл, насыщенный водный раствор хлорида ртути – 2 мл.

- Реактив №2: насыщенный спиртовой раствор основного фуксина – 0,4 мл.

Протраву, состоящую из растворов №1 и №2, готовят за сутки до использования.

Техника окраски:

1. Протраву наливают на препарат на 8–10 мин.
2. Промывают водой и окрашивают карболовым фуксином Цили 5 мин.
3. Мазок промывают водой.
4. Высушивают на воздухе и микроскопируют.

Оценка результатов.

Жгутики окрашиваются в красный цвет.

Метод окраски по Шенку.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) вода для промывания мазков;
- 3) метиленовый синий Леффлера или 1 %-й спиртовой раствор сафранина;
- 4) бактериологическая петля;
- 5) спиртовка;
- 6) реактивы:
 - Реактив №1: 30 мл насыщенного водного раствора танина и 10 мл 5 %-го водного раствора хлорида железа.
 - Реактив №2: 1 мл анилина и 4 мл 95 %-го этилового спирта.

Техника окраски:

1. Протраву, состоящую из растворов №1 (8 капель), и №2 (1 капля), наносят на мазок.
2. Протраву сливают.
3. Мазок окрашивают метиленовым синим Леффлера или 1%-м спиртовым раствором сафранина.

Окраска хламидий

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) водопроводная вода;
- 3) метиловый спирт;
- 4) 96 %-й этиловый спирт;

- 5) 10 %-й раствор Люголя;
- 6) бактериологическая петля;
- 7) спиртовка.

Техника окраски:

1. Мазки фиксируют 10 минут метиловым спиртом, затем 20 минут – 96 %-м этиловым спиртом.
2. После фиксации на препарат наносят 10 %-й раствор Люголя и окрашивают 5 минут.
3. Краситель сливают, микропрепарат промывают водой.
4. Высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой (окуляр x7, x10, объектив x100).

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

АБСОРБЦИЯ – поглощение вещества из раствора или смеси газов твердым телом или жидкостью; в отличие от адсорбции происходит во всем объеме поглотителя.

АВТОТРОФЫ – организмы, способные использовать углекислоту в качестве единственного или главного источника углерода и обладающие системой ферментов для ее ассимиляции, а также способные синтезировать все компоненты клетки. Некоторые А. могут нуждаться в экзогенных (поступающих извне) витаминах и факторах роста (ауксотрофы). В зависимости от источника энергии, используемого А. для восстановления CO_2 , различают фотоавтотрофы (наземные зеленые растения; водоросли; цианобактерии, способные к оксигенному фотосинтезу; фототрофные бактерии, осуществляющие анакисгенный фотосинтез) и хемоавтотрофы, получающие энергию за счет окисления неорганических соединений и осуществляющие хемосинтез. Большинство А. ассимилируют углекислоту через восстановительный пентозофосфатный путь (цикл Кальвина). А. – продуценты органического вещества в биосфере, образующие первый трофический уровень в сообществах.

АДСОРБЦИЯ ВИРУСА – первая фаза взаимодействия вируса с клеткой. Характеризуется выраженной специфичностью, определяемой соответствием рецепторов клеточной стенки (находятся в липопротеиновом или липополисахаридном слое) и поверхностных структур вириона.

АЗОТОБАКТЕР (*Azotobacter*) – род аэробных свободноживущих азотфиксирующих бактерий. Форма клеток овальная или кокковидная, подвижные и неподвижные, грамтрицательные, спор не образуют. Обычны на хороших почвах, продуценты ряда витаминов, ауксинов, антибиотиков, что объясняет их положительное влияние на рост растений. В активном состоянии связывают до 20 мг азота на 1 г использованного углевода. Некоторые виды применяются в производстве бактериального удобрения азотобактерина.

АКТИНОМИЦЕТЫ – крупная группа грамположительных бактерий, объединяемых в актиномицетную линию, или актинобактерии. Уст. Название А. – «лучистые грибки». В большинстве своем А. – обитатели почвы, почти все – аэробы, органотрофы, могут разлагать самые различные природные полимеры, в частности хитин, многие способны к активному антагонизму за счет синтеза антибиотиков. Последнее в значительной степени стимулировало изучение этой группы микроорганизмов в интересах биотехнологии.

АЛКАЛОФИЛЫ – микроорганизмы, развивающиеся в щелочных средах (рН 9,0—11,0). Облигатные А. растут в пределах рН 8,5—11,0; факультативные – 5,0—11,0. К А. относятся, напр., аммонифицирующие бактерии. В основном почвенные и водные организмы. То же, что и базофилы, базофильные организмы.

АММОНИФИКАТОРЫ – физиол. группа бактерий, использующих белки и аминокислоты в качестве энергетических субстратов, что сопровождается выделением в среду аммиака. Среди А. встречаются как спорообразующие формы (*Bacillus*), так и микроорганизмы, не образующие спор (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Proteus*).

АММОНИФИКАЦИЯ – разложение микроорганизмами азотсодержащих органических соединений (белков, мочевины, нуклеиновых кислот и др.) с образованием свободного аммиака. Белки сначала вне клетки расщепляются протеолитическими ферментами до пептидов, которые затем поглощаются клеткой и внутри нее пептидазами разлагаются до отдельных аминокислот.

АМФИТРИХИ – бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах клетки.

АНАБИОЗ – состояние организма, при котором жизненные процессы настолько замедлены, что отсутствуют все видимые проявления жизни. А. наблюдается при резком ухудшении условий существования организма (низкая температура, отсутствие воды и др.).

АНАЭРОБЫ – организмы (в основном прокариоты), способные жить при отсутствии в среде свободного кислорода. Облигатные А. получают энергию в результате брожения (маслянокислые бактерии и др.), анаэробного дыхания (метаногены, сульфатвосстанавливающие бактерии и др.) и аноксигенного фотосинтеза (фототрофные бактерии). Они не выносят присутствия молекулярного кислорода в среде. Факультативные А. способны переключаться с одного способа получения энергии на другой (дыхание – брожение) в зависимости от наличия O₂ в среде (энтеробактерии, дрожжи и др.). Аэротолерантные А. обладают метаболизмом анаэробного типа (напр., брожение), но могут расти в присутствии воздуха (молочнокислые бактерии).

АРХЕИ – группа микроорганизмов с прокариотным типом строения клетки, отличающихся от бактерий (эубактерий) многими свойствами. Физиологически и экологически разнообразная группа. Многие способны жить в экстремальных условиях при строгом анаэробии, в горячих и сильно засоленных водных источниках. Некоторые А. обладают особым типом фотосинтеза на основе бактериородопсина; ассимиляцию углерода автотрофные А. осуществляют через ацетил–КоА–путь или через

восстановительный цикл трикарбоновых кислот. Некоторые А. способны фиксировать N_2 .

АЦИДОФИЛЫ – микроорганизмы, нормально развивающиеся на кислых средах (рН 2–4). Облигатные А. могут расти при значениях рН среды 1,0–5,0; факультативные – 1,0–9,0. К А. относятся дрожжи, молочнокислые бактерии, тионовые бактерии и некоторые др.

АЭРОБЫ, АЭРОБНЫЕ ОРГАНИЗМЫ – организмы, нуждающиеся в молекулярном кислороде. Облигатные А. получают энергию только за счет аэробного дыхания, при котором кислород играет роль терминального окислителя. Облигатные А., нуждающиеся в пониженной концентрации кислорода в среде (порядка 2 %), получили название микроаэрофилы. Факультативные А. способны существовать как в кислородных, так и в бескислородных условиях, переключаясь с аэробного дыхания на брожение или анаэробное дыхание (дрожжи, энтеробактерии).

БАКТЕРИИ ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩИЕ – бактерии, способные осуществлять денитрификацию.

БАКТЕРИИ КИШЕЧНОЙ ГРУППЫ – бактерии сем. Enterobacteriaceae, включающего ряд родов (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* и др.) – типичных обитателей кишечника животных и человека. При значительном разнообразии они обладают некоторыми общими свойствами – грамотрицательные палочки, активно подвижные, спор не образуют. Факультативные анаэробы, способны получать энергию как в процессе дыхания, так и в результате смешанного (муравьинокислого) брожения. В отношении питания нетребовательны – растут на простых синтетических средах, содержащих глюкозу, аммоний и минеральные соли. Имеют большое значение для эпидемиологии как возбудители ряда болезней (дизентерия, холера, чума и др.), а также для разного рода экспериментальных исследований. Типичным и наиболее хорошо изученным представителем Б. к. г. является кишечная палочка (*Escherichia coli*), поэтому в санитарной микробиол. всю группу называют бактериями группы кишечной палочки (БГКП).

БАКТЕРИИ КЛУБЕНЬКОВЫЕ – бактерии родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, азотфиксирующие симбиотические бактерии, образующие клубеньки на корнях бобовых растений – симбионтов. Внутри клубеньков Б. к. фиксируют азот, переводя его в соединения, усваиваемые растениями, которые, в свою очередь, обеспечивают бактерии питательными веществами. В чистой культуре Б. к. палочковидной формы, подвижны, аэробы и факультативные анаэробы. В клубеньках меняют свою форму, образуя бактериоды, интенсивно связывающие.

БАКТЕРИИ МЕЗОФИЛЬНЫЕ – бактерии, для которых температурный оптимум для роста лежит в пределах 2–42 °С; большинство – почвенные и водные организмы.

БАКТЕРИИ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИЕ – бактерии, использующие метан как источник энергии и углерода. Грамотрицательные, подвижные и неподвижные, сферической, палочковидной или вибриоидной формы.

БАКТЕРИИ МОЛОЧНОКИСЛЫЕ – бактерии родов *Lactobacillus*, *Streptococcus* и др., при сбраживании углеводов образуют молочную кислоту. Факультативные анаэробы, грамположительные палочки и кокки, спор не образуют. Растут только на сложных питательных средах. Ауксотрофы по большинству аминокислот и витаминов. Ацидофилы. Встречаются в молоке и молочных продуктах, на растениях и разлагающихся растительных остатках, в кишечнике человека и животных. Могут осуществлять гомоферментативное и гетероферментативное молочнокислое брожение. Участвуют в процессах силосования кормов, квашения капусты, используются в производстве молочнокислых продуктов, молочной кислоты, декстранов.

БАКТЕРИИ НИТЧАТЫЕ – бактерии, растущие в виде длинных нитей, состоящих из цепочек клеток. Нередко имеют общую слизистую капсулу. Типичный представитель – железобактерии *Leptothrix*.

БАКТЕРИИ ПАТОГЕННЫЕ – бактерии, вызывающие болезни человека, животных и растений.

БАКТЕРИИ ПРОПИОНОВОКИСЛЫЕ – бактерии рода *Propionibacterium* и др., сбраживающие углеводы с образованием пропионовой, уксусной кислот. Обитатели рубца и кишечника жвачных. Используются в производстве некоторых сортов сыра, а также как продуценты витамина В₆.

БАКТЕРИИ СПОРООБРАЗУЮЩИЕ – бактерии, обладающие способностью образовывать термоустойчивые споры при наступлении неблагоприятных для роста условий. Аэробные и факультативно аэробные Б. с. относят к родам *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*; анаэробные – к родам *Clostridium*, *Desulfotomaculum*.

БАКТЕРИИ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ – бактерии, хорошо растущие при температурах выше 40°С; для большинства из них верхний предел температуры – 70°С. В отличие от Б.т. термотолерантные бактерии растут до 50°С, экстремально термофильные – при температурах выше 70°С.

БАКТЕРИИ УКСУСНОКИСЛЫЕ – группа бактерий, способных образовывать органические кислоты путем неполного окисления сахаров или спиртов. В качестве конечного продукта образуют уксусную, гликолевую, глюконовую и др. кислоты.

БАКТЕРИИ ФОТОТРОФНЫЕ – бактерии, способные использовать свет как источник энергии для роста. К Б. ф. относят пурпурные, зеленые бактерии, гелиобактерии, осуществляющие фотосинтез без выделения кислорода (аноксигенный фотосинтез), и цианобактерии, выделяющие на свету кислород (оксигенный фотосинтез).

БАКТЕРИИ ХЕМОЛИТОАВТОТРОФНЫЕ – бактерии, получающие энергию за счет окисления неорганических соединений (H_2 , S, S_2 , S_2O_3 , H_3 , Fe^{2+}) и ассимилирующие углекислоту в качестве единственного источника углерода.

БАКТЕРИИ ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗРУШАЮЩИЕ – физиол. группа бактерий, включающая представителей разных таксонов: клостридии, ряд актиномицетов, миксобактерии, некоторые псевдомонады, представители коринеформных бактерий, постоянные обитатели желудка жвачных, относящиеся к родам *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio* и др. Единственное общее свойство этих организмов – способность к ферментативному расщеплению целлюлозы.

БАКТЕРИЦИДНОСТЬ – способность физ. (температура, ионизирующее излучение), хим. (спирты, фенол, соединения ртути и др.), биол. (напр., лизоцим) факторов вызывать гибель бактерий.

БАЦИЛЛЫ – 1) тривиальное название любых бактерий палочковидной формы; 2) представители рода *Bacillus*, включающего аэробные и факультативно анаэробные грамположительные палочковидные спорообразующие бактерии; 3) в ненаучном словоупотреблении различные болезнетворные бактерии.

БИФИДОБАКТЕРИИ (*Bifidobacterium*) – род бактерий актиномицетной линии. Грамположительные, неподвижные палочки, не образующие спор, часто ветвящиеся, с булавовидными утолщениями на концах. Анаэробы, но при высокой концентрации CO_2 (1%) толерантны к кислороду. Сбраживают углеводы по типу гетероферментативного молочнокислого брожения. Являются нормальной кишечной микрофлорой детей и молодняка сельскохозяйственных животных в период молочного вскармливания; подавляют развитие гнилостных и болезнетворных микробов, образуют витамины К и группы В, способствуют перевариванию углеводов.

БОЛЕЗНЬ ИНФЕКЦИОННАЯ – нарушение нормальной жизнедеятельности организма, обусловленное функциональными и (или) морфологическими изменениями, возникающими в результате проникновения в организм и последующего размножения болезнетворных микроорганизмов.

БОТУЛИЗМ – болезнь человека, связанная с отравлением организма токсином анаэробных бактерий *Clostridium botulinum*, развивающихся на пищевых продуктах (чаще всего в некачественных мясных и рыбных консервах).

БРОЖЕНИЕ МАСЛЯНОКИСЛОЕ – тип брожения, осуществляемый сахаролитическими анаэробными клостридиями, расщепляющими крахмал, декстрин, инулин, маннитол, пектин и др. Расщепление гексоз идет по гликолитическому пути. Акцепторами водорода служат органические кислоты или кетоны, образующиеся из пирувата или ацетил-КоА. В результате доминирующими продуктами брожения являются бутират, ацетат, CO_2 , иногда H_2 . При этом ацетон и бутанол не образуются, что отличает этот тип брожения от брожения ацетоно–бутилового.

БРОЖЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛОЕ – тип брожения, осуществляемый молочнокислыми бактериями. В зависимости от того, какие продукты образуются при сбраживании глюкозы – только молочная кислота или вместе с ней также этанол, ацетат и углекислота, – принято различать гомоферментативное и гетероферментативное Б. м. При гомоферментативном Б. м. не менее 9 % всех продуктов брожения составляет молочная кислота. Катаболизм глюкозы идет по гликолитическому пути, образующийся восстановитель расходуется на восстановление пирувата до лактата. Небольшая часть пирувата может декарбоксилироваться, превращаясь в уксусную кислоту, этанол и CO_2 . Бактерии, осуществляющие гетероферментативное Б.м., не имеют главных ферментов гликолитического пути – альдолазы и триозофосфатизомеразы. Начальное превращение глюкозы идет у них по пентозофосфатному пути с образованием акцепторов водорода – ацетилфосфата и глицеральдегидфосфата. В результате их восстановления образуются ацетат, этанол, молочная кислота. Гомоферментативное Б. м. осуществляют мезофилы – *Streptococcus lactis*, *S. faecalis*, *S. cremoris*, и др., термофилы – *Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii* и др.; гетероферментативное – *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Bifidobacterium bifidum* и др. Б. м. широко используется в пищевой промышленности, в производстве кормов, молочной кислоты.

БРОЖЕНИЕ ПРОПИОНОВОКИСЛОЕ – тип брожения, осуществляемый пропионовокислыми бактериями, использующими в анаэробных условиях широкий круг соединений–глюкозу, сахарозу, лактозу, а также лактат, малат, глицерол и др. с образованием пропионовой кислоты. Расщепление гексоз происходит по гликолитическому пути. Восстановление пирувата идет по метилмалонил-КоА-пути, названному так по характерному промежуточному продукту (метилмалонил-КоА). При этом пируват

сначала карбоксилируется до оксалацетата, который последовательно восстанавливается до сукцината через малат и фумарат. На уровне метилмалонил-КоА, образующегося из активизированного сукцината (сукцинил-КоА), происходит декарбоксилирование и образование пропионил-КоА, а затем – пропионата как продукта брожения.

БРОЖЕНИЕ СПИРТОВОЕ – тип брожения, осуществляемый дрожжами и некоторыми бактериями, в результате которого образуется этанол. Расщепление сахаров дрожжами осуществляется по гликолитическому пути. Образующийся пируват сначала декарбоксилируется до ацетальдегида, последний при участии НАДН₂ восстанавливается до этанола. Если искусственно связать ацетальдегид бисульфитом, то акцептором водорода будет выступать дигидроксиацетонфосфат и в качестве конечного продукта образуется глицерин. Этот прием используется в пром-ти для получения глицерина. Образование этанола бактериями (*Zyomonas mobilis*) связано с разложением глюкозы по пути Энтнера-Дудорова; превращение образующегося пирувата идет тем же путем, что и у дрожжей. Этанол также является побочным продуктом др. типов брожения. Б. с. широко используется в виноделии, пивоварении, пром. производстве этанола, глицерина.

ВИРУЛЕНТНОСТЬ – 1) сложное свойство болезнетворности данного микроорганизма, складывающееся из инфекционности, инвазивности, патогенности; 2) количественное выражение болезнетворности данного микроорганизма в отношении определенного вида животного или растения. Измеряется в условных величинах – минимальная летальная доза (DLM), 5 %-ная летальная доза (LD 5) для определенного вида экспериментального животного.

ГАЛОФИЛЫ – обобщенное название микроорганизмов, растущих на средах с повышенным содержанием минеральных солей. Обычно морские формы, обитатели соленых озер. Уровень галофилии определяется по количеству NaCl в питательной среде. Облигатные Г. способны расти на средах, содержащих не менее 12 % NaCl, экстремальные Г. растут при концентрации NaCl в среде 20–30 %.

ГИФЫ – микроскопические ветвящиеся нити, образующие вегетативное тело гриба – таллом. Вся совокупность Г. грибного таллома называется мицелием. Толщина Г. от 0 до 30 мкм. Обладают вершущечным (апикальным) ростом. У «низших» грибов Г. не имеют поперечных перегородок и мицелий представляет собой одну крупную клетку. Хим. состав оболочек Г. различен в разных систематических группах: хитин, целлюлоза, глюкан. Среди прокариотных организмов Г. образуют гифомикробы и актиномицеты, у последних формируется субстратный или воздушный мицелий, подобный грибному.

ДЕЗИНФЕКЦИЯ – комплекс мер по уничтожению возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных с применением антимикробных средств. Термин употребляется главным образом в гигиене, санитарии.

ДЕНИТРИФИКАЦИЯ – микробиол. процесс восстановления окисленных соединений азота (нитратов, нитритов) до газообразных продуктов (обычно до N_2 , иногда до N_2O , редко до NO). Происходит в результате жизнедеятельности бактерий родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paracoccus* и др. – факультативных анаэробов, использующих в отсутствие кислорода нитраты и нитриты в качестве конечных акцепторов электронов (анаэробное дыхание, нитратное дыхание). При этом бактерии окисляют органические и неорганические вещества. В ходе Д. связанный азот удаляется из почвы и воды с освобождением N_2 в атмосферу. Процесс активно протекает в затопляемых почвах и может служить причиной потерь азота в земледелии. Д. замыкает цикл азота в биосфере и препятствует накоплению оксидов азота, которые в высоких концентрациях токсичны. Важный процесс в очистке сточных вод от нитратов, обеспечивает также постоянное содержание N_2 в атмосфере Земли.

ДРОЖЖИ – сборная группа микроскопических грибов (размеры 1,5–2,0 до 10–12 мкм), не имеющих типичного мицелия. Размножаются делением или почкованием. Известно около 500 видов. Д. – гетеротрофы с окислительным или бродильным типом метаболизма. Обычны на плодах, ягодах растений, в почве. Широко используются в науке как модели эукариотических клеток, а также в пищевой (пивоварение, хлебопечение, виноделие и др.) и в микробиол. пром-ти (производство БВК, этанола, глицерина и др.).

ЖГУТИК – органелла движения у прокариот и ряда водорослей, простейших. Основание Ж. (блефаропласт – у прокариот, кинетосомы – у простейших) располагается на внешней стороне плазматической мембраны. Ж. простейших состоит из 9 пар периферийных белковых микротрубочек (аксонем) и пары микротрубочек в центре. Снаружи аксонема одета плазматической мембраной. Диаметр Ж. простейших – 0,2 мкм, длина – до 150 мкм; число Ж. на клетку – от 1 до 4. Ж. прокариот (диаметр 12–18 нм, длина до 20 мкм) состоят из пучка белковых (белок флагеллин) нитей, закрученных вокруг внутреннего пространства, образующих таким образом микротрубочку. Внешняя оболочка отсутствует. Число белковых нитей (3–11) различно у разных видов. Ж. обладают антигенными свойствами (Н-антигены). Количество Ж. на клетку может колебаться от 1 (монотрихи) до сотен (перитрихи). Движение клетки обеспечивается вращением Ж. в ту или иную сторону.

В зависимости от числа и расположения Ж. на поверхности микробной клетки различают монотрихи, перитрихи, лофотрихи, амфитрихи.

ИНВАЗИВНОСТЬ – свойство паразитического микроорганизма активно размножаться в организме хозяина (прежде всего в лимфатических пространствах) и распространяться от ворот инфекции по всем тканям. Возможно попадание паразита в кровь, в результате чего могут возникать вторичные очаги инфекции в различных органах. В зависимости от природы паразита и устойчивости хозяина И. не всегда сопровождается развитием заболевания.

КИШЕЧНАЯ ПАЛОЧКА (*Escherichia coli*) – колибактерия, грамотрицательная бактерия семейства энтеробактерий. Палочка со слегка закругленными концами (0,4–0,8 x 1–3 мкм), спор не образует, подвижна, факультативный анаэроб. Сбраживает глюкозу, лактозу и др. углеводы (см. муравьинокислородное брожение). К. п. – один из наиболее обычных представителей нормальной кишечной микрофлоры млекопитающих. Выделяется с фекалиями в окружающую среду. Присутствие К. п. в исследуемых пробах почвы, воды свидетельствует об их фекальном загрязнении. Классический объект микробиол. и молекулярно-генетических исследований. Используется в биотехнологии для получения интерферона, инсулина и как продуцент некоторых ферментов.

КЛОН – культура микроорганизма (популяция клеток), полученная из одной (родительской) клетки путем бесполого размножения.

КЛОСТРИДИИ (*Clostridium*) – род спорообразующих палочковидных бактерий; обычно подвижны; грамположительные; при спорообразовании клетка раздувается в месте залегания споры. Анаэробы. Сбраживают углеводы (сахаролитические К. – возбудители маслянокислого и ацетонобутилового брожения), азотистые вещества (пептолитические К.). Мезофилы и термофилы. Обитатели воды, почвы, илов, пищевых продуктов. Ряд видов патогенны – *C. botulinum* – возбудитель ботулизма; *C. perfringens* и *C. histolyticum* – возбудители газовой гангрены; *C. tetani* – возбудитель столбняка. Некоторые К. фиксируют молекулярный азот. Сахаролитические К. применяются в пром-ти для получения ацетона и бутанола.

КОККИ – бактерии, клетки которых имеют шаровидную форму. В большинстве не обладают подвижностью. Спор, как правило, не образуют (за исключением рода *Sporosarcina*). Могут формировать достаточно устойчивые скопления клеток, что является диагностическим признаком – диплококки, стрептококки, сарцины, стафилококки. Обычные обитатели почвы, воды, воздуха. Сапротрофы, имеются патогенные виды.

КОЛИ-ИНДЕКС – количество клеток *Escherichia coli* в литре воды или килограмме твердого субстрата (напр., почвы). Показатель загрязнения водоемов, почв хозяйственно-бытовыми сточными водами. Обратная величина К. – и. – коли-титр. По действующему в нашей стране стандарту на питьевую воду ее К. – и. должен составлять не более 3, а коли-титр соответственно – не менее 300.

ЛАКТОБАЦИЛЛЫ (*Lactobacillus*) – род молочнокислых бактерий. Палочковидные, грамположительные, не образуют спор, обычно неподвижны. Осуществляют гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение. Обитают в молоке, мясных и растительных продуктах, на слизистых человека и животных. Некоторые виды Л. используют для пром. получения молочной кислоты, кисломолочных продуктов. За редким исключением непатогенны.

ЛИЗОЦИМ – антибиотик, обнаруживаемый в слезной жидкости, слюне человека и животных, в яичном белке, а также у фагов, бактерий и растений. Обладает свойствами фермента мурамидазы. Катализирует гидролиз связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой, что приводит к разрушению муреина. В организме растений и животных выполняет функцию неспецифического антибактериального барьера. Открыт А. Флемингом в 1922 г. Один из наиболее изученных ферментов.

L-ФОРМЫ БАКТЕРИЙ – искусственно получаемые формы бактерий, полностью или частично лишенные клеточной стенки. Образуются под воздействием некоторых хим. веществ (напр., пенициллина). В отличие от сферопластов и протопластов сохраняют способность к росту и размножению.

МЕЗОФИЛЫ – микроорганизмы, температурный оптимум которых лежит в пределах от 20 до 42 °С. К М. относится большинство почвенных и водных микроорганизмов. Свободноживущие М. в холодные сезоны года неактивны.

МИКОБАКТЕРИИ (*Mycobacteriaceae*) – семейство бактерий актиномицетной линии. Клетки палочковидные, часто искривленные и ветвящиеся, некоторые виды образуют легко распадающийся мицелий. Грамположительные, характеризуются высоким содержанием восков, что обеспечивает их кислотоустойчивость. Сапротрофы. Обитатели почвы, участвуют в минерализации органических остатков, в том числе окисляют жиры, воска, парафины и др. углеводороды. Патогенные виды вызывают болезни человека (*M. tuberculosis* – туберкулез, *M. leprae* – проказу), животных, растений.

МИКОЗЫ – заболевания человека и животных, вызываемые паразитическими грибами. Наиболее часто повреждению грибами подвергаются кожа, волосы, ногти (дерматофитии), легкие (кандидоз,

бластомикоз), слизистые оболочки (кандидоз, риноспориоз). Некоторые виды патогенных грибов продуцируют экзотоксины (напр., афлатоксины), но большая часть – эндотоксины.

МИКРОКОККИ – морфотип грамположительных бактерий, имеющих шаровидную форму. После деления материнской клетки дочерние расходятся, не образуя групп сцепления, как это наблюдается у диплококков, стрептококков, сарцин или стафилококков.

МИКСОБАКТЕРИИ (Mucosocates) – порядок грамотрицательных бактерий, содержащий 4 семейства. Обладают скользящим движением, образуют плодовые тела и микроцисты (миксоспоры). Вегетативные клетки палочковидные, размножаются поперечным делением. Характерной особенностью М. является образование ими слизистых колоний и яркоокрашенных плодовых тел. Строго аэробные хемогетеротрофы, обитатели почвы, ила, навоза и др. По пищевым потребностям М. разделяют на бактериолитические и целлюлозолитические. Бактериолитические М. наряду со скользящими флексибактериями называют «бактериальными хищниками».

МОНОТРИХИ – палочковидные бактерии, имеющие единственный жгутик, расположенный терминально или латерально. Типичными М. являются вибрионы.

МУРЕИН – гетерополимер, состоящий из остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных между собой 1,4-глюкозидными связями. Через лактильные группы и тетрапептидные мостики гетерополимерные цепи М. связаны между собой и образуют муреиновый мешок – опорный каркас клеточной стенки бактерий.

НИТРИФИКАЦИЯ – процесс биол. окисления аммиака, образующегося при деградации органических веществ до нитрата. Происходит в аэробных условиях в воде и почве. Автотрофная Н. осуществляется последовательно двумя группами нитрифицирующих бактерий – нитрификаторы 1-й фазы (роды *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*) окисляют аммиак до нитрита; затем нитрификаторы 2-й фазы (роды *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*) нитрит-ион окисляют в нитрат-ион. Нитрифицирующие бактерии (выделены и описаны в 1890 г. С.Н. Виноградским).

ОБЛИГАТНЫЙ – термин, определяющий состояние или условие, обязательное для данного организма. Напр., О. аэроб или О. анаэроб.

ОЛИГОТРОФЫ – микроорганизмы, развивающиеся на средах с низкой концентрацией питательных веществ. О. чаще всего обитают в водоемах с невысоким уровнем первичной продуктивности. Это

обычно озера и горные реки с холодной и насыщенной кислородом водой, бедной биогенными элементами (олиготрофные водоемы).

ОРГАНОТРОФЫ – микроорганизмы, использующие органические вещества в качестве доноров водорода для получения восстановителя (фотоорганотрофы – несерные пурпурные бактерии), а также энергии (хемоорганотрофы – большинство бактерий, грибов, простейших). Значительная часть О. использует органические вещества и как источник энергии, и как источник углерода. Термин О. употребляют иногда как синоним термина гетеротрофы.

ПАТОГЕННОСТЬ – свойство паразитического микроорганизма образовывать токсины (экзотоксины и эндотоксины), обладающие высокой активностью по отношению к отдельным тканям организма хозяина (нервная, мышечная) или широкого спектра действия, что приводит к возникновению клинической картины болезни различной тяжести, вплоть до смертельного исхода. П. вместе с инфекционностью и инвазивностью определяют болезнетворность микроорганизма.

ПЕРИТРИХИ – бактерии, имеющие многочисленные жгутики, прикрепляющиеся по всей поверхности клетки или вдоль боковых ее поверхностей.

ПЕРМЕАЗЫ – белки-переносчики, участвующие в активном транспорте веществ через цитоплазматическую мембрану. Обладают специфичностью к переносимым соединениям. Перенос веществ П. осуществляется против градиента их концентраций и зависит от АТФ или др. носителей метаболической энергии.

ПИЛИ, F-ВОРСИНКИ, ПОЛОВЫЕ ВОЛОСКИ, ФИМБРИИ – нитевидные поверхностные придатки бактериальных клеток. Обнаружены преимущественно у грамотрицательных бактерий (роды *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* и др.). Число П. варьирует от единиц до сотен на клетку. Состоят из белка пилина с низким содержанием основных аминокислот. При конъюгации бактерий участвуют в передаче ДНК. Специфические рецепторы для фагов.

ПИНОЦИТОЗ – 1) поглощение жидких питательных веществ эукариотической клеткой; 2) основной путь внедрения животных и растительных вирусов в клетку-хозяина. При этом происходит впячивание клеточной оболочки и обволакивание вирусной частицы.

ПЛАЗМИДЫ – внехромосомные факторы наследственности, представляющие собой малые по сравнению с хромосомой замкнутые в кольцо двухцепочечные ДНК (молекулярной массой 106–108 Да), способные к автономной репликации. Термин предложен в 1952 г. Наиболее изучены бактериальные П., хотя они широко распространены во всех живых клетках, в том числе и высших организмов.

ПНЕВМОКОККИ – бактерии *Streptococcus pneumoniae*, вызывающие у человека ряд заболеваний (чаще всего крупозное воспаление легких).

ПРОСТЕКИ – цитоплазматические выросты или выступы у некоторых бактерий, ограниченные клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной. Форма нитчатая или шиповидная. П. увеличивают клеточную поверхность, прикрепляют клетки к субстрату, участвуют в конъюгации бактерий. Характерны для простекобактерий, стебельковых бактерий и др.

ПРОСТЕКОБАКТЕРИИ – бактерии, обладающие специальными выростами – простеками. Большинство П. обнаружено среди олиготрофных микроорганизмов, обитающих в воде. У фотосинтезирующих бактерий *Prosthecochloris* в простеках располагаются хлоросомы, содержащие пигменты фотосинтеза.

ПСИХРОФИЛЫ – микроорганизмы, хорошо растущие при пониженных температурах. Облигатные П. не могут расти при температурах выше 20 °С, но растут при 0 °С и даже при отрицательных температурах, напр. На нижней стороне плавучих льдов. В основном водные организмы.

РИККЕТСИИ (Rickettsiaceae) – семейство бактерий. Названы по имени амер. микробиолога Х.Т. Риккетса, впервые описавшего возбудителя пятнистой лихорадки Скалистых гор. Плеоморфные кокковидные или палочковидные клетки (0,2–0,6 x 0,4–2,0 мкм), неподвижные, грамотрицательные, размножаются бинарным делением, спор не образуют. Облигатные внутриклеточные паразиты членистоногих и млекопитающих. Возбудители сыпного тифа, лихорадки Ку и др. тяжелых заболеваний человека и животных.

САЛЬМОНЕЛЛЁЗЫ – острые кишечные заболевания, вызываемые бактериями рода *Salmonella*.

САЛЬМОНЕЛЛЫ (*Salmonella*) – род энтеробактерий. Прямые палочки с закругленными концами (0,4–0,7 x 1,0–3,0 мкм), подвижные, грамотрицательные, факультативные анаэробы, гетеротрофы. Длительное время сохраняются во внешней среде и пищевых продуктах. Синтезируют эндотоксин. Большинство относятся к патогенным видам, вызывая сальмонеллезы (тифопаратифозные заболевания, пищевые токсикоинфекции).

САПРОБНОСТЬ – характеристика водного источника, отражающая количество органического вещества в воде. Понятие «С.» сформулировано и разработано для внутренних водоемов. По степени загрязненности вод органическими веществами их делят на олигосапробные (с малым содержанием органики), мезо- и полисапробные, а организмы, в них обитающие (сапробионты), соответственно называют олигосапробами, мезосапробами

и полисапробами. Несмотря на то что сапробионтами выступают преимущественно микроорганизмы, в микробиол. принят термин, характеризующий только олигосапробов, – олиготрофы.

САПРОТРОФЫ – общебиол. термин, характеризующий гетеротрофные организмы, использующие для питания органические соединения мертвых тел или выделения животных. Участвуя в минерализации органических соединений, С. составляют важное звено в биол. круговороте веществ и энергии. К С. относятся бактерии, грибы, а также немногие высшие растения и некоторые водоросли.

САПРОФИТЫ (уст.) – организмы, питающиеся остатками растений и животных и превращающие органические вещества в неорганические. В общебиол. литературе в настоящее время термин употребляется редко; в микробиол. используется как антоним паразитов, т. е. организмов, питающихся также готовыми органическими веществами, но живых организмов-хозяев. Напр., говорят о патогенных микроорганизмах – сапрофитах (возбудитель ботулизма) и паразитах (развивающихся в организме больного).

САРЦИНЫ (род *Sarcina*) – бактерии кокковидной формы, которые при делении не расходятся, а образуют скопления в виде пластин или пакетов. Образование групп клеток у них связано с тем, что каждое последующее деление клеток происходит с изменением плоскости деления на 90°.

СЕДИМЕНТАЦИЯ – оседание мелких частиц какого-либо тела в жидкости или газе под действием гравитационного поля или центробежных сил.

СПИРИЛЛЫ – граммотрицательные бактерии, имеющие вид спирально извитых палочек. Благодаря полярным жгутикам совершают винтообразные движения в воде, где обычно обитают. Большинство – хемоорганотрофы, многие растут при низкой концентрации кислорода (микроаэрофилы) и окисляемого субстрата в среде. Типичный род – *Spirillum*.

СПИРОХЕТЫ (*Spirochaetales*) – порядок бактерий. Клетки винтообразно закручены, имеют характерные структуры (см. аксиальные фибриллы, аксостиль). Размножаются делением. Грамотрицательные, спор не образуют, хемо-органогетеротрофы. Аэробы, факультативные и строгие анаэробы. Сапротрофы и паразиты животных и человека (возбудители сифилиса, лептоспироза и др.).

СТАФИЛОКОККИ (*Staphylococcus*) – род шаровидных бактерий. Клетки при делении в различных плоскостях не расходятся и образуют скопления, напоминающие гроздья винограда, хотя могут находиться в среде и одиночно. Неподвижные, грамположительные, факультативные анаэробы, хемоорганогетеротрофы, некоторые образуют пигменты. Широко распространены в почве, воздухе,

представители нормальной кожной микрофлоры человека и животных. Патогенные и условно патогенные виды. Возбудители гнойно-воспалительных заболеваний. Патогенные *C.* образуют эндо- и экзотоксины.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ – обеспложивание, полное освобождение от живых микроорганизмов различных веществ и предметов, напр. пищевых продуктов, питательных сред, хирургического инструмента, посуды и т. д. Осуществляется действием высоких температур, бактериальных фильтров (холодная *C.*), а также применением хим. веществ, ионизирующих излучений.

СТРЕПТОКОККИ (*Streptococcus*) – род шаровидных бактерий. Клетки *C.* расположены цепочками или парами, неподвижные, грамположительные. *C.* – факультативные анаэробы, большинство – хемоорганогетеротрофы, требовательные к составу среды.

ТАКСИСЫ – двигательные реакции подвижных микроорганизмов под влиянием одностороннего раздражения – светом (фототаксис), хим. веществами (хемотаксис), температурой (термотаксис) и др.; различают *T.* положительные (движение к раздражителю) и *T.* отрицательные (движение от раздражителя).

ТЕРМОФИЛЫ – микроорганизмы, приспособленные к жизни в условиях постоянно высоких температур. Средой обитания таких организмов являются природные горячие источники, саморазогревающиеся субстраты (влажные сено, зерно, навоз и др.), верхние слои почвы, сильно нагреваемые солнцем. Группу *T.* делят на 4 подгруппы – термотолерантные виды растут в пределах от 10 до 55–60 °C, при оптимуме в 35–40 °C; факультативные *T.* имеют максимальную температуру для роста в диапазоне 50–65 °C, но способны расти при комнатной температуре (20 °C); облигатные *T.* обнаруживают способность расти при температурах около 70 °C и не растут ниже 40 °C; к четвертой группе *T.* относятся экстремальные *T.* и гипертермофилы, для которых оптимум лежит в пределах 80–105 °C при минимальной границе роста в 60 °C и максимальной – до 110 °C. Многие из них относятся к археям и представлены метаногенами и видами, метаболизирующими молекулярную серу. В целом термофилия свойственна преимущественно прокариотным организмам, для многих одноклеточных эукариот предельной является температура 60 °C, а многоклеточные способны расти при температурах до 50 °C.

ФАКУЛЬТАТИВНЫЙ – возможный, необязательный. Напр., *F.* анаэробы способны расти не только в бескислородных условиях, но и в присутствии кислорода.

ФИТОНЦИДЫ – биол. активные вещества, синтезируемые растениями, убивающие или подавляющие рост и развитие др.

организмов (главным образом микроорганизмов). Играть важную роль в иммунитете растений.

ФЛАГЕЛЛИН – специфический фибриллярный белок, содержащийся в жгутиках бактерий, архей.

ФЛЕКСИБАКТЕРИИ – скользящие бактерии, обладающие способностью изгибаться. Представлены нитевидными одноклеточными и многоклеточными трихомными формами. Аэробные хемоорганотрофы, обитатели пресных и морских вод. Трудны для выделения в чистую культуру и потому плохо изучены.

ФОТОЛИТОАВТОТРОФЫ – организмы, конвертирующие энергию света в энергию хим. связей и использующие в качестве источника углерода и донора электронов неорганические соединения (соответственно CO_2 и H_2O ; H_2 , H_2S , SO и др.). К Ф. относят растения, цианобактерии, зеленые и пурпурные фототрофные бактерии. Обычно Ф. называют фотоавтотрофами.

ФОТОТРОФЫ – общее название организмов, использующих свет в качестве источника энергии. К Ф. относятся растения и фототрофные микроорганизмы.

ХЕМОТАКСИС – движение подвижных организмов под влиянием одностороннего раздражения хим. веществами.

ХЕМОТРОФЫ – организмы, получающие энергию за счет окисления хим. соединений (органических и неорганических).

ШТАММ – чистая культура микроорганизма, выделенная из определенного источника или полученная в результате мутаций. Разные Ш. одного и того же микроорганизма могут отличаться рядом свойств, напр. вирулентностью, чувствительностью к антибиотикам. Ш. микроорганизмов, используемых в пром-ти в качестве продуцентов антибиотиков, аминокислот и др. биол. активных веществ, как правило, значительно продуктивнее природных Ш.

ЭНДОГЕННЫЙ – внутренний, возникший внутри организма; в микробиол. часто употребляется термин «Э. метаболизм», определяющий метаболизм клетки за счет запасного вещества (напр., гликогена, крахмала).

ЭНТЕРОБАКТЕРИИ (Enterobacteriaceae) – семейство бактерий. Палочки, подвижные и неподвижные, грамотрицательные, аэробы и факультативные анаэробы, гетеротрофы, спор не образуют. Различаются по ферментативной активности, серологически, по чувствительности к бактериофагам. Устойчивы к воздействию факторов внешней среды. Обитают в кишечнике человека и животных, в воде и почве, загрязненных сточными водами. 12 родов – *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* и др. сапротрофные и патогенные бактерии.

ЭУБАКТЕРИИ – истинные бактерии. Термин был введен для обозначения известных бактерий после достаточно полного изучения родственных им прокариотных организмов, получивших название археобактерии. В наст. время использование термина нецелесообразно, поскольку археобактерии по современной классификации относят к самостоятельному царству прокариот – археям.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев, С.А. Микробиология: Учебное пособие / С.А. Беляев. - СПб.: Лань П, 2016. - 496 с.
2. Блинов, Л.Н. Санитарная микробиология: Учебное пособие КПТ / Л.Н. Блинов, М.С. Гутенев, И.Л. Перфилова и др. - СПб.: Лань КПТ, 2016. - 240 с.
3. Блинов, Л.Н. Микробиология и иммунология: Учебное пособие / Л.Н. Блинов, И.Л. Перфилова и др. - СПб.: Лань, 2013. - 240 с.
4. Борзова, Л.Д. Ветеринарная микробиология и иммунология. Практикум: Учебное пособие / Л.Д. Борзова, Н.Ю. Черникова, В.В. Якушев и др. - СПб.: Лань П, 2016. - 368 с.
5. Бородин, А.Н. Ветеринарная микробиология и микология: Учебник / А.Н. Бородин. - СПб.: Лань, 2014. - 624 с.
6. Ганина, В.И. Техническая микробиология продуктов животного происхождения: Учебное пособие / В.И. Ганина, Н.С. Королева, С.А. Фильчакова. - М.: ДеЛи принт, 2008. - 352 с.
7. Госманов, Р.Г. Санитарная микробиология: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.Х. Волков, А.К. Галиуллин, А.И. Ибрагимова. - СПб.: Лань, 2018. - 260 с.
8. Госманов, Р.Г. Санитарная микробиология пищевых продуктов: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев и др. - СПб.: Лань, 2015. - 560 с.
9. Госманов, Р.Г. Микробиология: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин и др. - СПб.: Лань, 2019. - 496 с.
10. Дейша-Сионицкая, М.А. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / М.А. Дейша-Сионицкая. - СПб.: Лань, 2016. - 588 с.
11. Джей, Д.М. Современная пищевая микробиология / Д.М. Джей, М.Д. Лесснер, Д. Гольден. - М.: Бином, 2014. - 886 с.

- 12.** Емцев, В.Т. Микробиология: Учебник для бакалавров / В.Т. Емцев. - Люберцы: Юрайт, 2016. - 445 с.
- 13.** Кисленко, В.Н. Пищевая микробиология: микробиологическая безопасность сырья и продуктов животного и растительного происхождения: Учебник / В.Н. Кисленко, Т.И. Дячук. - М.: Инфра-М, 2016. - 81 с.
- 14.** Колычев, Н.М. Ветеринарная микробиология и микология: Учебник / Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов. - СПб.: Лань, 2018. - 632 с.
- 15.** Лабинская, А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина и др. - СПб.: Лань, 2017. - 624 с.
- 16.** Мартинчик, А.Н. Микробиология, физиология питания, санитария: Учебник / А.Н. Мартинчик. - М.: Academia, 2018. - 399 с.
- 17.** Нетрусов, А.И. Микробиология: Университетский курс: Учебник / А.И. Нетрусов. - М.: Академия, 2014. - 400 с.
- 18.** Рябцева, С.А. Микробиология молока и молочных продуктов: Учебное пособие / С.А. Рябцева, В.И. Ганина, Н.М. Панова. - СПб.: Лань, 2018. - 192 с.
- 20.** Сбойчаков, В.Б. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований / В.Б. Сбойчаков. - СПб.: Спецлит, 2017. - 608 с.
- 21.** Сидоренко, О.Д. Микробиология продуктов животноводства (практ.рук.): Учебное пособие / О.Д. Сидоренко. - М.: Инфра-М, 2017. - 160 с.
- 22.** Сидорчук, А.А. Санитарная микробиология пищевых продуктов: Учебное пособие / А.А. Сидорчук, А.А. Глушков. - СПб.: Лань, 2015. - 560 с.
- 23.** Скокан, Л.Е. Микробиология основных видов сырья и полуфабрикатов в производстве кондитерских изделий / Л.Е. Скокан, Г.Г. Жарикова. - М.: ДеЛи принт, 2006. - 148 с.

Дмитрий Юрьевич Ильин
Галина Викторовна Ильина
Светлана Анатольевна Сашенкова

Микробиология

Учебное пособие для студентов технологического факультета
направления подготовки 36.03.01 Ветеринарно-санитарная
экспертиза

Компьютерная верстка Г.В. Ильиной

Подписано в печать
Бумага SvetoCopy
Усл. печ. л. 19,3

Формат 60 × 84 1/16
Отпечатано на ризографе
Тираж 100 экз. Заказ №

РИО ПГАУ

440014, г. Пенза, ул. Ботаническая, 30