

**ГОУ ВПО РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ (РГМУ) РОСЗДРАВА РФ**

**ГОУ ВПО РГМУ МОСКОВСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
РОСЗДРАВА РФ**

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ЧАСТЬ 1

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ,
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ
И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Москва 2010

**ГОУ ВПО РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ (РГМУ) РОСЗДРАВА РФ**

**ГОУ ВПО РГМУ МОСКОВСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
РОСЗДРАВА РФ**

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ЧАСТЬ 1

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ,
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ
И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
МИКРООРГАНИЗМОВ**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

Москва 2010

Общая микробиология. Часть 1. Морфологические, физиологические, биохимические и генетические свойства микроорганизмов.

ГОУ ВПО Российской государственный медицинский университет (РГМУ) РФ Росздрава, Московский факультет РГМУ.

166 с. 2010

Учебно-методическое пособие составлено в соответствии с действующей типовой «Программой по микробиологии, вирусологии и иммунологии», принятой для высших учебных медицинских учреждений» и разделена на три раздела - «Морфология микроорганизмов», «Физиология и биохимия микроорганизмов», «Бактериофаги. Генетика бактерий».

В учебно-методическом пособии разбираются свойства микроорганизмов, особый акцент делается на изучение прокариотических клеток. Для проводимых практических занятий дается краткое содержание рассматриваемой темы, обоснование цели исследования, описание методики постановки опыта и получаемого результата, приводятся вопросы для самоподготовки к занятию.

Назначение учебно-методического пособия – оказать помощь студентам при изучении свойств микроорганизмов и ознакомить с методами микробиологических исследований, чтобы использовать их при лабораторной диагностике инфекционных заболеваний.

Пособие предназначено для студентов 2-3 курсов медицинских вузов.

Под общей редакцией проф. Л.И.Кафарской и доц. Н.С.Горячкой.

Составители: сотрудники кафедры микробиологии и вирусологии РГМУ
Н.С.Горячкина, Е.Д.Радакова, Л.И.Кафарская, И.А.Гладько.

Коллектив авторов
ГОУ ВПО РГМУ РФ Росздрава
Московский факультет РГМУ РФ Росздрава,
2010 г.

Введение

Медицинская микробиология является фундаментальной дисциплиной, пополняющей естественно-научное образование студентов, что в первую очередь относится к общей микробиологии, инфекционной иммунологии и общей вирусологии.

Предметом ее изучения являются свойства микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов), как патогенных, так и условно-патогенных, нормальная микрофлора человека и закономерности инфекционного процесса, а также инфекционная иммунология, включающая факторы естественной защиты от болезнетворных микроорганизмов и адаптивного иммунитета к ним.

В то же время, медицинская микробиология имеет тесную связь с практической медициной, изучая свойства возбудителей инфекционных заболеваний, механизмы патогенеза и формирования инфекционного иммунитета, экологию и эпидемиологию, методы лабораторной диагностики, специфической профилактики и принципы специфической терапии этих заболеваний.

Таким образом, медицинская микробиология сочетает в себе основы как фундаментальной, так и прикладной науки, что обуславливает ее интеграцию со многими предметами, изучаемыми в медицинских вузах. Без знания теоретических дисциплин - биологии, химии, физики, биохимии, гистологии, физиологии и других - невозможно полноценное восприятие микробиологии. При изучении клинических дисциплин и, прежде всего, инфекционных болезней, акушерства, гинекологии, хирургических болезней, а также в повседневной практической деятельности врача, необходимо знание основ микробиологии, вирусологии и инфекционной иммунологии (граф 1).

СВЯЗЬ МИКРОБИОЛОГИИ



Граф 1

С ДРУГИМИ ДИСЦИПЛИНАМИ

ГИСТОЛОГИЯ

Строение клетки; гемопоэз; лимфоидная система; строение кожи и слизистых; микроскопия, гистологические методы окраски

БИОХИМИЯ

Химический состав клетки; метаболизм; нуклеиновые кислоты, их репликация; белки и биосинтез белка, электрофорез; углеводы, липиды; навыки лабораторной работы

НОРМАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

Кровообращение; пищеварение; дыхание и др.; понятие о гемостазе

ИСТОРИЯ МЕДИЦИНЫ

С ИММУНОЛОГИЕЙ ЛОГИЕЙ

Реакции антиген-антитело

СУДЕБНАЯ МЕДИЦИНА

Этиология гнойных инфекций, анаэробных раневых инфекций; их специфическая профилактика и терапия; природа тканевой несовместимости; методы стерилизации

ХИРУРГИЯ

ДЕТСКАЯ ХИРУРГИЯ

Реактивность организма; воспаление; аллергия

Закономерности иммунологии

АКУШЕРСТВО

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

ИММУНОЛОГИЯ

ПЕДИАТРИЯ

Этиология, иммунологические аспекты, лабораторная диагностика, специфическая профилактика и специфическая терапия инфекционных заболеваний

ЛОР-БОЛЕЗНИ

ГЛАЗНЫЕ БОЛЕЗНИ

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ С ЭПИДЕМИОЛОГИЕЙ

АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ

ДЕТСКИЕ ИНФЕКЦИИ

ТУБЕРКУЛЕЗ

КОЖНО-ВЕНЕРИЧЕСКИЕ БОЛЕЗНИ

Раздел 1

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Занятие 1

**Тема: Основные формы бактерий.
Микроскопическое изучение микроорганизмов.**

План занятия:

1. Знакомство с правилами работы и основами техники безопасности в микробиологической лаборатории.
2. Основные формы бактерий: демонстрация микрофотографий и таблиц.
3. Техника микроскопии с иммерсионной системой окрашенных мазков из чистых культур кокковидных, палочковидных и извитых форм бактерий.

Методические указания к выполнению практического занятия

I. Правила работы и основы техники безопасности в учебной микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории проводится с инфекционным материалом, что требует соблюдения основных правил техники безопасности при ее выполнении:

1. Студенты работают в медицинских халатах и шапочках, в необходимых случаях надевают маску из марли;
2. В помещениях лаборатории запрещено курение, прием пищи, излишние разговоры, суета, что может привести к инфицированию и нарушает стерильность при работе.
3. Каждый студент имеет постоянное рабочее место, где выполняется основная работа. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов, оно должно содержаться в образцовом порядке.
4. Работу с инфекционным материалом следует проводить при помощи специальных инструментов – бактериальной петли, пипетки, шпателя и др. у зажженной горелки.

5. Спиртовая горелка должна стоять на столе на подставке (керамической плитке). Зажигают горелку спичкой, гасят, накрывая колпачком. При загорании каких-либо предметов следует быстро воспользоваться огнетушителем.
6. Материал для работы раздает студентам дежурный по группе под наблюдением преподавателя и в конце занятия собирает.
7. Посевы в чашках Петри и пробирках проводят около горящей горелки с обжиганием бактериальной петли и краев пробирки. Запрещается переливание инфицированного материала из сосуда в сосуд через край – только стерильной пипеткой с защитной ваткой. Нельзя касаться руками исследуемого материала и конденсата воды в засеянных чашках Петри!
8. Предметы, использованные в работе с живыми микробами, сразу обеззараживают: бактериальные петли прожигают в пламени спиртовой горелки; пипетки, предметные стекла и др. погружают в дезинфицирующий раствор. Отдельно собирают посуду с использованными питательными средами, материалами от инфекционных больных. В дальнейшем их обеззараживают автоклавированием, кипячением или обрабатывают дезинфицирующими средствами. Запрещается оставлять на рабочем месте нефиксированные препараты, чашки Петри с посевами и другую посуду с инфекционным материалом!
9. В случае попадания заразного материала на стол или на пол студент должен немедленно сообщить об этом преподавателю и под его наблюдением провести обеззараживание инфицированного участка дезинфицирующим раствором.
10. В конце занятия студент обязан: привести в порядок рабочее место, сдать материал дежурному, вымыть руки, представить альбом с зарисовками и протоколами на подпись преподавателю.

II. Разбор основных форм бактерий (кокки, палочки, извитые формы, их размеры, расположение в мазке), сопровождаемый демонстрацией микрофотографий и таблиц.

III. Техника микроскопии окрашенных микропрепаратов с иммерсионной системой.

1. Поднять конденсор микроскопа до уровня предметного стекла и полностью открыть диафрагму;
2. Установить свет с помощью зеркала или включить осветитель;
3. На мазок нанести каплю иммерсионного масла, поместить препарат на предметный столик микроскопа;
4. Поставить в рабочее положение иммерсионный объектив «ОИ x 90»;
5. Под контролем глаза, глядя сбоку, с помощью макрометрического винта (макровинта) осторожно опустить тубус микроскопа до погружения иммерсионного объектива в каплю масла до предела; при необходимости провести коррекцию освещенности поля зрения с помощью зеркала;
6. Глядя в окуляр, пользуясь макровинтом, очень медленно поднимать тубус, пока не появится изображение объекта;
7. Далее провести точную фокусировку с помощью микрометрического винта (микровинта); не рекомендуется вращать микровинт более чем на пол-оборота в одну или другую сторону;
8. В процессе микроскопии следует передвигать препарат, устанавливать наилучшее поле зрения, в котором микробные клетки располагаются не слишком густо;
9. По окончании просмотра поднять тубус и только после этого снять препарат с предметного столика микроскопа;
10. Далее необходимо протереть фронтальную линзу иммерсионного объектива чистой тряпочкой и повернуть револьвер таким образом, чтобы ни один из объективов не был направлен в сторону конденсора.

Задание

1. Провести микроскопию окрашенных микропрепаратов (мазков) из чистых культур кокковидных, палочковидных и извитых форм, наименования которых указаны в таблице 1.
2. Таблицу перенести в альбом и начать ее заполнение. На последующих занятиях по мере изучения строения бактериальной клетки вписывать в нее свойства изучаемых бактерий.
3. Зарисовать рассматриваемые микропрепараты и написать их латинские названия.

Таблица 1

Морфологические признаки бактерий

Название	Форма	Расположение	Характер концов	Капсула	Жгутики	Включения	Эндоспоры
<i>Staphylococcus aureus</i>							
<i>Streptococcus pyogenes</i>							
<i>Sarcina flava</i>							
<i>Escherichia coli</i>							
<i>Lactobacterium spp.</i>							
<i>Bifidobacterium spp.</i>							
<i>Vibrio cholerae</i>							

Контрольные вопросы по теме занятия:

1. Организация микробиологической лаборатории, правила работы в ней и основы техники безопасности.
2. История микробиологии. Основные периоды развития.
3. Значение работ Л.Пастера и его школы в становлении общей и медицинской микробиологии.
4. Вклад Р.Коха и его школы в развитие общей и медицинской микробиологии.
5. Основные принципы систематики прокариот. Биогенетическая и нумерическая классификации.
6. Определитель прокариот по Берги (Bergye), принцип его составления. Практическое применение.
7. Таксономические категории: семейство, род, вид.
8. Основные морфологические формы бактерий, размеры, расположение.
9. Техника и значение микроскопии окрашенных микропрепараторов с иммерсионной системой.
10. Что входит в понятие «морфологические признаки бактерий»?

Занятие 2

Тема: Методы микроскопического изучения микроорганизмов.
Методы окраски. Ультраструктура бактериальной клетки.
Поверхностные структуры: капсула, клеточная стенка, жгутики, ворсинки.

План занятия:

1. Техника приготовления препарата-мазка, окраска простым методом.
2. Сложные методы окраски. Метод Грама.
3. Поверхностные структуры бактериальной клетки:
 - а) клеточная стенка бактерий: микроскопия мазков из чистых культур грамположительных бактерий, окрашенных по методу Пешкова;
 - б) капсула бактерий: окраска мазков из чистых культур капсулльных бактерий по методу Бурри-Гинса; выявление капсулы в мазках-отпечатках из органов зараженных животных, окрашенных простым методом;
 - в) жгутики бактерий: микроскопия нативных препаратов бактерий в затемненном поле зрения; демонстрация слайдов и микрофотографий;
 - г) ворсинки (пили, фимбрии): демонстрация электронных микрофотографий.
4. Способы микроскопии нативных (живых) препаратов бактерий:
 - а) приготовление нативных препаратов «раздавленная капля» и «висячая капля»;
 - б) микроскопия в затемненном поле зрения;
 - в) темнопольная микроскопия;
 - г) метод фазово-контрастной микроскопии.

Методические указания к выполнению практического занятия

1. Приготовление мазка из чистых культур кокковидных и палочковидных бактерий, окраска простым методом.

Для исследования микробов в окрашенном состоянии готовят мазок из чистой культуры бактерий на предметном стекле, высушивают и фиксируют в пламени горелки. Фиксация мазка является обязательной процедурой, в результате которой микробы погибают, прочно прикрепляются к стеклу и значительно лучше воспринимают окраску.

Способы фиксации: обычно применяют фиксацию в пламени горелки (фиксация жаром): предметное стекло в положении мазком вверх 3 раза проводят через пламя горелки. Применяют также различные жидкие фиксаторы, оказывающие более щадящее действие, например: этиловый или метиловый спирт, ацетон, формалин и др. Существуют также жидкие фиксаторы, представляющие собой смесь нескольких веществ, например: жидкость Карнуа. Выбор способа фиксации зависит от окрашиваемого объекта: в жидких фиксаторах фиксируют мазки из крови, гноя, мокроты и т.п. и метода окраски.

Различают простые и сложные методы окраски.

Простой метод окраски. Является одноэтапным и заключается в окраске микропрепарата одним красителем. Используют основные анилиновые красители, такие как фуксин, генцианвиолет, метиленовый синий в виде водных растворов или пропитанных красителем фильтровальных бумажек, которые, поместив на мазок, смачивают водой. Продолжительность окраски составляет 3-5 минут, после чего микропрепарат промывают водой, высушивают и микроскопируют.

В препаратах, окрашенных простым методом, можно получить представление о форме и размерах микробных клеток, их расположении в мазке, но не о детальном строении клеток.

Задание: Приготовить мазки-препараты из чистых культур *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sarcina flava*, как указано выше, окрасить их простым методом, микроскопировать с иммерсионной системой, зарисовать в альбоме.

На каждом занятии ко всем зарисовкам микропрепаратов делают аннотации по следующей форме: латинское название микроорганизма, способ окраски (при простом способе указывают наименование красителя); краткое описание микроскопической картины.

2. Сложные методы окраски. Сложные методы являются многоэтапными, приготовленный мазок последовательно обрабатывают различными красителями, протравами, дифференциирующими веществами. Сложные методы подразделяются на:

- **дифференциальные**, позволяющие отличить один вид или группу бактерий от других (метод Грама, метод Циля-Нильсена);

- **предназначенные для выявления различных морфологических структур бактериальной клетки.** Например: споры окрашивают

методом Ожешки, включения волютина – методом Нейссера, капсулу выявляют методом Бурри-Гинса и пр.

Протравы – физические и химические факторы, обладающие свойствами повышать окрашиваемость микробов. Уплотняя цитоплазму, они могут делать окраску более прочной, или усиливать красящие свойства красителя, или разрыхлять оболочки клеток, спор, способствуя проникновению краски в клетку.

Протравами обрабатывают мазок:

- a) перед окрашиванием – воздействуя раствором HCl при окраске спор у бактерий в методе Ожешки,
- b) в момент окраски – фенол и высокая температура (подогревание препарата) в методе Циля-Нильсена;
- v) после нанесения краски для ее закрепления – раствор Люголя в методе Грама.

Дифференцирующие вещества избирательно обесцвечивают одни виды или структуры бактериальных клеток и не обесцвечивают другие. Например: этиловый спирт в окраске по Граму, серная кислота в методах Циль-Нильсена и Ожешки.

Задание:

1. Освоить метод Грама, для чего приготовить смешанные мазки из чистых культур *Staphylococcus epidermidis* + *Escherichia coli* или *Sarcina flava* + *Escherichia coli*, окрасить по Граму, как указано в таблице 2.

2. Разбираемые на занятиях сложные методы окраски занести в сводную таблицу 3 по образцу метода Грама.

Таблица 2

Название метода	Метод Грама
Цель применения	Дифференциальный метод окраски для отличия одних видов бактерий от других (грамположительных от грамотрицательных), что является важным таксономическим признаком
Применяемые реагенты: 1. Красящие растворы	<ol style="list-style-type: none"> Карболовый генцианвиолет или фильтровальная бумагка, пропитанная раствором этой краски; Водный раствор карболового фуксина или фильтровальная бумагка, пропитанная этой краской;
2. Протрава	Раствор Люголя (на 300 мл дист. воды 1,0г кристаллического йода и 2,0 йодистого калия);
3. Дифференцирующее вещество	Этиловый спирт
Способ фиксации	В пламени горелки
Этапы окраски	<ol style="list-style-type: none"> На фиксированный мазок поместить фильтровальную бумагку, пропитанную генцианвиолетом, смочить водой, красить 3 минуты; Снять бумажку, слить с препарата оставшуюся краску и налить раствор Люголя на 1 минуту; Слить раствор Люголя, провести дифференциацию, погрузив препарат несколько раз в стаканчик со спиртом (пока не станут отходить фиолетовые струйки); Тщательно промыть препарат водой; Дополнительно докрасить препарат с помощью фильтровальной бумагки, пропитанной карболовым раствором фуксина в течение 4-5 минут; Промыть водой, высушить
Сущность метода	<p>При окраске генцианвиолетом и последующем воздействии раствором Люголя образуется комплексное соединение краски с йодом, которое при дифференциации спиртом удерживается в клетках грамположительных бактерий, имеющих многослойный пептидогликан (клетки остаются фиолетовыми) и удаляется из грамотрицательных (они обесцвечиваются). При дополнительной окраске фуксином грамотрицательные бактерии приобретают красный цвет.</p> <p>Следовательно, способность бактерий удерживать комплекс генцианвиолет-йод зависит, главным образом от строения клеточной стенки, имеющей существенные различия у грамположительных и грамотрицательных бактерий.</p>
Результат: описание микропрепарата и рисунок	В поле зрения видны грамположительные кокки (стафилококки или сарцины) сине-фиолетового цвета и расположенные между ними красные грамотрицательные кишечные палочки

Таблица 3

Сложные методы окраски

Название методы	Метод Грама	Метод Пешкова	Метод Бурри-Гинса.	Метод Циля-Нильсена	Метод Ожешки	Метод Романовского-Гимзы	Метод Нейссера
Цель применения							
Реактивы:							
1.краски							
2.протравы							
3.дифференц. вещества							
Способ фиксации							
Этапы окраски:							
1.							
2.							
3.							
4.							
Сущность метода							
Результат: описание и рисунок микроскопической картины							

3. Поверхностные структуры бактериальной клетки

Задание:

1. Изучить схему строения бактериальной клетки по таблицам и электронным микрофотографиям, обратить внимание на поверхностные структуры: капсулу, клеточную стенку, жгутики и ворсинки (фимбрии и пили). Приступить к заполнению таблицы 4.

3.1. Клеточная стенка бактерий является очень важным структурным компонентом прокариотических клеток, располагается над цитоплазматической мембраной (ЦПМ). Она защищает клетку от механического и физического воздействия окружающей среды, противодействует тургорному давлению клеточного содержимого и, следовательно, предотвращает осмотический лизис, определяет форму и антигенную специфичность клетки

Метод Пешкова применяется для окраски клеточной стенки. Техника окраски: приготовленный и высушенный препарат из бактериальной культуры грамположительных бактерий, например *Bacillus cereus*, фиксируют в жидкости Карнua (смесь этилового спирта, хлороформа и ледяной уксусной кислоты в соотношении 6:3:1) в течение 15 минут, промывают водой, протравливают в 10% растворе танина 6-8 минут, промывают и окрашивают водным раствором фуксина 30-60 секунд и, не промывая водой, высушивают с помощью фильтровальной бумаги, микроскопируют.

Результат окраски по методу Пешкова: в поле зрения видны крупные клетки стрептобацилл светло-розового цвета, они окаймлены клеточной стенкой красного цвета.

Задание: Микроскопировать и зарисовать готовый препарат из культуры *B.cereus*, окрашенный по методу Пешкова

L-формы бактерий. Если бактерии частично или полностью утратили клеточную стенку, но сохранили способность к размножению, они называются L-формами. L-формы бактерий образуются под воздействием препаратов, ингибирующих синтез пептидогликана (антибиотик пенициллин) или разрушающих пептидогликан (лизоцим). L-формы разных видов бактерий (палочковидных, кокковидных) морфологи-

Таблица 4

Ультраструктура бактериальной клетки

Наименование анатомических структур	Подразделение (если имеется)	Химический состав	Строение	Функции, значение	Методы выявления
Капсула					
Клеточная стенка					
Жгутики					
Ворсинки (фимбрии, пили)					
Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ)					
Мезосомы					
Нуклеоид					
Рибосомы					
Включения					
Эндоспора					

чески не различимы. Существуют нестабильные L-формы, частично сохраняющие клеточную стенку и способные к ее полному восстановлению, и стабильные L-формы, не способные к реверсии в исходное состояние. Утрата бактериями клеточной стенки ведет к изменению их морфологии, они теряют свою форму, становятся полиморфными, имеют различную оптическую плотность и образуют крупные и мелкие сферические тела, гранулы, мельчайшие элементарные тельца. В связи с осмотической хрупкостью L-форм невозможно получить их окрашенные препараты, поэтому их исследуют в фазово-контрастном микроскопе (в нативном состоянии).

3.2. Капсула бактерий располагается поверх клеточной стенки. Она защищает бактериальную клетку во внешней среде от механического повреждения, высыхания, ядовитых веществ, бактериофагов. Многие патогенные бактерии образуют капсулы в инфицированном организме, где капсулы защищают их от фагоцитов. Капсулы можно выявить в мазках-отпечатках из органов зараженных животных, для этого достаточно окрасить мазки простым методом или по Граму. При микроскопии на фоне окрасившейся ткани органа (печени, селезенки) видны окрашенные тела бактерий, окруженные белым ореолом, капсулы, так как сама капсула не окрашивается.

Метод Бурри-Гинса применяют для окраски чистой культуры капсулевых бактерий. Техника окраски:

1. На предметное стекло нанести рядом каплю туши и каплю воды, в которой суспензировать внесенную петлей капсулевую бактериальную культуру;
2. Обе капли соединить в одну и распределить ее тонким слоем с помощью второго предметного стекла (подобно тому как готовят мазок из крови);
3. Высохший на воздухе препарат осторожно фиксировать в пламени горелки;

На этой стадии мы получаем негативный способ окраски по Бурри: тушь, обтекая бактерии с капсулами, создает темно-серый фон, на котором хорошо видны неокрашенные, светлые бактерии. Чтобы выявить капсулу, необходимо продолжить окраску.

4. Препарат докрашивают разведенным (1:3) карболовым фуксином в течение 2-3 минут, промывают водой, высушивают.

Результат окраски по методу Бурри-Гинса: фуксин окрашивает тела бактерий в красный цвет, капсулы остаются неокрашенными и хорошо видны в виде белых ореолов вокруг бактерий на серовато-коричневом фоне туши.

Задание: Приготовить и окрасить препарат из чистой культуры *B.cereus* методом Бурри-Гинса. Рассмотреть слайды и мазки-отпечатки из органов животных, зараженных капсулыми бактериями: *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* и др., зарисовать.

3.3. Жгутики бактерий являются органами движения, они представляют собой нитевидные придатки, состоящие из белка флагеллина. Жгутик прикрепляется к бактериальной клетке с помощью сложной структуры, состоящей из базального тельца, представляющего собой систему дисков и крючка, к которому прикреплена жгутиковая нить. Количество жгутиков у бактерий разных видов различно. По количеству и расположению жгутиков различают монотрихи – один жгутик, перитрихи – жгутики по всей поверхности бактериальной клетки, лофотрихи – пучок жгутиков на одном конце клетки, амфитрихи – единичные жгутики или пучки на разных полюсах клетки.

Размеры жгутиков (толщина 10-20 нм, длина 3-15 мкм) не позволяют их увидеть в обычном световом микроскопе без особого метода сверхокраски, например метод серебрения, при котором жгутики искусственно утолщаются и становятся видимыми в иммерсионном микроскопе. Чаще всего определяют наличие жгутиков косвенно по активной подвижности микробных клеток в нативных препаратах.

Задание: Приготовить нативный препарат «раздавленная капля» из бульонной культуры подвижных бактерий, микроскопировать в затемненном поле зрения. Уметь отличать активное движение бактерий от броуновского движения.

3.4. Ворсинки (фимбрии и пили) имеются у многих как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, состоят из белка пилина. Они короче и тоньше жгутиков и, следовательно, видны только в электронном микроскопе. По своим функциям ворсинки подразделяются на половые пили (F-пили), обеспечивающие конъюгацию между

бактериями, и фимбрии общего порядка, которым присуща функция адгезии, то есть, они играют важную роль в процессах взаимодействия бактерий с макроорганизмом.

4. Способы микроскопии нативных (живых) микропрепараторов.

Из живой бактериальной культуры готовят нативные препараты в виде «раздавленной» или «висячей капли». Препарат «раздавленная капля» представляет собой каплю бактериальной культуры, нанесенную на предметное стекло и покрытую покровным стеклом. При приготовлении препарата «висячая капля» небольшую каплю культуры наносят на покровное стекло и накладывают каплей вниз на лунку специального предметного стекла. Приготовленные нативные препараты можно рассматривать в затемненном поле зрения и использовать темнопольную или фазово-контрастную микроскопию.

1) Микроскопия в затемненном поле зрения проста, но получаемое изображение недостаточно контрастно. Она заключается в уменьшении интенсивности освещения препарата, что достигается опусканием конденсора и сужением диафрагмы. Метод позволяет наблюдать движение бактерий, а также микроскопировать грибы и простейшие.

2) Темнопольная микроскопия основана на освещении препарата лучами, идущими в косом направлении и не попадающими в объектив, что делает поле зрения темным. В объектив попадают только те лучи, которые отражаются от имеющихся в препарате микробных клеток либо других частиц, и на общем темном фоне хорошо видны яркие, светящиеся изображения объектов. Освещение препарата косыми лучами создается с помощью специального темнопольного конденсора с затемненной центральной частью и боковой зеркальной поверхностью. Такой конденсор задерживает центральные лучи, а краевые лучи, проходя через кольцевую щель, отражаются от зеркальной поверхности конденсора и, далее, встречая на своем пути микробные клетки или другие объекты, отражаются от них и попадают в объектив.

Темнопольная микроскопия повышает разрешающую способность микроскопа примерно в 10 раз, она особенно ценна при изучении спирохет (возбудителей сифилиса, возвратного тифа, лептоспироза и др.) и наблюдении за подвижностью бактерий. При микроскопии в темном поле зрения четко видны контуры изучаемых объектов, но их внутренняя структура неразличима.

3) Метод фазово-контрастной микроскопии – универсальный метод изучения живых неокрашенных микроорганизмов, обладает хорошей разрешающей способностью, дает возможность различить некоторые анатомические структуры микроорганизмов, подвижность, является основным методом изучения микоплазм и L-форм бактерий.

Метод основан на превращении оптическими средствами фазовых колебаний в амплитудные. Это дает возможность получать контрастное изображение живых неокрашенных объектов, которые по своей природе являются «фазовыми» (малоконтрастными), т.е. вызывают сдвиг по фазе проходящей через них световой волны, не меняя ее амплитуды. Человеческий глаз не улавливает фазовых изменений, но воспринимает различия в длине волны и ее амплитуде. Поэтому неокрашенный объект при обычном методе микроскопии практически невидим. Чтобы сделать его хорошо различимым, обычно прибегают к окраске. Для повышения контрастности живых неокрашенных объектов их превращают в «амплитудные» с помощью специального фазово-контрастного устройства, которым оснащают обычный биологический микроскоп.

Устройство содержит: 1) несколько фазовых объективов с различным увеличением, в которых находится фазовая пластинка, имеющая форму кольца; 2) фазовый конденсор с набором кольцевых диафрагм для каждого объектива, вмонтированных в револьверный диск; 3) вспомогательный микроскоп, с помощью которого осуществляется настройка фазово-контрастной системы (фазовые кольца объектива должны быть совмещены с соответствующей кольцевой диафрагмой конденсора).

Микроскопическая картина живых микроорганизмов в фазово-контрастном микроскопе: на ярко освещенном поле зрения видны контрастные изображения живых, неокрашенных объектов с хорошо различимой внутренней структурой.

Контрольные вопросы по теме занятия

1. Основные краски, красящие растворы, применяемые в микробиологии..
2. Техника приготовления мазка-препарата, способы фиксации, ее значение. Простые методы окраски, цели.
3. Сложные методы окраски, характеристика, подразделение.

4. Сложные методы окраски. Протравы, их назначение, примеры. Дифференцирующие вещества, назначение, примеры, в каких методах окраски их применяют.
5. Метод Грама, его сущность, техника окраски, цель применения.
6. От чего зависит различное отношение бактерий к окраске по Граму? Приведите примеры грамположительных и грамотрицательных бактерий.
7. Основные анатомические структуры прокариот.
8. Клеточная стенка бактерий, ее строение у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Функции клеточной стенки.
9. Окраска клеточной стенки бактерий. Метод Пешкова. Сущность. Микроскопическая картина мазка грамположительных бактерий, окрашенных по методу Пешкова.
10. Капсула бактерий, химический состав, подразделение, значение. Примеры бактерий, образующих капсулу. Выявление капсул в органах зараженных животных.
11. Метод Бурри-Гинса, реактивы, сущность, микроскопическая картина мазка капсулльных бактерий, окрашенных методом Бурри-Гинса.
12. Жгутики бактерий, строение, химический состав. Подразделение жгутиковых бактерий. Методы выявления.
13. Ворсинки бактерий (пили, фимбрии), химический состав, функции.
14. Способы приготовления нативных (живых) препаратов «раздавленная капля», «висячая капля».
15. Микроскопическое изучение живых микроорганизмов в затемненном поле зрения. Назначение.
16. Темнопольная микроскопия. Сущность. Назначение.
17. Фазово-контрастная микроскопия. Сущность. Назначение.

Занятие 3

**Тема: Ультраструктура бактериальной клетки (продолжение).
Методы микроскопического изучения микроорганизмов
(продолжение). Морфология спирохет.**

План занятия:

1. Сложные методы окраски. Метод Циля-Нильсена.
2. Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) и мезосомы бактерий: демонстрация электронных микрофотографий.
3. Цитоплазма и расположенные в ней органеллы:
 - а) нуклеоид бактерий: микроскопия мазка из чистой культуры бактерий, окрашенного по методу Романовского-Гимзы; демонстрация электронных микрофотографий;
 - б) рибосомы бактерий;
 - в) цитоплазматические включения волютина у дифтерийной палочки: микроскопия мазков из чистой культуры *Corynebacterium diphtheriae*, окрашенных по Нейссеру и Леффлеру, демонстрация слайдов;
 - г) эндоспора бактерий: окраска мазков из чистой культуры *Bacillus cereus* методом Ожешки (Аузески) и простым методом (для выявления спор).
4. Спирохеты. Изучение морфологии и ультраструктуры боррелий, трепонем и лептоспир в окрашенных микропрепаратах, слайдах и электронных микрофотографиях.

Методические указания к выполнению практического занятия

1. Сложные методы окраски. Метод Циля-Нильсена.

Задание:

1. Освоить метод Циля-Нильсена. Окрасить фиксированный мазок из смеси чистых культур *Staphylococcus epidermidis* и *Mycobacterium bovis* (штамм BCG) по Цилю-Нильсену, как указано в таблице 5, микроскопировать, зарисовать.

2. Рассмотреть микропрепараты и слайд из мокроты туберкулезного больного. Найти в препарате рубиново-красные *Mycobacterium tuberculosis* на общем голубом фоне, остальные элементы мокроты, а также некислотоустойчивые бактерии синего цвета.

Таблица 5

Название метода	<i>Метод Циля-Нильсена</i>
Цель применения	Дифференциальный метод для выявления кислотоустойчивых бактерий, например: туберкулезных палочек в мокроте
Реактивы:	
1. Красящие растворы	1. концентрированный карболовый фуксин Циля; 2. водный раствор метиленового синего;
2. Протравы	1. действие фенола в красителе – фуксине Циля 2. высокая температура в процессе окраски;
3. Дифференцирующие вещества	5% раствор H_2SO_4
Способ фиксации	В пламени горелки
Этапы окраски	1. На фиксированный мазок положить белую фильтровальную бумажку и налить на нее раствор карболового фуксина Циля; 2. подогревать препарат над пламенем горелки до появления паров 3 - 4 раз; 3. снять бумажку, остудить препарат и промыть водой; 4. провести дифференциацию: опустить препарат в стаканчик с раствором 5% серной кислотой 2-3 раз; 5. тщательно промыть препарат водой; 6. Налить на препарат (без фильтровальной бумагки) раствор метиленового синего на 5 минут; 7. промыть водой, высушить, микроскопировать.
Сущность метода	Кислотоустойчивые бактерии содержат в своем составе большое количество сложных липидов с большой молекулярной массой, сульфолипидов, восков, и, особенно, миколовой кислоты, что делает эти бактерии кислото-, щелоче- и спиртоустойчивыми. Они плохо воспринимают анилиновые красители и обычные способы окраски. Высокая температура в процессе окраски методом Циля-Нильсена расплавляет липиды, фенол разрыхляет бактериальную оболочку и краска проникает внутрь клетки. После остывания препарата липиды вновь затвердевают, прочно удерживают краситель, поэтому кислотоустойчивые бактерии не обесцвечиваются серной кислотой и остаются рубиново-красными. Кислотонеустойчивые бактерии и элементы мокроты обесцвечиваются и их докрашивают контрастной краской – метиленовым синим.
Результат: описание и рисунок микроскопической картины	В поле зрения видны рубиново-красные кислотоустойчивые туберкулезные палочки, а некислотоустойчивые бактерии и элементы мокроты окрашены в соответственно синий и голубой цвет.

3. Метод Циля-Нильсена оформить в альбоме, как и все сложные методы окраски.
4. Закончить заполнение таблицы 3 – «Ультраструктура бактериальной клетки».

2. Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ), мезосомы.

ЦПМ – это основной барьер, который ограничивает протопласт бактерий, выявляется только в электронном микроскопе. ЦПМ прокариот имеет мозаичное строение, состоит из двойного слоя фосфолипидов, куда включены интегральные и неинтегральные белки, и отличается от мембраны эукариот отсутствием стеролов (единственным исключением являются микоплазмы).

Функции ЦПМ чрезвычайно разнообразны:

- участвует в процессах избирательного активного транспорта молекул из внешней среды;
- является осмотическим барьером и осмотическим мостиком;
- выделяет гидролитические ферменты, которые расщепляют полимеры окружающей среды на достаточно мелкие субъединицы;
- в ее состав входят ферменты электронно-транспортной цепи, с ней связана АТФаза, участвующая в синтезе АТФ;
- содержит ферменты комплекса репликации ДНК нуклеоида;
- в ней фиксируются жгутики и ворсинки, функционирование которых связано с затратой энергии;
- имеет ферментный аппарат, участвующий в синтезе своих собственных структур, а также в синтезе структур клеточной стенки.

Мезосомы – инвагинации (впячивания) ЦПМ внутрь цитоплазмы

клетки, при этом сохраняется физическая непрерывность ЦПМ и мезосом. Они играют роль в репликации хромосомы и ее последующем расхождении по дочерним клеткам, разграничивают внутриклеточное содержимое на отсеки, создают более благоприятные условия для прохождения определенной последовательности ферментативных реакций, поэтому они локализуются в тех участках цитоплазмы, где необходима высокая концентрация энергии.

Мезосомы грамотрицательных бактерий представляют собой простые инвагинации, у грамположительных бактерий, как правило, они имеют сложную морфологию, встречаются везикулярные, трубчатые (тубулярные) и/или пластинчатые (ламинарные) структуры.

3. Цитоплазма и расположенные в ней органеллы.

Содержимое клетки, окруженное ЦПМ, состоит из цитозоля - гомогенной коллоидной субстанции, содержащей набор растворимых РНК, ферментных белков, продуктов и субстратов метаболизма и различных структурных компонентов клетки (генетического аппарата, рибосом, включений).

3.1. Нуклеоид является основным генетическим аппаратом бактерий, в нем закодирована необходимая для полноценного функционирования наследственная информация клетки. Нуклеоид отличается по своим биологическим свойствам от ядер эукариотов. Он представлен одной двунитевой молекулой ДНК, компактно упакованной (суперспирализованной), в развернутом состоянии замкнутой в кольцо, не имеет ядерной мембранны, поэтому располагается непосредственно в цитоплазме, не содержит белков гистонов. Количество нуклеоидов зависит от фазы роста бактериальной культуры: в состоянии покоя бактериальная клетка имеет один нуклеоид (бактерии гаплоидны), в период деления – два, четыре и более нуклеоидов. Выявляют нуклеоид при электронной микроскопии, окраской методом Фельгена и Романовского-Гимзы.

Метод Романовского-Гимзы является универсальным методом. Его применяют для окраски нуклеоида бактерий, а также для окраски спирохет, хламидий, риккетсий, простейших и мазков крови.

Техника окраски нуклеоидов бактерий: готовят мазок из чистой культуры бактерий, например *Bacillus cereus*, фиксируют в жидким фиксаторе Карнуа (смесь этилового спирта, хлороформа и ледяной уксусной кислоты в соотношении 6:3:1), затем проводят кислотный гидролиз в растворе HCl при температуре 40-60°C, после чего окрашивают краской Романовского-Гимзы (смесь красителей: основных метиленового синего и азура и кислого эозина) в течение 40-60 минут, после каждого этапа препарат промывают дистиллированной водой.

Сущность метода: при кислотном гидролизе разрушается РНК клетки, ДНК нуклеоида, будучи кислой, окрашивается метиленовым синим и азуром в сине-фиолетовый цвет, цитоплазма клетки окрашивается эозином в розовый цвет.

Задание:

Микроскопировать и зарисовать готовый микропрепарат *B.cereus*, окрашенный по методу Романовского-Гимзы.

Микроскопическая картина мазка: цитоплазма бактериальных клеток розовая, в ней видны один или несколько компактных нуклеоидов сине-фиолетового цвета, имеющих разную форму (округлую, овальную, палочковидную).

3.2. Рибосомы бактерий представляют собой систему синтеза белков. Они располагаются свободно в цитоплазме клетки в виде целых рибосом размером 20нм и константой седиментации 70S (клетки эукариот имеют 80S рибосомы) или в виде 2-х субъединиц – 30S и 50S. В процессе синтеза белка рибосомы с помощью иРНК собираются в полисомы, часто связанные с ЦПМ. Имея столь малые размеры, рибосомы видны только в электронном микроскопе.

3.3. Зерна волютина являются внутриклеточными включениями, содержащими поли- и метафосфаты. Они имеют дифференциально-диагностическое значение при изучении возбудителя дифтерии (*Corynebacterium diphtheriae*), у которых зерна волютина располагаются по полюсам клеток. Окрашиваются зерна волютина сложным методом Нейссера и простым методом Леффлера.

Метод Нейссера. Методика окраски: фиксированный в пламени горелки мазок из чистой культуры *C.diphtheriae* окрашивают уксусно-кислой синькой 1 минуту, промывают водой, протравливают раствором Люголя 30 секунд и докрашивают везувином 20-30 секунд. Препаратор промывают водой, высушивают, микросcopируют.

Микроскопическая картина мазка из чистой культуры *C.diphtheriae*: тела бактерий окрашены в желтый или светлокоричневый цвет, зерна волютина, расположенные на обоих концах клеток, имеют темно-синий цвет (иногда темно-красный вследствие метахромазии).

Метод Леффлера заключается в окраске фиксированного в пламени горелки мазка щелочным метиленовым синим 5 минут. Микроскопическая картина мазка из чистой культуры *C.diphtheriae*: тела бактерий окрашены в голубой цвет, зерна волютина – в темно-синий.

Задание:

Изучить и зарисовать микропрепараты и слайды из чистых культур дифтерийной палочки, окрашенные методами Нейссера и Леффлера.

3.4. Эндоспора является приспособлением бактерий для сохранения вида в неблагоприятных условиях внешней среды, а не способом размножения, так как в одной бактериальной клетке образуется только одна спора. Такой способностью обладают бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*, содержащие патогенные для человека виды, и многие сапрофиты. У бацилл споры не превышают поперечник клетки и имеют центральное расположение. Клостридии образуют более крупные споры, которые обычно располагаются субтерминально, иногда терминально; в месте нахождения споры клетка раздувается, приобретая веретенообразную форму.

Зрелые споры сохраняют свою жизнеспособность, не проявляя метаболической активности, они устойчивы к высоким температурам, дезинфектантам и другим, вредным для бактерий, факторам. Прорастают споры в благоприятных для вида условиях. Высокая резистентность спор связана с низким содержанием свободной воды, высокой концентрацией кальция, наличием дипиколиновой кислоты и белка, богатого цистеином (что делает его похожим на кератин), а также наличием нескольких оболочек, которые являются дополнительной защитой от неблагоприятных внешних воздействий.

Споры плохо воспринимают окраску. При простом методе окраски вегетативных клеток во время споруляции, споры остаются бесцветными в окрашенных клетках в виде овальных или круглых образований. Свободно лежащие зрелые споры бесцветны, окаймлены слабо окрасившейся оболочкой. Окрасить споры удается специальным методом Ожешки.

Метод Ожешки (Аузски). Техника окраски: готовят мазок из культуры спорообразующих бактерий *B. cereus* на конце предметного стекла, высушивают на воздухе (но не фиксируют), наливают на мазок 0,5% раствор HCl и подогревают 2 минуты для протравливания; при этом оболочки спор размягчаются (что способствует их последующему окрашиванию); мазок промывают водой, высушивают, фиксируют в пламени горелки. Далее мазок окрашивают по методу Циля-Нильсена.

Таблица 6

Свойства прокариот

Группа	Бактерии	Актиномицеты	Спирохеты	Риккетсии	Хламидии	Микоплазмы
Формы существования	Вегетативные клетки, споры	Гифы, споры, друзы	Вегетативные клетки, цисты, зерна	Вегетативная форма, покоящаяся форма	Элементарное тельце (ЭТ), ретикулярное тельце (РТ)	Полиморфизм: от крупных элементов до фильтрующихся форм
Морфологические формы	Шаровидные, палочковидные, извитые	Нитевидные, ветвящиеся, палочковидные	Спиралевидные	Кокковидные, палочковидные, бациллярные, нитевидные	ЭТ – круглые или овальные 0,3-0,4 мкм, РТ – округлые 0,8-1,5 мкм	Шары, вакуоли, зерна, нити и др.
Ультраструктура	Типичные клетки прокариотов грамположительные или грамотрицательные	Аналогична грамположительным бактериям	Цитоплазматический цилиндр, эластичная клеточная стенка, двигательные эндофлориллы	Аналогична грамотрицательным бактериям	Аналогична грамотрицательным бактериям	Нет клеточной поверхности оболочкой является ЦПМ, содержит стеролы
Размножение	Бинарное деление	Фрагментация гифов, споры	Бинарное деление, распад на зерна, цисты	Бинарное или мицелиарное деление	Сложный цикл внутритканевого развития. Бинарное деление.	Почекование, бинарное деление, распад на мельчайшие зерна
Методы микроскопии нативных (живых) препаратов	Затемненное поле зрения, темнопольная или фазово-контрастная микроскопия	Фазово-контрастная микроскопия	Темнопольная или фазово-контрастная микроскопия	Фазово-контрастная микроскопия	Фазово-контрастная микроскопия	Фазово-контрастная микроскопия
Методы окраски	Простые и сложные методы (Грама, Циля-Нильсена и др.)	Простые и сложные методы (Грама, Циля-Нильсена и др.)	Простые, в т.ч. метод Бури, и сложные – Романовского-Гимзы, Морозова	Сложные – Романовского-Гимзы, Эдровского	Сложный – Романовского-Гимзы	Не применяется (в связи с крупностью клеток)

Микроскопическая картина мазка, окрашенного по Ожешке: вегетативные клетки (палочки, расположенные цепочками) имеют голубой цвет, споры рубиново-красные, некоторые из них находятся внутриклеточно, другие лежат вне клеток.

Задание:

Приготовить два препарата из чистой культуры *B.cereus*, первый из них нужно окрасить по методу Ожешки, как указано выше. Второй мазок фиксировать и окрасить простым методом (метиленовым синим или другим красителем). Препараты микроскопировать и зарисовать.

Просмотреть готовые микропрепараты и слайды спорообразующих бактерий с различным расположением спор: *Clostridium tetani* (возбудитель столбняка имеет терминальное расположение спор – «барабанная палочка»); *Clostridium botulinum* (возбудитель ботулизма имеет субтерминальное расположение спор – «теннисная ракетка»); *Bacillus anthracis* (возбудитель сибирской язвы, споры расположены центрально, подобно *Bacillus cereus*).

4. Морфология разных групп прокариот, имеющих значение в инфекционной патологии человека.

Основываясь на знании строения бактериальной клетки, студенты переходят к изучению морфологии спирохет, риккетсий, хламидий, актиномицет и микоплазм (таблица 6) и сравнивают их со свойствами истинных бактерий.

4.1. Спирохеты – тонкие нитевидные, спирально извитые микроорганизмы, обладающие активной подвижностью. По строению и химическому составу клеточной стенки спирохеты относятся к грамотрицательным прокариотам, однако, в отличие от истинных бактерий, клеточная стенка у них эластичная, что позволяет им совершать различные движения: колебательные, врашательные, сгибательные.

Отличием спирохет является также внутриклеточное расположение двигательного аппарата. Он представляет собой фибриллярный тяж, состоящий из двух пучков фибрилл, начинающихся от блефаробластов, расположенных субтерминально на обоих концах клетки. Фибриллы пролегают в клеточной стенке, обвивая цитоплазматический цилиндр (протопласт). В середине клетки фибриллы перекрывают друг друга.

Фибриллы состоят из белка флагеллина. Их число варьирует у разных видов спирохет.

Спирохеты изучают в нативных препаратах, используя темнопольную микроскопию для выявления их формы и подвижности. Их ультраструктуру изучают с помощью электронной микроскопии. Для изучения спирохет в окрашенном состоянии применяют:

1. Метод Романовского-Гимзы. Представители разных родов окрашиваются в разные цвета: в сине-фиолетовый – боррелии, в бледно-розовый – трепонемы, в красно-розовый – лептоспирсы.
2. Метод серебрения по Морозову основан на протравливании танином спирохет с последующей обработкой солями серебра; при этом спирохеты (трепонемы, лептоспирсы) несколько утолщаются и имеют вид темно-коричневых спиралей на светло-желтом фоне препарата.
3. Негативный способ Бурри представляет собой окраску препарата тушью. Тушь не проникает в тела микробов, поэтому в препаратах по Бурри на темном фоне туши видны белые контуры спирохет (боррелий, трепонем).
4. Простой способ окраски пригоден только для окраски боррелий, другие спирохеты этим методом не окрашиваются.

Задание:

Нарисовать схему строения спирохет (цитоплазматический цилиндр, фибриллярный тяж, клеточную стенку). Микроскопировать готовые препараты: *Borrelia recurrentis*, окрашенные по Романовскому-Гимзе; *Treponema pallidum* в отделяемом из твердого шанкра больного сифилисом, окрашенного методом серебрения по Морозову. Рассмотреть слайды, микрофотографии, электронограммы боррелий, трепонем, лептоспир, зарисовать. Заполнить таблицу 7.

Таблица 7

Дифференциальные признаки спирохет

Наименование спирохет	Вызываемые заболевания	Размеры	Количество и характер завитков	Методы окраски. Цвет спирохет при окраске по Романовскому-Гимзе
Род: <i>Borrelia</i> Вид: <i>B. recurrentis</i>	Возвратный тиф			
Род: <i>Treponema</i> Вид: <i>T. pallidum</i>	Сифилис			
Род: <i>Leptospira</i> Вид: <i>L. interrogans</i>	Лептоспироз			

Контрольные вопросы по теме занятия

1. Метод Циля-Нильсена, его сущность, методика окраски. От чего зависит кислотоустойчивость туберкулезных бактерий. Применение. Микроскопическая картина мазка из мокроты туберкулезного больного, окрашенного по методу Циля-Нильсена.
2. Мембранные образования бактериальной клетки. Строение цитоплазматической мембраны, ее функции.
3. Мезосомы, их строение, функции.
4. Цитоплазма бактерий, состав. Перечислите находящиеся в цитоплазме структуры (органеллы).
5. Нуклеоид бактерий, его отличия от ядер эукариотических клеток. Биологические функции нуклеоида, химический состав. Методы выявления.
6. Окраска нуклеоида по методу Романовского-Гимзы, сущность. Опишите микроскопическую картину мазка бактерий, окрашенных по методу Романовского-Гимзы.
7. Рибосомы бактерий, химический состав, строение, функция.
8. Цитоплазматические включения бактерий, их химическая природа, значение.
9. Зерна волютина, химическая природа, методы окраски.
10. Метод Нейссера, сущность, методика окраски. Опишите микроскопическую картину мазка дифтерийной палочки (*Corynebacteriae diphtheriae*), окрашенного методом Нейссера.
11. Формы существования бактериальной клетки (вегетативная клетка, спора). Эндоспора бактерий, условия и процесс спорообразовании. Ультраструктура спор, причины их высокой

резистентности к воздействиям внешней среды. Примеры спорообразующих бактерий.

12. Окраска спорообразующих бактерий по методу Ожешки и простым методом. Микроскопическая картина мазков.
13. Опишите морфологию и ультраструктуру спирохет, строение двигательного аппарата, назовите способы размножения спирохет.
14. Укажите, к каким родам относятся патогенные спирохеты. Приведите по одному примеру возбудителя каждого рода.
15. Сравнительная характеристика боррелий, трепонем и лептоспир: размеры, количество и характер завитков, отношение к окраске по Романовскому-Гимзе.
16. Методы микроскопического изучения спирохет в нативных препаратах и в окрашенном состоянии.

Занятие 4

Тема: Изучение морфологии отдельных групп прокариот (продолжение): актиномицет, риккетсий, хламидий, микоплазм и изучение морфологии микроскопических грибов.

План занятия:

1. Актиномицеты: свойства, формы существования. Морфология чистой культуры актиномицет и строение друз: демонстрация микропрепараторов, микрофотографий, слайдов, электронных микрофотографий.
2. Риккетсии. Свойства. Формы существования. Демонстрация таблиц, слайдов.
3. Хламидии. Свойства. Формы существования. Жизненный цикл развития хламидий. Демонстрация слайдов.
4. Микоплазмы. Свойства. Полиморфизм. Демонстрация таблиц, слайдов, микрофотографий.
5. Морфология плесневых грибов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Изучение нативных и окрашенных микропрепараторов, слайдов, таблиц.
6. Методы выделения чистых культур бактерий. Техника посева смеси бактерий на плотные питательные среды (1-й этап метода Дригальского).

Методические указания к выполнению практического занятия

Продолжить изучение отдельных групп прокариотов (таблица 6).

1. Актиномицеты – большая неоднородная группа нитчатых грамположительных прокариот, многие представители которой способны к объединению клеток в скопления и к дифференцировке. Свое название актиномицеты получили от первого из описанных видов - *Actinomyces bovis* – «лучистого грибка», который вызывает актиномикоз у животных и, иногда, у человека.

В род *Actinomyces* включены виды актиномицет, представляющие собой тонкие неспорообразующие полиморфные палочки

0,2-1,0x2-5 мкм и нити (гифы) длиной до 10-50 и более мкм с настоящим ветвлением; гифы, переплетаясь, образуют мицелий. Делятся актиномицеты фрагментацией гифов.

Высокоорганизованные актиномицеты, например представители рода *Streptomyces*, имеют хорошо развитый мицелий и размножаются спорами, которые образуются на концах спороносных гифов воздушного мицелия. Многие представители этого рода являются продуcentами антибиотиков.

Для изучения актиномицет применяют как простые, так и сложные методы окраски, например методы Грама и Циля-Нильсена.

Актиномицеты у здорового человека обитают, главным образом, в полости рта и кишечном тракте, не причиняя ему вреда, но при снижение сопротивляемости (иммунитета) организма, они могут вызвать заболевание – актиномикоз, при котором развиваются хронические гнойные процессы с поражением любых органов и тканей. Возможно и экзогенное инфицирование.

В пораженном организме актиномицеты образуют друзы, имеющие звездчатую, лучистую форму. Центр друзы состоит из растущего или компактного кальцинированного плотного мицелия, а периферийные (концевые) гифы, расположенные на поверхности мицелия, покрыты капсулоподобными эозинофильными чехлами, выполняющими защитную функцию.

Задание:

Микроскопировать готовые препараты чистой культуры актиномицет, найти поле зрения с тонкими ветвящимися гифами и короткими палочковидными формами.

Рассмотреть друзы актиномицет в ткани, пораженной актиномикозом, в микропрепаратах, слайдах, таблицах.

2. Риккетсии – грамотрицательные полиморфные бактериоподобные прокариоты, капсул, спор не образуют. Жизненный цикл риккетсий включает 2 стадии – вегетативную (внутриклеточную) и покоящуюся. Риккетсии, находящиеся в вегетативной стадии, активно размножаются путем бинарного деления и цитоплазме или, реже, в ядре клетки-хозяина, так как они являются облигатными внутриклеточными энергетическими паразитами, не способными синтезировать кофермент НАД. Покоящаяся форма обладает повышенной резистентностью; клетки округлые, меньших размеров, с утолщенной клеточной стенкой, уплотненной цитоплазмой. Различают 4 морфологические формы риккетсий

(по Здродовскому): кокковидную диаметром 0,3-0,4 мкм, палочковидную - 1-2 мкм, бациллярную -3-5 мкм, нитевидную – до 40 мкм. Риккетсии содержат большое количество липидов и плохо воспринимают анилиновые красители, для их окраски применяют сложные методы – Романовского-Гимзы и Здродовского, последний метод рекомендуется для обнаружения риккетсий в зараженных тканях.

Патогенные для человека риккетсии являются возбудителями риккетсиозов, для которых характерны лихорадочные состояния и часто высыпания на коже (сыпнотифозные или пятнистые лихорадки). Например, *Rickettsia prowazekii* вызывает эпидемический вшивый сыпной тиф.

Метод Здродовского (облегченная модификация метода Циля-Нильсена). Методика окраски: фиксированный в пламени горелки мазок окрашивают разведенным карболовым фуксином Циля (без нагревания), промывают водой, обесцвечивают слабым раствором органической (0,5% лимонной, 0,15% уксусной) или минеральной кислоты (0,01% HCl), промывают водой и докрашивают водным раствором метиленового синего. Результат окраски: риккетсии окрашиваются в рубиново-красный цвет и при внутриклеточном расположении видны на голубом фоне цитоплазмы, ядро клетки-хозяина имеет синий цвет.

Задание:

Рассмотреть слайды, таблицы, электронные микрофотографии, зарисовать.

3. Хламидии – мелкие грамотрицательные прокариоты, обладающие облигатным внутриклеточным паразитизмом (не способны синтезировать АТФ) и сложным циклом внутриклеточного развития. Различают две формы существования хламидий – элементарное (инфекционное) тельце - ЭТ и ретикулярное (вегетативное) тельце - РТ.

ЭТ - внеклеточная инфекционная частица диаметром 0,2-0,4 мкм, содержит компактный нуклеоид, рибосомы, жесткую клеточную стенку. ЭТ проникает в чувствительную клетку путем эндоцитоза, вокруг него образуется вакуоль. Внутри вакуоли ЭТ разбухает, приобретает сетчатую структуру, увеличивается в размере до 0,5-1,5 мкм и превращается в РТ.

РТ внутри вакуоли многократно делится путем образования поперечных перегородок. В конечном итоге вакуоль заполняется микроколониями хламидий, содержащих большое количество РТ в процессе деления, промежуточные тельца и ЭТ. Сама вакуоль превращается во внутриклеточное включение, покрытое оболочкой – хламидой, расположеннное в цитоплазме клетки-хозяина. Выход хламидий из клетки может осуществляться через неповрежденную мемрану или при гибели клетки. Освободившиеся ЭТ внедряются в другие здоровые клетки, где цикл развития повторяется.

Изучают хламидии в живом состоянии, в фазово-контрастном микроскопе и окрашивают методом Романовского-Гимзы (ЭТ окрашиваются в розовый, ретикулярные – в сине-голубой).

Существует несколько видов хламидий, патогенных для человека, например: *Chlamydia trachomatis* - возбудитель трахомы и урогенитальных инфекций, *Chlamydia pneumoniae* - вызывает различные формы респираторных инфекций, *Chlamydia psittaci* - орнитоз.

Задание:

Рассмотреть слайды и микрофотографии микроколоний хламидий, уметь различать ЭТ и РТ, зарисовать.

4. Микоплазмы – полиморфные микроорганизмы, отличающиеся от других прокариотов отсутствием клеточной стенки и ее предшественников. Поверхностной оболочкой микоплазм является цитоплазматическая мембрана, но более прочная и эластичная, что связано с присутствием в ней холестерина. Большинство видов микоплазм для роста нуждается в экзогенном холестерине или других стеринах. Клетки микоплазм содержат нуклеоид (геном микоплазм является самым маленьким среди всех саморепродуцирующихся живых клеток), рибосомы, цитоплазму и цитоплазматическую мембрану (мезосомы не выявлены), похожую на мембрану эукариотических клеток. Иногда вокруг крупных морфологических элементов в электронном микроскопе виден мукозный слой, подобный капсуле. У некоторых микоплазм обнаружены микроворсинки (*Mycoplasma pneumoniae*) и нитчатые или стеблеобразные выросты различной длины, которые принимают участие в скользящем движении клеток и адгезии. У микоплазм наблюдаются различные способы размножения: бинарное

деление, фрагментация крупных тел и нитей с образованием мелких зерен, процесс, сходный с почкованием.

Для микоплазм характерен полиморфизм. В чистой культуре одного вида можно обнаружить различные морфологические формы: крупные шаровидные тела (до 10 мкм диаметром), мелкие зерна, так называемые «элементарные тельца» меньше 0,1-0,2 мкм, элипсоидные, грушевидные, гантлевидные, дискообразные, шаровидные, палочковидные формы различных размеров и нитевидные, иногда ветвящиеся формы размером 0,2-0,3x100-150 мкм.

Отсутствие клеточной стенки делает микоплазмы осмотически более хрупкими, поэтому для их культивирования используются специальные полужидкие среды, на которых через 2-4 недели получают видимый рост в виде колоний, напоминающих «яичницу-глазунью».

Микоплазмы являются «мембранными паразитами», в основном поражают слизистые оболочки, где отсутствуют микробы-антагонисты. Они прочно прикрепляются к мемbrane клеток, усваивая из мембраны необходимые им питательные вещества, эпителиоциты при этом повреждаются, но не погибают. Патогенными для человека являются *Mycoplasma pneumoniae*, вызывающая микоплазмы респираторного тракта, а также *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* – возбудители урогенитального микоплазмоза.

В связи с хрупкостью микоплазм, их не удается окрашивать анилиновыми красителями и их изучают в нативных препаратах в фазово-контрастном микроскопе.

Задание:

Рассмотреть таблицы, слайды, микрофотографии микоплазм, обратить внимание на их полиморфизм.

5. Эукариоты – возбудители инфекционных заболеваний человека.

Значительную роль в инфекционной патологии человека играют простейшие и грибы. Заболевания человека вызывают многие простейшие – малярийные плазмодии, дизентерийные амебы, лямблии, балантидии, трипаносомы, лейшмании, трихомонады, токсоплазмы (их изучают в курсе биологии). Грибы являются возбудителями инфекционных заболеваний, получивших общее название - микозы. Простейшие и грибы по строению своих клеток относятся к эукариотам (таблица 8).

Таблица 8

Отличия эукариот и прокариот

Признак	Эукариоты	Прокариоты
1. Организация генетического материала;	1. Ядро, окруженное ядерной мембраной; 2. Хромосомы как структуры; 3. Содержит белки-гистоны; 4. Способно к митозу.	1. Нуклеоид не имеет ядерной оболочки и состоит из одной молекулы ДНК; 2. Молекула ДНК функционально является хромосомой; 3. Не содержит белков-гистонов; 4. Не способен к митозу.
2. Число хромосом.	Более одной.	Одна молекула ДНК.
3. Набор хромосом.	Диплоидный или гаплоидный.	Гаплоидный.
4. ДНК цитоплазматическая, не связанная с хромосомой (ядром).	Митохондрии, аппарат Гольджи и др.	Плазмиды (не окружены мембраной).
Наличие органелл, окруженных мембраной	Митохондрии, ядерная полость, лизосомы, (у растительных клеток – хлоропласти и др.)	Отсутствуют.
Рибосомы: 1. локализация в клетке; 2. константа седиментации.	Прикреплены к эндоплазматическому ретикулуму; 80S (только собственные рибосомы митохондрий – 70S).	Рибосомы рассеяны по всей цитоплазме; 70S
Энергетический метаболизм (ферменты, АТфаза и др.).	В митохондриях.	В цитоплазматической мемbrane и мезосомах.
Клеточная стенка – пептидогликан.	Отсутствует.	Имеется у большинства прокариотов, кроме микоплазм.
Стеролы в составе мембран.	Обычно присутствуют.	Отсутствуют, кроме микоплазм.
Тип поступления питательных веществ в клетку.	Голозойное (поглощение твердых кусочков – эндоцитозом и пиноцитозом) и голофитное питание	Только голофитное, т.е. растворенные мелкие молекулы; для этого прокариоты выделяют во внешнюю среду экз ферменты гидролазы. Эндоцитоз не наблюдается

5.1. Грибы (Fungi, Mycota) – самостоятельное царство эукариотических свободноживущих или паразитических организмов, как микроскопических, так и макроскопических.

Царство Fungi, по способу размножения подразделено на 4 подцарства:

1. Chytridiomycota
2. Zygomycota
3. Ascomycota
4. Basidiomycota.

Возбудители микозов человека входят в подцарства Zygomycota (зигомицеты), Ascomycota (аскомицеты) и Basidiomycota (базидиомицеты), а также в условную группу несовершенных грибов – Deuteromycota. Грибы могут размножаться как бесполым, так и половым путем. При половом пути размножения образуются половые споры (аскоспоры, зигоспоры и др.). Бесполый путь размножения у плесневых грибов характеризуется образованием большого количества экзоспор или эндоспор, у дрожжей – почкованием. Половые формы грибов называют телеоморфами, бесполые – анаморфами.

Протопласты клеток грибов содержат истинное ядро с ядрышком, митохондрии, лизосомы, эндоплазматический ретикулум, рибосомы, фагосомы, вакуоли и др. Снаружи протопласты покрыты ЦПМ с высоким содержанием стеролов (главным образом эргостерола) и плотной клеточной стенкой, в состав которой входит хитин, целлюлоза, глюкуроновая кислота, глюканы, различные углеводы, липиды, белки, пигменты.

По морфологическим особенностям грибы подразделяются на группы: плесневые грибы, дрожжи и дрожжеподобные грибы, а также выделяют промежуточную группу диморфных грибов.

Плесневые грибы образуют мицелий (тело гриба), который состоит из переплетенных гифов, поэтому их называют гифальными грибами. На питательной среде плесневые грибы образуют *субстратный* (вегетативный) мицелий, который прорастает в нее, извлекая из среды все необходимые для роста и размножения вещества, и *воздушный* (репродуктивный) мицелий, на котором созревают неполовые споры, с помощью которых грибы размножаются. Многие грибы могут размножаться и половым путем – половыми спорами. По характеру мицелия различают высшие и низшие грибы.

У высших грибов гифы разделены перегородками (септами), имеющими поры, через которые клетки сообщаются между собой. Гифы низших грибов не имеют перегородок и весь мицелий представляет собой «одну клетку», имеющую общую оболочку, в которой содержится цитоплазма, разные органеллы и множество ядер.

Зигомицеты включают в себя роды *Mucor*, *Rhizopus* и другие, вызывающие микозы у человека. Они относятся по своей морфологии к низшим грибам, так как имеют, как правило, несептированный мицелий. Размножаются бесполым способом - эндоспорами, созревающими внутри спорангииев, и половым путем – зигоспорами.

Типичным представителем зигомицетов является гриб *мукор* (*Mucor*) - «головчатая плесень», имеющий несептированный мицелий, на концах воздушных плодоносящих гифов – спорангеноносцев – созревают в округлых спорангиях (головках) эндоспоры.

Аскомицеты. Многие возбудители микозов человека входят в подцарство аскомицет, получившее свое название от плодоносящих сумок – асков, которые содержат половые споры (аскоспоры). Среди аскомицет выделяют плесневые и дрожжевые грибы.

Плесневые аскомицеты являются высшими грибами - мицелий гриба септированный, на концах воздушных гифов у них созревают экзоспоры – конидии (бесполый способ размножения). Типичными представителями плесневых аскомицетов являются грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium*, например: *Aspergillus niger* и *Penicillium notatum*. У представителей этих родов встречаются и анаморфные формы.

Aspergillus («леочная плесень») имеет септированный мицелий, плодоносящие гифы – конидиеносцы – несут на утолщенном конце стеригмы, от которых отходят цепочки экзоспор – конидий (в виде струек воды из лейки).

У *Penicillium* («кистевая плесень») мицелий септирован, конидиеносцы на концах разветвляются; образуя стеригмы, которые несут цепочки экзоспор конидий в виде кисточки.

Дрожжи (род *Saccharomyces*) входят в подцарство аскомицетов. Они представляют собой отдельные клетки круглой или овальной формы размером 3-10 мкм. В цитоплазме дрожжевых клеток часто об-

наружаются включения гликогена, волютина, липидов и др. Размножаются почкованием, делением (неполовая стадия) и аскоспорами.

Диморфные грибы – в зависимости от условий растут как дрожжи или как плесневые грибы. Явление диморфизма характерно для возбудителей системных микозов человека (бластомикоз, гистоплазмоз, кокцидиоидомикоз). В организме хозяина эти возбудители формируют дрожжеподобные клетки, а *in vitro* растут в виде мицелия. В зараженном организме могут существовать и обе формы возбудителя, например: у диморфного дрожжеподобного гриба *Candida albicans*.

Дейтеромицеты (митоспоровые, то есть размножаются митозом) – условная сборная группа возбудителей микозов человека, выделенная в медицинской микологии, куда включены несовершенные грибы (*Fungi imperfecti*), в цикле развития которых неизвестна стадия полового размножения. По мере появления и накопления новых знаний многие виды дейтеромицетов будут переведены в соответствующие таксоны совершенных грибов.

К диморфным дейтеромицетам относится гриб *Candida albicans* – наиболее частый возбудитель кандидоза человека. Его называют дрожжеподобным, так как в отличие от истинных дрожжей гриб каннида не образует аскоспор и способен формировать псевдомицелий – ветвящиеся цепочки из продолговатых клеток, отличающийся от истинного мицелия отсутствием общей оболочки и перегородок в гифах. В местах сочленений клеток могут располагаться группы почкающихся клеток (бластоспоры), так же характерно образование более крупных хламидоспор. В чистой культуре гриба *C.albicans* преобладают круглые или овальные клетки размером 3-7 мкм, часто почкающиеся, иногда встречается ветвящийся псевдомицелий.

Морфологию грибов изучают в нативных препаратах «раздавленная капля» в затемненном поле зрения, фазово-контрастном и люминесцентном микроскопе и с помощью окраски простым методом, по Граму, Цилю-Нильсену, Нейссеру и др.

Задание:

1. Рассмотреть таблицу 8 «Отличия эукариот от прокариот».
2. Изучить морфологию плесневых грибов родов мукора, аспергилла, пеницилла, и дрожжеподобного гриба *C.albicans* в нативных препаратах, окрашенных микропрепаратах, слайдах, микрофотографиях, таблицах, зарисовать и заполнить таблицу 9.

Таблица 9

***Морфологические особенности плесневых (нитчатых)
и дрожжеподобных грибов***

Название гриба	Подцарство	Характер мицелия	Спорообразование	Способ размножения	Микропрепарат
Головчатая плесень - <i>Mucor</i>					
Леечная плесень - <i>Aspergillus</i>					
Кистевая плесень <i>Penicillium</i>					
Дрожжеподобный гриб <i>Candida</i>					

6. Выделение чистой культуры бактерий по способу Дригальского.

Задание:

1. Подготовка к следующему занятию – ознакомиться с классификацией методов выделения чистых культур бактерий.
2. Выполнить первый этап исследования: рассеять с помощью шпателя каплю исследуемого материала, содержащего бактерии нескольких видов, по поверхности питательного агара в чашке Петри таким образом, чтобы разобщить отдельные бактериальные клетки и получить (после инкубации в термостате) рост изолированных колоний.

Для этой цели дно чашки расчертить стеклографом на 3 сектора.

Бактериальной петлей нанести одну каплю исследуемого материала на 1-й сектор и тщательно растереть шпателем по всему сектору, не повреждая поверхность питательной среды. Тем же шпателем растереть оставшиеся на нем бактерии по 2-му сектору и затем по 3-му.

Посевы выполняют на чашках Петри с МПА (мясо-пептонным агаром), со средой Эндо и ЖСА (желточно-солевым агаром).

Контрольные вопросы по теме занятия

1. Роль актиномицет в инфекционной патологии человека. Приведите примеры патогенных актиномицет.
2. Формы существования актиномицет во внешней среде и в организме. Способы размножения.
3. Морфологические особенности актиномицет. Ультраструктура гифов. Строение друж.
4. Способы окраски актиномицет. Микроскопическая картина мазка из чистой культуры актиномицет.
5. Приведите примеры патогенных для человека риккетсий, назовите вызываемые ими заболевания.
6. Морфологические особенности риккетсий. Формы существования. Способы размножения.
7. Четыре морфологические группы риккетсий по Здродовскому. Методы окраски риккетсий.
8. Приведите примеры патогенных для человека хламидий, назовите заболевания, которые они вызывают.
9. Морфологические особенности хламидий. Формы существования. Какая форма хламидий является инфекционной.
10. Цикл внутриклеточного развития хламидий. Методы выявления. Способы окраски.
11. Приведите примеры патогенных микоплазм, какие заболевания они вызывают?
12. Морфологические особенности микоплазм. Полиморфизм. Особенности роста микоплазм.
13. Способы изучения микоплазм. Сущность фазово-контрастной микроскопии.
14. Основные отличия в организации клеток эукариот и прокариот.
15. Какие микроорганизмы имеют эукариотический тип строения клеток?
16. К каким микроорганизмам по строению клеток относятся грибы? В какое царство они объединены? Какие подцарства содержат патогенные для человека грибы? Как называются инфекционные заболевания, вызываемые грибами? Приведите примеры таких заболеваний.
17. Опишите строение клетки гриба. Назовите морфологические группы грибов, укажите их отличия.

18. Назовите представителей плесневых грибов. Укажите отличия высших и низших плесневых грибов.
19. Назовите двух представителей высших плесневых грибов. Опишите морфологические особенности грибов рода *Penicillium*.
20. Опишите морфологические особенности и способы размножения грибов рода *Aspergillus*.
21. Опишите морфологические особенности низшего плесневого гриба рода *Mucor*.
22. Укажите, к какой группе по морфологии относится гриб *Candida albicans*. Перечислите его морфологические особенности.

Раздел 2

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ БАКТЕРИЙ

Занятие 5

Тема: Питание микроорганизмов. Методы выделения чистых культур. Методы стерилизации. Методы определения количества бактерий.

План занятия

1. Химический состав микроорганизмов.
2. Питание микроорганизмов. Питательные среды. Изучение различных типов питательных сред: простые (основные), сложные с повышенной питательной ценностью, элективные и/или селективные, дифференциально-диагностические среды.
3. Методы выделения чистых культур бактерий (аэробов и факультативных анаэробов). Метод Дригальского (2-й этап): макро- и микроскопическое изучение колоний и отсев их на скошенный МПА для получения чистой культуры.
4. Основные методы стерилизации и дезинфекции.
5. Методы изучения физиологии роста:
 - 1) Кривая роста периодической микробной популяции.
 - 2) Методы определения количества бактерий: определение общего числа бактерий в популяции и количества жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц - КОЕ).

Методические указания к выполнению практического занятия

Физиология микроорганизмов является одним из важнейших направлений общей бактериологии. Она изучает такие вопросы как: конструктивный и энергетический метаболизм, питание и дыхание микроорганизмов; рост и размножение микробов, действие на микробы факторов внешней среды и др.

1. Химический состав микроорганизмов (таблица 10)

По химическому составу клетки микроорганизмов сходны с клетками макроорганизмов. В их состав входят:

1. Вода как в свободном, так и в связанном состоянии. *Свободная вода* служит дисперсной средой для коллоидов, растворителем для кристаллических веществ, источником H^+ и OH^- , участником химических реакций в гидролитических процессах расщепления белков, углеводов и липидов, а также в процессах дыхания. *Связанная вода* является структурным компонентом цитоплазмы, клеточной стенки, ЦПМ и других структур, обуславливает устойчивость микроорганизмов к физическим факторам (высокая резистентность спор бактерий).

2. Минеральные соли. Роль минеральных солей заключается в поддержании pH среды, окислительно-восстановительного потенциала, осмотического давления и активации ферментативных процессов. По количеству их содержания различают *макроэлементы* (C, O, H, N, P, S, Na, Ca, K, Mg, Fe) и *микроэлементы* (Mn, Zn, Cu, Co, Br, Cl, Si, Mo, Ni и др.).

3. Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК. В ДНК закодирована вся наследственная информация клетки. РНК обеспечивает транскрипцию и трансляцию белков и входит в состав рибосом.

4. Белки подразделяются на структурные и неструктурные. Структурные белки входят в состав клеточной стенки, ЦПМ, нуклеоида, рибосом, капсул, жгутиков, ворсинок и цитоплазмы (нуклеопротеины, гликопротеины, липопротеины). Неструктурные белки являются ферментами, токсинами. Белки определяют резистентность клеток к лекарственным, дезинфицирующим веществам и красителям.

5. Липиды входят в состав структур микробной клетки (ЦПМ и мезосом, клеточной стенки и др.), определяют заряд клетки (в слабых растворах NaCl бактерии имеют отрицательный заряд и поэтому они хорошо окрашиваются основными анилиновыми красителями), регулируют проницаемость мембран, повышают устойчивость к кислотам, щелочам, спиртам (особенно у кислотоустойчивых бактерий).

6. Углеводы входят в состав структур клетки, например, в липополисахарид (ЛПС) наружной мембранны клеточной стенки грамотрицательных бактерий, клеточную стенку (аминосахара N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота) и др., также могут находиться в виде включений в цитоплазме клеток (крахмал или гликоген).

Углеводы являются источниками энергии, обуславливают антигенную специфичность микробов.

Таблица 10.

Химический состав бактерий

Основные компоненты бактериальной клетки	Процент сухого остатка	Значение для жизнедеятельности клетки
Вода 1. Свободная 2. Связанная	75-85	1. Универсальная дисперсная среда, растворитель для кристаллических веществ, источник H^+ и OH^- , участвует в метаболизме, в процессе роста и размножения бактерий. 2. Структурный элемент цитоплазмы (цитозоля), клеточной стенки, цитоплазматической мембраны эндоспор, определяет устойчивость к физическим факторам
Минеральные соли	2-3	Определяют и поддерживают pH среды, окислительно-восстановительный потенциал, осмотическое давление, активируют ферментативные процессы
Нуклеиновые кислоты 1. ДНК 2. РНК	10-30	1. Носитель всей наследственной информации бактериальной клетки. 2. Обеспечивают транскрипцию и трансляцию, составная часть рибосом
Белки	30-40	Определяют резистентность клеток к лекарственным, дезинфицирующим веществам и анилиновым красителям. 1. Структурные белки входят в состав клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, рибосом, жгутиков, ворсинок, капсул, цитоплазмы. 2. Неструктурные белки являются составной частью ферментов, токсинов, антигенов.
Липиды	5-10	Входят в состав структур клетки (ЦПМ и мезосомы, клеточной стенки и др.), определяют заряд клетки; регулируют проницаемость мембран; повышают устойчивость к кислотам, щелочам, спиртам, обеспечивают токсичность.
Углеводы	12-18	Входят в состав структур клетки (ЛПС грамотрицательных бактерий, пептидогликан клеточной стенки, включения и др.), источник энергии, обуславливают антигенную специфичность

2. Питание микроорганизмов

Основными физиологическими функциями микроорганизмов, необходимыми для их жизнедеятельности, роста и размножения, являются питание, брожение и/или дыхание. Эти процессы участвуют в микробном метаболизме, обеспечивая микробную клетку необходимыми питательными веществами и энергией.

Патогенные для человека и животных микроорганизмы по типу источника питания и энергии являются *гетерохемоорганотрофами*, получая углерод из органических соединений. Из поступивших в клетку содержащих углерод органических низкомолекулярных веществ синтезируются жизненно необходимые высокомолекулярные соединения, а энергия для этих целей высвобождается путем биологического окисления углеродсодержащих веществ в дыхательной цепи.

Патогенные микроорганизмы являются *паразитами* (паратрофами). В зависимости от степени гетеротрофности их подразделяют на *облигатные* паразиты и *факультативные*. Облигатные паразиты способны только к внутриклеточному существованию в живом организме (или в культуре клеток), откуда они получают все необходимое для поддержания их жизнедеятельности. Облигатными паразитами являются риккетсии, хламидии, некоторые спирохеты, отдельные виды простейших и вирусы.

Факультативные паразиты способны существовать не только в условиях макроорганизма, но и на неживых органических субстратах (подобно сапрофитам). К ним относятся патогенные бактерии, актиномицеты, микоплазмы и грибы. Все эти микроорганизмы культивируются на питательных средах.

2.1. Питательные среды широко применяются как в лабораторных, так и в производственных условиях. В бактериологических лабораториях на питательных средах выделяют чистые культуры из различных инфицированных материалов и изучают их свойства с целью постановки бактериологического диагноза, а также проводят научные исследования.

На специальных питательных средах изучают химический состав микроорганизмов, процессы метаболизма, их биохимию, проводят генетические эксперименты и т.п. Питательные среды необходимы для поддержания и сохранения выделенных чистых культур, создания коллекций микробных штаммов.

На различных биологических производствах на питательных средах получают в большом количестве биомассу бактерий, актиномицет или грибов для последующего приготовления вакцин, диагностических препаратов, антибиотиков, бактериофагов, интерферонов, ферментов, гормонов и других биопрепаратов. Причем, во многих случаях, их производителями могут быть только микроорганизмы. Получение из микробной массы диагностических и лечебно-профилактических препаратов проще и дешевле, чем химический синтез подобных веществ, особенно при использовании высокопродуктивных штаммов-производителей микроорганизмов, полученных генетическими инженерными методами.

Основные требования, предъявляемые к питательным средам:

- Полнота, то есть оптимальное содержание питательных веществ в легкоусвояемой форме (органические источники углерода и азота, набор минеральных солей, факторы роста);
- Адекватное значение pH, обычно 7,2-7,4;
- Изотоничность, созданная 0,85% NaCl (концентрация солей в питательной среде должна соответствовать их концентрации в микробной клетке);
- Обладание определенным окислительно-восстановительным потенциалом (редокс-потенциал), различным для аэробов и анаэробов;
- Достаточная влажность (для плотных сред не менее 60%);
- Стерильность и, желательно, прозрачность.

2.2. Питательные среды принято подразделять по происхождению, консистенции, составу и назначению.

По происхождению питательные среды делят на естественные, искусственные и синтетические.

- *Естественные среды* готовят из натуральных продуктов – овощей (картофель, морковь), молока, яиц, сыворотки крови и пр.
- *Искусственные среды* содержат переработанные естественные продукты (мясную воду, мясной перевар), вещества, полученные из этих продуктов (пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты и др.) и различные добавки. Это самая большая, разнообразная по составу и наиболее часто применяемая группа сред. Основной недостаток естественных и искусственных сред – их недостаточная стандартность вследствие непостоянного состава.

- **Синтетические среды** готовят из химически чистых соединений с точно известным количественным и качественным составом (аминокислоты, углеводы, витамины, минеральные соли и др.). В зависимости от питательных потребностей культивируемых бактерий, среды могут иметь более сложный или простой состав. Например, очень простой средой является минимальный агар, используемый в генетических исследованиях, в котором единственным источником азота является $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а углевода — глюкоза.

На основе синтетических сред, добавляя к ним казеиновый, дрожжевой или грибной гидролизат, альбумин или сыворотку крови, получают **полусинтетические среды**, применяемые в производственных условиях, а также для выращивания культур клеток.

По консистенции различают: жидкие, полужидкие и плотные среды. Плотность создается добавлением к жидким средам агара (полисахарида, получаемого из морских водорослей), обладающего способностью плавиться при температуре около 100°C и застывать при температуре 40-45°C, создавая гель, который не расщепляется большинством бактерий. Полужидкие среды содержат 0,3-0,7% агара, плотные — 1-2%. Плотными являются также свернутые яичные среды, свернутая при нагревании сыворотка крови и среды с желатиной, однако последние имеют ограниченное применение вследствие следующих недостатков: у желатинового геля температура плавления около 35°C, т.е. ниже температуры инкубации большинства бактерий а температура застывания 26-28°C, многие микробы разжижают желатину своими протеолитическими ферментами.

По составу принято делить питательные среды на простые и сложные.

К простым (основным) средам относятся мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА). Их готовят на основе мясной воды (настой измельченного мяса), к которому добавляют пептон, NaCl и устанавливают нужное значение pH; плотность МПА создает агар-агар. Простой средой является и пептонная вода, содержащая дистиллированную воду, 1% пептона и 0,5% NaCl.

Пептон — продукт неполного переваривания белка, получаемый путем ферментного или кислотного гидролиза отходов производства

мясных или рыбных продуктов или из молочного казеина. Пептон является ценным источником легкоусвояемых соединений азота и углерода для хемоорганотрофных микробов. Выпускается пептон в виде порошка.

Сложные среды получают из простых сред (МПБ и МПА), добавляя в них различные дополнительные компоненты: глюкозу, кровь, желчь, куриные яйца, различные соли, индикаторы и т.п.

По целевому назначению различают основные и специальные среды. Последние в свою очередь подразделяются на сложные с повышенной питательной ценностью, элективные, дифференциально-диагностические и элективно-дифференциальные.

Основные (простые или универсальные) среды – мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА), на которых культивируют многие патогенные бактерии.

Сложные среды с повышенной питательной ценностью получают путем обогащения основных сред углеводами (сахарный бульон, сахарный агар с глюкозой) или белками (кровяной бульон или кровяной агар, сывороточной бульон или сывороточный агар, асцит-бульон или асцит-агар).

Элективные (избирательные, селективные) среды обеспечивают оптимальные условия для выделения определенного микроорганизма из исследуемого материала, содержащего сопутствующую микрофлору, для которой создают неблагоприятные условия (недостаток питательных веществ, добавляют компоненты, ингибирующие рост и др.). Получая преимущество, выделяемый возбудитель растет быстрее и интенсивнее и накапливается на элективной среде, а рост сопутствующих микробов задерживается или отсутствует. Примеры элективных сред:

- а) Среда *Ry* (свернутая неразведенная сыворотка крови) или среда *Леффлера* (свернутая смесь из 3 частей сыворотки крови и 1 части сахарного бульона) элективна для *дифтерийной палочки* (*Corynebacterium diphtheriae*), которая на этих средах опережает сопутствующие микробы по темпу роста.
- б) *Щелочной агар и щелочная пептонная вода* элективны для *холерного вибриона* (*Vibrio cholerae*), который быстро размножается, а для других микробов значение pH среды 8,0-8,2 не является благоприятным, ограничивает их рост также бедность пептонной воды питательными веществами.

- в) Желточно-солевой агар (ЖСА) эффективен для стафилококков, которые могут размножаться при содержании в среде до 10% NaCl, а другие бактерии не выносят повышенной концентрации соли (оптимальное содержание NaCl для большинства микробов – 0,5%).
- г) Желчный бульон эффективен для сальмонелл, размножение которых стимулирует добавленная 10% желчь, одновременно тормозящая рост некоторых сопутствующих микробов.
- д) Селенистовая среда, в которой содержится 10% кислого селенитого натрия, является жидкой средой обогащения, способствует накоплению патогенных энтеробактерий (сальмонелл и шигелл) и ингибирует размножение сопутствующих микробов, например эшерихий.

Дифференциально-диагностические среды позволяют отличать (дифференцировать) одни роды и виды микроорганизмов от других по характеру их ферментативной активности. Такими средами являются:

- среды с углеводами и индикаторами, на которых выявляют сахаролитическую активность выделяемой чистой культуры. Примеры дифференциально-диагностических сред с углеводами: среды Эндо и Левина, применяемые на 1-м этапе выделения чистой культуры энтеробактерий, среды Гисса, предназначенные для биохимической идентификации чистой культуры на 3-м этапе исследования;

- среды, содержащие белковые субстраты – желатину, сыворотку крови, кровь, молоко и другие, позволяющие выявить протеолитическую и гемолитическую активность культуры;

- среды с различными веществами, например цитратом, мочевиной и др., которые усваиваются одними видами микроорганизмов и не усваиваются другими;

- среды предназначенные для выявления редуцирующей способности микробов (для определения типа дыхания), например окисительно-ферментативная среда (ОФС).

Применяют также *элективно-дифференциальные среды*, сочетающие избирательность размножения группы определяемых бактерий и различия в характере роста отдельных видов. Например: среда Плоскирева и другие.

В настоящее время многие питательные среды готовят фабричным путем, выпускают в виде порошка с инструкцией к употреблению, которая обычно включает приготовление навески, растворение её в определенном количестве воды, нагревание и разлив в лабораторную посуду (чашки Петри, колбы, пробирки, матрацы и др.).

Задание:

1. Ознакомиться с различными питательными средами.
2. Заполнить таблицу «Питательные среды», записывая среды по целевому назначению.

Таблица 11.

Питательные среды

Обозначение	Состав	Цвет	Принцип действия	Применение
Основные (простые, универсальные) 1. 2.				
Сложные с повышенной питательной ценностью 1. 2. 3.				
Элективные 1. 2. 3. 4.				
Дифференциально-диагностические 1. 2. 3.				

3. Методы выделения чистых культур бактерий (аэробов и факультативных анаэробов)

Чистой культурой называется совокупность бактерий одного вида, полученных из одной колонии, клетки которой идентичны по биологическим свойствам (морфологическим, тинкториальным, культуральным, ферментативным и др.). Колония является аналогом клона, так как считается, что она представляет собой популяцию микроорганизмов – потомков одной клетки. Чистые культуры одного вида, выделенные из различных источников или из одного источника в разное время, называются *штаммами*. Штаммы одного вида могут

незначительно отличаться друг от друга, тогда они обозначаются как «вариант» (вар) и в зависимости от характера отличия их называют морфоварами, сероварами, биоварами, фаговарами.

Выделение чистых культур бактерий является обязательным этапом бактериологического исследования в лабораторной диагностике инфекционных болезней, при изучении различных объектов окружающей среды. Исследуемый материал (гной, мокрота, фекалии, моча, рвотные массы, вода, пищевые продукты, почва и др.) обычно содержит ассоциации микробов. Для выделения отдельных бактериальных культур, в частности возбудителей заболевания, используют методы, которые условно можно разделить на 2 группы.

3.1. Методы, основанные на принципе механического разобщения микроорганизмов в питательной среде

Метод Пастера – последовательное разведение исследуемого материала в жидкой питательной среде, применяется как один из этапов подсчета количества бактерий в исходном материале (КОЕ), а также имеет историческое значение.

Метод Коха (метод пластинчатых разводок Коха) – последовательное разведение исследуемого материала в пробирках с расплавленным МПА, далее содержимое каждой пробирки выливают в стерильные чашки Петри, где МПА застывает; после инкубации на поверхности МПА и внутри питательной среды вырастают изолированные колонии. Метод применяется для подсчета количества бактерий в исходном материале, имеет также историческое значение.

Метод Дригальского – рассев исследуемого материала на поверхности питательного агара в чашке Петри с помощью шпателя, бактериальной петли или тамponsа с целью получения на поверхности среды изолированных колоний.

Метод получения клonalных культур – перенос с помощью микроманипулятора одной бактериальной клетки в питательную среду и получение ее потомства – клона.

3.2. Методы, основанные на использовании биологических особенностей (свойств) микроорганизмов

1. *Создание оптимальных условий для размножения* отдельного вида микроба: применение элективных питательных сред. оптимальные температура, pH среды, концентрация CO₂, O₂ и т.п.

Биологический метод:

- а) Заражение лабораторных животных, особо восприимчивых к данному виду микроба, с последующим выделением чистой культуры из отдельных органов и крови заболевших или погибших животных.
- б) Метод Щукевича – посев в конденсат свежеприготовленного скошенного МПА смеси подвижных и неподвижных бактерий. Неподвижные бактерии растут в конденсате, а подвижные бактерии дают ползучий рост по всей скошенной поверхности питательной среды.

3.3. Метод Дригальского: этапы выделения чистой культуры и ее изучение с целью идентификации

1-й этап. Рассев исследуемого материала по поверхности плотной питательной среды для получения изолированных колоний. Нередко перед посевом проводится предварительная микроскопия исследуемого материала. Инкубация в термостате, обычно в течение суток.

2-й этап. Изучение выросших колоний (макро- и микроскопическое) и отсев колонии, характерной для определенного вида, на скошенный МПА (или другую среду) для получения чистой культуры.

3-й этап. Идентификация – определение вида выделенной чистой культуры на основании изучения биологических свойств: морфологических, тинкториальных (отношение к окраске), культуральных (характер роста на жидких и плотных питательных средах), биохимических (ферментативных), антигенных, вирулентных, токсигенных, чувствительности к антибиотикам и другим лекарственным веществам, чувствительности к типовым диагностическим бактериофагам.

Задание:

Продолжить работу по выделению чистой культуры по Дригальскому (2-й этап): рассмотреть колонии, выросшие на чашках Петри, засеянных смесью бактерий, отметить 2-3 колонии различного вида и изучить их в последовательности, указанной в таблице . Результаты по ходу работы заносить в альбом. Из части изучаемой колонии пригото-

вить микропрепарат, окрасить по Граму, микроскопировать. Другую часть изучаемой колонии пересеять в пробирку со скошенным МПА для получения чистой культуры. Инкубировать посев в термостате.

Таблица 12

Этапы выделения чистой культуры по Дригальскому

Этапы	Выполняемая работа и ее цель	Полученные результаты		
1	Рассев исследуемого материала по поверхности плотной питательной среды (после предварительной микроскопии). Инкубация при оптимальных условиях. <i>Цель: Получение изолированных колоний.</i>			
2	A) Макроскопическое и микроскопическое изучение выросших на питательной среде колоний ¹) 1. Форма; 2. Величина (в мм); 3. Степень прозрачности; 4. Цвет (пигмент); 5. Характер поверхности; 6. Характер краев; 7. Внутренняя структура; 8. Консистенция; 9. Как эмульгируется в воде; 10. Результат окраски микропрепарата. Б) Отсея колоний, характерных для определенного вида, на скошенный МПА (или элективную среду). Инкубация при оптимальных условиях. <i>Цель: Получение чистой культуры.</i>	К о л о н и и		
3	<i>Цель: Идентификация выделенной чистой культуры</i> на основании изучения следующих свойств ²): 1. Морфологические и тинкториальные; 2. Культуральные (характер роста на питательных средах); 3. Биохимические (ферментативные); 4. Вирулентные (наличие ферментов патогенности); 5. Токсигенные; 6. Чувствительность к диагностическим (типовым) бактериофагам; 7. Чувствительность к антибиотикам и другим веществам.			
4	Учет полученных результатов при изучении биологических свойств и заключение			

*Примечание:

1. Признаки 1-3 изучаются при просмотре чашек Петри «на просвет» против источника света; 4-5 – в падающем свете; 6-7 – при малом увеличении микроскопа, положив чашки Петри вверх дном; 8-9 – в процессе приготовления мазка.

2. Методики изучения свойств выделенной культуры разбираются в течение семестра в соответствующих разделах.

4. Основные методы стерилизации и дезинфекции

Стерилизация (обеспложивание) – полное освобождение какого либо вещества или предмета от микроорганизмов и их спор. Стерилизация широко применяется в различных областях медицины, являясь основой асептики.

4.1. Асептика – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение возможного попадания микробов в организм человека при медицинских вмешательствах и в госпитальных условиях, а также предотвращение контаминации (попадание, обсеменение) микроорганизмами стерильных объектов во внешней среде. Для соблюдения асептических условий, кроме стерилизации, используют *антисептику и дезинфекцию*, рассматриваемые ниже.

Стерилизации подлежат все объекты, контактирующие с тканями, полостями и кровяным руслом организма, а также со слизистыми оболочками (инструменты, перевязочные материалы, лекарственные растворы, шприцы, катетеры, эндоскопические приборы и другая аппаратура, многие другие предметы). Стерилизацию применяют в гигиене, фармацевтике, пищевой промышленности, и других областях народного хозяйства.

Работа в микробиологических (в том числе вирусологических) лабораториях также невозможна без использования методов стерилизации, соблюдения асептических условий. Необходимы стерильные питательные среды и растворы, лабораторная посуда, инструменты, шприцы, вата, марля и многое другое. При некоторых исследованиях, особенно вирусологических, и работе с возбудителями особо опасных инфекций, требуются стерильные халаты, шапочки, маски, резиновые перчатки и др. Стерильными должны быть все инъекционные биопрепараты микробного происхождения, кроме живых вакцин.

В настоящее время существуют одноразовые изделия медицинского назначения, простерилизованные изготовителем (пластмассовая лабораторная посуда, шприцы, перчатки, катетеры, одноразовые инструменты и др.), что очень удобно. Но часто приходится использовать подобные материалы многократно и они должны подвергаться дезинфекции и предстерилизационной очистке. Например, инфицированную

лабораторную посуду кипятят или автоклавируют, тщательно отмывают с помощью моющих средств с детергентами. промывают проточной водой, сушат, а затем чашки Петри, пробирки (заткнутые ватными пробками), пипетки с защитными ватками по несколько штук упаковывают в плотную бумагу или помещают в металлические пеналы. Подобным образом поступают и с другими стерилизуемыми материалами. Халаты, перевязочный материал, резиновые перчатки и другие помещают в завернутом виде в стерилизационные металлические коробки-биксы.

4.2. Физические (термические и холодные) и химические методы стерилизации.

Наиболее распространены термические методы с применением высоких температур: кипячение, прокаливание, воздушная стерилизация (сухим жаром), паровая (паром под давлением).

Реже применяют холодную стерилизацию – радиационную, ультразвуковую и фильтрацию через бактериальные фильтры.

К химическим методам стерилизации относится газовая стерилизация и стерилизация путем воздействия растворов химических веществ.

Выбор метода стерилизации зависит от свойств стерилизуемых объектов: их термоустойчивости, отношения к влаге и сухому жару, размеров, а также от характеристики метода, который должен быть эффективен, доступен, безопасен и не повреждать стерилизуемые материалы.

Применяют следующие методы стерилизации:

Кипячение – проводят в стерилизаторе (металлической коробке с крышкой и вторым внутренним дном со множеством отверстий), в который наливают дистиллированную воду и помещают шприцы с иглами, мелкие стеклянные предметы, металлические инструменты (их помещают в 1% раствор соды). Время кипячения 30-40 минут. Устраняются вегетативные формы микробов, споры остаются жизнеспособными.

Прокаливание – осуществляют в пламени горелки в течение 5-7 секунд. Этим методом стерилизуют бактериологические петли, пинцеты, препаровальные иглы (не рекомендуется прокаливать режущие инструменты). При прокаливании погибают вегетативные клетки и споры.

Воздушная стерилизация (сухим жаром) – проводится в воздушных стерилизаторах (старое название – сухо-жаровой шкаф или печь Пастера). Это металлический шкаф с решетчатыми полками, электроподогревом и терморегулятором. Режим стерилизации: при температуре 180°C – 60 минут, при 160°C – 150 минут. Стерилизуют инструменты и другие изделия из металла, стеклянную посуду (при 160°C), силиконовую резину, масла. Этим методом нельзя стерилизовать объекты, содержащие воду! Сухой жар эффективно убивает (сжигает) микроорганизмы и их споры.

Паровая стерилизация паром под давлением. Ее проводят в паровом стерилизаторе – автоклаве, который бывает вертикальным и горизонтальным. Это наиболее универсальный и часто применяемый метод стерилизации. Режимы стерилизации могут быть различными в зависимости от величины избыточного давления. При давлении 0,5 атм. температура пара равна 111°C, при 1,0 атм. – 121°C, при 2 атм. – 134°C, время стерилизации варьирует от 15 до 60 минут.

Паром под давлением стерилизуют многие питательные среды и растворы, большинство изделий из металла, термостойкой пластмассы, резины, белье и перевязочный материал, лабораторную посуду и др., а также отработанный инфекционный материал, использованные питательные среды с посевами бактерий. Насыщенный пар под давлением надежно уничтожает все живое.

Паровая стерилизация текучим паром осуществляется в аппарате Коха или в паровом стерилизаторе (автоклаве) с незавинченной крышкой и открытым выпускным краном. Аппарат Коха имеет форму цилиндра, в крышке находится отверстие для выхода пара. На дно аппарата наливают воду, над которой укреплена подставка для стерилизуемых материалов – питательных сред с углеводами, желатиной, желчью, лекарственных растворов и других объектов, не выдерживающих автоклавирование (если в них есть условия для прорастания спор). Через них течет пар с температурой 100°C, образующийся при кипении воды в аппарате. При этом погибают вегетативные формы микроорганизмов, а споры выживают. Чтобы добиться полной стерилизации, ее проводят дробно – в течение 3-х дней по 30 минут с суточными интервалами, во время которых питательные среды находятся при комнатной температуре. Это создает условия для прорастания спор и превращения их в вегетативные клетки, которые погибают при

повторной стерилизации. Принцип дробной стерилизации предложен Тиндалем, однако его именем назван другой метод.

Пастеризация – неполная стерилизация, при которой погибают вегетативные формы многих патогенных микробов и, в том числе, энтеробактерий, туберкулезной палочки, бруцелл, однако остаются жизнеспособными споры бактерий. Пастеризации подвергают пищевые продукты, не подлежащие длительному хранению: молоко и молочные изделия, соки, пиво, рыбные пресервы и другие.

При пастеризации используются температуры ниже 100°C с последующим быстрым охлаждением пастеризуемого продукта для сохранения его состава и органолептических свойств. Режимы пастеризации зависят от пищевого продукта. В молочной промышленности применяют три режима пастеризации:

- при длительной пастеризации молоко нагревают до 63-65°C и выдерживают при этой температуре 30 минут;
- кратковременная пастеризация проводится при 72-75°C с выдержкой в течение 15-20 секунд;
- мгновенная пастеризация – нагревание молока до температуры 85-90°C продолжительностью 1 секунда.

Радиационная стерилизация проводится гамма-излучением (источники ^{60}Co и ^{137}Cs) в специальных установках, стерилизующая доза равно 2,5 Мрад, но может колебаться. Метод надежен - гибнут микробы и их споры, но технически сложен и требует особых условий. Стерилизуют пластмассовую лабораторную посуду и другие изделия, лекарственные растворы, сыворотку крови.

УФ-облучение осуществляется ртутно-кварцевыми лампами с длиной волны 260-300 мкм с экспозицией от 20 минут до 2-х часов и более. Применяется для обеззараживания воздуха и поверхностей в лабораторных помещениях, боксах, операционных и т.п., при этом погибает большинство вегетативных форм бактерий, кроме резистентных, споры сохраняются.

Фильтрование проводится с помощью мелкопористых бактериальных фильтров различных типов – мембранных и глубинных. Мембранные фильтры – тонкие пластинки круглой формы из сложных эфиров целлюлозы, полиамида и других веществ с известным размером пор. Глубинные фильтры – толстые асbestosовые диски, пористые стеклянные фильтры или фильтры-свечи (фарфоровые или керамические) – имеют неравномерные поры, микробы задерживаются на поверхности

и внутри фильтров за счет адсорбционных и других механизмов. Для фильтрования используют насосы, создающие вакуум или повышенное давление. Этим методом стерилизуют не выдерживающие нагревание жидкости: плазму и сыворотку крови, анатоксины, лекарственные растворы и т.п. Фильтры задерживают многие микроорганизмы и споры, но через них проникают вирусы и фильтрующиеся элементы микоплазм и L-форм.

Газовая стерилизация проводится в газовых стерилизаторах – больших герметичных камерах. В них помещают стерилизуемые объекты (упакованные в пленку или крафт-бумагу), главным образом, аппаратуру и приборы медицинского назначения, пластмассовые изделия; камеру заполняют газом. Применяют этиленоксид (ЭТО-стерилизация) или его смесь с бромистым этилом (ОВ-смесь) или другими газами для понижения взрывоопасности этиленоксида.

Имеются специальные газовые стерилизаторы для стерилизующего агента – формальдегида, в которых поддерживается вакуум.

Газовая стерилизация продолжается 6-10 часов, после чего требуется дегазация – интенсивное проветривание в течение нескольких суток. Метод надежен, но сложен и длителен.

Стерилизация химическими растворами осуществляется 2% щелочным водным раствором глютаральдегида, 20% раствором формальдегида в 70% этаноле, 6% раствором перекиси водорода. Эти растворы наливают в стерильные контейнеры и помещают туда стерилизуемые объекты (эндоскопы, трубы и маски для анестезии, резиновые и пластмассовые изделия и др.) на 5-6 часов. После окончания стерилизации предметы тщательно промывают стерильной водой, соблюдая правила асептики. Метод надежен, но возможна вторичная контаминация (обсеменение) микробами в процессе отмывания.

4.3. Дезинфекция (обеззараживание) – уничтожение или значительное снижение численности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов во внешней среде. Дезинфекцию проводят физическими и химическими методами, при этом споры бактерий, как правило, остаются жизнеспособными

К физическим методам относятся: действие высоких температур (прогревание, кипячение, сжигание малоценных предметов, исполь-

зование сухого и влажного горячего воздуха), применение лучистой энергии (лучи солнца, инфракрасные и УФ-лучи, ионизирующая радиация) и механическая очистка (мытье водой, растворами соды и моющих средств, протирание, вытряхивание, уборка пылесосами, установка воздухоочистителей и т.п.).

Химический метод заключается в использовании химических дезинфицирующих средств (*дезинфектантов*), обладающих противомикробными свойствами. К ним относятся химические соединения различной природы: галоиды (наиболее часто применяют хлорсодержащие соединения – хлорную известь, хлорамин, гипохлориды), фенолы и их производные (растворы лизола, карболовой кислоты), окислители (растворы перекиси водорода), спирты, соли тяжелых металлов (мертиолят натрия, сулема), альдегиды (формальдегид, глютаральдегид) и др.

Дезинфектанты должны быть эффективными в небольших концентрациях и в присутствии биологических материалов, действовать быстро и длительно сохранять свою активность, иметь широкий спектр антимикробного действия, быть экологичными и малотоксичными для людей и животных, не повреждать обрабатываемые объекты.

Различают профилактическую дезинфекцию и дезинфекцию в эпидемическом очаге. *Профилактическая дезинфекция* применяется очень широко с целью предотвращения возможного распространения инфекционных заболеваний. Ее проводят во всех общественных местах, где наблюдается большое скопление людей (на вокзалах, в магазинах, транспорте, детских учреждениях, предприятиях общественного питания и т.п.). Особенно тщательно проводят дезинфекцию в учреждениях медицинского профиля. В госпитальных условиях это основная мера, препятствующая распространению внутрибольничной инфекции. В микробиологических лабораториях дезинфекцию в комплексе со стерилизацией применяют для предотвращения загрязнения исследуемых объектов посторонней микрофлорой и в целях соблюдения техники безопасности.

Дезинфекцию (текущую и заключительную) в эпидемическом очаге, в котором диагностировано конкретное инфекционное заболевание, проводят целенаправленно против возбудителей данного заболевания.

Близкой к дезинфекции является *антисептика*, направленная на уничтожение или резкое снижение количества патогенных микроорганизмов на поверхности тела человека и в полостях организма. Антисеп-

тика осуществляется физическими, химическими и биологическими методами. Наиболее распространен химический метод, при котором применяют дезинфектанты со щадящим действием – антисептики. Они должны обладать выраженными противомикробными свойствами и быть практически безвредными (или причинять минимальный вред).

Примеры антисептиков: этиловый спирт, спиртовой раствор йода, растворы анилиновых красителей, раствор перекиси водорода, (их применяют для обеззараживания кожи, обработки ран, гнойничковых поражений), растворы перманганата калия, борной кислоты, фурацилина, риванола (для промывания слизистых оболочек и полостей). При развившейся инфекции проводят лечение химиотерапевтическими средствами и антибиотиками, которые, в отличие от антисептиков, обладают избирательной antimикробной активностью.

Задание:

Самостоятельно изучить основные методы стерилизации и дезинфекции, внести в альбом таблицу «Основные методы стерилизации» и заполнить ее.

Таблица 13

Основные методы стерилизации и дезинфекции

Метод стерилизации	Аппаратура	Режим стерилизации: температура, давление, однократно или дробно (сколько раз) и др.	Надежность: полное обеспложивание или остаются жизнеспособные микроорганизмы (споры, вирусы и др.)	Стерилизуемые материалы
A. Термовая стерилизация				
1. Прокаливание. 2. Кипячение. 3. Паровая стерилизация паром под давлением. 4. Паровая стерилизация текущим паром. 5. Воздушная стерилизация (сухим жаром). 6. Пастеризация.				
B. Холодная стерилизация: 8. Ионизирующая радиация. 9. УФ-облучение. 10. Фильтрование.				
B. Химическая стерилизация: 11. Газовая стерилизация. 12. Химические растворы				

5. Методы изучения физиологии роста:

5.1 Кривая роста периодической микробной популяции. Для живых бактерий характерен рост и размножение. Под ростом понимают увеличение массы клетки, под размножением – увеличение числа клеток. Размножение бактерий характеризуется временем генерации, а именно периодом, в течение которого осуществляется деление клетки.

Бактерии, засеянные в определенный объем *жидкой* питательной среды, размножаются до тех пор, пока не наступит истощение среды и накопление токсических продуктов жизнедеятельности, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательные вещества в среду и не удалять конечные продукты метаболизма, то такая культура, называемая «*периодической*», ведет себя как многоклеточный организм с генетически ограниченным ростом. Размножение бактерий в периодической культуре может быть представлено в виде «*кривой роста*», которая отражает зависимость логарифма числа живых клеток от времени культивирования. На этой кривой выделяют несколько фаз (периодов) роста:

1. начальная, или лаг-фаза;
2. экспоненциальная (логарифмическая) фаза – период интенсивного деления клеток и увеличение бактериальной популяции;
3. стационарная фаза, или фаза максимальной концентрации бактерий;
4. фаза отмирания.

Если к растущей в жидкой питательной среде культуре микроорганизмам постоянно добавлять питательные вещества и удалять метаболиты, то получают «*непрерывную культуру*», которая непрерывно находится в логарифмической фазе роста.

Бактерии, растущие на плотных питательных средах, образуют изолированные колонии. Их вид, форма, цвет и другие свойства являются видовыми признаками микробов.

5.2 Определение общего числа микроорганизмов (живых и мертвых) в популяции. Для этой цели проводят прямой подсчет микробных клеток под микроскопом в камере Горяева, которую заполняют стандартным объемом исследуемой микробной взвеси. Подсчет ведут подобно счету форменных элементов крови. В завершение, пользуясь специальной формулой, рассчитывают общее число микробных клеток

в 1 мл исследуемой взвеси - так называемое «микробное число». Наиболее удобный и быстрый метод определения микробного числа – с помощью морфологического автоанализатора.

5.3 Определение количества жизнеспособных клеток в популяции (колониеобразующих единиц – КОЕ). Считается, что каждая колония вырастает из одной колониеобразующей единицы (КОЕ), а именно из одной бактериальной или дрожжевой клетки, споры, фрагмента гифы актиномицета или плесневого гриба. Применяют два метода подсчета КОЕ – глубинный (метод агаровых пластин) и чашечный. При проведении чашечного метода готовят десятикратные разведения испытуемой пробы (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} и т.д.) и засевают по 0,1 мл из каждой пробирки на чашки Петри с полноценной питательной средой. Посевы инкубируют при 37°C 1-2 суток. Далее подсчитывают число видимых невооруженным глазом колоний, выросших на чашках Петри. Для правильного определения КОЕ подсчитывают только те чашки Петри, в которых количество колоний свыше 30 и не более 250-300.

Общее количество жизнеспособных клеток (КОЕ) в 1 мл(г) испытуемой пробы определяют по формуле:

$$N = m / 10^{-n} \times 10^{-1} = m \times n \times 10, \text{ где}$$

N – количество микроорганизмов в 1 мл исходной популяции;

m – количество колоний, выросших на чашке Петри;

n – разведение исходной популяции.

Для определения количественного содержания КОЕ конкретного вида бактерий, а не всех присутствующих в испытуемой пробе, высевы делают на среду, элективную для данного вида.

Метод определения количества КОЕ часто используют при микробиологической диагностике инфекционных заболеваний, для выявления дисбактериоза, а также для определения количества санитарно-показательных микробов в различных объектах внешней среды – в воде, почве, воздухе, пищевых продуктах и т.п.

Задание:

1. Начертить в альбоме кривую роста периодической микробной популяции в жидкой питательной среде.

2. Изучить методы определения общего количества микробных клеток и количество жизнеспособных клеток (КОЕ).

Контрольные вопросы по теме занятия

1. Химический состав бактериальной клетки. Роль воды, минеральных солей, белков, нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), липидов, углеводов в жизнедеятельности бактерий.
2. Понятие о метаболизме бактерий: конструктивный и энергетический. Подразделение микроорганизмов в зависимости от источника энергии и питательного субстрата.
3. Питание микроорганизмов. Механизмы переноса питательных веществ из внешней среды в клетку: пассивная и облегченная диффузия, активный транспорт, транслокация химической группы.
4. Потребность микроорганизмов в факторах роста, их химическая природа и роль в метаболизме клетки. Прототрофы и ауксотрофы.
5. Основные требования, предъявляемые к питательным средам, их подразделение по консистенции, составу, назначению. Простые питательные среды. Примеры, применение.
6. Специальные питательные среды. Сложные питательные среды с повышенной питательной ценностью. Примеры, применение.
7. Элективные питательные среды, сущность действия. Примеры, применение.
8. Дифференциально-диагностические среды, принцип приготовления. Применение.
9. Методы выделения чистых культур бактерий (аэробов и факультативных анаэробов), их подразделение. Методы, основанные на принципе механического разобщения микробов, примеры. Методы, основанные на использовании биологических свойств выделяемых микроорганизмов, примеры.
10. Метод выделения чистых культур бактерий по Дригальскому, основные этапы и цели каждого этапа.
11. Изучение культуральных свойств микроорганизмов. Характер роста на жидких и плотных питательных средах. Пигменты микробов. Методика изучения изолированных колоний.
12. Размножение бактерий: бинарное деление. Особенности репликации нуклеоида, связь с клеточным делением, функции мезосом.

13. Стерилизация, определение. Методы стерилизации и применяемая аппаратура. Термические методы стерилизации, их характеристика, стерилизуемые материалы. Методы холодной стерилизации, характеристика. Химическая стерилизация, методы, характеристика.
14. Дезинфекция, определение. Применяемые дезинфицирующие вещества.
15. Антисептика; определение. Примеры антисептиков в зависимости от цели применения.
16. Кривая роста периодической микробной популяции, характеристика фаз (периодов).
17. Принцип определения общего количества микробов в популяции. Метод подсчета количества жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц – КОЕ).

Занятие 6

**Тема: Выделение чистых культур бактерий (продолжение).
Ферменты бактерий. Методы изучения ферментативной
активности бактерий.**

План занятия:

1. Ферменты бактерий. Подразделение ферментов в зависимости от катализируемых реакций, экзо- и эндоферменты, конститутивные и индуцибельные ферменты.
2. Методы изучения ферментативной (биохимической) активности бактерий:
 - а) Определение сахаролитической активности;
 - б) Определение продуктов муравьинокислого брожения с помощью реакций на метил-рот и Фогес-Прескауэра.
 - в) Протеолитические ферменты и методы их выявления: тесты на индол, H_2S , желатиназу, тесты на декарбоксилазную и дезаминазную активность;
 - г) Определение уреазной активности и способности утилизировать цитрат.
3. Ферментативные тест-системы, их применение для биохимической идентификации выделенных чистых культур бактерий. API-20 тест-система.
4. Выделение чистой культуры по методу Дригальского (3-й этап):
 - а) Проверка чистоты выделенной культуры: приготовление мазка, окраска по Граму;
 - б) Определение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам методом бумажных дисков.

Методические указания к выполнению практического занятия

1. Ферменты микробов, их подразделение, свойства.

В микробных клетках содержится активный ферментативный аппарат, необходимый для жизнедеятельности клеток, обладающий теми же свойствами и функциями, что и ферменты высших организмов. В микробных клетках ферменты располагаются упорядоченно и связаны с теми структурами, в которых проявляется их активность. Например,

ферменты энергетического обмена и транспорта веществ располагаются в цитоплазматической мемbrane и ее производных, ферменты белкового синтеза связаны с рибосомами, многие ферменты находятся в цитозоле в растворенном состоянии.

Таблица 14

Классы ферментов

Класс	Тип катализируемых химических реакций	Примеры
1. Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления, осуществляют перенос водорода и электронов от донора к акцептору	Цитохромоксидаза, дегидрогеназа, пероксидаза, каталаза и др.
2. Трансферазы	Осуществляют внутри- и межмолекулярные переносы различных атомов, групп атомов и радикалов.	Аденозинтрифосфатаза, аминотрансфераза и др.
3. Гидролазы	Расщепляют внутримолекулярные связи (пептидные, эфирные, гликозидные и д.) органических веществ с присоединением воды	Фосфатаза, амидаза, эстераза, гликозидаза, ДНК-аза, РНК-аза, карбогидролаза, протеазы, аргиназа, уреаза, нейраминидаза, гиалуронидаза, лейцитиназа и др.
4. Лиазы	Разрывают связи в субстратах без присоединения воды, что приводит к отщеплению различных групп и образованию двойных связей или присоединению групп к месту двойной связи.	Декарбоксилаза, дезаминаза и др.
5. Изомеразы	Осуществляют внутримолекулярные перестройки с образованием изомеров.	Глюкозо-6-фосфатизомераза, рацемаза и др.
6. Лигазы (синтетазы)	Осуществляют синтез органических веществ из исходных молекул с использованием энергии распада фосфатных связей (распад АТФ или других макроэргических молекул).	Глютаминсинтетаза, аспарагинсинтетаза, карбоксилаза и др.

Ферменты, функционирующие только внутри клетки, называются **эндоферментами**, они катализируют биосинтез и энергетический обмен внутри клеток, например ферменты гликолитического пути и др.) **Экзоферменты** выделяются клеткой в окружающую среду и катализируют реакции гидролиза крупных макромолекул на более простые соединения, доступные для ассимиляции микробной клеткой.

Конститтивные ферменты синтезируются микробами в определенных концентрациях вне зависимости от наличия или отсутствия субстрата во внешней среде, они связаны, в основном, с клеточным метаболизмом. Синтез **индуцильных** ферментов резко усиливается при наличии в среде субстрата-индуктора (β -лактамаза, разрушающая пенициллин; амилаза, расщепляющая крахмал и т.п.), в отсутствии субстрата они находятся в клетках в следовых концентрациях. К индуцильным ферментам относится большинство гидролаз (гидролитических ферментов).

Многие патогенные микробы продуцируют ферменты патогенности, относящиеся к классу гидролаз, способные повреждать ткани организма. Например, гиалуронидаза, нейраминидаза, лецитиназа, ДНК-азы, уреаза и другие. Ферменты патогенности будут рассмотрены в разделе «Инфекция».

2. Методы изучения ферментативной активности бактерий.

Наиболее часто при изучении биохимической активности чистых культур используются методы, основанные на изменении рН среды. Ферментативное расщепление микробами углеводов приводит к накоплению кислых продуктов за счет образования органических кислот, а утилизация белковых веществ, как правило, вызывает защелачивание среды.

Для изучения ферментативной активности микробов значительно реже применяют методы, основанные на других принципах, а именно: используют хромогенные или флюорогенные субстраты (для идентификации медленно растущих микроорганизмов или требующих особых условий культивирования), выявляют конечные продукты метаболизма (летучие и нелетучие кислоты и др.) с помощью газожидкостной хроматографии; по наличию роста культуры на специальной питательной среде судят о способности ассимилировать субстрат, имеются и другие методы.

Определение сахаролитической активности проводят на дифференциально-диагностических средах, содержащих углеводы и индикаторы – среды Эндо, Левина и среды Гисса (табл. 15) и др.

Среды Эндо и Левина применяются в бактериологической диагностике на 1-м этапе выделения чистой культуры энтеробактерий (возбудителей эшерихиозов, дизентерии, брюшного тифа, сальмонеллезов и др.).

Дифференциально-диагностические среды Гисса представляют собой набор пробирок с питательными средами, содержащими в каждой пробирке различные углеводы («сахара»): чаще всего используют лактозу, глюкозу, мальтозу, арабинозу, ксилозу, галактозу, рамнозу, многоатомные спирты – инозит, маннит, дульцит, глицерин и индикатор. При необходимости, набор углеводов может быть расширен за счет включения других углеводов – инулина, сорбита, крахмала, трегалозы и др.

При ферментации (сбраживании) этих субстратов бактериями происходит образование органических кислот (муравьиная, уксусная, молочная и др.), нейтральных продуктов, иногда образование газа (CO_2 и H_2). Накопление кислых продуктов улавливается находящимся в среде индикатором, который при снижении значений рН изменяет цвет среды, что указывает на положительную реакцию. Рост бактерий на среде Гисса без изменения ее цвета свидетельствует об отсутствии фермента, расщепляющего данный углевод, то есть, об отрицательной реакции.

Таким образом, среды Гисса предназначены для биохимического (ферментативного) тестирования выделенных культур бактерий.

Таблица 15

Дифференциально-диагностические среды

Наименование и внешний вид среды	Состав (компоненты)	Назначение	Принцип действия и внешний вид среды после посева
<i>Среда Эндо</i> Бледно-розовая плотная среда, разливается в чашки Петри	Питательная основа-МПА, субстрат – лактоза. Индикатор – основной фуксин. обесцвеченный сульфитом натрия (Na_2SO_3)	Для рассева исследуемого материала (нативного или после обогащения) с целью получения изолированных колоний патогенных и условно-патогенных микробовактерий: эшерихий, сальмонеллы, шигелл, йерсиний и других	На среде можно наблюдать рост красных или бесцветных колоний. Эшерихии разлагают лактозу до кислых продуктов, в том числе альдегидов, они соединяются с сульфитом натрия. При этом освобождается фуксин, который окрашивает колонии и среду в красный цвет, часто с металлическим зелено-блестящим блеском (положительный результат). Сальмонеллы и шигеллы не разлагают лактозу и образуют бесцветные колонии (отрицательный результат).
<i>Среда Левина</i> Плотная среда красновато-фиолетового цвета, разливается в чашки Петри. Среда является дифференциальной диагностической и слабо selective, так как оказывает ингибирующее действие на грамположительную микрофлору	Питательная основа-МПА, Субстрат – лактоза. Индикаторы – эозин и метиленовый синий	Для получения изолированных колоний патогенных и условно-патогенных микробовактерий – см. среду Эндо. Среда Левина может быть использована также для выделения грибов <i>Candida albicans</i>	На среде можно наблюдать рост синих или бесцветных колоний. <i>Escherichia coli</i> , разлагающая лактозу, вызывает сдвиг pH в кислую сторону, при этом комплекс индикаторов эозина и метиленового синего выпадает в осадок и колонии приобретают темно-сине-фиолетовый, почти черный цвет, часто с металлическим блеском (положительный результат). Энтеробактерии, не расщепляющие лактозу, образуют бесцветные колонии.
<i>Среды Гисса</i> Набор пробирок с полужидкой средой фиолетового цвета.	Питательная основа – полуягурт МПА (0,4%). Субстрат (в каждой пробирке разный углевод), Индикатор – фромкрезоловый пурпурный	Определение спектра сахаролитической активности с целью идентификации (определение родовой и видовой принадлежности) выделенной культуры бактерий семейства Enterobacteriaceae, а также других семейств и родов.	При ферментации субстрата образуется кислые продукты (молочная, уксусная, мурьевинная и другие кислоты), которые снижают значение pH и фиолетовый цвет индикатора изменяется на желтый или желто-коричневый, что указывает на положительную реакцию. При образовании газа (H_2 и CO_2) – пузырьки и трещины в толще среды. Рост бактерий в среде Гисса без изменения ее цвета свидетельствует об отсутствии фермента, расщепляющего данный углевод, то есть об отрицательной реакции.
<i>Среды Гисса</i> из готовых сухих коммерческих сред.	Содержит те же компоненты: 0,4% МПА, углеводы или многоатомные спирты. Индикатор ВР (водный голубой и розоловая кислота)	То же	При положительной реакции цвет среды из желтой переходит в синюю. При газообразовании – пузырьки газа в толще среды.
Набор пробирок с полужидкой средой цвета обычного МПА (желтый)			При отсутствии расщепления субстрата цвет среды не меняется.

Тест на β -галактозидазу (ONPG). β -галактозидазную активность бактерий определяют на питательной среде с орто-нитрофенол-галактозидом, это вещество является хромогенным субстратом и, будучи бесцветным, при гидролизе образует окрашенные продукты. При посеве бактерий, имеющих β -галактозидазу (например *Escherichia coli*), орто-нитрофенол-галактозид распадается на галактозу и орто-нитрофенил, последний имеет желтую окраску и среда становится желтой (положительный результат). При отсутствии у бактерий фермента β -галактозидазы среда остается бесцветной (отрицательный результат).

Тест на утилизацию цитрата (CIT). Способность бактерий утилизировать цитрат выявляют на синтетической среде Симмонса, которая содержит набор солей, агар, неорганический источник азота, цитрат натрия в качестве единственного источника углерода и индикатор бромтимоловый синий. Исходный цвет среды оливково-зеленый. Бактерии, имеющие фермент цитратредуктазу и способные утилизировать цитрат, хорошо растут на этой среде. При расщеплении цитрата образуется двуокись углерода (CO_2), реагирующая с ионами Na и водой. В результате образуется натрия карбонат (Na_2CO_3), защелачивающий среду. При положительной реакции цвет среды становится ярко-синим. При отрицательном результате бактериальный рост на среде Симмонса отсутствует, цвет среды остается зеленым.

Проба на уреазу (URE). В пробирку с питательной средой, содержащей мочевину и индикатор фенолрот (исходный цвет среды - желтый, $\text{pH} 6,8-6,9$), добавляют 0,2 мл испытуемой бактериальной культуры. После 2-х часов инкубации при 37°C учитывают результат. Бактерии, обладающие ферментом уреазой, вызывая гидролиз мочевины, образуют в виде конечных продуктов аммиак и углекислоту, тем самым изменяя pH среды в щелочную сторону и происходит изменение цвета среды, она становится красной.

Определение продуктов муравьинокислого брожения-реакция с метилрот (MR-тест) и реакция Фогеса-Проскауэра (VP)

- Реакция на метилрот ставится для выявления интенсивности кислотообразования из глюкозы. Испытуемую культуру засевают в глюкозопептонный бульон с буфером и инкубируют не менее 2-х суток при 370C . Затем в среду вносят 3-4 капли индикатора метилрот и сразу учитывают реакцию. Если появляется ярко-красное окрашивание – реакция считается положительной, при желтой окраске – отрицательной.

Реакция с метилрот положительна при муравьинокислом брожении смешанного типа, характерном для многих энтеробактерий, например *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus* и др. Когда наблюдается интенсивное кислотообразование, pH снижается до 4,4-5,0, что приводит к переходу индикатора метилрот из желтого в красный цвет. Отрицательная реакция наблюдается при муравьинокислом брожении бутандиолового типа, при котором количество кислых продуктов незначительно и образуется ацетоин (ацетилметилкарбинол).

- *Реакция Фогес-Проскауэра (VP)* для выявления ацетоина. Ставится всегда одновременно с тестом на метилрот, как правило, если одна из реакций положительна, вторая – отрицательна. Испытуемую культуру выращивают на глюкозопептонном бульоне с буфером в течение 4-5 суток. Затем в пробирку добавляют сначала 5% спиртового раствора альфа-нафтола, затем 40% KOH, пробирку встряхивают, дают постоять 30-60 минут в термостате, после чего учитывают результат. При положительной реакции появляется красная окраска, так как в щелочных условиях ацетоин дает с альфа-нафтолом соединение красного цвета. Положительная реакция характерна для родов *Enterobacter*, *Serratia* и др.

Определение протеолитической активности

Многие бактерии обладают протеолитической активностью, связанной с их способностью синтезировать протеазы (пептидогидrolазы). При гидролизе белка с участием протеаз образуются пептоны, полипептиды и свободные аминокислоты.

В бактериологической диагностике для биохимической идентификации используют также тесты, позволяющие выявлять ферменты, расщепляющие аминокислоты лизин, орнитин, аргинин, фенилаланин, триптофан, цистеин и другие. Испытание проводят на питательных средах, содержащих соответствующую аминокислоту и индикатор, или добавляют реагент после инкубации испытуемой культуры.

Реакции на декарбоксилазную активность (LDC, ODC, ADH). Реакции ставятся на питательных средах, содержащих аминокислоты лизин, аргинин и орнитин и индикатор бромтимоловый синий, который при защелачивании среды (положительный результат) меняет свой цвет с оливково-зеленого на синий. Бактерии, обладающие специфическими декарбоксилазами, расщепляют аминокислоты орнитин и лизин, образуя диамины и CO₂, при этом pH среды становится щелочной. измене-

ние цвета среды на желтый указывает на отсутствие декарбоксилазы и образование кислых продуктов при росте культуры.

Аргинин расщепляется несколько иначе – с помощью декарбоксилазной и гидролазной систем (тест ADH), но при этом также происходит ощелачивание среды.

О положительной реакции судят по изменению цвета находящегося в среде индикатора.

Фенилаланиновый тест – определяют на плотной питательной среде с аминокислотой фенилаланином, он основан на способности бактерий (например *Proteus*) расщеплять фенилаланин с помощью фермента фенилаланиндиназы. В результате окислительного дезаминирования образуется бесцветная фенилпировиноградная кислота. Чтобы ее выявить, в среду (непосредственно на бактериальный рост) добавляют реагент – хлорид железа, с которым фенилпировиноградная кислота дает зеленое окрашивание.

Тест на утилизацию триптофана - проба на индол (IND). Индол образуют бактерии, имеющие фермент триптофаназу. Под действием этого фермента триптофан, присутствующий в пептоне питательной среды, расщепляется на индол, NH₃ и пировиноградную кислоту. Индол образуется в небольшом количестве, поэтому его концентрируют на поверхности среды, извлекая ксиолом или эфиром. Выявляют индол с помощью реагтива Ковача, в его состав входит парадиметиламинбензальдегид, который образует с индолом соединение красного цвета.

Испытуемую бактериальную культуру выращивают на МПБ при температуре 37°C 2-3 суток. В пробирку наливают 5 мл выросшей культуры и 1 мл ксиола, энергично встряхивают для извлечения индола. После отстаивания в пробирку осторожно добавляют реагент Ковача так, чтобы он образовал слой между питательной средой и ксиолом, при положительном результате появляется красное кольцо.

Определение проводят также с помощью фильтровальных бумагек, пропитанных щавелевой кислотой – проба Мореля. Полоски укрепляют под пробкой в пробирке с МПБ, куда внесена испытуемая культура. Появление на полосках бумаги красного окрашивания указывает на наличие индола.

Проба на сероводород (H_2S). Образование сероводорода связано с расщеплением аминокислот цистеина, цистина, метионина. Испытуемую культуру засевают на питательную среду, содержащую сульфат железа (или другую его соль), инкубируют 1-2 суток. Под действием H_2S среда чернеет за счет образования сернистого железа.

Выявление сероводорода возможно также с помощью индикаторной полоски бумаги, пропитанной уксуснокислым свинцом (положительная реакция – почернение бумажки). Этот метод менее чувствительный, чем предыдущий.

Тест на протеолитическое разжижение желатины. Разжижать желатину способны микроорганизмы, выделяющие в среду фермент желатиназу (фермент типа коллагеназы), вызывающий гидролиз аминокислот, входящих в желатину, вследствие чего этот белок теряет свои гелеобразующие свойства и разжижается. Для постановки опыта испытуемую бактериальную культуру засевают уколом в столбик 15% мясопептонной желатины. При наличии желатиназы отмечается разжижение желатины, которое может быть послойным, воронкообразным, в виде перевернутой елочки, мешковидным и т.п.

3. Коммерческие микро-тест-системы для биохимической идентификации культур.

В настоящее время, кроме классических биохимических тестов, для идентификации выделенных культур микробов применяют коммерческие микро-тест-системы, которые повышают точность результатов за счет стандартизации и увеличения количества тестов (от 15 до 30), менее трудоемки и, следовательно, сокращают время исследования.

Тест-системы делятся на 2 группы в зависимости от содержания субстрата:

1. Системы, в которых субстрат и индикатор находятся в питательной среде;
2. Системы, где субстрат и индикатор содержатся в носителе-шаблоне, например в бумажных дисках или полимерном шаблоне-носителе.

Тест-системы первой группы представляют собой полистироловые пластины с микрообъемными лунками, содержащие обезвоженные дифференциально-диагностические среды. Количество тестов в таких системах составляет около 20 и более. Для небольших лабораторий выпускаются индивидуальные тест-системы, на которых идентифицируют одну культуру. В лунки вносят суспензию испытуемой культуры в изотоническом растворе, учет проводят после 18-24 часовой инкубации. Примерами таких тест-систем являются ПБДЭ и ТБДС («Диагностические системы», г. Н.Новгород), семейство систем API (BioMerieux, Франция), Enterotube П (Becton Dickinson, США) и др.

Для крупных лабораторий с большим количеством исследуемых культур имеются коммерческие тест-системы на 8-12 культур, содержащих до 96 лунок, например: ММТ Е1 и ММТ Е2 («Аллерген», г. Ставрополь), ЭНТЕРО-тест 1 и 2 (Lachema, Чехия).

Для коммерческих тест-систем второй группы изучаемую культуру выращивают в жидких питательных средах, в которые помещают шаблон-носитель, содержащий субстрат и индикатор к изучаемому ферменту. Примером такой тест-системы является Micro-ID (Organon Teknika, США).

При необходимости ускоренной идентификации (когда лаборатории работают в круглосуточном режиме) можно использовать *коммерческие рапид-системы*, в которых тесты основаны не на изменении pH, а на использовании хромогенных или флюорогенных субстратов. Рапид-системы позволяют получить результаты после 4-6 часов инкубации. Примерами коммерческих рапид-систем являются API Rapid 20E (BioMerieux, Франция), RapiD NF Plus и RapiD ANA П (IDS, США) и другие.

При идентификации выделенной культуры микробы определяют, чаще всего, ее видовую принадлежность, но иногда достаточно определить род или принадлежность к определенной группе. Учет результатов проводят визуально или с использованием специальных считающих устройств – ридеров, которые повышают достоверность результатов и снижают субъективизм оценки. Каждый положительный результат оценивается знаком “+”, а отрицательный – знаком “-”. В некоторых случаях перед учетом результата теста в лунку необходимо добавить специальные проявляющие реактивы.

Фирмы, выпускающие микро-тест-системы, как правило, предлагают к тестам и «Фирменные» программы для компьютерной обработки результатов.

Задание:

1. Ознакомиться с коммерческой микро-тест-системой API-20 E.
2. Учесть результаты тестирования бактериальных культур (таблица 15), представителей семейства Enterobacteriaceae – Escherichia, Salmonella, Proteus, Shigella, Klebsiella на API-20 E планшетах.
3. Провести биохимическую идентификацию предложенной культуры энтеробактерий, пользуясь интерпретационной таблицей и сравнить результаты с таблицей 17, результаты внести в альбом.

Система API-20 E – стандартная система для идентификации энтеробактерий и других грамотрицательных палочек, состоящая из набора биохимических микро-тестов (23 теста) на полистироловой пластине и базы данных.

Пластина API-20 E содержит 20 микротуб, в которых находятся сухие среды для различных биохимических тестов, содержащие субстрат к определенному ферменту и индикатор. В каждую тубу вносят взвесь (сусpenзию) изучаемой культуры в дистиллированной воде, которая восстанавливает исходную консистенцию среды. Затем пластину помешают в прозрачный пенал (бокс) и инкубируют при 37°C в течение 18-24 часов. В процессе инкубации продукты метаболизма бактерий вызывают изменение цвета среды в микротубах, которое в большинстве тестов наступает спонтанно, а в некоторых тестах для выявления результата необходимо добавить соответствующие реагенты (тесты на VP, TDA, IND, OX, NO₂).

Результаты биохимических тестов учитывают с помощью Интерпретационной таблицы (таблица 16), в которой перечислены тесты, указаны субстраты, определяемые ферменты и цвет в микротубах при положительном и отрицательном ответе. Полученные ответы вносят в стандартную учетную карту.

Идентификацию исследуемой культуры проводят путем сравнения результатов тестирования в учетной карте с Идентификационной таблицей, в которой представлены результаты биохимического тестирования 98 видов энтеробактерий и других грамотрицательных палочек. Более совершенными способами учета результатов тестирования бактерий являются определение Аналитического профильного индекса, в котором тесты разбиваются на триады, или/и использование API LAB компьютерной программы.

Таблица 16

Интерпретационная таблица

Тесты	Субстраты	Реакции/ферменты	Результат отрицательный	Результат положительный
ONPG	орт-нитрофенил-галактозид	В-галактозидаза	бесцветный	желтый
ADN	аргинин	Аргинин-дегидролаза	желтый	красный/оранжевый
LDC	лизин	Лизин-декарбоксилаза	желтый	Оранжевый/красный
ODC	орнитин	Орнитин-декарбоксилаза	желтый	красный/оранжевый
CIT	цитрат Na	Утилизация цитрата	светло-зеленый/желтый	синий
H ₂ S	тиосульфат Na	Образование H ₂ S	бесцветный	черный осадок
URE	мочевина	Уреаза	желтый	красный/оранжевый
TDA	триптофан	Триптофан-дезаминаза	желтый	темно-коричневый
IND	триптофан	Индолообразование	светло-зеленый/желтый	красный
VP	пируват Na	Продукция ацетоина	бесцветный	розовый/красный
GEL	желатина	Желатиназа	бесцветный	черный
GLU	глюкоза	Ферментация/окисление	синий/сине-зеленый	желтый
INO	инозит	- << - <<	- <<	- <<
MAN	маннит	- << - <<	- <<	- <<
SOR	сорбит	- << - <<	- <<	- <<
RHA	рамноза	- << - <<	- <<	- <<
SAC	сахароза	- << - <<	- <<	- <<
MEL	мелабиоза	- << - <<	- <<	- <<
AMY	амигдалин	- << - <<	- <<	- <<
ARA	арabinоза	- << - <<	- <<	- <<

Примечание. Таблица упрощена, так как, кроме перечисленных ферментов, при идентификации чистых культур выявляют наличие подвижности, способность расти на среде Мак-Конки и дыхательные ферменты, последние разбираются на следующем занятии.

В настоящее время существуют бактериологические автоанализаторы, предназначенные для подробного биохимического тестирования бактериальных культур и определения их чувствительности к антибиотикам (к 40 препаратам).

Дифференциально-диагностические признаки некоторых родов энтеробактерий на API-20E

Оценка результатов биохимических тестов

4. Продолжить работу по выделению чистой культуры по методу Дригальского – 3-й этап. Целью этапа является идентификация выделенной культуры, которая проводится на основании изучения комплекса признаков: морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, антигенных, вирулентных, токсигенных, чувствительности к бактериофагам, антибиотикам и др.

Для успешного лечения антибиотиками инфекционных заболеваний необходимо предварительно определить степень чувствительности к ним возбудителя заболевания. Наиболее простым является метод бумажных дисков - небольших кружочков фильтровальной бумаги, пропитанных определенным количеством различных антибиотиков. Диски отличаются по цвету или имеют буквенную маркировку. Их помещают на чашки с питательным агаром, предварительно засеянные изучаемой культурой. Степень чувствительности к антибиотикам определяют после инкубации в термостате по величине зоны задержки роста вокруг каждого диска.

Задание:

1. Проверить чистоту выделенной культуры, убедиться в ее однородности. Для этого приготовить мазок со скошенного МПА, окрасить по Граму и просмотреть несколько полей зрения.
2. Определить чувствительность выделенной культуры к антибиотикам методом бумажных дисков (диско-диффузный метод). Для этого в пробирку с выделенной чистой культурой на скошенном МПА налить 4-5 мл физиологического раствора NaCl. Вращая пробирку между ладонями, смыть бактерии с питательного агара. Нанести 2-3 капли смыва бактерий на поверхность МПА в чашке Петри и равномерно растереть шпателем для получения сплошного роста культуры в виде «газона». На засеянную поверхность МПА поместить 4-5 дисков, пропитанных различными антибиотиками, на одинаковом расстоянии друг от друга и отступив от края чашки на 20-30 мм. Результаты опытов учитывают на следующем занятии.

Контрольные вопросы по теме занятия

1. Ферменты микроорганизмов. Подразделение по классам и механизму действия.
2. Гидrolазы, их значение для жизнедеятельности бактериальной клетки.
3. Индуцибельные и конститутивные ферменты.
4. Экзогенные и эндогенные ферменты.
5. Подразделение ферментов в зависимости от субстрата.
6. Определение сахаролитической активности бактерий. Дифференциально-диагностические среды Эндо, Левина, Гисса.
7. Тест на β -галактозидазную активность (ONPG).
8. Определение продуктов муравьинокислого брожения с помощью реакций метилрот (MR-тест) и Фогеса-Проскауэра (VP).
9. Определение уреазной активности (URE) и тест на цитратредуктазу (CIT).
10. Протеолитические ферменты и методы их определения.
11. Реакции на декарбоксилазную активность (LDC, ODC, ADH). Фенилаланиновый тест.
12. Тест на утилизацию триптофана – проба на индол (IND). Проба на сероводород (H_2S). Тест на протеолитическое разжижение желатины (GEL).
13. Коммерческие микро-тест-системы, подразделение. Практическое применение, преимущества по сравнению с классическими методами биохимической (ферментативной) идентификации.
14. Система APJ-20E и ее использование для биохимического тестирования энтеробактерий.
15. Метод выделения чистых культур по Дригальскому (3-й этап): принципы идентификации выделенной чистой культуры.

Занятие 7

**Тема: Энергетический метаболизм микроорганизмов.
Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов.
Антибиотики. Методы определения чувствительности к антибиотикам.**

План занятия:

1. Дыхание прокариот, типы дыхания у облигатных аэробов, облигатных и факультативных анаэробов. Брожение, его сущность, типы брожения.
2. Тесты для выявления путей утилизации глюкозы (окислительный или ферментативный) у бактерий с различным типом дыхания. Методы определения дыхательных ферментов. Демонстрации.
3. Облигатные анаэробы. Способы создания бескислородных условий. Применяемая аппаратура для культивирования облигатных анаэробов – анаэростаты и анаэробные боксы. Питательные среды. Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов. Демонстрации питательных сред и отдельных этапов выделения чистых культур.
4. Химиотерапия. Антибиотики. Типы классификаций антибиотиков (по происхождению, способу получения, химическому составу, молекулярному механизму, типу и спектру действия). Демонстрации антибиотиков с различным молекулярным механизмом и спектром действия.
5. Механизмы резистентности микроорганизмов к антибиотикам, пути их формирования и преодоления.
6. Методы определения чувствительности к антибиотикам у выделенных культур микробов:
 - 1) Диско-диффузный метод: учет опыта определения чувствительности культур методом бумажных дисков;
 - 2) Метод серийных разведений: демонстрация опыта.

1. Энергетический метаболизм микроорганизмов.

Типы дыхания. Брожение

Метаболизм (обмен веществ) – это совокупность биохимических реакций, протекающих в микробной клетке и направленных на построение ее компонентов и обеспечение ее энергией. Клеточный метаболизм состоит из двух потоков реакций, тесно связанных между собой и протекающих одновременно: энергетического и конструктивного.

Конструктивным метаболизмом (анаболизмом) – называют поток реакций, направленный на построение вещества клетки (биосинтез) из мелких и простых молекул, в том числе и из поступивших извне с использованием запасенной энергии.

Энергетический метаболизм (катализм) - это поток реакций, сопровождающийся распадом крупных молекул на более мелкие с выделением энергии и запасанием получаемой энергии в форме макроэргических молекул – АТФ, АДФ, ЦТФ (цитидинтрифосфат), УТФ (уридинтрифосфат) и других, главными из них являются АТФ, которые в дальнейшем расходуются для биосинтеза, для активного движения, осморегуляции и других энергозатратных процессов.

Основными способами получения энергии для большинства микробных клеток являются дыхание (окислительное фосфорилирование) и брожение (субстратное фосфорилирование). При этом в обоих случаях происходит перенос фосфорильной группы от фосфорной кислоты на АДФ с образованием АТФ.

Дыхание по энергетической эффективности во много раз превосходит брожение. В процессе дыхания при полном окислении одной молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ. А, например, при молочно-кислом брожении одна молекула глюкозы дает только 2 молекулы АТФ.

1.1 Дыхание

Дыхание – это метаболический процесс, идущий с образованием АТФ путем окислительного фосфорилирования, сопряженного с функционированием электронно-транспортной цепи, при котором органические и неорганические соединения служат донорами электронов, а конечными акцепторами электронов являются в основном неорганические соединения.

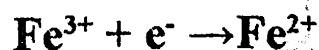
Для понимания механизмов дыхания необходимо иметь представление о ферментах дыхательной цепи, их окислительно-восстановительных потенциалах и об их взаиморасположении в мембране прокариотической клетки.

Дыхательная (электронно-транспортная) цепь содержит систему переносчиков (окислительно-восстановительных ферментов и коферментов), осуществляющих транспорт протонов и электронов в цикле Кребса. У прокариот дыхательная цепь локализована в ЦПМ и, возможно, в ее производных (мезосомах). Мембрана содержит фермент АТФ-синтазу, образующую АТФ из АДФ и фосфора. Важнейшими ферментами дыхательной цепи являются:

- *Флавопротеины* – окислительно-восстановительные ферменты, содержащие в качестве простетических групп flavинмононуклеотид (ФМН) или flavинаденидинуклеотид (ФАД), которые передают атомы водорода от восстановленных пиридиновых нуклеотидов (НАДН, НАДФН) последующим переносчикам.

- *Хиноны* - окислительно-восстановительные коферменты (циклические дикетоны), способные переносить как водород, так и электроны (e^-). В мембране они содержатся в избытке, являясь «сборщиками водорода» от других коферментов и простетических групп ферментов, который они дальше передают цитохромам. У грамотрицательных бактерий чаще встречается убихинон – кофермент Q (КоК), у грамположительных – нафтохинон; существуют и другие хиноны.

- *Цитохромы* – окислительно-восстановительные ферменты, которые переносят только электроны. В молекуле цитохромов простетической группой является гем, в состав которого входит железо. Дыхательная цепь содержит несколько цитохромов, различающихся по окислительно-восстановительным потенциалам и другим свойствам (цитохромы в, с, о, а, аз и другие). Обычно в цитохроме железо находится в окисленной форме (Fe^{3+}), но после присоединения электрона оно восстанавливается:



Схематично дыхательная цепь в соответствии с возрастанием окислительно-восстановительного потенциала ее компонентов может быть представлена следующим образом:

Субстрат \rightarrow НАДН \rightarrow ФП \rightarrow Убихинон (КоК) \rightarrow Цв \rightarrow Цс1 \rightarrow Цс \rightarrow Цаа3 \rightarrow O_2 ,

где переносчиками водорода от окисляемого субстрата являются, главным образом, два пиримидиновых нуклеотида - НАД (никотинамидадениндинуклеотид) и НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). Эти переносчики, присоединяя водород, восстанавливаются и передают его на другие акцепторы. От НАД[.]Н₂ водород поступает на промежуточные продукты дыхательной цепи или брожения, а НАДФ[.]Н₂ участвует в реакциях биосинтеза белков и липидов.

Атомы водорода от НАД[.]Н² поступают на флавопротеиды (ФАД, ФМН). В свою очередь, эти соединения, окисляясь, передают его на хиноны, которые способны переносить не только водород, но и электроны. Атомы водорода распадаются на протоны Н⁺ и электроны. Протоны переносятся на наружную поверхность мембраны и накапливаются там, создавая положительный потенциал, а электроны поступают на цитохромы, переходя от одного цитохрома к другому (в → c1 → c → a → aa₃). Терминальный цитохром a+a₃ (aa₃) называется цитохромоксидазой, он присоединяет электрон к кислороду, превращая его в отрицательно заряженный активный анион: O²⁺ e⁻ → O²⁻.

При переносе электронов на ЦПМ возникает трансмембранный электрохимический градиент ионов водорода (первоначальное накопление энергии). Протоны и электроны накапливаются по разные стороны мембраны, и при этом ее наружная поверхность заряжается положительно, а внутренняя – отрицательно, что создает разность потенциалов. Когда эта разность становится значительной, образуется протонный канал при участии фермента АТФ-синтазы, через который протоны переходят с наружной стороны мембраны клетки на внутреннюю сторону. Этот процесс сопровождается выделением большого количества энергии, значительная часть которой идет на синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, а поступающие внутрь клетки протоны соединяются с анионом кислорода, образуя воду и молекулярный кислород: 4H⁺ + 2O²⁻ → 2H₂O + O².

Электронно-транспортная цепь аэробных прокариот, изложенная выше, в своем строении и функционировании принципиально сходна с дыхательной цепью эукариот, но ферменты дыхательной цепи прокариот находятся в ЦПМ, а в клетках эукариотов они локализованы во внутренней мембране митохондрий, которые у прокариот отсутствуют. Кроме того, у прокариот электронно-транспортная цепь нередко бывает энергетически менее эффективной и может отличаться по составу переносчиков в зависимости от видовой принадлежности.

У прокариотических форм помимо аэробного дыхания существуют анаэробное дыхание и брожение.

Анаэробное дыхание – это процесс, в котором, в отличие от аэробного дыхания, в качестве конечного акцептора электронов используется не кислород, а окисленные неорганические соединения – нитраты (NO_3^-), сульфаты (SO_4^{2-}), карбонаты (CO_3^{2-}) и другие, в редких исключениях – органические соединения, например фумарат. При анаэробном дыхании функционирует электронно-транспортная цепь с теми же типами переносчиков электронов и протонов, но цитохромоксидаза заменена на соответствующие редуктазы (нитратредуктаза, сульфатредуктаза и др.)

Анаэробным типом дыхания обладают как облигатные, так и факультативные анаэробы.

Облигатные анаэробы вообще не способны использовать O_2 в качестве конечного акцептора электронов, для них наиболее характерно сульфатное дыхание, встречаются и другие типы дыхания – серное, карбонатное, железное, фумаратное.

Факультативные анаэробы переходят к анаэробному дыханию только при отсутствии в окружающей среде кислорода, им свойственно нитратное дыхание с конечным акцептором NO_3^- .

Анаэробное дыхание у прокариот-органотрофов имеет значительно меньшее распространение, чем брожение, которое является основным способом получения энергии в анаэробных условиях.

1.2 Брожение

Брожение – метаболический процесс, приводящий к образованию АТФ в результате анаэробного окислительно-восстановительного превращения органических соединений в реакциях субстратного фосфорилирования.

Процессу брожения подвергается не свободная молекула углевода, а соединенная с фосфорной кислотой, т.е. фосфорилированная (фосфорилирование – это процесс включения остатка неорганической фосфорной кислоты в молекулы различных химических соединений). Реакции фосфорилирования, сопровождающиеся образованием АТФ при гликолизе и в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса), называют *субстратным фосфорилированием* – в отличие от окислительного фосфорилирования, протекающего в дыхательной цепи. При брожении донорами и акцепторами электронов служат органические вещества. Брожение протекает

в анаэробных условиях, при этом из сбраживаемого субстрата извлекается только незначительная часть запасенной в нем энергии.

Конечными продуктами брожения являются органические соединения (органические кислоты, спирты, ацетон). В зависимости от природы конечных продуктов различают разные типы брожения: молочнокислое, спиртовое, уксуснокислое, маслянокислое, пропионовокислое, муравьинокислое и другие. Химическая природа конечных продуктов брожения зависит как от вида микроорганизма, осуществляющего энергетический метаболизм в анаэробных условиях, так и от условий его протекания.

В зависимости от отношения к молекулярному кислороду и строения электронно-транспортной цепи прокариоты делятся на следующие группы:

1. *Облигатные аэробные бактерии* - используют кислород для роста и метаболизма (аэробное дыхание), устойчивы к стандартным концентрациям O_2 (20-21%) в окружающей среде.
2. *Микроаэрофильные бактерии* - нуждаются в кислороде для осуществления метаболизма, но устойчивы к нему только при пониженном содержании O_2 в окружающей среде (концентрация O_2 не выше 5%); так как повышенная концентрация O_2 приводит к инактивации ферментов их основных метаболических путей.
3. *Строгие (облигатные) анаэробы* - осуществляют свой рост и метаболизм (брожение, анаэробное дыхание) только при отсутствии молекулярного кислорода, который вызывает их гибель из-за отсутствия защитных ферментов.
4. *Аэротolerантные микроорганизмы* - осуществляют анаэробный метаболизм (брожение), но устойчивы к действию кислорода при его обычных концентрациях, так как имеют специфические механизмы защиты от токсических соединений кислорода.
5. *Факультативные анаэробы* - могут расти в аэробных и в анаэробных условиях, им свойственно аэробное или анаэробное (нитратное) дыхание или брожение. Они устойчивы к обычным концентрациям кислорода, так как имеют специальные защитные ферменты.

Токсические продукты, образующиеся в присутствии молекулярного кислорода

Для аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных бактерий кислород (как фактор внешней среды) необходим для осуществления процесса аэробного дыхания в качестве конечного акцептора электронов. Но с молекулярным кислородом и его производными связаны и токсические для клеток эффекты. Наиболее токсичными являются супероксидный анион (O_2^-), гидрооксидный радикал (OH^-) и пероксид водорода (H_2O_2).

1. $O_2 + e^- > O_2^-$
2. $O_2^- + H_2O_2 + H^+ > O_2 + H_2O + OH^-$
3. $O_2 + 2H^+ + 2e^- > H_2O_2$

Защиту от токсических соединений кислорода осуществляют присущие в клетке специфические защитные ферменты: каталазы (Cat), пероксидазы, супероксиддисмутазы (СОД). У облигатных аэробов и факультативных анаэробов в клетках содержатся эти ферменты, а у большинства облигатных анаэробов они отсутствуют.

Каталаза и пероксидаза улавливают пероксид водорода, а СОД захватывает молекулы O_2^- . Таким образом, эти ферменты сводят концентрацию H_2O_2 и O_2^- в клетке до минимума и не дают им возможности взаимодействовать с образованием OH^- .

1. $2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{СОД} H_2O_2 + O_2$
2. $2H_2O_2 \xrightarrow{Cat} 2H_2O + O_2$
3. $H_2A + H_2O_2 \xrightarrow{\text{пероксидаза}} A + 2H_2O$

2. Определение способа расщепления глюкозы (OF-тест). и тесты для выявления окислительно-восстановительных ферментов у бактерий

При биохимической идентификации чистых культур бактерий часто определяют ключевые ферменты энергетического метаболизма (разные типы брожения, аэробное и анаэробное дыхание), а также ферменты, обеспечивающие защиту микробов от токсического действия соединений кислорода.

OF-тест позволяет выявлять пути утилизации глюкозы – окислительный, ферментативный пути или отсутствие утилизации. Оксилитерный путь осуществляется в присутствии O_2 как конечного акцептора электронов, ферментативный путь наблюдается в анаэробных условиях, при котором происходит перенос электронов на органические субстраты.

Тест проводят на специальной ОФС (окислительно-ферментативной среде), которая относится к дифференциально-диагностическим средам, она содержит набор минеральных солей, глюкозу, индикатор бромтимоловый синий, агар-агар. Среда разливается в пробирки и имеет зеленовато-синий цвет. При утилизации глюкозы среда окисляется и цвет меняется на желтый. Для создания анаэробных условий на среду насыпают около 3 мл стерильного вазелинового масла. После посева изучаемые культуры инкубируют 3-4 дня при $37^{\circ}C$. Учет результатов проводится по наличию роста и изменению цвета среды.

Тест на фермент каталазу. Этот фермент расщепляет пероксид водорода (H_2O_2) на молекулярный кислород и воду. Катализной активностью обладают облигатные аэробы и факультативные анаэробы. У облигатных анаэробов фермент каталаза отсутствует, поэтому пероксид водорода накапливается в присутствии O_2 и оказывает губительное действие на бактериальные клетки.

Постановка опыта:

На поверхность бактериальной культуры, выращенной на плотной питательной среде, наносят 2-3 капли 3% раствора пероксида водорода. В присутствии каталазы выделяются пузырьки газа (O_2).

Тест может быть поставлен на предметном стекле, на которое наносят каплю 3% раствора пероксида водорода и 1 петлю изучаемой культуры. Через 3-4 минуты при наличии каталазы образуются пузырьки газа.

Тест на фермент цитохромоксидазу, характерный для облигатных аэробов.

Постановка опыта: К бактериальной культуре добавляют несколько капель 1% спиртового раствора α -нафтола и 1% водного раствора метола, которые в присутствии цитохромоксидазы образуют соединение лиловой окраски.

Тест на фермент нитратредуктазу (крахмало-йодная реакция на нитриты). О наличии фермента нитратредуктазы судят по способности бактерий восстанавливать нитраты в нитриты. При участии этого фермента факультативные анаэробы используют нитраты в качестве конечного акцептора электронов при отсутствии O_2 («нитратное» дыхание), превращая их в нитриты.

Присутствие в среде нитритов выявляют по крахмало-йодной реакции, которая основана на том, что в кислой среде нитриты окисляют йодистый цинк с выделением йода. Последний реагирует с крахмалом с образованием синей окраски.

Постановка опыта:

1. В пробирку наливают 2-3 мл испытуемой культуры, выращенной на среде, содержащей KNO_3 , добавляют 1 мл реактива, содержащего KJ , $ZnCl_2$ и крахмал, среду подкисляют раствором HCl . При наличии в среде нитритов наблюдается синее окрашивание.
2. Капельный метод: на предметное стекло наносят 1 каплю реактива, содержащего KJ , $ZnCl_2$ и крахмал, добавляют 1 каплю испытуемой культуры, выращенной на среде, содержащей KNO_3 , и 1 каплю раствора HCl . При положительном результате возникает синее окрашивание.

Задание:

1. Рассмотреть демонстрации посева трех видов бактерий на ОФС: облигатного аэроба (*Pseudomonas aeruginosa*), факультативного анаэроба (*Escherichia coli*), облигатного анаэроба (*Clostridium perfringens*).
2. Учесть результаты опытов по выявлению окислительно-восстановительных ферментов у перечисленных трех видов бактерий и занести их в таблицу.

Таблица 18

**Определение способов утилизации глюкозы
и окислительно-восстановительных ферментов**

Вид бактерий	Тип дыхания	Ката-лаза	Цитохром-оксидаза	Нитрат-редуктаза	ОФС в аэробных условиях (без масла)	ОФС в анаэробных условиях (с маслом)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Облигатные аэробы					
<i>Escherichia coli</i>	Факультативные анаэробы					
<i>Clostridium perfringens</i>	Облигатные анаэробы					

3. Облигатные анаэробы. Способы создания бескислородных условий и применяемая аппаратура для культивирования облигатных анаэробов. Питательные среды

Облигатными анаэробами являются прокариоты, осуществляющие свой метаболизм в отсутствии молекулярного кислорода. Среди них имеются виды, играющие значительную роль в инфекционной патологии человека. К ним относятся возбудители раневых инфекций, входящие в род *Clostridium* (спорообразующие), например возбудители газовой гангрены (*C.perfringens*, *C.novyi*, *C.septicum* и другие), возбудитель столбняка (*C.tetani*), возбудитель ботулизма (*C.botulinum*) и не образующие спор (неклостридиальные) возбудители гноино-воспалительных инфекций, включенные в роды *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella* и другие.

3.1 Способы создания анаэробных условий. Аппаратура для культивирования облигатных анаэробов

При работе с облигатными анаэробами необходимо на всех этапах выделения и идентификации исключить их контакт с молекулярным кислородом, который оказывает на них токсическое действие. Для создания бескислородных условий применяются физические и химические методы.

Физические методы:

- Для вытеснения из среды воздуха - кипячение питательной среды в течение 10-20 минут на водянной бане с последующим быстрым охлаждением;
- Для уменьшения диффузии O_2 в жидкую питательную среду и верхний слой плотной питательной среды на ее поверхность наливают стерильное вазелиновое масло или парафин слоем в 1,0-1,5 см.
- Выращивание анаэробов в высоком столбике (в пробирки наливают по 10-12 мл) плотной или полужидкой питательной среды. O_2 диффундирует на глубину 1,5-2,0 см от поверхности, в более глубокой части среды сохраняются анаэробные условия.
- Удаление воздуха вместе с O_2 из герметически закрытых сосудов – микроанаэростатов, анаэробных боксов, специальных полиэтиленовых газонепроницаемых пакетов – с последующей заменой его инертным газом (аргон, азот, гелий) или газовой смесью, состоящей из 85% азота, 5% углекислого газа, 10% водорода или с другим составом газов.

Химические методы:

- Поглощение O_2 из замкнутого воздушного пространства (воздух эксикатора, микроанаэростата) при помощи химических поглотителей кислорода. Такими свойствами обладают щелочной раствор пирогаллола, насыщенный раствор карбоната натрия, раствор гидросульфита натрия и другие химические соединения.

Для создания анаэробных условий используются газогенераторные пакеты с реагентами – GasPak, GasPak Plus (газогенераторный пакет с палладиевым катализатором) и другие. При применении GasPak Plus необходимо увлажнить таблетку боргидрида натрия, при этом выделяется водород и в присутствии палладиевого катализатора он соединяется с кислородом с образованием воды.

- В состав питательных сред, предназначенных для культивирования облигатных анаэробов, включаются ингредиенты, обладающие редуцирующими свойствами, которые связывают остаточный кислород, например тиогликолевая кислота и ее соли, аскорбиновая кислота, углеводы (глюкоза, декстроза и другие), цистин и цистеин и другие.

Для культивирования облигатных анаэробов применяют:

- Микроанаэростаты, представляющие собой толстостенные металлические или пластиковые цилиндры с герметически завинчивающимися крышками, на которых имеются вакуумметр и краны для присоединения к вакуум-насосу и баллону с газом. Засеянные анаэро-

бами питательные среды помещают в анаэростат, откачивают воздух, заменяют его газовой смесью и инкубируют в течение 2-3 суток при температуре 37°C.

Вместо анаэростатов можно использовать специальные газонепроницаемые полизиленовые пакеты, заполненные газовой смесью.

- Анаэробный бокс – прозрачная плексиглазовая камера со шлюзом, отверстиями для рук с рукавами, заканчивающимися резиновыми пречатками. В анаэробоксе создают стерильные условия, его заполняют газовой смесью, поддерживают температуру 37°C.

3.2. Питательные среды для культивирования облигатных анаэробов. Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов

Питательные среды, применяемые для культивирования облигатных анаэробов, должны отвечать определенным требованиям.

- При анаэробном типе дыхания вырабатывается значительно меньше энергии, чем при аэробном, поэтому питательные среды должны быть значительно богаче питательными веществами и витаминами. В их состав входят различные экстракты и белковые гидролизаты: сердечно-мозговой и печеночные настои, дрожжевой экстракт, гидролитический перевар казеина, пептон, триптон и другие; факторы роста: гемин, твин-80, сукцинат натрия и другие; цельная или лизированная кровь.
- В состав сред включаются редуцирующие вещества (восстанавливающие кислород), к ним относятся глюкоза или декстроза, цистин или цистеин, аскорбиновая кислота, муравьинокислый натрий и др.
- В жидкие питательные среды вносят тканевые клетки (кусочки печени, головного мозга, почек или других органов), которые активно поглощают и адсорбируют на себе O₂. Для изоляции от воздуха, эти среды заливают стерильным вазелиновым маслом. Примером такой среды является среда Китта-Тароцци
- Для сохранения низкого окислительно-восстановительного потенциала применяют полужидкие или плотные среды, так как агар повышает их вязкость и уменьшает диффузию воздуха в среду.
- В питательных средах должен отсутствовать молекулярный кислород. Для контроля за отсутствием O₂ в питательные среды

вносят специальные редокс-индикаторы – метиленовый синий или резазурин, которые окрашивают среду при повышении окислительно-восстановительного потенциала соответственно в синий и розовый цвет.

- При выделении отдельных видов облигатных анаэробов из смеси микроорганизмов учитывают их свойства, поэтому добавляют в среды желчь, азид натрия, антибиотики или другие ингредиенты, которые делают среду селективной.

Примеры питательных сред для облигатных анаэробов

Транспортные среды:

Сердечно-мозговой бульон (на 100 мл среды):

дрожжевой экстракт - 0,5г

Пептон – 1,0г

Цистеин – 0,05г

Декстроза -0,2г

Гемин – 0,3мл

Дистиллированная вода – до 100 мл объема среды.

Тиогликолевая среда с резазурином (на 1000 мл среды):

Пептон казеиновый – 10,0г

Дрожжевой экстракт – 4,0г

NaCl – 3,0г

Na₂HPO₄ · H₂O – 2,0г

Тиогликонат Na – 0,5

Декстроза – 5,5г

L-цистеин -0,25г

Резазурин нативная соль – 0,001г

Агар-агар – 0,75г

Дистиллированная вода – 1000мл

Готовые среды имеют pH 7,1-7,2, среды автоклавируют при 0,5 атм. в течение 15 минут.

Транспортные среды предназначены для доставки исследуемого клинического материала в бактериологическую лабораторию в строго анаэробных условиях. Время транспортировки не должно превышать 3-5 часов.

Пробирки с транспортными средами предварительно прогревают для удаления диффундированного кислорода (редуцируют), пространство над средой заполняют газом тяжелее воздуха (пропаном или газовой смесью пропана – 60% и CO₂ – 40%), пробирки закрывают специальными резиновыми пробками. Исследуемый материал, взятый шприцом, вносят в пробирку через иглу шприца, прокалывая пробку.

Среды для культивирования анаэробов:

Среда КАБ - кровяной агар для бактероидов

(на 1000мл среды):

Дрожжевой экстракт – 4,0г

Пептон – 10,0г

Мясной экстракт – 3,0г

Декстроза – 6,0г

Твин-80 – 1,0мл

NaCl – 3,0г

Na₂HPO₄ · H₂O – 2,0г

Агаг-агар – 15,0г

Дистиллированная вода - 1,0л

Среду автоклавируют при 0,5 атм.

в течение 15 минут; pH 7,2.

Кровь дефибринированная – 30мл (добавляют в расплавленную среду перед разливом в чашки Петри).

Каламбия-агар (Columbia Agar):

Пептон – 10,0г

Биопептон – 10,0г

Сердечный экстракт сухой – 3,0г

L-цистеин – 0,1г

Глюкоза – 2,5г

NaCl – 5,0г

MgSO₄ – 0,1г

FeSO₄ – 0,02г

Na₂CO₃ – 0,6г

Трис (гидроксиметиламинометан) – 0,83г

Трис – гидрохлорид – 2,86г

Дистиллированная вода – 1,0л

Среду автоклавируют при 0,5 атм в течение 15 мин, pH 7,2
Кровь дефибринированная – 30мл (добавляют
в расплавленную среду перед разливом в чашки Петри)

Железо-сульфитный агар –среда Вильсена-Блера
(для выделения клоストридиальных анаэробов):

МПА – 1000,0мл
Глюкоза – 10,0г
 Na_2SO_3 (20% раствор) – 5,0мл
8% раствор FeSO_4 или FeCl_2 – 1,0мл
рН готовой среды 7,4.

Многие патогенные и условнопатогенные анаэрообы рода *Clostridium* выделяют фермент тиосульфат редуктазу, способный образовывать H_2S из неорганической серы. Соли железа, содержащиеся в среде, вступают в реакцию с сероводородом, образуя сульфит железа в виде черного нерастворимого преципитата, который окрашивает (в зависимости от густоты посева) отдельные колонии или всю среду в черный цвет.

Среда Китта-Тароцци (жидкая среда -
используется часто как среда накопления):

Бульон Хоттингера – 1000,0мл
Глюкоза – 10,0г
Агаг-агар – 1,5г

В стерильные пробирки перед заполнением средой кладут кусочки (1-1,5 cm^3) вареной печени или мяса, заливают средой. Автоклавируют при 121°C в течение 20 минут. pH среды 7,1.

После посева (для предотвращения диффузии воздуха) среду заливают небольшим количеством стерильного вазелинового масла.

4. Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов

В настоящее время чистую культуру облигатных анаэробов из клинического материала выделяют чашечным методом с использованием элективных питательных сред с низким окислительно-восстановительным потенциалом и инкубированием посевов в микроанаэростатах. На 2-м этапе исследования выделенные изолированные колонии пересевают для получения чистой культуры, которую на 3-м этапе идентифицируют по морфологическим, тинкториальным, биохимическим и другим свойствам до рода, и при необходимости, до вида.

Ранее для выделения чистых культур возбудителей – облигатных анаэробов – применялись различные методы, имеющие в настоящее время только историческое значение и отличающиеся друг от друга по особенностям рассева исходной смеси и получением изолированных колоний (1-й этап исследования).

В *методе Цейссlera* исследуемый материал засевали на чашки Петри с сахарным кровяным агаром, последние инкубировали в анаэробных условиях (в анаэростате) при 37°C в течение 24-72 часов, колонии вырастали на поверхности среды.

В *методе Вайнберга* исследуемый материал последовательно засевали в 3 пробирки с охлажденным до 45-50°C сахарным агаром, разлитым высоким столбиком (или в среду Вильсен-Блера), инкубировали при 37°C в течение 24-72 часов. Выросшие в глубине среды изолированные колонии извлекали с соблюдением правил стерильности.

В *биологическом методе Фортнера* на чашку с сахарным агаром одновременно засевали культуры облигатного аэроба и облигатного анаэроба. Чашку герметично закрывали и инкубировали в аэробных условиях при 37°C 24-48 часов. Сначала на чашке росли облигатные аэробы, используя имеющийся кислород воздуха, способствуя дальнейшему росту облигатных анаэробов.

4.1 Схема выделения чистой культуры облигатных неспорообразующих анаэробов

Взятие исследуемого материала осуществляется шприцем с притертым поршнем, после чего материал вносят в пробирку с транспортной средой, как указано выше.

Выделение чистой культуры проводится со строгим соблюдением анаэробных условий на всех этапах исследования.

1-й этап – получение изолированных колоний.

Готовят ряд разведений исследуемого материала и делают посев на чашки Петри со средой КАБ или другой питательной средой для культивирования анаэробов. Посевы инкубируют в микроанаэростатах, заполненных газовой смесью, при температуре 37°C в течение 48-72 часов.

2-й этап – получение чистой культуры анаэробов.

На этом этапе:

1. Изучают морфологические и культуральные свойства выросших колоний.
2. Проводят параллельный рассев каждой отобранный колонии на две чашки Петри с питательной средой, например КАБ. Одну чашку инкубируют в аэробных условиях, другую – в анаэробных условиях.

Для дальнейшего исследования отбирают культуры, выросшие только в анаэробных условиях (так исключают факультативные анаэробы).

3-й этап – идентификация выделенных облигатных анаэробов.

Проводят биохимическую идентификацию в микротест-системе, например API-20A. Сусpenзию выделенной культуры засевают на пластину AP-20A с набором биохимических тестов, инкубируют в анаэробных условиях в течение 48 часов, учитывают биохимические свойства культуры по изменению окраски индикаторов системы и определяют ее родовую и/или видовую принадлежность.

Задание:

1. Ознакомиться с аппаратурой для культивирования облигатных анаэробов (микроанаэростаты, анаэробные боксы).
2. Изучить питательные среды для культивирования облигатных анаэробов, рассмотреть характер роста на средах КАБ, Вильсон-Блера и других.
3. Микроскопировать и зарисовать готовые микропрепараты облигатных анаэробов – клостридий и бактероидов.

5. Химиотерапия. Антибиотики

Химиотерапия – этиотропное (направленное на возбудителя) лечение инфекционных заболеваний или злокачественных опухолей, которое заключается в избирательном подавлении химиотерапевтическими средствами жизнеспособности возбудителей инфекций или опухолевых клеток.

В широком смысле, химиотерапия – наука, которая занимается получением, изучением и применением в медицинской практике лекарственных средств – химиотерапевтических препаратов и, в том числе, антибиотиков, обладающих избирательным действием на возбудителей инфекционных и протозойных заболеваний и на опухолевые клетки, существенно не затрагивая макроорганизм.

К химиотерапевтическим препаратам предъявляется целый ряд требований. В идеале они должны:

- обладать максимальной терапевтической эффективностью при минимальной концентрации в организме человека и минимальной токсичностью;
- иметь широкий спектр антимикробной активности, ингибировать многие виды патогенных микроорганизмов;
- сохранять стабильность при широких диапазонах рН, что дает возможность применения *per os*, при этом иметь высокий процент биодоступности (способность к проникновению в кровяное русло) и оптимальный период полувыведения;
- не вызывать побочных эффектов: аллергии и угнетения иммунитета, нарушения микрофлоры, диспептических явлений и т.п.;
- не способствовать развитию лекарственной устойчивости микроорганизмов к применяемым препаратам.

Существующие в настоящее время химиотерапевтические средства (химиопрепараты), включая антибиотики, не полностью отвечают этим требованиям и имеют более или менее выраженные недостатки. Современная химиотерапевтическая наука занимается постоянным совершенствованием имеющихся препаратов и созданием новых.

В настоящее время имеется огромное количество антибактериальных, противогрибковых, антипротозойных, противовирусных и противоопухолевых препаратов. Наиболее эффективными и чаще всего применяемыми из них являются антибиотики.

5.1. Антибиотики – химиотерапевтические средства биологического происхождения, их полусинтетические и синтетические производные и аналоги, избирательно подавляющие жизнеспособность микроорганизмов или рост злокачественных опухолей.

Избирательность антибиотиков заключается в их направленном действии на микробные клетки-мишени без существенного повреждения клеток организма, а также в том, что различные антибиотики эффективны по отношению к определенным родам и видам микроорганизмов, то есть отличаются по *спектру действия*.

Таким образом, мишень-рецептор для антибиотиков (и других химиотерапевтических средств) находится не в тканях человека, а в клетке микроорганизма, и это является их уникальным свойством. Что касается противоопухолевых препаратов, то они оказывают повреждающее действие на злокачественно перерожденные клетки, которые в значительной степени чужеродны для организма.

Существенным недостатком многих антибиотиков является непостоянство их эффективности, которая со временем снижается, что обусловлено формированием у микроорганизмов устойчивости (резистентности) к этим препаратам. Антибиотикорезистентность – неизбежное биологическое явление, которое практически невозможно предотвратить. Резистентные к антибиотикам штаммы представляют большую опасность для людей как больных, так и здоровых.

5.2. Существующие классификации антибиотиков

Антибиотики классифицируют по различным признакам и свойствам: происхождению, химическому строению, механизму и типу действия, спектру антимикробной активности.

Классификация антибиотиков по происхождению и способу получения

Различают антибиотики микробного, растительного и животного происхождения. (таблица 19). Из них основное значение имеют антибиотические вещества, образуемые микроорганизмами, обладающими антагонистической активностью по отношению к другим микробам.

Продуцируют антибиотики некоторые истинные бактерии (*Bacillus*), грибы (*Penicillium*, *Cephalosporium*), но чаще всего – актиномицеты (*Actinomyces*, *Streptomyces*, *Micromonosporum*).

Антибиотические вещества, выделяемые растениями (фитонциды и другие) и находящиеся в организме животных (лизоцим, эритрин, экмолин и др.), почти не имеют практического значения.

По способу получения антибиотики подразделяют на природные, полусинтетические и синтетические.

Природные антибиотики получают путем биологического синтеза при культивировании штаммов-продуцентов в жидкой питательной среде. Накопившиеся в культуральной жидкости антибиотические вещества извлекают и подвергают тщательной очистке.

Полусинтетические антибиотики являются производными природных антибиотиков, макромолекулы которых модифицируют путем замещения их конечных группировок на различные химические радикалы. Таким способом из исходного природного антибиотика удается получить целый ряд препаратов с различными свойствами (препараты I, II, III, IV поколения и т.д.). Полусинтетические антибиотики, как правило, более эффективны, имеют расширенный или измененный спектр действия, нередко способны преодолевать микробную резистентность, улучшаются их фармакологические свойства. В настоящее время это наиболее распространенные и часто применяемые препараты.

Синтетические антибиотики получают путем химического синтеза. К ним относятся аналоги некоторых природных антибиотиков: левомицетин (симвомицин), циклосерин, пуромицин, которые экономически выгоднее получать химическим, а не биологическим синтезом.

В эту группу часто включают синтезированные химическим путем антибиотические препараты, не встречающиеся в природе. Например хинолоны, которые нередко называют антибиотиками, сульфаниламиды, имидозолы и др. Таким образом, постепенно границы между антибиотиками и синтетическими химиопрепаратами стираются, так как и те и другие, независимо от происхождения, являются противомикробными препаратами.

**Классификация антибиотиков
по происхождению и способу получения**

Способ получения	Продуцент	Примеры
Природные (биосинтетические)	Собственно бактерии	Грамицидин С, полимиксин, тиротрицин
	Актиномицты	Стрептомицин, эритромицин, тетрациклин и многие другие
	Грибы	Бензилпенициллин, цефалоспорин, гризофульвин, циклоспорин
Полусинтетические (комбинация биосинтеза и химического синтеза)	Продукты модификации молекул природных антибиотиков	Оксациллин, ампициллин, гентамицин, цефитин, доксициклин, кларитромицин, рифамицин и многие другие
Синтетические	Аналоги природных антибиотиков, синтезированные химическим путем	Левомицетин, амикацин, циклосерин
	Антимикробные химические препараты, не встречающиеся в природе	Хинолоны и фторхинолоны, сульфаниламиды, нитрофураны, имидазолы и другие

**Классификация антибиотиков
по химическому строению и типу действия**

Антибиотики имеют различное химическое строение и по этому признаку их подразделяют на классы (таблица 20). Многочисленные препараты антибиотиков, принадлежащих к одному классу, имеют сходный механизм и тип действия, им свойственны похожие побочные эффекты. По спектру действия, при сохранении характерных для класса закономерностей, различные препараты, особенно разных поколений, нередко имеют отличия.

По типу действия на клеточные мишени чувствительных микроорганизмов (различные анатомические структуры или отдельные звенья метаболизма) различают микробостатические и микробоцидные антибиотики. В зависимости от объекта, тип действия называют бактерио-, фунги-, протозоостатическим или –цидным.

Антибиотики со статическим действием ингибируют рост и размножение микробных клеток, однако, при удалении антибиотика жизнедеятельность возбудителей восстанавливается. При лечении микробостатиками защитные силы организма должны сами окончательно справиться с временно ослабленными микроорганизмами.

Микроцидные антибиотики необратимо связываются с клеточными мишениями, вызывая гибель чувствительных к ним микроорганизмов.

Классификация антибиотиков по молекулярному механизму действия на микробную клетку

В бактериальной клетке имеются жизненно важные структуры, являющиеся мишениями для антибиотиков. Ингибирование их функций или разрушение их целостности ведет к нарушению метаболизма клетки или к ее гибели. В зависимости от мишени антибиотики подразделяются на четыре группы (таблица 21).

1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки

- β -лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины) связываются с активным центром фермента транспептидазы, осуществляющего процесс образования пептидных мостиков между гликановыми цепями пептидогликана, что ведет к нарушению синтеза клеточной стенки.
- гликопептиды (ванкомицин, капреомицин, тейкопллнин)
 - блокируют синтез пептидогликана, прочно связываясь с D-аланин-D-аланиловой частью предшественника пептидных мостиков клеточной стенки (а также нарушает проницаемость мембран бактериальной клетки и тормозит синтез РНК).
 - циклосерин – нарушает синтез тетрапептидных мостиков пептидогликана за счет включения D-циклосерина вместо D-аланина.

2. Антибиотики, нарушающие молекулярную структуру и функцию ЦПМ – антибиотики, связывающиеся с фосфолипидами ЦПМ и вызывают ее повреждение и гибель клетки (полиены - нистатин, леворин, амфотерицин В).

3. Ингибиторы синтеза белка. Самая обширная группа антибиотиков, действующая на разные звенья синтеза белка, в частности:

- аминогликозиды (стрептомицин, канамицин и др.) связываются с 30S субъединицами рибосом, что приводит к нарушению связывания рибосом с t-РНК и образованию дефектных инициальных комплексов;
- тетрациклины связываются с 30S субъединицами рибосом и блокируют начальные этапы синтеза белка;
- макролиды (эритромицин, кларитромицин и др.), хлорамфеникол, линкосамиды связываются с 50S субъединицами

рибосом и необратимо ингибируют процесс элонгации полипептидных цепей при синтезе белка;

- линезолид необратимо связывается с 30S и 50S субъединицами рибосом, что приводит к нарушению образования 70S рибосом и формирования полипептидных цепей.

4. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот – подразделяются на антибиотики, нарушающие синтез ДНК и синтез РНК:

- хинолоны – ингибируют фермент ДНК-гиразу, ответственную за суперспирализацию ДНК, что приводит к нарушению репликации молекулы ДНК;
- рифампицин – блокирует фермент РНК-полимеразу, что ведет к нарушению синтеза бактериальных РНК.

Классификация антибиотиков по спектру antimикробного действия (активности)

Существуют антибиотики с антибактериальной (их большинство), антигрибковой и антипротозойной активностью. Традиционно их подразделяют на антибиотики узкого и широкого спектра действия. В настоящее время это подразделение детализировано, различают:

- Препараты, действующие на грамположительные бактерии и грамположительные и грамотрицательные патогенные кокки (бензилпенициллин, оксациллин, цефалоспорины 1-го поколения, ванкомицин, линкомицин и др.).
- Антибиотики с преимущественной активностью по отношению к грамотрицательным палочкам (цефалоспорины 3-го поколения, азtreонам, полимиксин).
- Антибиотики, обладающие широким спектром действия, активные по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям (полусинтетические пенициллины с широким спектром действия, цефалоспорины 2-го поколения, аминогликозиды, тетрациклины; хлорамфеникол).
- Противотуберкулезные антибиотики (стрептомицин, рифампицин, флоримицин и др.).
- Противогрибковые антибиотики (nistatin, леворин, амфотерицин В, гризофульвин, кетоконазол, флуконазол, тербинафин, аморолфин и др.).

Более подробные сведения представлены в таблице 22.

Таблица 20

**Классификация антибиотиков
по химическому строению и типу действия**

Наименование класса антибиотика	Химическая структура	Тип действия	Примеры
В-лактамы – Пенициллины	Содержат β -лактамное кольцо	Бактерицидное	Бензилпенициллин, ампициллин, оксациллин,
Цефалоспорины			амоксициллин,
Карбонемы			Цефалоспорины (I–IV поколение),
Монобактамы			Имипенем, меропенем
Аминогликозиды	Содержат аминосахара	Бактерицидное	Азtreonam
Тетрациклины	Содержат четыре конденсированых шестичленных кольца	Бактериостатическое	Стрептомицин, канамицин, гентамицин, амикацин, тобрамицин, сизомицин
Макролиды и азалиды	Содержат макроциклическое лактонное кольцо (14, 15- или 16-членное)	Бактериостатическое, (в больших дозах – бактерицидное)	Тетрациклин, доксициклин, метациклин
Линкозамииды	По строению близки к акролидам	Бактериостатическое	Эритромицин, кларитромицин, азидри
Рифамицины	ансамакролиды	Бактерицидное	Линкомицин, клиндамицин
Гликопептиды	Гликопептиды	Бактерицидное	Рифампицин, рифаксимин
Амфениконы	Производные диоксиаминофенилпропана	Бактериостатическое	Ванкомицин, капреомицин, тейколланин
Гликопептиды	Полипептиды	Бактерицидное, (применяется в основном местно вследствие высокой токсичности)	Хлорамфеникол, левомицетин, тиамфеникол
Полиены	Полиены (ациклические соединения)	Фунгистатическое (в больших дозах фунгицидное), протозооцидное	Полимиксин В, М, грамицидин С, бациллацин Нистатин, леворин, амфoterцин В
Сборная группа антибиотиков (Антибиотики вне группы!)	Имеют различное химическое строение	Бактерицидное или бактериостатическое	Фузидин, фузафунжин, гризофульвин, циклосерин, фосфомицин
Оксазолидиноны	Оксазолидиноны	Бактериостатическое	Линезопид

Таблица 21

*Классификация антимикробных препаратов
по молекулярному механизму действия*

Ингибиторы синтеза клеточной стенки	Ингибиторы функции ЦПМ и ее производных	Ингибиторы синтеза белка	Ингибиторы синтеза ДНК и РНК
β -лактамные антибиотики: пенициллины природные и полусинтетические, цефалоспорины I-IV поколений; карбапенемы; монобактамы; Гликопептиды: ванкомицин; Цикloserин	Полимикинны, полиены, имидазолы	Аминогликозиды; макролиды; линкозамиды; тетрациклины; амфениколы; хлорамфеникол; фузидиевая кислота; оксазолидины: линезолид	Ингибиторы синтеза ДНК: хинолоны Ингибиторы синтеза РНК: рифамицины

Таблица 22

**Спектр антимикробной активности
представителей различных классов антибиотиков**

Класс антибиотиков	Название препарата	Спектр активности
β-лактамные антибиотики	Пенициллин С Ангистафиллокковые пенициллины. Оксациллин Аминопенициллины, ампициллины, амоксициллин	Грамположительные бактерии и кокки, грамотрицательные кокки (нейссерии) Спектр, аналогичный пенициллину, устойчивы к действию пенициллиназы! Грамположительные бактерии, грамположительные и грамотрицательные кокки. *Неэффективны в отношении <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (синегнойная палочка) и <i>клебасиэлл</i> .
	Антисинегнойные пенициллины, карбоксипенициллины, карбенициллины	Действуют на синегнойную палочку, протеин, неспорообразующие анаэробы (<i>B.fragilis</i>).
	Уреидопенициллины, азлоциллин, мезлоциллин	Высокоэффективны в отношении синегнойной палочки и других грамотрицательных бактерий. Активны в отношении неспорообразующих анаэробов.
	Карбапенемы: имипенем	Эффективны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (все клинически значимые штаммы). Устойчивы к действию β-лактамаз. *Не действуют на метицилпрезистентные стафилококки.
	Монобактамы: азtreонам	Высокая активность в отношении грамотрицательных бактерий. Устойчивы к действию β-лактамаз.
	Цефалоспорины: I поколение: цефазолин, II поколение: цефамандол	I-II поколение цефалоспоринов активны против грамположительных бактерий. *Низкая активность против грамотрицательных бактерий.
	Цефалоспорины: III поколение: цефтазидин	III поколение – высокоактивны по отношению к грамотрицательным бактериям, включая синегнойную палочку и анаэробы.
	Цефалоспорины; IV поколение: цефитим	IV поколение активны против грамположительных и грамотрицательных бактерий (включая все клинически значимые штаммы). *Не действует на метициллинрезистентные стафилококки

Класс антибиотиков	Название препарата	Спектр активности
Аминогликозиды	1 поколение: стрептомицины	Активны преимущественно против грамотрицательных бактерий и микобактерий.
	II поколение: гентамиции	Активны против грамотрицательных, включая псевдомонады и клебсиеллы, и грамположительных бактерий.
	III поколение: амикации	Эффективны против грамотрицательных, включая псевдомонады и клебсиеллы, и грамположительных бактерий. Устойчивы к ферментативной инактивации.
Макролиды	Природные: эритромицины	Эффективны против грамположительных кокков, грамотрицательных бактерий (легионеэла и гемофильной палочки, но не против энтеробактерий), хламидий и микоплазм.
	Полусинтетические: азидромицины	Эффективны против грамположительных кокков, грамотрицательных бактерий (включая энтеробактерии), хламидий и микоплазм.
Линкосамиды	Клиндамицин, линкомицины	Эффективны против грамположительных бактерий и грамотрицательных, преимущественно против неспорообразующих анаэробов (<i>B.fragilis</i>).
Тетрациклины	Доксициклин	Активны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий, микоплазм, хламидий, боррелий.
Оксазолидоны	Линезолид	Активен против ванкомицинрезистентных энтерококков, метициллинрезистентных стафилококков, пенициллинрезистентных пневмококков.
Препараты, нарушающие синтез нукleinовых кислот	Фторхинолоны (старые): ципрофлоксацин, норфлоксацин, перфлоксацин.	Активны в отношении грамотрицательных бактерий, стафилококков. *Низкая активность против анаэробов.
	Фторхинолоны (рестартовые): левофлоксацин, моксифлоксацин	Эффективны против грамположительных бактерий ((в том числе применяются против пенициллинрезистентных пневмококков и метициллинрезистентных стафилококков), и грамотрицательных бактерий (включая синегнойную палочку).
	Рифамицины	Эффективен против грамположительных и грамотрицательных бактерий и <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
Препараты, нарушающие функцию ЦПМ	Полипептидные, полимиксины	Эффективны против грамотрицательных бактерий, особенно в отношении синегнойной палочки.

5.3. Резистентность микроорганизмов к антибиотикам, пути ее формирования и способы преодоления

В настоящее время значительно увеличилась частота выделения микробных штаммов, устойчивых к действию антибиотиков. Это связано с неуклонно возрастающим применением антибиотиков, нередко необоснованным и неконтролируемым. Устойчивость к антибиотикам может быть природной и приобретенной.

Природная устойчивость – врожденный видовой признак микроорганизма. Она связана с отсутствием мишени для конкретного антибиотика или ее недоступностью. В этом случае применение данного антимикробного препарата с лечебной целью бесполезно.

Приобретенная устойчивость характеризуется способностью отдельных штаммов микроорганизмов выживать при концентрациях антибиотиков, способных ингибировать основную часть микробной популяции данного вида. При дальнейшем распространении антибиотикорезистентных штаммов они могут стать преобладающими.

Приобретенная устойчивость к антимикробным препаратам обеспечивается генотипической изменчивостью, связанной с мутациями и рекомбинациями.

Формирование резистентных штаммов в результате хромосомных мутаций происходит медленно и не имеет ведущего значения в клинической практике.

Рекомбинационная изменчивость затрагивает гены мобильных элементов бактериального генома – плазиды, транспозоны, профаги. Перенос генов резистентности с хромосомы на плазиды и обратно, перенос между плазидами и бактериофагами осуществляется с помощью мобильных генетических элементов – транспозонов.

Распространение генов резистентности между микроорганизмами осуществляется посредством генетического обмена – конъюгации и трансдукции, с помощью которых передаются R-плазиды. При этом часто формируется множественная лекарственная резистентность к целому ряду антибиотиков.

Различают пять путей формирования резистентности прокариот к антимикробным препаратам:

- 1. Ферментативный путь инактивации антибиотика.** Ферменты, обуславливающие возникновение резистентности, могут

либо разрушать активный центр антибиотика, как β -лактамазы разрушают β -лактамные антибиотики; либо модифицировать антибактериальные препараты путем добавления новых химических групп, что ведет к утрате активности антибиотика, таким образом инактивируются аминогликозиды, макролиды, линкозамиды.

2. *Изменение мишени, чувствительной к действию антибиотиков.* Например: изменение структуры пенициллинсвязывающего протеина (транспептидазы) приводит к возникновению резистентности к β -лактамным антибиотикам, изменение структуры рибосом - к резистентности к аминогликозидам и макролидам, ДНК-гираз – к устойчивости к фторхинолонам, РНК-синтетаз – к рифампицину.
3. *Снижение проницаемости клеточной стенки бактерий.* Способствует формированию полирезистентных штаммов, например появление неспецифических белков в наружной мембране E.coli повышает ее резистентность.
4. *Активный выброс антибиотиков из бактериальной клетки – эффлюкс (эффект «помпы»).* В основном характерен для тетрациклинов. Это связано с синтезом специфических белков на наружной мембране клеточной стенки, которые обеспечивают свободный выход антибиотика из микробной клетки во внешнюю для клетки среду.
5. *Формирование «метаболического шунта»* - обходного (альтернативного) биохимического пути, не чувствительного к действию антибиотиков, при блокировании антибиотиком метаболического пути, жизненно важного для микроорганизма.

Антибиотикорезистентность встречается у многих видов бактерий как грамположительных (наиболее часто у стафилококков), так и у многих грамотрицательных - шигелл, эшерихий, протея, синегнойной палочки и других, особенно среди госпитальных штаммов, которые формируются и циркулируют в больничных учреждениях. При антибиотикотерапии инфекционных заболеваний в короткие сроки развивается резистентность к стрептомицину, эритромицину, олеандомицину, рифампицину, линкомицину, фузидину. Широкое распространение резистентных штаммов является основной причиной снижения эффективности антибиотикотерапии, и это стало одной из глобальных проблем медицины.

Способы преодоления лекарственной устойчивости у микроорганизмов.

Сдерживанию распространения антибиотикорезистентности способствует выполнение следующих рекомендаций:

- Минимально использовать антибиотики с целью профилактики инфекционных заболеваний;
- Применять антибиотики целенаправленно, с учетом чувствительности к ним возбудителей;
- В процессе лечения менять антимикробные препараты, особенно в пределах одного стационара;
- Проводить лечение одновременно 2-3 сочетающимися антибиотиками с различным молекулярным механизмом действия;
- При применении β -лактамных антибиотиков назначать их в комплексе с ингибиторами β -лактамаз, например с клавулановой кислотой, которая ингибирует β -лактамазы грамположительных и грамотрицательных бактерий;
- Проводить антибиотикотерапию совместно с другими лекарственными средствами;
- Применять новые, более совершенные антимикробные препараты с расширенным спектром действия, в том числе против антибиотикорезистентных штаммов;
- Не использовать в ветеринарии антибиотики, применяемые для лечения людей.

6. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Для проведения эффективной антибиотикотерапии необходимо у микроорганизма - возбудителя заболевания определить спектр чувствительности к антибиотикам *in vitro*. Однако необходимо учитывать, что исход лечения будет зависеть не только от рационального подбора антибиотиков, но и от состояния больного; его иммунитета как неноспецифического, так и специфического.

В микробиологической практике применяются две группы методов определения чувствительности микробов к антибиотикам: метод диффузии антибиотика в плотную питательную среду и метод серийных разведений в плотной или жидкой питательной среде. Эти методы

позволяют определить минимальную подавляющую (ингибирующую) концентрацию антибиотика для изучаемой культуры. Минимальная подавляющая (ингибирующая) концентрация (МПК или МИК) антибиотика – концентрация, подавляющая видимый рост исследуемой культуры в жидкой или на плотной питательной среде.

В настоящее время применяют два варианта диффузного метода: диско-диффузный и элипсометрический (Е-тест).

Диско-диффузный метод основан на формировании вокруг бумажного диска с антибиотиком зоны задержки роста микроорганизма на плотной питательной среде. Метод считается качественным и, благодаря простоте исполнения, наиболее распространенным в лабораторной практике. Для проведения опыта используются стандартные питательные среды (АГВ №1, АГВ №2 или агар Мюллера-Хинтона) и коммерческие стандартные диски (промышленного производства) с антибиотиками.

Постановка опыта: Испытуемую чистую культуру засевают густым газоном на поверхность подсушенной плотной питательной среды. На чашку с посевом кладут при помощи стерильного пинцета или автоматического диспенсора не более 6 дисков, расстояние между дисками и от края чашки до дисков должно быть не менее 15-20 мм. После наложения дисков чашки помещают в термостат вверх дном и инкубируют при 37°C в течение 18-20 часов.

Учет результатов: после инкубации чашки с дисками помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет от настольной лампы падал под углом 45° и измеряют диаметр зон задержки роста, включая диаметр диска, с точностью до 1мм с помощью линейки. Для определения отношения микроорганизма, вызвавшего данное инфекционное заболевание, к антибиотику служат следующие три категории чувствительности:

1. «Чувствительный» микроорганизм – предполагается, что применение АБ в обычных терапевтических дозах для лечения инфекционного заболевания, вызванного данным микроорганизмом, скорее всего будет успешным.
2. «Промежуточный» (среднеустойчивый, умеренно устойчивый) – предполагается, что лечение этим антибиотиком инфекционного заболевания, вызванного данным возбудителем, может быть успешным лишь при использовании повышенных терапевтических доз антибиотика.

3. «Резистентный» (устойчивый) микроорганизм – предполагается, что лечение инфекционного заболевания, вызванного этим микроорганизмом, даже при использовании максимальных терапевтических доз антибиотика, будет, скорее всего, неудачным.

Условно для оценки степени чувствительности изучаемой культуры к антибиотикам можно принять следующие критерии: диаметр зоны задержки роста <15мм свидетельствует об устойчивости бактерий к данному антибиотику, диаметр 16-19мм – о средней устойчивости, диаметр >20мм указывает, что данная культура чувствительна к антибиотику.

Эллипсометрический метод (E-тест) занимает промежуточное положение между методом бумажных дисков и методом серийных разведений. В нем используется узкая полоска полимера, пропитанная разными концентрациями антибиотика (от минимальных до максимальных), которая наносится на поверхность плотной питательной среды, предварительно засеянной испытуемой культурой. Задержка роста культуры вокруг полоски наблюдается только в той зоне, где концентрация антибиотика выше МПК. На поверхности полоски нанесены типографским способом величины концентрации антибиотика в каждом участке. Если культура обладает чувствительностью к данному антибиотику, то зона задержки роста имеет каплевидную (эллипсоидную) форму.

За величину минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотика принимают отрезок полоски, к которому вплотную подходит рост микробы.

Метод серийных разведений является более точным, информативным, но очень трудоемким, поэтому он применяется только в научных исследованиях и особо сложных лечебных случаях. Для постановки метода необходимо приготовить ряд последовательных двукратных разведений антибиотика в питательной среде, где

- исходная концентрация антибиотика в 2-8 раз превышает максимальный уровень препарата в крови при его введении в терапевтических дозах;
- нижняя граница концентрации зависит от типа антибиотика и вида возбудителя.

Затем в каждую пробирку с разведениями антибиотика вносят изучаемую культуру в количестве 4-5.10⁵ КОЕ/мл. Контролями служат: пробирка питательная среда с бактериальной культурой без антибиотика, пробирка со стерильной питательной средой и пробирка с питательной средой и с антибиотиком. Посевы инкубируют при 37°C 18-20 часов.

При учете результатов отмечают последнюю пробирку с задержкой роста: питательная среда осталась прозрачной, но на чашке с отсевом из этой пробирки имеется рост колоний. Эту концентрацию принимают за минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотика для данной бактериальной культуры. За минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) принимают разведение антибиотика в той пробирке, посев из которой не дал роста на чашке Петри с плотной питательной средой.

В настоящее время для оценки антибиотикорезистентности применяются коммерческие тест-системы с разными концентрациями антибиотика на полистироловых планшетах, в которых рост микроорганизма определяют по оптической плотности с помощью фотометрического измерения. Применяют два типа тест-систем:

- Для метода *серийных разведений* используют полиэтиленовые планшеты, в лунки которых внесены и лиофильно высушены убывающие концентрации антибиотика в питательной среде.
- В методе *пограничных концентраций* используют полистироловые планшеты, где в лунках содержатся только 2 концентрации антибиотика – высокая (С) и низкая (с). Если после инкубации рост культуры отсутствует в обеих лунках, штамм считается чувствительным, если рост отсутствует только в лунке с высокой концентрацией – умеренно устойчивым, при росте культуры в обеих лунках – штамм является устойчивым к данному антибиотику.

Задание:

1. Учесть результаты опыта определения чувствительности к антибиотикам методом бумажных дисков, измерив диаметр зон задержки роста вокруг дисков, результаты занести в таблицу 23. Написать антибиотикограммы к каждому изучаемому штамму и ответить на вопрос: какие антибиотики Вы рекомендуете для лечения и почему?

Таблица 23

Результат посева выделенной культуры на чувствительность к антибиотикам методом бумажных дисков

Вид изучаемой культуры	Величина диаметра зоны задержки роста в мм					
	Антибиотики					

2. Ознакомиться с демонстрацией определения чувствительности культуры стафилококка к антибиотику методом серийных разведений, результаты записать. Указать МПК и МБК антибиотика для изучаемой культуры.

Таблица 24

Результат определения чувствительности культуры стафилококка (МПК в ед/мл) к пенициллину методом серийных разведений

Концентрация антибиотика в МПБ, ед/мл	128	64	32	16	8	4	Контроль культуры	Контроль МПБ	Контроль антибиотика
Ингибирующее действие антибиотика (МИК)									
Бактерицидное действие антибиотика МБК)									

3. Заполнить таблицу «Антибиотики, подразделение по молекулярному механизму и спектру действия» внести в нее следующие антибиотики: пенициллин, ванкомицин, стрептомицин, хлорамфеникол, тетрациклин, макролиды, аминогликозиды, полиеновые антибиотики, линкомицин, хинолоны, рифампицин, линезолид.

Таблица 25

Антибиотики. Подразделение по молекулярному механизму и спектру действия

Наименование антибиотика	Примеры	Молекулярный механизм действия	Спектр действия
1. Антибиотики – ингибиторы синтеза клеточной стенки			
2. Антибиотики – ингибиторы функций ЦПМ			
3. Антибиотики – ингибиторы синтеза белка			
4. Антибиотики – ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот			

Контрольные вопросы по теме занятия

1. Энергетический метаболизм микроорганизмов. Типы дыхания. Брожение.
2. Аэробное дыхание. Ферменты дыхательной цепи. Структура дыхательной цепи облигатных аэробов.
3. Методы выявления дыхательных ферментов – цитохромоксидазы, нитратредуктазы, каталазы и способов утилизации глюкозы прокариотами с разным типом дыхания.
4. Подразделение прокариот по отношению к молекулярному кислороду.
5. Анаэробное дыхание у факультативных и облигатных анаэробов. Примеры факультативных анаэробов.
6. Способы создания бескислородных условий и применяемая аппаратура для культивирования облигатных анаэробов.
7. Питательные среды, применяемые для культивирования облигатных анаэробов, предъявляемые требования. Примеры.
8. Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов. Этапы выделения чистой культуры неспорообразующих облигатных анаэробов.
9. Примеры патогенных представителей облигатных анаэробов спорообразующих (клостридий) и неспорообразующих.
- 10.Брожение. Его сущность. Типы брожения: молочнокислое, маслянокислое, муравьинокислое, пропионовокислое. Примеры микроорганизмов, осуществляющих различные типы брожения.
- 11.Влияние биологических факторов внешней среды на микроорганизмы. Микробный антагонизм. Бактериоциногения.
- 12.Химиотерапия. Требования, предъявляемые к химиотерапевтическим препаратам.
- 13.Антибиотики. Классификация по происхождению, способу получения и по химическому строению.
- 14.Классификация антибиотиков по типу действия и молекулярному механизму действия на микробную клетку. Примеры.
- 15.Классификация антибиотиков по типу действия и спектру antimикробной активности. Примеры.
- 16.Механизм и спектр действия наиболее употребляемых антибиотиков: пенициллинов, ванкомицина, стрептомицина, хлорамфеникола, тетрациклинов, макролидов, аминогликозидов, полиеновых антибиотиков, линкомицина, рифампицина, линезолида, хинолонов.

17. Резистентность микроорганизмов к антибиотикам, пути ее формирования и способы преодоления.
18. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Диско-диффузный метод (метод бумажных дисков), критерии оценки. Элипсометрический метод (E-тест), сущность.
21. Метод серийных разведений, сущность, практическое применение.

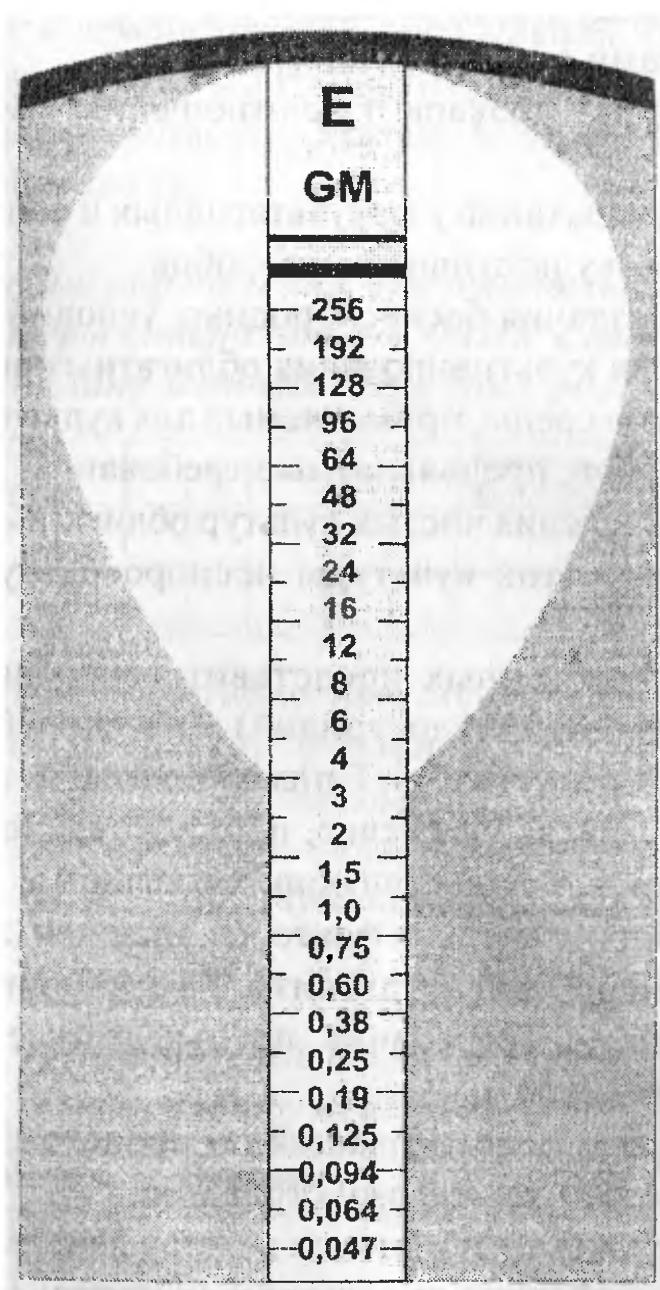


Рисунок 1. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам эпсилометрическим методом (E-тест): МПК гентамицина для исследуемого штамма 1,5 мкг/мл.

Раздел 3

БАКТЕРИОФАГИ. ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ.

Занятие 8

Тема: Бактериофаги. Фенотипическая и генотипическая изменчивость микроорганизмов. Мутации

План занятия

1. Свойства бактериофагов. Основные морфологические группы фагов. Строение Т-четного фага. (Демонстрация таблиц и электронных микрофотографий). Специфичность фагов. Резистентность фагов во внешней среде.
2. Вирулентные бактериофаги, стадии взаимодействия с чувствительными клетками (продуктивная инфекция). Умеренные бактериофаги. Особенности взаимодействия с чувствительными бактериями. Профаг. Явление лизогении. Фаговая конверсия, примеры.
3. Индикация и выделение бактериофагов из окружающей среды. Титрование фага методом агаровых слоев по Грациа. Негативные колонии вирулентных и умеренных бактериофагов.
4. Применение бактериофагов в диагностике инфекционных заболеваний. Фаготипирование, значение. Демонстрация опыта фаготипирования Vi-фагами культуры *Salmonella typhi*.
5. Применение бактериофагов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Изучение биопрепаратов бактериофагов.
6. Генетический аппарат прокариот – хромосома и внекромосомные генетические элементы: плазиды, профаги, транспозоны, *Is*-последовательности.
7. Фенотипическая и генотипическая изменчивость микроорганизмов.
8. Мутации, характеристика типов мутаций у микроорганизмов. Значение мутаций. Ауксотрофные мутанты, характеристика. Демонстрация теста Эймса, практическое применение.
9. Мутагены физические и химические, молекулярный механизм действия. Репаративные системы прокариот.
10. Темы докладов по генетике бактерий.

Методические указания к выполнению практического занятия

1. Бактериофаги – вирусы бактерий, обладающие теми же характерными особенностями, что и другие вирусы. Бактериофаги (фаги) являются ультрамикроскопическими неклеточными формами жизни; содержат одну из нуклеиновых кислот – ДНК или РНК, которые выполняют функции генома. У фагов отсутствуют белоксинтезирующие системы и самостоятельный метаболизм. Они являются генетическими паразитами и вносят в чувствительную бактериальную клетку закодированную в их геноме программу, выполняя которую, бактерия на своих структурах воспроизводит множество фагов, а сама при этом погибает – лизируется. Такой способ размножения вирусов называется *репродукцией*.

Строение бактериофагов. Различают покоящуюся, внеклеточную форму фага, называемую вирионом, и внутриклеточную форму – *вегетативную*.

Во внешней среде фаговые частицы – вирионы – представляют собой инертные, покоящиеся формы и, чаще всего, состоят из головки и отростка. Головка построена из белкового футляра, называемого капсидом, внутри которого находится фаговая нуклеиновая кислота. У разных фагов диаметр головки составляет от 25 до 100нм, отросток имеет белковую природу и может отличаться по длине и строению.

Морфологические формы фагов. Различают несколько морфологических форм фагов: нитевидные фаги длиной около 800нм; мелкие фаги с аналогом отростка; фаги с коротким отростком; фаги с длинным несокращающимся отростком; фаги с отростком, чехол которого способен к сокращению.

Строение T-четных фагов E.coli. Наиболее крупными и сложно устроенными являются фаги с сокращающимся чехлом отростка, например, Т-четные фаги (T2 и T4) – типовые фаги кишечной палочки (*Escherichia coli*), которые были детально изучены.

Головка T-четного фага состоит из капсида с икосаэдрическим (кубическим) типом симметрии, построенного из капсомеров, имеет форму вытянутого двадцатигранника размером 100x65нм, внутри находится плотно упакованная молекула ДНК.

Отросток длиной около 100нм состоит из внутреннего стержня, присоединенного к головке, и имеет внутри канал, сообщающийся с ней. Поверх стержня располагается чехол, способный сокращаться. И стержень, и чехол построены из белковых субъединиц по спиральному типу симметрии. Чехол находится в растянутом состоянии: сверху он

прикреплен к воротничку, снизу – к базальной пластинке, снабженной шестью зубцами и отходящими от нее шестью длинными нитями. Эти структуры служат для прикрепления фага к поверхности бактериальной клетки (органы адсорбции).

Специфичность взаимодействия фагов с бактериями. Фаги способны взаимодействовать только с определенным видом или типом (штаммом) бактерий. В соответствии с этим различают видовые и типовые бактериофаги. Специфичность действия бактериофагов на чувствительные бактерии используется в диагностике инфекционных заболеваний для определения: видовой принадлежности выделенной чистой культуры и внутривидовой дифференциации (фаготипирование) при проведении эпидемиологического анализа.

Резистентность бактериофагов. Бактериофаги устойчивы во внешней среде, сохраняют активность при рН от 3 до 9, резистентны к протеолитическим ферментам и нуклеазам, к ферментным ядам (азид натрия, динитрофенол, фторид), хлороформу. Эти вещества используются для предотвращения контаминации фаговых препаратов бактериями и грибами.

Инактивируются фаги УФ-облучением и высокой температурой (при 60°C фаги инактивируются в течение 30-60 мин).

2. Взаимодействие фага с бактериальной клеткой

По типу взаимодействия с клеткой различают вирулентные и умеренные фаги.

Вирулентные фаги вызывают продуктивную инфекцию, при которой происходит репродукция фагов и лизис бактериальной клетки.

Умеренные фаги также способны вызывать продуктивную инфекцию, но для них более характерна интегративная (лизогенная) инфекция, при которой ДНК фага встраивается в бактериальную хромосому в виде профага. При этом клетка остается жизнеспособной и становится лизогенной.

Этапы продуктивной инфекции (на примере фага T2)

Весь цикл репродукции продолжается 24 минуты.

1. Адсорбция фага на чувствительной клетке. Происходит при наличии комплементарных рецепторов в клеточной стенке бактерий и на концах нитей фагового отростка. Сперва фаг присоединяется нитями, а затем прочно прикрепляется к клеточной стенке с помощью зубцов базальной пластиинки.

- 2. Проникновение ДНК фага в бактериальную клетку.** С помощью лизоцима, находящегося в области базальной пластинки, гидролизуется участок клеточной стенки, чехол отростка сокращается и внутренний стержень, наподобие иглы шприца, прокалывает оболочки клетки. Молекула фаговой ДНК по каналу стержня проникает внутрь клетки.
- 3. Внутриклеточное развитие фага.** Фаговая ДНК вносит в бактериальную клетку генетическую информацию, направляя клеточные системы на биосинтез компонентов, необходимых для репродукции фагов. На начальных этапах синтезируются «ранние белки» - ферменты (неструктурные белки), осуществляющие репликацию фаговой ДНК с целью образования множества ее копий. Затем на клеточных рибосомах формируются структурные «поздние белки»: белки головки, отростка, фаговой пластинки, нитей, а также фаговый лизоцим.
- 4. Морфогенез фага.** Созревание фага происходит по трем независимым ветвям в различных участках клетки, то есть является дисьюнктивным (разобщенным) процессом. Отдельно формируются головки фага – вокруг молекулы ДНК строится капсид. Независимо идет построение отростка: образуется базальная пластинка, к ней прикрепляется сформировавшийся внутренний стержень и одевается чехлом. Отдельно синтезируются нити отростка, состоящие из двух сегментов. Затем все составные части фага объединяются, образуя зрелые устойчивые частицы фага – вирионы.
- 5. Лизис бактериальной клетки и выход фага.** Под воздействием фагового лизоцима происходит гидролиз компонентов клеточной стенки и лизис клетки. Около 200 вирионов фага выходят в окружающую среду (выход по взрывному типу).

Иногда процесс репродукции остается незавершенным и потомство фагов не образуется. Такая инфекция называется abortивной.

Интегративная инфекция, лизогения

Как уже указывалось, умеренные фаги обладают способностью к продуктивной инфекции, но им более свойственно вызывать интегративную инфекцию, при которой ДНК фага включается в кольцевую хромосому бактериальной клетки. Во время деления клетки интегрированная ДНК фага, которая носит название профага, реплицируется в составе клеточного генома и переходит в следующие поколения бактерий. Бактериальная культура, инфицированная умеренным фагом,

сохраняет жизнеспособность и становится лизогенной. Она постоянно продуцирует небольшое количество фагов за счет отдельных клеток, в которых профаг индуцируется, что вызывает развитие продуктивной инфекции с образованием потомства фагов. Освободившиеся фаги не способны лизировать всю культуру, так как несущие профаг клетки иммунны к данному фагу, однако остаются чувствительными к другим, неродственным фагам.

Способность умеренных фагов вызывать интегративную инфекцию зависит от белка-репрессора, постоянное образование которого кодируется специальным фаговым геном. Белок-репрессор блокирует начавшийся процесс репродукции, обычно на стадии репликации фаговой ДНК (иногда позже), которая переходит в состояние профага.

В отдельных клетках лизогенной культуры (в одной на 10^4 - 10^6 клеток) репрессор может инактивироваться или произойдет мутация в соответствующем гене. В таких клетках развивается продуктивная инфекция, ведущая к накоплению в лизогенной культуре свободного фага.

Можно искусственно вызвать массовое разрушение репрессора в клетках лизогенной культуры – индукцию, приводящую к полному лизису этой культуры. Индуцирующими факторами являются УФ-облучение, алкилирующие вещества и другие агенты, вызывающие повреждение ДНК.

Фаговая (лизогенная) конверсия

Этим термином принято называть изменение свойств бактериальной культуры и/или приобретение ею новых признаков в результате лизогенизации. Интегрированный в клеточную хромосому профаг (ДНК фага) вносит в нее дополнительный набор генов. Некоторые из этих генов детерминируют изменения морфологических, биохимических, антигенных и других свойств культуры, ставшей лизогенной. Важное значение имеет наличие у некоторых умеренных бактериофагов *tox*-гена, индуцирующего образование экзотоксина у возбудителей дифтерии, ботулизма, скарлатины и ряда других видов бактерий, что делает их способными вызывать тяжелые заболевания.

При элиминации (удалении) фага из лизогенной культуры, например, при обработке ее акридиновым оранжевым, культура наряду с профагом утрачивает свойства, приобретенные в результате фаговой конверсии.

Знание свойств бактериофагов необходимо для понимания закономерностей молекулярной биологии и, в частности, генетики бактерий, а также вирусологии.

На модели фага была окончательно доказана роль ДНК в наследственности, расшифрован генетический код, изучена тонкая структура гена, механизмы мутагенеза и многие другие вопросы.

Умеренные фаги участвуют в одной из форм генетического обмена – трансдукции, являются переносчиками плазмид. Фаги применяют в генной инженерии в качестве векторов, переносящих клонированную чужеродную ДНК.

3. Индикация (обнаружение) и выделение бактериофага

Существуют различные методы обнаружения фага в исследуемом материале, в основу которых положен принцип совместного посева исследуемого материала и чувствительной к искомому фагу культуры бактерий, которую называют тест-культурой. Чаще применяют метод обогащения «с подсевом».

Метод обогащения с «подсевом». Преимуществом метода является то, что им можно выделить фаги даже при их минимальном количестве в исходном материале.

Из исследуемого материала, полученного из какого-либо объекта (испражнений, гноя, сточной воды, пищевого продукта, образцов почвы и др.), готовят суспензию и затем фильтруют. Фильтрат вносят в пробирку с МПБ, добавляя туда гомологичную тест-культуру, к которой хотят получить бактериофаг, и ставят в термостат при 37°C на 18-24 часов. Затем содержимое пробирки освобождают от бактерий центрифугированием или фильтрованием через бактериальный фильтр. Фильтрат засевают на чашки с МПА совместно с тест-культурой, которая применялась для обогащения. Через 18-24 часа инкубации при 37°C на поверхности питательной среды на фоне роста бактериальной культуры наблюдают округлые стерильные пятна - негативные колонии фага.

Далее, для получения бактериофага, материал из стерильного пятна с помощью петли переносят в пробирку с МПБ, добавляют бактериальную тест-культуру, инкубируют сутки при 37°C. Фаги, размножаясь в чувствительных бактериях, вызывают их лизис и в пробирке получают прозрачный фаголизат, содержащий большое количество фагов. Фаголизат центрифицируют и добавляют хлороформ для полного освобождения его от бактерий.

Этим методом получают бактериофаги, из которых готовят как диагностические, так и лечебно-профилактические препараты.

Умеренные фаги выделяют из фильтратов лизогенных бактериальных культур или вызывают индукцию такой культуры с последующим лизисом.

Титрование бактериофага методом агаровых слоев по Грация.

Метод Грация является наиболее точным методом титрования бактериофага и незаменим в работе с фагами. *Титром фага называется количество вирионов фага в 1 мл препарата фага.*

Метод основан на том, что испытуемый фаг и чувствительные бактериальные клетки смешивают в пробирке с расплавленным 0,7% МПА, смесь выливают в чашку с подсущенным плотным 1,5% МПА, она застывает в виде второго верхнего слоя. При инкубации при 37°C в этом слое размножаются бактерии, давая сплошной равномерный рост. Однако на месте попадания вирионов фага происходит гнёздный лизис бактерий, и образуются негативные колонии - округлые прозрачные пятна. Количество образовавшихся негативных колоний соответствует количеству фагов, попавших в бактериальный газон, что дает возможность подсчитать титр фага.

Для определения титра готовят последовательные десятикратные разведения испытуемого фага ($10^{-1} - 10^{-8}$), в физиологическом растворе NaCl. По 1 мл каждого разведения вносят в разные пробирки с 2,5 мл полужидким расплавленным и остуженным до 45-50°C МПА (0,7%), в эти же пробирки добавляют по 1,0 мл бактериальной тест-культуры. После перемешивания содержимое каждой пробирки быстро выливают в разные чашки Петри с МПА, чашки покачивают, чтобы слой распределился по всей поверхности агара.

После суточной инкубации при 37°C чашки просматривают, подсчитывают количество образовавшихся негативных колоний (на тех чашках, где их возможно подсчитать). Титр фага определяют путем подсчета количества негативных колоний и умножения на показатель разведения. Например, на чашке с разведением 10^{-6} (где фаг был разведен в 10^6 раз) образовалось 150 негативных колоний. Следовательно, испытуемый фаг имеет титр $150 \times 10^6 = 1,5 \times 10^8$, то есть такое количество вирионов фага содержится в 1 мл исследуемого материала.

Задание:

1. Рассмотреть на таблицах и электронных микрофотографиях различные морфологические группы фагов; изучить анатомическое строение Т-чётного фага (T2; T4), зарисовать в альбоме схему строения фага, отметив детали анатомической структуры.
2. Рассмотреть чашки с негативными колониями вирулентных и умеренных фагов. Отметить, что вирулентные фаги дают полностью прозрачные негативные колонии. Для умеренных фагов характерны негативные колонии с прозрачной периферией и мутным центром, где наблюдается рост лизогенных бактерий.
3. Определить титр фага методом Грация по готовым чашкам путём подсчёта негативных колоний и умножения на указанное разведение.

4. Применение бактериофагов для диагностики инфекционных заболеваний. Фаготипирование.

Опыт фаготипирования *S.typhi* Vi-фагами.

Бактериофаги строго специфично взаимодействуют с чувствительными бактериями, поэтому их используют в диагностике инфекционных заболеваний в качестве дополнительного метода:

1. Для определения видовой принадлежности выделенной культуры бактерий;
2. Для фаготипирования – видовой дифференциации выделенной чистой культуры возбудителя;
3. С целью индикации возбудителя непосредственно в материале от больного или в объектах внешней среды (без предварительного выделения чистой культуры) с помощью РНФ - реакции нарастания титра фага (применяют редко).

Фаготипирование получило наибольшее распространение среди методов фагодиагностики. Метод основан на том, что с помощью специальных высокоспецифичных (типовых) фагов удаётся дифференцировать культуры одного вида (внутривидовая идентификация), не отличающиеся по биохимическим, серологическим и другим свойствам, на основании их различной чувствительности к набору таких фагов, то есть обнаружить среди этих культур разные фаговары (фаготипы).

Установление фаговара культур, выделяемых от больных, позволяет проследить эпидемиологическую цепочку (выявить источник заболевания, пути его распространения).

В настоящее время проводят фаготипирование при лабораторной диагностике ряда инфекционных заболеваний: брюшном тифе, паратифах А и В, дизентерии, холере, туберкулезе, стафилококковых и стрептококковых инфекциях и др. Существуют международные схемы фаготипирования для *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*.

Фаготипирование брюшнотифозных бактерий (S.typhi). Для этой цели существует набор типовых брюшнотифозных Vi-фагов, обозначаемых заглавными буквами латинского алфавита: А, В, С, Д, Е и так далее. Каждый из этих фагов лизирует культуры определённых фаговаров. Кроме того, для типирования нужен фаг Vi-I, который лизирует все брюшнотифозные культуры, содержащие Vi-антитела, т.к. только такие культуры пригодны для типирования.

Для типирования используют 3-4-х часовую бульонную культуру, которую засевают в виде отдельных капель на поверхность высушенной чашки с 1% МПА. На высохшие капли культуры наносят в одинаковых объемах типовые брюшнотифозные Vi-фаги, а также фаг Vi-I; посевы помещают в термостат при 37°C на 2-3 часа, затем на ночь в холодильник и снова на 4-6 часов в термостат. Далее учитывают результат опыта.

При учёте результатов культура должна полностью лизироваться фагом Vi-I и определёнными типовыми фагами, что и позволяет определить её фаговар, пользуясь специальной таблицей.

Задание:

Учесть опыт фаготипирования *Salmonella typhi* типовыми брюшнотифозными Vi-фагами, определить фаговар изучаемой культуры.
Опыт зарисовать.

5. Применение бактериофагов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний

Для лечения инфекционных болезней широко применяют антибиотики, но их длительное и не всегда правильное использование часто вызывает осложнения в виде развития аллергии, прямого токсического действия на отдельные органы, угнетения иммунной системы, дисбактериоза. Проблема лечения инфекционных болезней усложняется также широким распространением антибиотикорезистентных штаммов возбудителей. В качестве альтернативной терапии могут быть использованы препараты бактериофагов.

Препараты бактериофагов составлены из поливалентных вирулентных бактериофагов широкого спектра действия, активных против антибиотикорезистентных бактерий. Они представляют собой стерильный фильтрат бактериальных фаголизатов, их выпускают жидкими и лиофильно высушенными, в виде таблеток с кислотоустойчивым покрытием, кремов, мазей, свечей. Фаги можно применять внутрь, местно для орошения ран и слизистых оболочек, вводить в различные полости организма человека при гнойно-воспалительных заболеваниях, однако перед применением препаратов бактериофагов необходимо определить фагочувствительность возбудителя инфекции. Препараты бактериофагов можно применять по эпидемическим показаниям для профилактики в очагах инфекции.

Примеры наилучше употребляемых лечебно-профилактических препаратов бактериофагов:

- *Дизентерийный бактериофаг поливалентный*. Его выпускают в виде таблеток с пектином, устойчивых к действию желудочного сока, и в виде свечей, имеющих более быстрое и длительное действие. Эти препараты применяют у детей, больных дизентерией, вызванной антибиотикоустойчивыми штаммами шигелл.
- *Сальмонеллезный бактериофаг*. Жидкий поливалентный бактериофаг, приготовленный из смеси фаголизатов, лизирующих сальмонеллы, наиболее часто встречающихся серогрупп - А, В, С, D, Е. Применяют для профилактики и лечения различных сальмонеллезов у детей и взрослых.
- *Брюшнотифозный бактериофаг* в таблетках с кислотоустойчивым покрытием. Препарат предназначен для профилактики брюшного тифа по эпидемическим показаниям в семейном очаге, больнице, населенном пункте и пр.
- *Коли-протейный* – смесь стерильных фаголизатов энтеропатогенных эшерихий, активных в отношении наиболее распространенных серогрупп и фаголизатов *P.vulgaris* и *P.mirabilis*.
- *Интексти-бактериофаг* – комбинированный препарат, содержащий фаги против шигелл, сальмонелл, стафилококков, энтерококков, кишечной и синегнойной палочек, протея. Предназначен для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванных перечисленными микроорганизмами, а также при смешанной инфекции.

- *Стафилококковый бактериофаг*. Жидкий препарат, содержащий фаголизаты, размноженные на стафилококах, выделенных от больных с разными клиническими формами стафилококковых инфекций. Выпускается в жидким виде, в аэрозольной упаковке, в виде мази, в свечах. При лечении больных препарат рекомендуется вводить в очаг инфекции. Ставилококковый бактериофаг высокоактивен по отношению к антибиотикоустойчивым штаммам стафилококка.
- *Бактериофаг стрептококковый* - жидкий препарат представляет собой стерильный фаголизат стрептококков.
- *Бактериофаг псевдомонас аэргиноза* - жидкий препарат представляет собой стерильный фаголизат бактерий *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойной палочки). Предназначен для лечения и профилактики заболеваний, вызванных синегнойной палочкой, а также для лечения дисбактериоза.
- *Бактериофаг протейный* - жидкий препарат, состоит из стерильных фаголизатов протейных бактерий видов *P.vulgaris* и *P.mirabilis*. Предназначен для лечения и профилактики заболеваний, вызванных данными видами протея, а также протейных дисбактериозов.
- *Пиобактериофаг поливалентный очищенный*, жидкий – представляет собой смесь стерильных фаголизатов стафилококков, стрептококков, *P.vulgaris*, *P.mirabilis*, *K.pneumoniae*, *E.coli* (различных серогрупп), *P.aeruginosa*. Предназначен для лечения и профилактики различных форм гноино-воспалительных и энтеральных заболеваний, вызванных перечисленными бактериями, а также дисбактериозов.

Задание:

Изучить биопрепараты фагов, используемых для диагностики, профилактики и лечения различных инфекционных заболеваний.

6. Генетический аппарат прокариот

Генетика микроорганизмов и, в частности, генетика бактерий (прокариот) – актуальное и перспективное направление микробиологической науки. Генетика бактерий изучает строение и функции

генетического аппарата прокариот, закономерности их наследственности и изменчивости. На этой основе развивается прикладная наука – генная инженерия.

Под наследственностью понимают способность организмов при размножении передавать присущие им признаки последующим поколениям.

Все видовые признаки и свойства прокариот закодированы в их геноме (генотипе), который представляет совокупность всех генов – хромосомных и внехромосомных.

Строение бактериального генома. Геном бактерий представлен нуклеоидом и внехромосомными генетическими элементами.

Нуклеоид – это кольцевая двухцепочечная суперспирализованная молекула ДНК. Бактериальная клетка гаплоидна, содержит только один нуклеоид, однако, при нарушении деления в одной клетке может находиться четыре и более нуклеоидов.

В клетке могут присутствовать и внехромосомные элементы наследственности – *плазмиды* и *профаги*, содержащие дополнительные наборы генов (необязательных), индуцирующих появление новых признаков, например, антибиотикорезистентности, способности к токсинаобразованию и других, и, тем самым, расширяющих возможности существования таких штаммов бактерий.

Закодированная в геноме совокупность морфологических признаков, физиологических функций и других свойств в конкретных условиях существования бактерий проявляется в виде *фенотипа* (генетический термин -*фен* обозначает признак, свойство). В фенотипе проявляются не все признаки, записанные в геноме, часть тех или иных генов остаются репрессированными.

Ген – элементарная единица наследственности, представляющая собой небольшой участок геномной ДНК детерминирующей синтез определенного полипептида или репликацию соответствующей ему молекулы РНК. Различают *структурные гены* – ответственные за синтез специфических полипептидных цепей, и *регуляторные* (ген-регулятор, ген-оператор), контролирующие деятельность структурных генов. Комплекс близких по функциям структурных генов и соответствующих регуляторных носит название *оперона*.

У некоторых видов бактерий расшифрован генетический код. Для них составлены кольцевые генетические карты, (например для наиболее изученной *E.coli*), на которых указано последовательное расположение генов.

Плазиды – внекромосомные наследственные элементы. Это небольшие молекулы ДНК кольцевидной, реже линейной формы. Они свободно располагаются в цитоплазме и реплицируются автономно, некоторые способны интегрировать в бактериальную хромосому и реплицироваться вместе с ней (см. занятие 9).

У многих бактерий обнаружены генетические мигрирующие элементы – небольшие линейные молекулы ДНК – инсерционные последовательности (*Is*-последовательности, *Is*-элементы) и транспозоны. Они, как правило, находятся в хромосоме, могут перемещаться с одного локуса хромосомы на другой, а также с хромосомы на плазиды и обратно, их репликация происходит в составе хромосомы или плазиды.

***Is*-последовательности** – это участки ДНК, имеющие только гены, которые детерминируют синтез белка-транспозазы, ответственно за их перемещение (исключение из одного локуса ДНК и интеграция в другой локус), по краям они содержат инвертируемые повторы.

Транспозоны – участки ДНК, содержащие как гены, обеспечивающие их перемещение, так и дополнительно структурные гены, кодирующие антибиотикорезистентность, устойчивость к тяжелым металлам и другие признаки.

Значение *Is*-элементов и транспозонов заключается в том, что они регулируют активность генов, а именно «включают» и «выключают» соседние с транспозонами гены; индуцируют мутации (делеции, инверсии и другие) и геномные перестройки, например слияние репликонов (интеграция плазиды в хромосому); повышают резистентность бактерий к антибиотикам, солям тяжелых металлов и другим химическим соединениям.

7. Фенотипическая и генотипическая изменчивость

Наряду с наследственностью, сохраняющей основные признаки бактериального вида, прокариотам свойственна изменчивость, то есть способность приобретать новые признаки и утрачивать некоторые из имеющихся. Причем, способность к изменчивости у них выражена в большей степени, чем у высших организмов. Это зависит от большой скорости размножения (быстрой смены поколений), частоты мутаций и наличия различных форм обмена генетической информацией.

Различают фенотипическую и генотипическую изменчивость.

При *фенотипической изменчивости* происходит изменение одного или нескольких признаков, причем только тех, информация о которых заложена в геноме и была репрессирована («молчание» гены), при этом генотип остается не затронутым. Изменения фенотипа происходят под влиянием факторов внешней среды (состава питательной среды, действия разнообразных химических и физических факторов, не повреждающих геном). Фенотипическая (модификационная) изменчивость является адаптивной и позволяет сохранять жизнеспособность бактерий при изменении условий их обитания. Возникающие модификации не наследуются, характеризуются частотой появления и, как правило, кратковременностью. Их биохимическую основу составляет индуциальный синтез ферментов. Модификация обычно исчезает вскоре после прекращения действия вызвавшего ее фактора.

Генотипическая изменчивость – стойкое изменение свойств бактерий как результат изменения их генотипа (генома). Эта форма изменчивости передается по наследству и является долговременной. Она может возникнуть вследствие мутаций или генетического обмена – трансформации, конъюгации или трансдукции.

8. Мутации. Типы мутаций. Мутагены. Системы reparации

Мутации – стабильное изменение первичной структуры геномной ДНК, которое приводит к наследственно закрепленному изменению или утрате одного или нескольких признаков, не связанное с генетическим обменом или присутствием плазмид. Мутации отличаются многообразием, их подразделяют по различным критериям.

Типы мутаций. По происхождению различают спонтанные (самопроизвольные) и индуцированные мутации. *Спонтанные мутации* возникают в обычных условиях под влиянием природных факторов, ошибок в репликации генома, действия транспозонов и *Is*-элементов. *Индуцированные мутации* получают с помощью обработки бактериальной культуры мутагенами – факторами химической, физической или биологической природы, способными вызывать повреждения ДНК. Они имеют различный механизм действия и разные точки приложения (таблица 26).

В зависимости от степени мутационных повреждений мутации подразделяют на хромосомные и генные (точковые) мутации. Встречаются также цитоплазматические мутации, возникающие при повреждении плазмидной ДНК.

Хромосомные мутации – крупные перестройки в отдельных фрагментах ДНК. Это могут быть *делеции* – выпадения нескольких нуклеотидов, *инверсии* – поворот участка хромосомы на 180°; *дупликации* – повторение участка хромосомы; *дислокации* – изменение последовательности нескольких оснований.

В числе других факторов, хромосомные мутации могут вызывать *Is*-последовательности и транспозоны путем их перемещения и вставок в различные фрагменты хромосомы. Хромосомные мутации значительно нарушают структуру ДНК и часто бывают летальными, приводящими мутировавшие бактерии к гибели.

Генные, или точковые мутации формируются значительно чаще, чем хромосомные и заключаются в изменении одной пары оснований. Различают: *выпадение* или *вставки оснований*; *простые замены (транзиции)* – при которых пурин заменяется на другой пурин ($A > G$), пиримидин – на другой пиримидин ($T > C$); *сложные замены (трансверсии)*, когда пурины заменяются пиримидинами ($A > T$ или $G > C$). В результате точковой мутации вместо одной аминокислоты синтезируется другая, может произойти бессмысленная мутация. Точковые мутации возникают с большой частотой и имеют наибольшее значение в генотипической изменчивости бактерий, способствуя их эволюции.

Различают прямые и обратные мутации. *Прямые мутации* всегда связаны с потерей функции, а *обратные* – с восстановлением этой функции.

Обратные мутации бывают *истинными* – когда полностью восстанавливаются не только фенотип, но и генотип или *супрессорными*, при которых прямая мутация компенсируется путем изменения в другом гене. Это приводит к восстановлению исходного фенотипа, но геном остается измененным.

Мутации могут быть обогащающими (полезными), способствующими повышению жизнеспособности прокариот и обедняющими, как ауксотрофные или морфологические мутации (утеря капсул, жгутиков) и др. Существуют также нейтральные мутации, условно-летальные и летальные.

Фенотипическое проявление мутаций отличается многообразием: могут изменяться морфологические, биохимические, антигенные, вирулентные свойства бактерий, развиваться устойчивость к антимикробным препаратам и другим химическим соединениям и т.п. Типичным примером этого явления считается диссоциация колоний энтеробактерий - переход S-форм (гладких) в R-формы (шероховатые) колоний, при этом меняются также и физиолого-биохимические свойства формирующих колонии бактерий.

Ауксотрофные мутации. Примерами биохимических мутаций являются ауксотрофные мутанты, потерявшие в результате мутаций способность синтезировать один или несколько факторов роста (аминокислоты, витамины и др.). Они хорошо растут на полноценных средах (МПА, МПБ и других), где эти факторы присутствуют, но не могут расти на минимальных средах, например, на минимальном агаре, в состав которого входят: дистиллированная вода, агар, соли аммония (как источник азота) и другие минеральные соли, глюкоза и фосфатный буфер.

Ауксотрофные мутанты получают из исходных «диких» штаммов, называемых прототрофами, которые способны расти как на полноценных, так и на минимальных питательных средах. Методика получения ауксотрофных мутантов заключается в следующем. На прототрофный штамм воздействуют УФ-лучами или химическими мутагенами. Далее обработанную культуру выращивают в жидкой полноценной среде при хорошей аэрации 2-3 часа при 37°C, на которой размножаются и прототрофные, и ауксотрофные клетки. Выросшие клетки отмывают от питательной среды физиологическим раствором NaCl. Бактериальную суспензию засевают на жидкую минимальную среду, содержащую пенициллин. Пенициллин вызывает гибель прототрофов, нарушая синтез пептидогликана растущих бактерий и не действует на ауксотрофные клетки, не способные к делению на минимальной среде, и они выживают. Полученные ауксотрофные мутанты идентифицируют, определяя необходимые для них факторы роста.

Ауксотрофные мутанты широко используют в различных генетических исследованиях (см. занятие 9), а также в тесте Эймса.

Тест Эймса - лабораторный тест, используемый для контроля мутагенной активности создаваемых лекарственных препаратов и пищевых добавок. Для постановки теста Эймса используют ауксотрофные мутанты эшерихий и сальмонелл, имеющих точковые мутации, которые нарушают биосинтез какой-либо аминокислоты.

Постановка опыта. Для данного эксперимента был взят штамм *Escherichia coli* K-12, ауксотроф по треонину (*thr-*), не способный расти на минимальной среде. Частота спонтанных обратных мутаций (реверсий) к дикому типу у взятой в опыт культуры происходит с низкой частотой : 1 мутация на 10^8 клеток.

Культуру посеяли на поверхность минимального агара в чашку Петри в виде густого газона. Далее на поверхность посева нанесли капли испытуемых химических веществ-мутагенов на равном расстоянии друг от друга. В качестве контроля была взята капля физиологического раствора NaCl , (можно помещать на поверхность посева бумажные диски, пропитанные различными веществами-мутагенами). Посев инкубировали 18-24 часа при 37°C .

На чашке Петри после инкубации в зоне действия веществ с мутагенной активностью вырастают колонии ревертантов (*thr+*) с частотой, значительно превышающей спонтанную – 1 мутация на 10^5 – 10^6 клеток. В месте нанесения капли физиологического раствора и на остальной поверхности чашки рост колоний отсутствует.

Испытуемые вещества: 1. физиологический раствор NaCl (контроль), 2. азотистая кислота, 3. 5-бромуурацил, 4. гидроксиламин и 5. нитрозомочевина.

Задание:

Провести учёт теста Эймса, отметить наиболее активный мутаген, результат опыта зарисовать.

9. Мутагены

Мутагены – физические, химические и биологические факторы, действующие на ДНК и вызывающие различные по степени наследственные изменения – мутации. Большинство мутагенов обладает канцерогенной активностью. Активность мутагенов зависит от их свойств и особенностей взаимодействия с молекулами ДНК (таблица 26).

Репарационные системы бактерий. В процессе эволюции прокариоты приобрели способность защищать свой генетический материал от повреждающего действия мутагенных факторов с помощью репарационных систем, которые полностью или частично устраняют возникающие повреждения. У прокариот описаны несколько репарационных систем. Наиболее изучены системы световой и темновой репарации, дорепликативной и пострепликативной, противостоящие мутагенному действию УФ-лучей.

Таблица 26

Свойства мутагенов

№№ п/п	Название	Механизм действия	Типы вызываемых мутаций
1.	Ультрафиолетовые лучи (длина волны 253-260 нм)	Образуются димеры (ковалентные связи между соседними пиримидинами), которые не считаются и, следовательно, индуцируют проявление пропущенных участков в комплементарных цепях.	Хромосомные мутации - делеции; точковые мутации типа транзиции и трансверсии.
2.	Ионизирующая радиация (рентгеновские лучи с длиной волны около 4000 ангстрем)	Ионизируют молекулу ДНК, что приводит к перегруппировке оснований, к одноцепочечным и двуцепочечным разрывам, т.е. фрагментации хромосомы с образованием новых комбинаций фрагментов	Хромосомные мутации – делеции и инверсии
3.	5-Бромурацил	Ошибочные включения в ДНК вместо тимина, он спаривается с цитозином, поэтому вместо Т-А получается 5-Бр-Ур-Г и далее Г-Ц	Точковые мутации - транзиции
4.	2-Аминопурин	Ошибочно включается в ДНК вместо аденина и образует водородные связи с цитозином вместо тимина	Точковые мутации – транзиции типа А-Т на Г-Ц
5.	Азотистая кислота	Вызывает замену А-Т на Г-Ц вследствие окислительного дезаминирования аденина, который образует водородные связи с цитозином вместо тимина	Точковые мутации – транзиции типа А-Т на Г-Ц или Г-Ц на А-Т
6.	Гидроксиламин	Вызывает замещение аминогруппы цитозина на оксаминогруппу с заменой Г-Ц на А-Т	Точковые мутации - транзиции
7.	Алкилирующие соединения (этилметан-сульфонат и др.)	Вызывает метилирование гуанина и, как следствие, ошибочное спаривание с тимином	Точковые мутации – транзиции типа Г-Ц на А-Т, реже А-Т на Г-Ц
8. 9.	Акридиновые красители, бромистый этидий	Внедряются между соседними основаниями ДНК и вызывают пространственные изменения: вставки или делецию пар оснований, что приводит к сдвигу «рамки считывания»	1.Хромосомные мутации – вставки, делеции, инверсии. 2.Элиминация (потеря) внехромосомных элементов, в частности плазмид
10.	Нитрозогуанидин, нитрозомочевина	Алкилирование в точке репликации (в репликативной вилке), приводящие к неправильному спариванию модифицированных оснований	Множественные точковые мутации типа транзиции или трансверсии и хромосомные мутации, чаще типа делеций
11.	Іs-последовательности, транспозоны, мюбактс-риофаги	Перемещаются по хромосоме с одного локуса на другой или с хромосомы на плазмиду и обратно	Хромосомные мутации типа делеций, инверсий, дупликаций

Световая репарация (фотореактивация) осуществляется с помощью специального фермента, который активируется под действием видимого света и расщепляет димеры тимина, образующиеся в хромосомной ДНК при УФ-облучении, тем самым восстанавливая исходное состояние ДНК.

Система темновой репарации не требует присутствия света.

Дорепликативная темновая репарация устраняет повреждения в одной нити ДНК (вторая нить не повреждена) посредством нескольких ферментов, действующих последовательно. Участок ДНК в области образовавшегося пиримидинового димера «вырезается» с помощью эндонуклеазы и удаляется экзонуклеазой. Образовавшаяся «брешь» в нити ДНК заполняется комплементарными нуклеотидами, синтезируемыми ДНК-полимеразой на матрице второй неповрежденной нити. В завершение, полинуклеотидлигаза «сшивает» репарированную нить ДНК в единое целое, восстанавливая бактериальную хромосому.

Пострепликативная репарация заключается в устраниении повреждений, возникших в обеих нитях ДНК, путем пострепликативной рекомбинационной репарации, при которой происходит генетический обмен между обеими нитями ДНК, помогающий заполнить «бреки» в их поврежденных участках.

С помощью механизмов темновой репарации могут восстанавливаться повреждения ДНК, вызываемые химическими мутагенными факторами.

Существуют и другие репарационные системы ДНК, например **SOS-система**, которая является индуциальной и включается при множественных повреждениях ДНК.

Темы докладов для занятия по разделу «Генетика бактерий»

1. Генетический аппарат прокариот – хромосома и внекромосомные генетические элементы. Бактериальная хромосома, химический состав, функция. Понятие о генетической карте бактерий, принцип ее построения. Методы генетического картирования.
2. Внекромосомные генетические элементы. Плазмиды, химическая природа, функции. Примеры: R-плазмида, Col-, Hly-, Ent-плазмиды, их значение.
3. Мигрирующие генетические элементы – транспозоны и Is-последовательности, химический состав, функции.

4. Генетический обмен у бактерий, сущность, значение. Трансформация, сущность, история открытия. Природа трансформирующего агента. Состояние компетентности у бактерий-реципиентов. Стадии трансформации.
5. Генетический обмен у бактерий, сущность. Трансдукция, сущность, история открытия. Трансдуцирующие фаги. Стадии трансдукции. Неспецифическая, специфическая и abortивная трансдукция, их особенности. Значение трансдукции.
6. Генетический обмен у бактерий, сущность. Конъюгация у бактерий, сущность, история открытия. Донорные и реципиентные клетки, их отличия. Полевой фактор F, его свойства. Типы доноров – F⁺, F⁻, Hfr, их отличия, результаты скрещиваний. Стадии процесса конъюгации Hfr x F⁻. Значение конъюгации.
7. Генная инженерия, сущность. Векторы, их свойства, типы векторов. Этапы получения организмов с новыми свойствами с помощью методов генной инженерии. Области применения.
8. Практическое использование молекулярной генетики в диагностике инфекционных заболеваний. ДНК-ДНК-гибридизация и полимеразно-цепная реакция (ПЦР), сущность, ингредиенты реакции, этапы, практическое применение.

Контрольные вопросы по теме занятия

1. Характерные свойства бактериофагов как представителей царства Vira. Особенности химического состава.
2. Основные морфологические группы фагов, их характеристика.
3. Анатомическое строение T-чётного фага.
4. Вирулентные фаги, стадии их взаимодействия с чувствительными бактериальными клетками (продуктивная инфекция).
5. Умеренные фаги. Особенности взаимодействия умеренных бактериофагов с чувствительными бактериями. Профаг, явление лизогении,
6. Конвертирующие фаги. Фаговая конверсия, примеры.
7. Методы индикации и выделение фага из окружающей среды. Негативные колонии вирулентных и умеренных фагов.
8. Метод титрования фага по Грациа, его сущность. Что называется титром фага?

9. Применение бактериофагов в диагностике инфекционных заболеваний. Фаготипирование, практическое значение.
10. Фагопрофилактика и фаготерапия инфекционных заболеваний. Примеры лечебно-профилактических бактериофагов.
11. Организация генетического аппарата прокариот: бактериальная хромосома и внехромосомные генетические элементы.
12. Фенотипическая и генотипическая изменчивость бактерий. Их сущность.
13. Мутации бактерий. Характеристика различных типов мутаций: спонтанные и индуцированные, точковые и протяжённые, прямые и обратные. Супрессорные мутации. Значение, мутаций.
14. Фенотипические проявления мутаций у бактерий: морфологические, культуральные, биохимические. Ауксотрофные мутации. Тест Эймса.
15. Мутагены. Примеры физических и химических мутагенов. Молекулярный механизм их действия.
16. Репаративные системы бактерий.

Занятие 9

Тема: Генетический обмен у бактерий: трансформация, трансдукция, конъюгация.

Молекулярно-генетические методы, их практическое использование.

План занятия

1. Генетический обмен у бактерий, его отличие от полового процесса у эукариот.
2. Трансформация, сущность. Свойства ДНК донора и клеток-реципиентов, участвующих в трансформации. Стадии процесса трансформации. Учёт опыта трансформации по передаче локуса устойчивости к стрептомицину у *Bacillus subtilis*.
3. Трансдукция, сущность. Типы трансдукции – специфическая, неспецифическая, abortивная. Стадии процесса трансдукции. Учет опыта специфической трансдукции по передаче локуса “gal⁺” с помощью умеренного фага “лямбда” у *Escherichia coli*.
4. Конъюгация, сущность. F-фактор, доноры и реципиенты. Характеристика доноров F⁺, Hfr, F⁻, их особенности. Типы скрещивания. Учет опыта скрещивания Hfr x F- у *E. coli*.
5. Плазмиды, свойства, функции, значение. Учет опыта выявления множественной лекарственной резистентности у *S.aureus* (R-плазмида) и гемолитических свойств у *E.coli* (Hly-плазмида).
6. Генная инженерия, сущность. Типы и свойства векторов. Этапы получения организмов с новыми свойствами с помощью методов генной инженерии. Области применения генной инженерии.
7. Молекулярно-генетические методы диагностики: ДНК-ДНК-гибридизация. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).
8. Микроэкология тела человека (подготовка к следующему занятию): посев микрофлоры кожи пальцев рук на МПА и посев микрофлоры со слизистой носовых ходов на ЖСА.

Методические указания к выполнению практического занятия

1. Генетический обмен у бактерий

Генетический обмен у бактерий – это процесс передачи генетического материала между клетками бактерий.

Перенос ДНК направлен только в одну сторону - от донора к реципиенту (горизонтальный перенос) - и может осуществляться путем *трансформации, трансдукции или конъюгации*. С наибольшей эффективностью генетический обмен происходит между бактериями одного вида, но возможны и межвидовые, а в редких случаях, и межродовые передачи генов. Конечным этапом передачи генетического материала от бактерии-донора к бактерии-реципиенту является рекомбинация, которая осуществляется через формирование частичной зиготы – мерозиготы.

Рекомбинация - это процесс взаимодействия между двумя молекулами ДНК, приводящий к образованию новой рекомбинантной молекулы, несущей признаки обоих родителей. Образующиеся рекомбинанты сохраняют генотип реципиента и дополнительно содержат один и несколько генов донора. Генетические рекомбинации по молекулярному механизму делятся на гомологичную, сайт-специфическую и незаконную рекомбинацию.

Задание:

По ходу изучения типов генетического обмена заполнить таблицу 27.

Таблица 27
Генетический обмен у бактерий (рекомбинации)

Способ передачи генетического материала	Определение	Способ передачи материала от донора к реципиенту	Характеристика участников генетического обмена	Молекулярный механизм рекомбинации	Число передаваемых генов
Трансформация					
Конъюгация 1. Hfr x F ⁻ 2. F ⁺ x F ⁻ 3. F ⁺ x F ⁺					
Трансдукция 1. Неспецифическая 2. Специфическая 3. Абортинная					

2. Трансформация

Трансформация – тип генетического обмена, при котором участок нативной молекулы ДНК донора проникает в бактерию-реципиент и вызывает изменение ее генотипа.

Трансформация впервые обнаружена и изучена у *Streptococcus pneumoniae* (1928-1944 гг). Позже природная трансформирующая способность выявлена у *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, некоторых нейссерий. Очень удобной моделью для изучения трансформации изза своей неприхотливости оказались бактерии вида *B. subtilis*. Долгое время не удавалась трансформация у *E.coli*, но затем были подобраны необходимые условия (использование мутантов, лишенных некоторых эндонуклеаз, высокая концентрация ионов кальция и др.). В настоящее время трансформация на модели *E.coli* широко используется в генной инженерии.

Характеристика участников трансформации. Для того, чтобы трансформация была успешной, ДНК донора и бактерии-реципиенты должны обладать определенными свойствами:

- **ДНК донора** должна быть выделена из бактериальной культуры того же вида, что и реципиент (или близкородственного). Участок трансформирующей ДНК должен сохранять интактную структуру (двувитчатую суперспирализацию) и иметь значительную молекулярную массу.

Молекулы ДНК выделяют из бактерий-доноров химическим методом, при этом на бактериальную культуру воздействуют фенолом для удаления белков и проводят многократное переосаждение этанолом. Такая обработка приводит к разрывам хромосомы, образуются фрагменты с молекулярной массой не более 1×10^7 дальтон, что составляет около 0.3% всей бактериальной хромосомы. Вследствие небольшой величины фрагмента при трансформации обычно передается один маркер, редко два близко расположенных (сцепленных генов).

На эффективность трансформации влияет количественное соотношение молекул ДНК и бактерий-реципиентов. Концентрация ДНК не должна быть малой или избыточной, в обоих случаях количество рекомбинантов резко снижается.

- **Клетки реципиентной бактериальной культуры** для осуществления трансформации должны быть **компетентными**, то есть способными адсорбировать на своей поверхности ДНК донора и поглощать ее. Состояние компетентности чаще развивается в конце логарифмической (экспоненциальной) фазы роста, оно непродолжительно и обычно возникает только у 1% клеток. Из компетентной бактериальной культуры удалось выделить белок, способствующий возникновению компетентности. Добавление полученного белка к реципиентной культуре значительно повышало процент компетентных

клеток. И, наоборот, при блокировке синтеза этого белка, например хлорамфениколом, состояние компетентности у бактерий не наступало. Предполагается, что белок включается в клеточную мембрану и активирует аутолитические ферменты клетки, повышающие проницаемость клеточной стенки, тем самым стимулируя поглощение клеткой-реципиентом ДНК из внешней среды.

Стадии трансформации:

1. Адсорбция фрагментов двунитевой ДНК донора на поверхности клеточной стенки компетентных клеток. ДНК связывается с участками поверхности, доступными только у компетентных клеток.
2. Ферментативное расщепление адсорбированной молекулы двунитевой ДНК на более мелкие фрагменты с помощью индуцированной клеточной эндонуклеазы.
3. Проникновение фрагментов ДНК с молекулярной массой не менее 5×10^5 дальтон сопровождается разрушением одной из нитей ДНК и освобождением энергии, необходимой для дальнейшего проникновения.
4. Проникший однонитевый фрагмент ДНК взаимодействует с участком высокой гомологии генома клетки реципиента с образованием гибридной молекулы ДНК (гомологичная рекомбинация), в которой одна нить содержит генотип реципиента, а вторая нить является рекомбинантной.

Следует отметить, что некоторые виды бактерий, например пневмококки, способны адсорбировать и поглощать ДНК различной видовой принадлежности и даже ДНК высших организмов (из тимуса теленка), но рекомбинанты при этом не образуются. Другие виды бактерий поглощают только гомологичную ДНК, например гемофильные бактерии.

Трансформация является одним из факторов эволюции бактерий. В природных условиях геномная ДНК часто высвобождается при гибели и лизисе бактериальных клеток и может трансформировать имеющиеся в окружающей среде восприимчивые бактерии с соответствующим генотипом. Появляющиеся рекомбинанты с новым сочетанием генов играют определенную роль в естественном отборе.

С помощью трансформации проводится тонкое картирование генов, уточняются генетические карты бактериальных хромосом. В последнее время трансформация играет значительную роль в генной инженерии.

*Постановка опыта трансформация по передаче локуса устойчивости к стрептомицину у *Bacillus subtilis*.*

В опыт берут:

1. ДНК, выделенную из стрептомицинуустойчивого штамма *B.subtilis* (ДНК должна иметь молекулярную массу не ниже 5×10^5 дальтон);
2. Стрептомицинчувствительную культуру-реципиент *B.subtilis* в компетентном состоянии.
3. Селективную среду – МПА, содержащий 100 Ед/мл стрептомицина.

Для проведения трансформации 1,0мл культуры компетентных клеток реципиента соединяют с 1 мкг/мл ДНК донора и инкубируют при 37°C в течение 30 минут для контакта. Далее на 5 минут в пробирку вносят 0,1мг/мл раствора фермента ДНК-азы в 0,5 мл хлорида магния для разрушения не проникшей в реципиентные клетки ДНК. Затем высевают 0,2 мл неразведенной смеси на чашки с селективной средой и инкубируют при 37°C. Контролем являются высевы - ДНК донора и стрептомицинчувствительной культуры реципиента не селективной среде. Для подсчета количества взятых в опыт реципиентных клеток делают их десятикратные разведения в изотоническом растворе NaCl (до 10^{-5} - 10^{-6}) и по 0,1мл засевают на чашки Петри с МПА без стрептомицина.

Опыт учитывают через 24-48 часов. В обоих контролях рост должен отсутствовать. На опытных чашках вырастают колонии рекомбинантов, которые приобрели признак стрептомицинуустойчивости, подсчитывают их количество.

Определяют частоту трансформации – отношение числа выросших рекомбинантов к числу реципиентных клеток. Например, если при высеве 0,1мл культуры реципиента, разведенного до 10^{-5} микробных клеток, выросло 120 колоний ($1,2 \times 10^8$), а количество колоний рекомбинантов в 0,1мл в неразведенной смеси составляет 60 ($6,0 \times 10^2$), частота трансформации в данном опыте будет равна:

$$6 \times 10^2 : 1,2 \times 10^8 = 5 \times 10^{-6},$$

т.е. на $1 \cdot 10^6$ клеток реципиентов образуется 5 рекомбинантов.

Задание:

Учсть опыт трансформации, подсчитать частоту трансформации. результаты записать в альбом. Объяснить причину отсутствия роста в контроле.

3. Трансдукция

Трансдукция - процесс переноса генетического материала от бактерии-донора к бактерии-реципиенту с помощью бактериофага.

Трансдукция осуществляется дефектными бактериофагами, которые не способны к самостоятельной репродукции в клетке и для формирования фагового потомства нуждаются в присутствии родственного фага.

Трансдуцирующие фаги получают путем продуктивной (литической) инфекции фагочувствительной культуры донора или с помощью индукции УФ-лучами лизогенизированной соответствующим фагом культуры донора (с ее последующим лизисом). В обоих случаях получают фаголизаты трансдуцирующих фагов, в которых подавляющее большинство составляют нормальные вирионы фага и только примерно один вирион из 10^5 особей содержит внутри головки фрагмент ДНК бактерии-донора, следовательно, способен к трансдукции.

Трансдуцирующие частицы фага дефектны, т.к. из-за недостатка места в головке, занятого фрагментом бактериальной ДНК включают только часть фагового генома и утрачивают часть свои функций. Дефектному фагу необходим фаг-помощник, роль которого выполняют полноценные вирионы фага.

Способность к трансдукции выявлена у представителей энтеробактерий, вибрионов, псевдомонад, стафилококков, бацилл и других. Закономерности трансдукции наиболее детально изучались у кишечных палочек и сальмонелл.

Типы трансдукции. Существуют неспецифическая (общая), специфическая (локализованная) и abortивная трансдукции.

Неспецифическая трансдукция. При этом типе трансдукции могут переноситься любые гены примерно с одинаковой частотой. Наиболее изучены системы: *E.coli* – фаг P1 и *Salmonella typhimurium* – фаг P22.

Формирование трансдуцирующего бактериофага происходит в процессе его размножения в бактериальной клетке. При самосборке фаговых частиц в его головку может быть случайно включен любой участок ДНК донора, сопоставимый по размеру с фаговым геномом. Образовавшийся дефектный бактериофаг сохраняет инфекционные свойства и способен переносить включенную ДНК в клетку-реципиент.

Процесс неспецифической трансдукции завершается гомологичной рекомбинацией и включением фрагмента перенесенной ДНК в клетку-реципиент, что влечет за собой изменение ее свойств. При отсутствии гомологии между ДНК донора и ДНК реципиента трансдукция не происходит, а привнесенный фрагмент разрушается клеточными эндонуклеазами.

Трансдуцирующие фаголизаты обычно получают путем продуктивной инфекции, реже с помощью индукции УФ-лучами донорных лизогенных культур.

Специфическая трансдукция. При этом типе трансдукции от донора к реципиенту могут переноситься только некоторые, строго определенные для конкретного фага, бактериальные гены. Основные исследования проводились на системе: *E.coli* - фаг «лямбда»(λ), который способен переносить только гены “gal” (способность к ферментации галактозы) или “bio” (способность синтезировать биотин). Эти гены никогда не переносятся совместно. Имеются и другие системы, например фаг фи-80 *E.coli* переносит ген “arg”.

Специфическая трансдукция всегда связана с интеграцией умеренного фага в определенный участок хромосомы клетки донора. В дальнейшем при выходе из хромосомы могут захватываться соседние бактериальные гены (например «gal» или «bio»). При этом теряется фрагмент собственной ДНК фага такого же размера и формируется дефектный трансдуцирующий бактериофаг (λ dg_{al}, λ db_{io}). Такой бактериофаг способен переносить захваченный фрагмент ДНК донора и включать его в геном клетки-реципиента по механизму сайт-специфической рекомбинации (дополнение генома).

Следует отметить, что трансдуцирующие фаги, способные к специфической трансдукции, получают путем индукции лизогенизированной бактериальной культуры. Фаголизаты, полученные путем продуктивной инфекции, трансдуцирующими свойствами не обладают.

Абортная трансдукция. Это трансдукция, при которой фрагмент донорной ДНК, внесенный фагом в реципиентную клетку, не интегрирует в бактериальную хромосому и не реплицируется. Присутствие донорного гена (маркера) проявляется только в его действии, например в индукции сбраживания углевода. При каждом клеточном делении только одна клетка из двух получает трансдуцированный маркер, а другая – только часть продукта, индуцированного этим маркером. Концентрация продукта с каждым делением клеток разбавляется, а

трансдуцированный ген при дальнейших делениях утрачивается (однолинейное наследование).

В естественных условиях трансдукция встречается довольно часто, вследствие широкого распространения бактерий, лизогенизированных различными бактериофагами. Причем существует не только внутривидовая, но межвидовая и межродовая трансдукция. Эти факты указывают на значительную роль трансдукции в эволюции бактерий.

При трансдукции переносится малое количество генетического материала, обычно один ген или два тесно сцепленных. Это обстоятельство позволяет применять трансдукцию для тонкого картирования генов. С помощью трансдукции происходит перенос бактериальных генов, плазмид и транспозонов, что используется в генной инженерии.

Постановка опыта специфической трансдукции по передаче локуса "gal+" фагом λ у E. coli.

В опыт берут:

1. Трансдуцирующий фаг λ, выделенный из лизогенной галактозопозитивной культуры E.coli путём индукции УФ-лучами (титр фаголизата должен быть высоким - 10^{10} вирионов фага на 1 мл).
2. 3-х часовую бульонную культуру-реципиента E. coli gal⁻.
3. Селективную среду ЭМС: дифференциально-диагностическая среда, содержащая МПА, галактозу, индикатор эозин-метиленовый синий. Выросшие на чашках gal⁺ колонии имеют сине-чёрный цвет, а gal⁻ колонии остаются неокрашенными.

Для постановки трансдукции в опытную пробирку вносят 0,9 мл культуры-реципиента и 0,1 мл фаголизата λ (множественность инфекции- 1,0). Смесь выдерживают при 37°C в течение 30 минут, а затем готовят ряд 10-кратных разведений (для получения сосчитываемого количества колоний) и высевают по 0,1 мл разведений смеси на чашки Петри с селективной средой.

Ставят два контроля: фаголизата на стерильность и культуры-реципиента, высевая их по 0,1 мл на чашки с ЭМС-средой. В контроле культуры-реципиента должны расти только бесцветные gal⁻ колонии.

Опыт учитывают через 24-48 часов. На опытной чашке среди бесцветных gal⁻ колоний культуры-реципиента вырастают окрашенные сине-чёрные колонии gal⁺ рекомбинантов (трансдуктантов). Подсчитывают количество выросших колоний рекомбинантов и реципиента. Частота специфической трансдукции – отношение количества

образовавшихся рекомбинантов к количеству участвующих в опыте реципиентных клеток. Например, на чашке Петри со средой ЭМС, куда посеяли 0,1 мл смеси в разведении 10^{-6} выросло 150 (1.5×10^9) бесцветных колоний реципиентов и 3 (3×10^7) колонии рекомбинантов, что составляет частоту рекомбинации в данном опыте:

$$3 \times 10^7 : 1.5 \times 10^9 = 2 \times 10^{-2}$$

Задание:

Рассмотреть чашки с результатами опыта специфической трансдукции, сравнить опытную и контрольные чашки, подсчитать частоту трансдукции, результаты записать в альбоме.

4. Конъюгация

Конъюгация – форма обмена генетическим материалом между бактериями при их непосредственном клеточном контакте. Этот процесс контролируется F-плазмидами, а также другими конъюгативными плазмидами. При конъюгации донорами являются «мужские» клетки, содержащие F-плазмиды, называемые F-фактором, фактором fertилности (от слова *fertility* – плодовитость). Реципиентами являются «женские» F-минус клетки (F^-), у которых плазмида отсутствует.

F-плазмида может находиться в цитоплазме клетки-донора в виде циркулярно-замкнутой двунитевой молекулы ДНК и реплицироваться автономно или быть интегрированной в бактериальную хромосому, реплицируясь в ее составе.

Типы донорных клеток. Донорные клетки, содержащие автономные F-плазмиды, носят название **F^+ -клеток**.

Бактериальные штаммы, в клетках которых F-фактор интегрирован в хромосому, называются ***Hfr-штаммами*** (high frequency of recombination), так как они способны переносить бактериальные гены с высокой частотой. F-фактор способен включаться в различные участки бактериальной хромосомы (таких сайтов более 10), но каждый Hfr-штамм имеет определенный сайт интеграции F-фактора. Такая закономерность выявлена у штамма *E.coli K12*, на котором проводились основные исследования процесса конъюгации.

Интегрированный F-фактор способен выщепляться из бактериальной хромосомы, снова становясь автономной циркулярной плаз-

мидой. При неправильном выходе из хромосомы в плазмидную ДНК могут включаться бактериальные гены. Образуется так называемый F'-фактор (F-замещенный), то есть свободная F'-плазмида, несущая несколько бактериальных генов.

F-плазмиды содержат до 100 генов, в том числе гены, отвечающие за их самостоятельную репликацию. Важное значение имеет tra-область плазмидной ДНК (*transfere* - перенос), от которой зависит способность бактерий быть генетическим донором – вступать в конъюгацию и переносить генетический материал. Под контролем tra-генов на поверхности клеток доноров образуются половые ворсинки – F-пили (осуществляющие контакт между клетками донора и реципиента), происходит мобилизация процесса переноса генетического материала, синтез ферментов, необходимых для метаболизма ДНК, обеспечение энергией.

Клетки-доноры возможно отличить от реципиентных клеток по наличию F-пилей, дополнительного поверхностного антигена, по чувствительности к некоторым РНК-бактериофагам (которые адсорбируются на F-пили), а также по ряду физико-химических свойств.

Типы скрещивания. В зависимости от состояния F-плазмиды различают следующие типы скрещивания: F⁺ x F⁻; Hfr x F⁻; F' x F⁻.

1. При скрещивании F⁺ x F⁻ передается только F-плазмида. Донорная F⁺-клетка прикрепляется к реципиентной F--клетке с помощью F-пили, образуя конъюгационный мостик. Далее происходит разрыв и деспирализация одной из нитей кольцевой плазмидной ДНК. Образовавшаяся линейная нить плазмидной ДНК по каналу конъюгационного мостика 5' концом проникает в клетку-реципиент, где достраивается вторая нить ДНК и восстанавливается кольцевая F-плазмида. Таким образом, F⁻-клетка становится F⁺-клеткой, приобретая плазмиду и свойства донора (F⁺ x F⁻ → F⁺). При этом хромосомные гены не передаются.

2. При скрещивании Hfr x F⁻ передаются бактериальные гены. После образования конъюгационного мостика происходит разрыв одной из нитей ДНК донора рядом с интегрированным F-фактором. Нить хромосомной ДНК в линейной форме, начиная с точки O (origin – начало) F-фактора, 5' концом, постепенно, переходит по конъюгационному мостику в реципиентную клетку, где происходит достройка второй нити. Оставшаяся в донорной клетке вторая нить ДНК также восстанавливает двунитевую структуру. Для

полного проникновения всей хромосомной нити *E.coli* требуется 90 минут и последним переходит оставшийся участок F-фактора. Однако, полный переход осуществляется редко. Как правило, непрочный конъюгационный мостик рвется гораздо раньше и в реципиент проникает только фрагмент ДНК бактериальной клетки большей или меньшей длины, содержащий соответствующее количество генов, а F-фактор не передается.

После полной достройки в реципиентной клетке второй нити ДНК происходит рекомбинация с гомологичным участком ДНК реципиента, приводящая к образованию рекомбинантов. С наибольшей частотой передаются бактериальные гены, расположенные близко к точке О. Передача генов, удаленных от этой точки, происходит значительно реже. Естественно, что гены, расположенные в той части хромосомы, которая не успела проникнуть в реципиентную клетку (в том числе и F-фактор) до разрыва конъюгационного мостика, не передаются вообще. Клетки-реципиенты при скрещивании *Hfr x F⁻*, как правило, не становятся донорами: *Hfr x F⁻ → F⁻*.

3. *Скрещивание F⁻ x F⁻*, иногда называемое сексдукцией, происходит аналогично скрещиванию *F⁺ x F⁻* и воспринявшая F-плазмиду реципиентная клетка превращается в донорную. Но F⁻-плазмида в составе своего генома содержит фрагмент бактериальной хромосомы, в котором могут находиться от 1 до 10, а иногда и более генов. Этот фрагмент способен рекомбинировать с гомологичным участком хромосомы реципиента, в результате чего образуются рекомбинанты.

Опыт скрещивания Hfr x F⁻ по передаче локусов Pro, Thr и Leu у Escherichia coli K12.

Постановка опыта:

1. Донор - штамм *E. coli* *Hfr* с генотипом *Pro⁺, Thr⁺, Leu⁺, Sms* (чувствительный к стрептомицину);
2. Реципиент - штамм *E. coli* *F⁻* с генотипом *Pro⁻, Thr⁻, Leu⁻, Smr* (резистентный к стрептомицину).
3. Селективная среда – минимальный агар, в состав которого входит дистиллированная вода, набор минеральных солей (NH_4Cl , NH_4NO_3 , Na_2SO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), глюкоза, стрептомицин 200ЕД/мл.

В опытную пробирку вносят 3-х часовые бульонные культуры донора и реципиента, выращенные при хорошей аэрации, в соотношении 1:10. Скрещиваемую смесь инкубируют при 37°C в течение 30 минут. Этого времени достаточно для передачи проксимальных маркеров Pro⁺, Thr⁺ и Leu⁺ (для переноса всей хромосомы донора смесь выдерживают 2 часа).

После инкубации скрещиваемую смесь разводят в 100 раз физиологическим раствором NaCl и засевают в объёме 0,1 мл на селективную среду. Ставят два контроля: культуры донорных и реципиентных клеток разводят в 100 раз и высевают по 0,1 мл на чашки с селективной средой. Для определения количества жизнеспособных клеток реципиента культуру разводят в десятикратных разведениях в изотоническом растворе NaCl и высевают из разведений 10⁻⁶ и 10⁻⁷ по 0,1 мл на селективную среду с добавлением аминокислот пролина, треонина и лейцина.

Все посевы инкубируют при 37°C в течение 24-48 часов. На опытной чашке вырастают рекомбинанты, число которых подсчитывают. На контрольных чашках роста быть не должно.

Частота рекомбинаций рассчитывается по отношению числа рекомбинантов к числу реципиентных клеток. Например: на чашке с селективной средой после посева 0,1 мл конъюгационной смеси в разведении 10⁻⁴ выросло 54 колоний рекомбинантов ($5,4 \times 10^6$ клеток/мл), а в посеве 0,1 мл реципиентной культуры в разведении 10⁻⁶ выросло 180 колоний ($1,8 \times 10^9$ клеток/мл), следовательно, частота рекомбинаций составляет:

$$5,4 \times 10^6 : 1,8 \times 10^9 = 3 \times 10^{-3}$$

Задание:

Рассмотреть чашки с результатами опыта конъюгации, посчитать частоту рекомбинаций. Объяснить отсутствие роста на контрольных чашках. Результаты занести в альбом.

5. Плазмиды

Плазмиды - внекромосомные дополнительные генетические структуры бактерий, способные к автономной репликации.

Плазмиды представляют собой двунитевую суперспирализованную молекулу ДНК, располагаются автономно в цитоплазме бактерий, некоторые могут включаться /интегрировать/ в бактериальную хро-

мосому. Не являясь жизненно необходимыми структурами, плазмиды индуцируют появление у бактерий новых свойств, способствующих их выживанию в условиях внешней среды, повышению вирулентности.

Плазмиды имеют собственный геном, содержащий следующие гены:

- гены, контролирующие саморепликацию, число копий в одной клетке и явление несовместимости (близкородственные плазмииды не могут стабильно сосуществовать в одной клетке и одна из плазмид удаляется);
- гены, контролирующие самоперенос (*tra-гены*) или мобилизацию на перенос;
- гены, наделяющие клетку-хозяина многими дополнительными свойствами.

Плазмида присущи две функции: регуляторная и кодирующая.

При участии плазмид восстанавливаются утраченные клеточным геном функции, например в результате мутаций (*регуляторная функция*).

Кодирующая функция заключается в том, что бактериальная клетка после проникновения в нее плазмиды получает новую дополнительную генетическую информацию, в зависимости от которой плазмиды подразделяются на:

- F-плазмиды (половые), придающие бактериальным клеткам дополнительные функции;
- R-плазмиды, обеспечивающие бактерии множественной лекарственной резистентности;
- Col-плазмиды, кодирующие синтез бактериоцинов;
- плазмиды патогенности, кодирующие синтез факторов адгезии, инвазии, белковых токсинов, например Ent-, Hly-плазмиды, CFA-1, CFA-П и другие;
- плазмиды биодеградации, кодирующие синтез ферментов, расщепляющих органические и неорганические соединения окружающей среды;
- скрытые (криптические) плазмиды, фенотипически не проявляющиеся в несущих их клетках.

Плазмиды, находящиеся автономно в цитоплазме клетки, способны самостоятельно реплицироваться, независимо от репликации нуклеоида. Количество их копий регулируется геномом плазмиды. По количеству в клетке различают малокопийные и мультикопийные плазмиды.

Малокопийные плазмиды представлены в клетке в количестве 1-4 копии. К ним относятся, как правило, высокомолекулярные плазмиды (м.м. до 1×10^8 Д), со сложным геномом, содержащим как собственные гены плазмиды, так и транспозоны.

Мультикопийные (многокопийные) плазмиды образуют в клетке 10-30 копий, имеют небольшую молекулярную массу – 1- 10×10^6 Д.

При интеграции генома плазмиды в бактериальную хромосому, он реплицируется одновременно как все хромосомные гены. В таком состоянии плазмида может существовать неопределенно долго.

Распространяются плазмиды среди бактерий *по вертикали* – путем передачи от родительской клетки в процессе деления дочерним клеткам, и *по горизонтали* – путем переноса между клетками независимо от клеточного деления.

Плазмиды, распространяющиеся в клеточной популяции путем конъюгации, называются конъюгативными (трансмиссивными), к ним относятся, как правило, крупные малокопийные плазмиды. Процесс переноса контролируют имеющиеся у этих плазмид *tra*-опероны.

Неконъюгативные, мультикопийные плазмиды имеют гены, мобилизующие их перенос в другие клетки с помощью конъюгативных плазмид и/или трансдуцирующих фагов.

Классификация плазмид основана на их несовместимости, а именно, неспособности родственных плазмид сосуществовать друг с другом в одной бактериальной клетке. По совместимости плазмиды объединяются в *Inc*-группы (от англ. *incompatibility* – несовместимость). Плазмиды, объединенные в одно *Inc*-группу, обладают многими общими свойствами.

Общебиологическое и медицинское значение плазмид заключается в том, что плазмиды:

- контролируют у бактерий обмен генетическим материалом и, следовательно, обеспечивают рекомбинации у бактерий;
- в присутствии плазмид биодеградации бактерии способны использовать в качестве источника углерода такие соединения, как толуол, ксиол, нафталин и др., что способствует их выживанию при недостатке питательных веществ и факторов роста;
- повышают резистентность бактерий к различным химическим агентам, в том числе антибиотикам, отдельным катионам, анионам, мутагенам, бактериоцинам;

- кодируют синтез факторов патогенности, обеспечивая благоприятные условия для размножения болезнетворных микробов в макроорганизме, и, следовательно, для развития инфекционного заболевания.

Задание:

Учесть и занести в альбом следующие опыты:

1. Выявление R-плазмида (множественной резистентность к антибиотикам) у *S.aureus*;
2. Изучить рост на кровяном агаре штамма *E.coli*, несущего Hly-плазмиду, обратить внимание на зону гемолиза вокруг колоний.

6. Генная инженерия

Генная инженерия – раздел молекулярной генетики, представляющий собой совокупность методов и технологий для создания *in vitro* рекомбинантных молекул ДНК или РНК и способов их переноса. В результате клетки, получившие чужеродные гены, приобретают способность синтезировать белки, которые они ранее не синтезировали.

Рекомбинантные молекулы содержат два компонента – вектор (переносчик) и клонируемую «чужеродную» ДНК.

Типы и свойства векторов. Векторами обычно являются циркулярно замкнутые молекулы ДНК – плазмиды, умеренные бактериофаги или вирусы животных, иногда космиды (плазмиды с липкими концами, cos-сайтами ДНК бактериофага λ). Они должны обладать рядом свойств, в частности:

- самостоятельно реплицироваться,
- нести в своем составе участки (сайты) рестрикций,
- содержать маркеры фенотипа (устойчивость к антибиотикам и др.), позволяющие по ним отбирать клетки-реципиенты, несущие гибридные молекулы с видимыми специфическими свойствами.

Клонируемые молекулы ДНК – это фрагменты ДНК, имеющие определенные гены, кодирующие синтез нужного вещества. Их получают различными способами, в том числе экстракцией нативной ДНК, получением ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы на молекуле м-RНК и синтезом генов химическим способом.

Рекомбинантную молекулу ДНК можно получить различными методами, наиболее простой из них заключается в следующем. Изолированные молекулы ДНК и ДНК-вектора обрабатывают ферментом-рестриктазой (рестрикционной эндонуклеазой), которая расщепляет взятые молекулы ДНК в строго определенном месте с образованием однонитчательных, комплементарных друг другу «липких» концов. Далее фермент полинуклеотидлигаза «сшивает» две разные линейные молекулы ДНК в одну рекомбинантную ДНК.

Технологию получения клеток с новыми заданными свойствами можно разделить на следующие этапы.

1. Получение отдельных генов или группы генов, отвечающих за искомый признак путем их синтеза химическим путем, экстракцией нативной ДНК и синтеза на молекуле и-РНК с помощью фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы).
2. Включение полученных фрагментов ДНК в ДНК-вектор – «сшивание» двух молекул ДНК в одну рекомбинантную с помощью фермента рестрикционной эндонуклеазы.
3. Введение полученной рекомбинантной молекулы ДНК в рептилентную прокариотическую или эукариотическую клетку – осуществляется чаще всего путем трансформации.
4. Отбор (по дополнительным генетическим маркерам, например устойчивости и антибиотикам) и клонирование трансформированных клеток, в которых активно экспрессируется искомый генетический материал.
5. Создание оптимальных условий для повышения деятельности клеток-продуцентов и синтеза специфического продукта «белка» в больших количествах.
6. Накопление и очистка специфического белкового продукта.

Области применения генной инженерии. Технология рекомбинантной ДНК позволяет *in vitro* переносить генетическую информацию из одного организма в другой, преодолевая даже межвидовые барьеры. В настоящее время методы генной инженерии широко используют при создании микроорганизмов-продуцентов ферментов, гормонов, вакцин, антигенных препаратов и других продуктов, представляющих интерес для медицины, ветеринарии, микробиологической промышленности, сельского хозяйства, экспериментальной науки.

Методом генной инженерии получены рекомбинантные молекулы ДНК, заставляющие микробные клетки-реципиенты синтезировать белки организма человека, обладающие терапевтическим действием, такие как инсулин, гормон роста соматотропин, пептидные гормоны – брадикинин и ангиотензин, интерлейкин-2, а- и γ-интерфероны и другие.

Генноинженерные технологии применяют для создания новых эффективных и безопасных вакцин. Примерами таких вакциновых препаратов являются генноинженерная рекомбинантная дрожжевая вакцина гепатита В (включена в РФ в календарь прививок) и ящура.

Рекомбинантная технология используется для получения высокочувствительных, специфичных и безопасных вирусных и бактериальных диагностических препаратов.

Генная инженерия приобретает все большее значение в генотерапии (геномная медицина), так как предрасположенность ко многим болезням или стойкость к ним заложены в геноме человека.

Ее достижения используются при разработке проекта «человеческий геном», клонировании, ксенотрансплантации и т.п.

Таким образом, технологии генной инженерии широко применяются как для практических биотехнологических разработок, так и при фундаментальных исследованиях, связанных с изучением механизмов экспрессии и регуляции работы отдельных генов и геномов в целом.

7. Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных заболеваний

Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных заболеваний – методы, позволяющие в исследуемых материалах обнаруживать фрагменты геномов.

К таким методам относятся молекулярная гибридизация и полимеразная цепная реакция (ПЦР), которые, благодаря своей специфичности, обусловленной индивидуальностью геномов, и высокой чувствительности, в последние годы получили широкое распространение. Эти методы позволяют обнаружить присутствие в исследуемом материале даже единичных копий генов определяемых вирусов, прокариотических или эукариотических клеток (молекулы ДНК или РНК с определенной нуклеотидной последовательностью) и тем доказать наличие соответствующей инфекции. В настоящее время

в банках генов (библиотеке генов) накоплены практически полные сведения о генах различных патогенных микроорганизмов, такие банки данных имеются в ряде стран, в том числе в России. Знание специфических консервативных нуклеотидных последовательностей отдельных микроорганизмов используются в молекулярно-генетических методах диагностики.

Метод молекулярной гибридизации (метод молекулярных зондов) основан на способности двухспиральных молекул ДНК к денатурации и ренатурации. Денатурация – расхождению цепей при нагревании ДНК до 80-100°С или обработке ее щелочью. Ренатурация – воссоединение цепей с помощью водородных связей при снижении температуры до 40-60°С (так называемый отжиг) и приобретение ДНК первоначальной двухспиральной структуры. Разъединенные цепи ДНК способны к гибридизации с фрагментами других односпиральных ДНК, имеющих комплементарные участки расположения нуклеотидов.

К гибридизации комплементарных нитей способна также молекулы РНК, образуя комплексы ДНК-РНК или РНК-РНК.

Для обнаружения в исследуемом материале нукleinовых кислот-мишеней используются молекулярные зонды - комплементарные молекулы ДНК или РНК, меченные радиоактивным изотопом (P_{32}), флюoresцентной или биотиновой меткой. Молекулярные зонды готовят из клонированных рекомбинантных нукleinовых кислот или выделяют из геномов вирусов или микробных клеток. Имеются наборы молекулярных зондов для определения многих микроорганизмов, прежде всего вирусов, они составляют библиотеку или банк генов. При постановке реакции молекулярной гибридизации зонды соединяют с исследуемым материалом, содержащим определяемую нукleinовую кислоту, подвергшуюся денатурации. Если зонд комплементарен цепи определяемой нукleinовой кислоты, происходит гибридизация в комплементарном участке. После отжига зонд оказывается включенным в ренатурированную нукleinовую кислоту и может быть обнаружен по имеющейся метке методами РИА, ИФА и МИФ.

Молекулярную гибридизацию можно проводить в растворе и на фильтрах путем прямого нанесения растворов нукleinовых кислот на фильтр (дот- или слот-блоты) или после их фракционирования в агарозном геле (Саузерн- или Нэзерн-блоты).

Методы гибридизации в растворе и блот-гибридизация используются при диагностике инфекционных заболеваний для обнаружения в

материале от большого нуклеиновой кислоты возбудителя, например персистирующих вирусов или возбудителей, которых не удается культивировать в лабораторных условиях.

Саузерн- и Нозерн-блоты позволяют обнаружить структурные изменения в молекулах нуклеиновых кислот. Метод применяется для выявления генетических нарушений на уровне макроорганизма.

Молекулярная гибридизация – высокоспецифичный метод, ее чувствительность находится на уровне иммунохимических методов, например иммуноферментного анализа (ИФА).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод получения большого количества специфических нуклеотидных последовательностей ДНК *in vitro*.

ПЦР основана, как и молекулярная гибридизация, на способности ДНК к денатурации и ренатурации и на комплементарности цепей ДНК. Новым важным принципом реакции является использование термостабильной ДНК-полимеразы, при участии которой происходит **амплификация** – умножение определенных генов (вирусных, бактериальных и др.) или их фрагментов с определенной нуклеотидной последовательностью ДНК. В результате реакции исследуемый генетический материал накапливается в значительном количестве и может быть легко выявлен и идентифицирован. Именно на амплификации генов или их фрагментов основана «сверхчувствительность» этой реакции.

С помощью ПЦР возможно определение не только нуклеотидной последовательности ДНК, но также РНК и, следовательно, выявление РНК-вирусов (для этого в реакцию вводят фермент транскриптазу).

ПЦР была предложена в 1983 г. К.Мюллисом, получившем за свое открытие Нобелевскую премию (1993 г.). Следует отметить, что способ получения и свойства главного компонента реакции – **фермента термостабильной ДНК-полимеразы (Тaq ДНК-полимеразы)**, выделенной из бактерий *Thermus aquaticus*, был разработан отечественными учеными А.Калединым с соавторами и опубликован в 1980 г.

В реакции участвуют следующие ингредиенты:

- **Определяемая ДНК** инфекционных агентов (вирусов, прокариотных или зукариотных клеток) в испытуемом биологическом материале, который предварительно концентрируется;

- **Праймеры двух типов** (олигонуклеотиды) – короткие цепочки ДНК, состоящие из 20-30 нуклеотидов, с нуклеотидной последовательностью, комплементарной 3` концам каждой из двух цепей определяемой ДНК. Праймеры получают *in vitro* химическим синтезом или выделяют из нуклеиновых кислот различных патогенных микроорганизмов.
- **Свободные нуклеотиды** (дезоксирибонуклеозидтрифосфаты 4-х типов с различными азотистыми основаниями) – необходимый материал для осуществления амплификации;
- **Фермент термостабильная ДНК-полимераза**, которая производит достройку комплементарных цепей ДНК из пула свободных нуклеотидов. Этот фермент выделяют из бактерий *Thermus aquaticus* или получают генноинженерным путем.

Сущность ПЦР состоит в том, что определяемая ДНК, находящаяся в тестируемом биологическом материале, подвергается денатурации. Затем праймеры 2-х типов в условиях отжига присоединяются, вследствие их комплементарности, к 3` концам каждой из антипараллельных цепей, восстанавливая на этом участке двухспиральную структуру ДНК. Праймеры служат «затравками» для последующей достройки цепей ДНК, осуществляющей термостабильной ДНК-полимеразой, которая использует для этой цели свободные нуклеотиды. В результате одного цикла ПЦР количество молекул определяемой ДНК удваивается (из одной матрицы ДНК образуется две копии), то есть происходит амплификация ДНК. Обычно проводят 25-40 повторных циклов амплификации и в итоге за 2-3 часа получают миллионы копий специфического фрагмента ДНК возбудителей инфекционных заболеваний (по формуле: 2^n , где n равно количеству циклов).

Этапы процесса ПЦР (рис. 2, 3). Полимеразную цепную реакцию проводят в 0,5-1,5 мл микроцентрифужных пробирках в амплификаторах, которые автоматически регулируют смену температуры. Каждому из 3-х этапов цикла амплификации – денатурации ДНК, отжига и достройки – необходима инкубация образцов при различном температурном режиме.

1. **Денатурация** – разъединение определяемой двухцепочечной ДНК на две изолированные цепи при нагревании до 90-95°C в течение 0,5-1,0 минут.

2. **Отжиг** – восстановление двухцепочечной структуры определяемой ДНК в области присоединения комплементарного праймера – проводится при температуре 40-60°C 0,5 минут.
3. **Удлинение (элонгация)** – достройка каждой цепи определяемой ДНК до исходного двухцепочечного состояния с помощью термостабильной ДНК-полимеразы – проводится при температуре 70-75°C в течение 2-5 минут.

Наличие ДНК после повторных циклов амплификации определяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, с использованием специфических радиоактивных или флюоресцентных олигонуклеотидных зондов или другими методами.

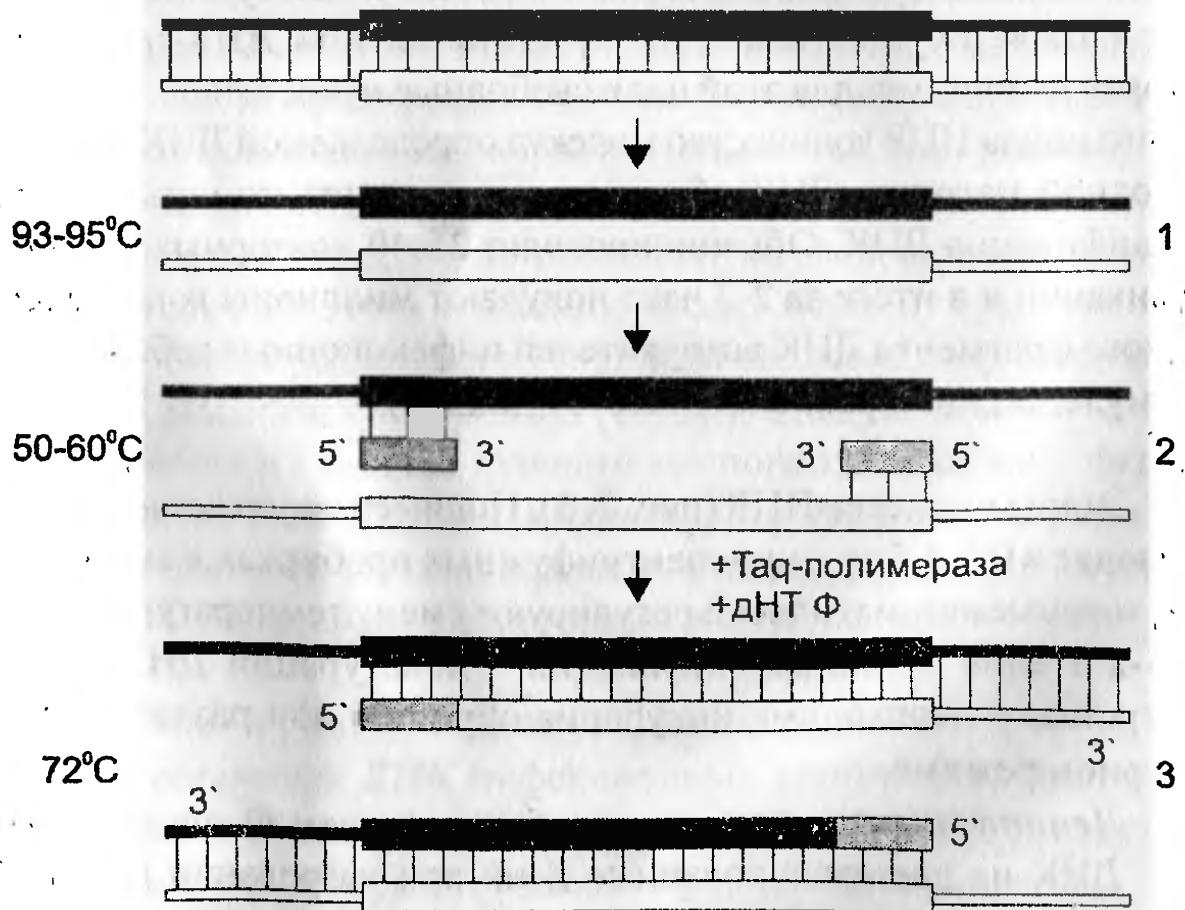
ПЦР – высокоспецифическая реакция: если исследуемый образец ДНК не комплементарен праймерам, то результат реакции отрицателен, в то время как выявление специфического участка ДНК указывает на присутствие возбудителя заболевания.

Рисунок 2

(А.С.Лабинская, Л.П.Блинкова, А.С.Ещина)

*Первый цикл процесса амплификации
искомого фрагмента ДНК возбудителя в ПЦР*

Искомый фрагмент ДНК-возбудителя

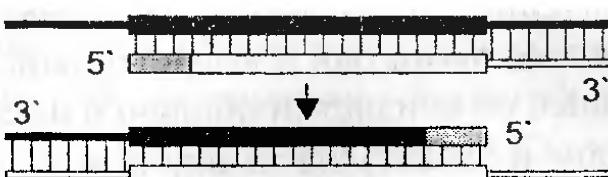


1 - денатурация двунитевой молекулы ДНК; 2 - присоединение или отжиг стартовых блоков (или праймеров) для последующего комплементарного достраивания нитей ДНК; 3 - комплементарное достраивание нитей ДНК с помощью фермента Таq-полимеразы и дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ).

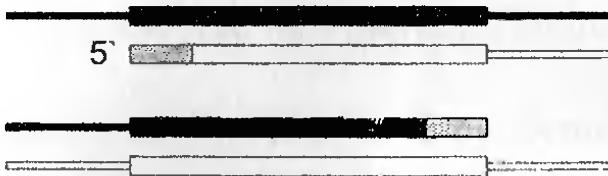
Рисунок 3

Второй и последующие циклы процесса амплификации искомого фрагмента ДНК возбудителя в ПЦР

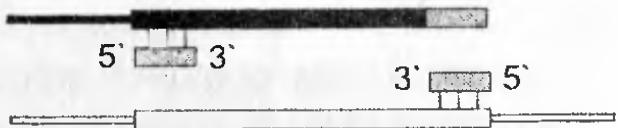
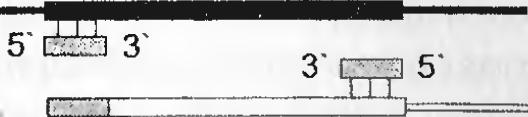
Удвоенные фрагменты ДНК,
полученные в первом
цикле амплификации



Денатурация



Отжиг праймеров



Достраивание цепи ДНК



Области применения ПЦР. ПЦР является высокочувствительным и специфическим молекулярно-генетическим методом исследования, позволяющим выявлять присутствие патогенных агентов в тестируемых биологических субстратах. Широко применяется ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний урологии, венерологии, акушерско-гинекологической практике, педиатрии и др. Особенno ценен этот метод в экспресс-диагностике ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов, урогенитальных инфекций различной этиологии, латентных вирусных инфекций.

Области применения ПЦР непрерывно расширяются. Методы постановки совершенствуются, предлагаются различные модификации, повышающие ее чувствительность.

8. Микроэкология тела человека

Подготовительная работа к занятию № 10:

Задание:

1. Сделать посевы микрофлоры пальцев рук, прикоснувшись пальцем к поверхности МПА на чашке. Рекомендуется на один сектор чашки приложить немытый палец, на другой - тот же палец, предварительно вымытый и высушенный.
2. Взять материал, со слизистой оболочки носовых ходов стерильным тампоном и засеять на чашку с желточно-солевым агаром (ЖСА) для выявления носительства патогенных стафилококков.

Контрольные вопросы по теме занятия

1. Генетический обмен у бактерий. Сущность и значение.
2. Трансформация, сущность. История открытия. Природа трансформирующего агента. Состояние компетентности у бактерий-реципиентов. Стадии трансформации. Значение трансформации.
3. Опыт трансформации по передаче устойчивости к стрептомицину у *Bacillus subtilis*. Определение частоты трансформации.
4. Трансдукция, сущность. История открытия. Типы трансдукции: неспецифическая (общая), специфическая, abortивная, их механизмы. Значение трансдукции.
5. Опыт специфической трансдукции у *Escherichia coli* по передаче локуса «gal⁺» с помощью умеренного фага λ. Определение частоты трансдукции.
6. Конъюгация у бактерий, сущность. История открытия. Донорные и реципиентные клетки, их отличия. Половой фактор F, его свойства.
7. Типы штаммов-доноров: F⁺, Hfr, F', их особенности, результаты скрещивания.
8. Стадии процесса конъюгации. Постановка опыта скрещивания Hfr x F⁻ у *E.coli*. Определение частоты конъюгации.
9. Понятие о генетической карте бактерии. Использование конъюгаций, трансформации и трансдукции для генетического картирования.
10. Внекромосомные факторы наследственности: плазмиды, свойства, функции, классификация. Значение. Примеры.
11. Внекромосомные факторы наследственности – транспозоны и Is-последовательности, функции, значение.
12. Генная инженерия, сущность. Векторы, типы векторов, их свойства. Этапы получения клеток с новыми свойствами. Области применения генной инженерии.
13. Молекулярно-генетические методы диагностики: полимеразная цепная реакция (ПЦР), молекулярная гибридизация.

Литература

1. А.А.Воробьев – Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Учебник. – М. МИА. 2004г.
2. А.А.Воробьев, А.С.Быков – Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М. МИА. 2003г.
3. Л.Б.Борисов – Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. Учебник. – М. МИА. 2002г.
4. Е.Г.Волина, Л.Е.Саруханова – Основы общей микробиологии, иммунологии и вирусологии. Учебное пособие. – М. Медицина. 2004г.
5. А.А.Воробьев – Полимеразная цепная реакция и ее применение в дерматовенерологии. – М. МИА. 2004г.
6. М.В.Гусев, Л.А.Минеева – Микробиология. Учебник. – М."Академия". 2003г.
7. В.Т.Емцев, Е.Н.Мишустин – Микробиология. Учебник. 5-е издание, переработанное и дополненное. – М. ДРОФА, 2005г.
8. Под редакцией А.М.Королюка, В.Б.Сбоячакова – Медицинская микробиология. Часть первая. Учебное пособие. – С.Пб. ЭЛБИ. 2002г.
9. А.И.Коротяев, С.А.Бабичев – Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. Учебник. – С.Пб. Спец.Лит. 2002г.
- 10.Под редакцией А.С.Лабинской, Л.П.Блинковой, А.С.Ещиной – Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. Учебное пособие. – М.Медицина. 2004г.
- 11.Под редакцией Й.Ленгелера, Г.Древса, Г.Шлегеля – Современная микробиология. Прокариоты. В 2-х томах. Учебник. – М."Мир". 2005г.
- 12.Под редакцией В.В.Теца – Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М.Медицина. 2002г.
- 13.Г.Стент. – Молекулярная генетика. – М. "Мир". 1974г.

Содержание

Введение	3
Раздел 1. Морфология микроорганизмов	4
Занятие 1. Тема: основные формы бактерий.	
Микроскопическое изучение микроорганизмов.....	4
Занятие 2. Тема: методы микроскопического изучения микроорганизмов. Методы окраски. Ультраструктура бактериальной клетки. Поверхностные структуры: капсула, клеточная стенка, жгутики, ворсинки.....	9
Занятие 3. Тема: ультраструктура бактериальной клетки (продолжение). Методы микроскопического изучения микроорганизмов (продолжение). Морфология спирохет.	21
Занятие 4. Тема: изучение морфологии отдельных групп прокариот (продолжение): актиномицет, риккетсий, хламидий, микоплазм и изучение морфологии микроскопических грибов.	33
Раздел 2. Физиология и биохимия бактерий	45
Занятие 5. Тема: питание микроорганизмов. Методы выделения чистых культур. Методы стерилизации. Методы определения количества бактерий.	45
Занятие 6. Тема: выделение чистых культур бактерий (продолжение). Ферменты бактерий. Методы изучения ферментативной активности бактерий.	69
Занятие 7. Тема: энергетический метаболизм микроорганизмов. Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов. Антибиотики. Методы определения чувствительности к антибиотикам.....	83

Раздел 3. Бактериофаги. Генетика бактерий.....	119
Занятие 8. Тема: бактериофаги. Фенотипическая и генотипическая изменчивость микроорганизмов.	
Мутации	119
Занятие 9. Тема: генетический обмен у бактерий:	
трансформация, трансдукция, конъюгация.	
Молекулярно-генетические методы, их практическое использование.	140