

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

**Методические указания по выполнению лабораторных работ по
дисциплинам «Микробиология с основами вирусологии» и
«Микробиология»**

Часть 2

Тула
Издательство ТулГУ
2016

УДК 581

Составили: М. А. Чепурнова, Е. В. Акатова, И. А. Нечаева

Методические указания по выполнению лабораторных работ по дисциплинам «Микробиология с основами вирусологии» и «Микробиология». Часть 2. Тула : Изд-во ТулГУ, 2016. – 70 с.

ISBN 978-5-7679-3358-7

ISBN 978-5-7679-3357-0 (Ч.2)

Приведены 25 лабораторных работ, выполнение которых будет способствовать усвоению студентами теоретического материала по курсам «Микробиология с основами вирусологии» и «Микробиология» очной, очно-заочной и заочной форм обучения. Направления подготовки 06.03.01 Биология, 19.03.01 Биотехнология.

Печатается по решению библиотечно-издательского совета
Тулльского государственного университета.

ISBN 978-5-7679-3358-7
ISBN 978-5-7679-3356-0 (Ч.2)

© М. А. Чепурнова,
Е. В. Акатова
И. А. Нечаева, 2016.
© Издательство ТулГУ, 2016

Оглавление

РАЗДЕЛ 6: КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ	5
Лабораторная работа № 15.....	5
Культуральные свойства микроорганизмов	5
Лабораторная работа № 16.....	12
Биохимические свойства микроорганизмов	12
Лабораторная работа № 17.....	20
Определение антибиотической активности микроорганизмов	20
РАЗДЕЛ 7: ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ	27
Лабораторная работа № 18.....	28
Генетика микроорганизмов. Перенос генетической информации у бактерий: конъюгация	28
Лабораторная работа № 19.....	31
Генетика микроорганизмов. Перенос генетической информации у бактерий: трансдукция	31
РАЗДЕЛ 8: БАКТЕРИОФАГИ.....	35
Лабораторная работа № 20.....	35
Бактериофаги.....	35
Лабораторная работа № 21.....	39
Выращивание Т-четных бактериофагов и Титрование фага методом агаровых слоев	39
РАЗДЕЛ 9: САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	45
Лабораторная работа № 22.....	45
Микрофлора воздуха.....	45
Лабораторная работа № 23.....	50
Микрофлора организма человека	50

РАЗДЕЛ 10: ОСНОВЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ.....	57
Лабораторная работа № 24.....	57
Серологические реакции.....	57
Лабораторная работа № 25.....	65
Моделирование процесса возникновения эпидемии на примере культуры пекарских дрожжей.....	65
Литература	69

РАЗДЕЛ 6: КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторная работа № 15 Культуральные свойства микроорганизмов

Цель работы: выявить и описать культуральные свойства различных микроорганизмов.

Материалы и оборудование: исследуемые культуры микроорганизмов на плотной питательной среде, микробиологические петли, спиртовки, микроскоп.

Основные положения

К культуральным свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

1. Рост на плотных питательных средах.

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

Колония – изолированное скопление клеток одного вида, выросшее из одной клетки.

В зависимости от того, где развивались клетки – на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда – различают колонии:

- поверхностные;
- глубинные;

- донные.

Образование поверхностных колоний – это существенная особенность роста многих микроорганизмов на плотном субстрате. Колонии отличаются большим разнообразием и при их описании учитывают следующие признаки (рис. 29-32):

1) форма – округлая, амебовидная, неправильная, ризонидная и др.;

2) размер (диаметр) – измеряют в мм; если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;

3) поверхность – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами, радиально исчерченная;

4) профиль – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и др.;

5) блеск и прозрачность – блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная и др.;

6) цвет – бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная и др.; отмечают выделение в субстрат пигмента; при описании колонии актиномицетов отмечают пигментацию воздушного и субстратного мицелия;

7) край – ровный (гладкий), волнистый, зубчатый, лопастной и др.;

8) структура – однородная, мелко-, крупнозернистая, струйчатая (*край и структуру определяют с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа*);

9) консистенция – определяют, прикасаясь к поверхности петлей – легко снимается с агара, плотная, мягкая или растаявшая в

агар, слизистая (прилипает к петле), тягучая, имеет вид пленки, хрупкая (легко ломается при прикосновении петлей).

Глубинные колонии более однообразные. По виду, как правило, они похожи на сплюсненные чечевички или пучки ваты с нитевидными выростами. Их образование часто сопровождается разрывом среды вследствие выделения CO_2 или других газов.

Донные колонии обычно имеют вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

Размеры и некоторые другие особенности колонии могут изменяться с возрастом и зависят от состава среды. Поэтому при их описании указывают возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

2. Рост в жидких питательных средах.

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах более однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка (рис. 33).

Основные характеристики:

1) степень помутнения – слабая, умеренная, сильная;
2) особенности пленки – тонкая, плотная, рыхлая, гладкая, складчатая;

3) осадок – скудный, обильный, плотный, рыхлый, слизистый, хлопьевидный.

4) Рост микроорганизмов может сопровождаться появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Выделение газа обнаруживают по образованию пены, пузырьков или с помощью «поплавок» (маленькая, запаянная с одного конца трубочка, которую помещают в пробирку запаянным концом вверх перед стерилизацией и

следят, чтобы она была заполнена средой полностью; при выделении газа, он скапливается в поплавке) (рис.34).

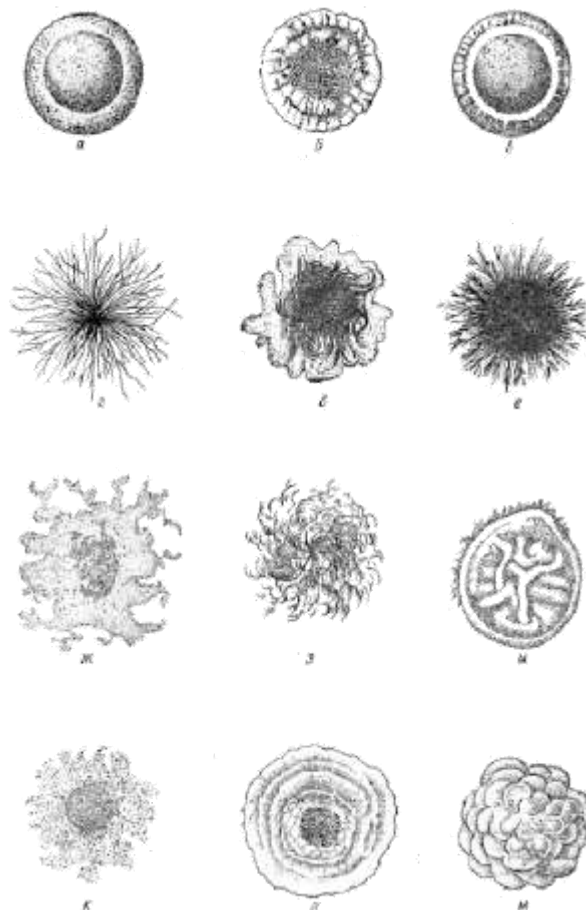


Рисунок 29. Форма колоний: а – круглая; б - круглая с фестончатым краем; в - круглая с валиком по краю; г, д – ризоидные; е – с ризоидным краем; ж – амёбовидная; з – нитивидная; и - складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная.

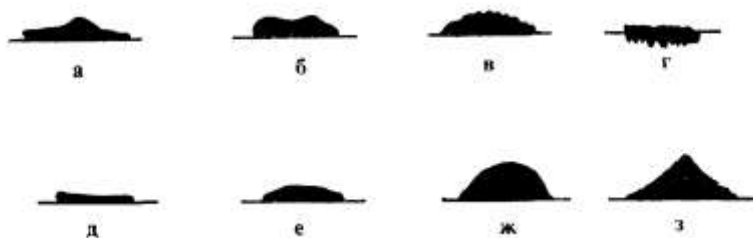


Рисунок 30. Профиль колоний: а – изогнутый, б – кратерообразный, в – бугристый, г – растающий в субстрат, д – плоский, е – выпуклый, ж – каплевидный, з – конусовидный

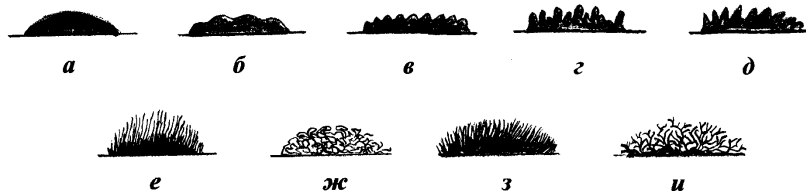


Рисунок 31. Край колоний: а – гладкий, б – волнистый, в – зубчатый, г – лопастной, д – неправильный, е – реснитчатый, ж – нитчатый, з – ворсинчатый, и – ветвистый

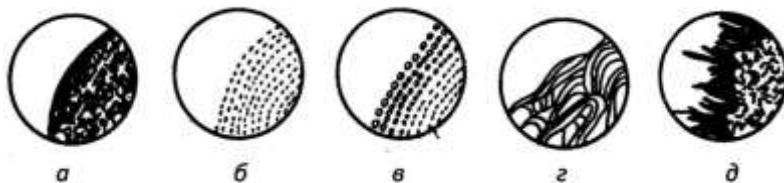


Рисунок 32. Структура колоний: а – однородная, б – мелкозернистая, в – крупнозернистая, г – струйчатая, д – волокнистая

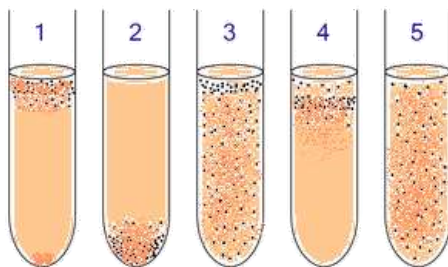


Рисунок 33. Рост микроорганизмов в жидкой среде. 1 – рост на поверхности среды, образование пленки, 2 – рост на дне пробирки (образование осадка), 3 – рост в основном на поверхности среды, но и в толще среды, 4 – рост в микроаэрофильной части среды (ближе к поверхности среды), 5 – равномерный рост по всей толще среды.

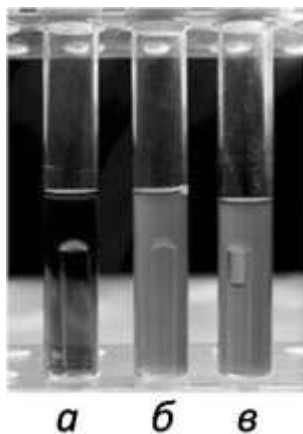


Рисунок 34. Обнаружение газа при росте микроорганизмов в жидкой среде: а – роста микроорганизмов не наблюдается, б – рост микроорганизмов (помутнение среды) без образования газа, в – рост микроорганизмов (помутнение среды) с образованием газа (пузырек газа в поплавке).

Задания

1. Рассмотреть колонии микроорганизмов на твердых питательных средах, выявить основные характеристики.
2. Заполнить таблицу 9.
3. Сделать вывод, где перечислить отличительные признаки исследуемых микроорганизмов.

Таблица 9. Основные культуральные признаки колоний микроорганизмов

Название микроорганизмов	<i>E. coli</i>	<i>Ps. putida</i>
Культуральные свойства				
Цвет				
Размер, мм/сутки				
Форма				
Поверхность				
Профиль				
Край				
Структура				
Консистенция				
Блеск, прозрачность				

Контрольные вопросы

1. Какие свойства микроорганизмов называют культуральными?
2. Как могут расти микроорганизмы на плотных питательных средах?

3. Что называют колонией?
4. Какие признаки учитывают при описании поверхностных колоний, глубинных и донных?
5. Как характеризуют рост микроорганизмов в жидких питательных средах?

Лабораторная работа № 16

Биохимические свойства микроорганизмов

Цель работы: изучить биохимические свойства различных микроорганизмов.

Материалы и оборудование: чистые культуры исследуемых микроорганизмов, микробиологические петли, автоматические пипетки со стерильными наконечниками, спиртовки, набор дифференциально-диагностических питательных сред.

Основные положения

Биохимическая активность микроорганизмов чрезвычайно разнообразна. Она обусловлена богатством у них специфических ферментативных систем и условиями среды. В медицинской микробиологии изучение биохимических свойств микробов является одним из основных дифференциально-диагностических методов для точного распознавания возбудителя болезни.

Для биохимической дифференциации микробов, как правило, изучаются их способность:

- 1) сбраживать углеводы с образованием кислоты или кислоты с газом;

- 2) разлагать белковые продукты;
- 3) редуцировать краски.

Для обнаружения этих свойств пользуются посевом микроорганизмов на дифференциально-диагностические питательные среды. Результат реакции определяется при помощи добавляемых в питательную среду различных индикаторов, дающих в большинстве случаев цветные реакции. Метод посева микробов на дифференциально-диагностические среды называется «пестрый ряд».

Задания

А). Сбраживание углеводов:

1) створаживание молока: молоко засеять кишечной палочкой, поставить в термостат при температуре 37 °С, через сутки провести наблюдение, сделать выводы;

2) использование среды Эндо: среду Эндо разлить в чашки Петри, методом штриха провести посев кишечной палочки, поставить в термостат для инкубирования, через 2-3 суток провести наблюдение, сделать выводы;

3) использование углеводов и спиртов: в стерильные пробирки разлить по 10 мл среды, содержащей в качестве основного фона пептон (5 г/л) и K_2HPO_4 (1 г/л), углеводы (в конечная концентрация 1%) и индикатор – бромкрезолпурпур (конечная концентрация 0,003%), изменяющий цвет от пурпурного к желтому в интервале рН 6,8 – 5,2. На дно каждой пробирки опустить поплавочек. Среда засеять суспензией клеток микроорганизмов и инкубировать до 5 суток при соответствующей температуре. Заполнить таблицу 10и сделать вывод по работе.

Таблица 10. Результаты наблюдений

Название микроорганизма	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Биохимические свойства				
Рост на углеводах:				
Ксилоза				
Глюкоза				
Маннит				
.....				
Образование газа в поплавке				
Ксилоза				
Глюкоза				
Маннит				
.....				
Изменение цвета индикатора (бромкрезолпурпур) при росте на углеводах:				
Ксилоза				
Глюкоза				
Маннит				
.....				

Б). Расщепление белков, являющееся одной из стадий круговорота азота в природе, сопровождается образованием аммиака, индола и выделением сероводорода. Для обнаружения этих веществ в стерильные пробирки разлить по 10 мл соответствующих сред, провести посев исследуемых микроорганизмов. Пробирки закрыть ватными пробками. Пробки завернуть в полиэтилен, чтобы затруднить улетучивание газа. Пробирки поставить на культивирование при соответствующей температуре. Результаты эксперимента занести в таблицу.

1) обнаружение аммиака: В качестве среды используют 4% пептонную воду (пептон – 40 г/л, Na_2HPO_4 – 2 г/л, NaCl – 5 г/л) после того как культура вырастет, делают качественную реакцию на аммиак с реактивом Несслера. На предметное стекло помещают несколько капель культуральной жидкости и добавляют к ним каплю реактива Несслера. В присутствии следов аммиака жидкость окрашивается в желтый цвет, при большом количестве аммиака образуется коричневый осадок.

2) обнаружение сероводорода: в пробирки с МПБ (мясной пептон – 10 г/л, мясной экстракт – 10 г/л, NaCl – 5г/л), содержащем раствор цистеина (0,01% добавить после автоклавирования среды), провести посев исследуемых микроорганизмов. После посева под ватной пробкой укрепить узкую стерильную полоску фильтровальной бумаги, смоченной раствором уксуснокислого свинца. Полоски не должны прикасаться к питательной среде.

3) проба на индол: В качестве среды для выявления образования индола в пробирки с МПБ (пептон – 10 г/л, мясной экстракт – 10 г/л, NaCl – 5г/л), содержащем раствор триптофана (0,01% добавить после автоклавирования среды). После того как культура вырастет, проводят качественную реакцию на индол с реактивом Эрлиха (или Ковача). Для этого на поверхность среды, не перемешивая, помещают 1 мл реактива Эрлиха (или Ковача); появление красной окраски свидетельствует об образовании индола.

- заполнить таблицу 11 и сделать вывод по работе

Таблица 11. Результаты наблюдений

<div> <div>Название микроорганизма</div> <div>Биохимические свойства</div> </div>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Цвет пробы с реактивом Несслера				
Выделение аммиака				
Цвет бумаги, смоченной $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$				
Выделение сероводорода				
Цвет пробы с реактивом Эрлиха (или Ковача)				
Выделение индола				

В) Определение внеклеточных ферментов.

Высокомолекулярные соединения (полисахариды, белки, липиды и др.) не могут проникать через мембрану клетки и подвергаются расщеплению экзоферментами бактерий, относящихся к классу гидролаз. Ферменты катализируют гидролиз полимера до растворимых продуктов, обычно димеров или мономеров, которые поступают в клетку с помощью специфических транспортных механизмов. Образование экзоферментов широко распространено среди различных групп микроорганизмов.

1) Амилолитическая активность. Крахмал подвергается гидролитическому расщеплению под действием амилаз, активными

продуцентами которых являются различные виды бацилл, псевдомонад, мицелиальных грибов (рис.35).

В чашки Петри с питательной средой (пептон – 10,0 г/л; K_2HPO_4 – 5,0 г/л; растворимый крахмал – 2,0 г/л; агар – 15,0 г/л; pH = 6,8 – 7,0) провести посев исследуемых микроорганизмов штрихом. После культивирования на поверхность среды налить 3-5 мл раствора Люголя. Зону гидролиза крахмала измерить от края штриха (колонии) до границы светлой зоны. Результаты записать в таблицу 12, сделать выводы.

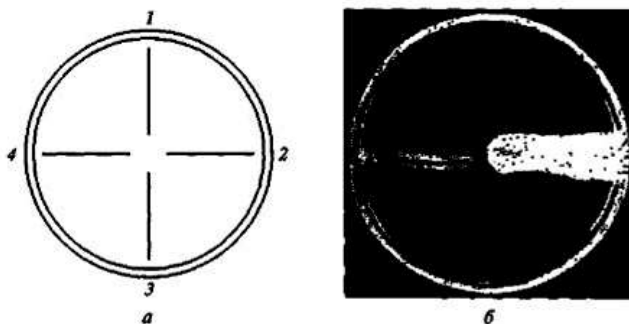


Рисунок 35. Определение амилалитической активности: а – схема посева, б – среда с культурами после обработки раствором Люголя

Таблица 12. Результаты наблюдений

Название микроорганизма	Размер зоны гидролиза, мм
<i>E. coli</i>	
<i>Ps. putida</i>	
.....	
.....	

2) Протеолитическая активность. Протеазы катализируют расщепление белков на поли- и олигопептиды. Они выделяются различными видами бацилл, актиномицетов, стафилококка, мицелиальных грибов.

Исследуемые микроорганизмы посеять в пробирки с мясопептонной желатиной (на 100 мл МПБ – 10-15 г желатины). Посев провести уколом. Культивирование провести при комнатной температуре 7-10 суток. Разжижение желатины отметить визуально, указать интенсивность и форму разжижения (рис. 36). Заполнить таблицу 13, сделать выводы.

Таблица 13. Результаты наблюдений

Название микроорганизма	Интенсивность разжижения желатины	Форма разжижения желатины
<i>E. coli</i>		
<i>Ps. putida</i>		
.....		

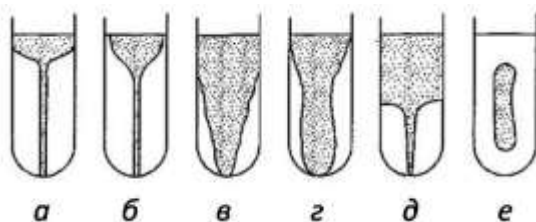


Рисунок 36. Схема разжижения желатины микроорганизмами при посеве уколом:

а – кратеровидное, б – реповидное, в – воронковидное, г – мешковидное, д – послойное, е - пузырьевидное

Г) Редукция красящих веществ.

Редуцирующая способность микроорганизмов определяется их отношением к определенным органическим краскам, которые они переводят в бесцветные лейкопродукты (метиленовая синяя, лакмус, нейтральная красная и др.).

Растворы красок добавить к питательной среде МПА (0,001%) и провести посев уколом исследуемых микроорганизмов. Наблюдать за постепенным обесцвечиванием краски по ходу укола. Сделать вывод по работе.

Контрольные вопросы

1. Какие способности микроорганизмов изучают для биохимической дифференциации микробов?
2. Как проводят изучения биохимических свойств микроорганизмов?
3. Как узнать способность микроорганизма использовать углеводы и спирты в качестве источников углерода и энергии?
4. Какие биохимические свойства можно выявить при расщеплении белков микроорганизмами?
5. Как установить выделение аммиака, сероводорода и индола при росте микроорганизмов на субстратах?
6. К какому классу относятся экзоферменты? Зачем бактериям экзоферменты?
7. Каким способом можно установить амилалитическую активность микроорганизмов?
8. В чем заключается дифференциально-диагностический тест на разжижение желатины? Как с помощью этого теста можно различить микроорганизмы?

9. В результате каких процессов происходит редукция красящих веществ?

Лабораторная работа № 17

Определение антибиотической активности микроорганизмов

Цель работы: определить чувствительность микроорганизмов к действию различных антибиотиков методом дисков и методом минимальной ингибирующей концентрации.

Материалы и оборудование: чистые культуры микроорганизмов в жидкой среде LB, стерильные чашки Петри, агаризованная среда LB, диски, пропитанные различными антибиотиками, спирт, стеклянный шпатель, автоматические пипетки, пинцеты, горелка, физраствор, стерильные пробирки.

Основные положения.

Антибиотики - обширный класс фармацевтических соединений, синтез которых осуществляются микроорганизмами.

Антибиотики способны тормозить рост и вызывать гибель бактерий и других микробов. Противомикробное действие антибиотиков имеет избирательный характер: на одни организмы они действуют сильнее, на другие - слабее или вообще не действуют. Некоторые антибиотики представляют значительный интерес для химиотерапии и могут применяться для лечения различных микробных инфекций у человека и животных.

Способностью вырабатывать антибиотики обладают не все микроорганизмы, а лишь некоторые штаммы отдельных видов. Так

пенициллин образует некоторые штаммы *Penicillium notatum* и *P. chrysogenum*, а стрептомицин - определенный штамм *Streptomyces griseus*, тогда как другие штаммы тех же видов либо вообще не вырабатывают антибиотики, либо вырабатывают, но другие. Существуют также различия между штаммами - продуцентами антибиотиков, причем эти различия могут быть количественными или качественными. Один штамм, например, дает максимальный выход данного антибиотика, когда культура растет на поверхности среды, и находится в стационарных условиях, а другой - когда его культура погружена в среду и постоянно встряхивается. Некоторые микроорганизмы выделяют не один, а несколько антибиотиков. Так, *Pseudomonas aeruginosa* образует пиоцианазу, пиоцианин, пиолипоевую кислоту и другие пио-соединения. Один и тоже антибиотик может продуцироваться микроорганизмами разного рода. Так глиотоксин образуют виды *Gliocladium* и *Trichoderma*.

1. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам диско-диффузионным методом.

Чашки Петри с агаризованной средой засевают исследуемой культурой микроорганизма сплошным газоном. Бумажные диски, пропитанные определенным антибиотиком, на равном расстоянии друг от друга раскладывают по периферии чашки. Антибиотики, диффундирующие в толщу агара, предотвращают или задерживают рост чувствительных к ним культур микроорганизмов, что появляется в образовании вокруг соответствующих дисков зоны угнетения роста, четко выделяющейся на фоне сплошного газона роста тестируемой культуры (рис. 37). Величина зоны угнетения определяет степень чувствительности микроорганизмов к антибиотику (табл. 14).



Рисунок 37. Определение зоны угнетения определяет степень чувствительности микроорганизмов к данному антибиотику:

Таблица 14. – Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам в зависимости от зоны задержки роста

Диаметр зоны задержки роста, мм	Степень чувствительности к антибиотику
Более 25	Высокочувствительные
15 – 25	Чувствительные
10 – 14	Малочувствительные
Менее 10 и полное отсутствие	Устойчивые

Задания

1. Разогреть питательную среду LB и разлить по чашкам Петри.
2. Взять суточную культуру исследуемого микроорганизма и нанести 50 мкл на чашку со средой, растереть культуру стеклянным шпателем, сделав сплошной газон.
3. Разложить диски, пропитанные разными антибиотиками по периметру чашки (рис. 36).
4. Поставить чашки в термостат для культивирования на 5-7 дней при температуре 28°C.
5. Измерить зону лизиса бактерий и результаты опыта занести в таблицу 15.
6. Сделать выводы по работе.

Таблица 15. Результаты эксперимента

Название микроорганизма	Размер зоны лизиса / чувствительность	Антибиотики			
		Гентамицин	Рифампицин	Канамицин	...
<i>E. coli</i>	Размер зоны лизиса, мм				
	Чувствительность				
<i>Pseudomonas</i> sp.	Размер зоны лизиса, мм				
	Чувствительность				
.....				

2. Определение чувствительности микроорганизмов методом минимальной ингибирующей концентрации

Критериями активности того или иного препарата выступают:

1. Минимальная ингибирующая концентрация (МИС) – наименьшая концентрация препарата, тормозящая рост тест-культуры;
2. Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) – наименьшая концентрация препарата, вызывающая бактерицидный эффект.

Метод серийных разведений в жидких средах позволяет установить МИС препарата для выделенного возбудителя, т.е. МИС определяют по минимальной концентрации антибиотика, задерживающего видимый рост микроорганизма в пробирках или на чашке Петри с питательной средой, содержащей убывающие концентрации антибиотика.

Для этого готовят двукратно убывающие концентрации антибиотика в стандартном питательном бульоне. Контролями культуры и антибиотика является бульон без антибиотика и с первым разведением антибиотика (в физрастворе). В опытные и контрольные пробирки вносят суспензию молодой культуры микроорганизма и после суточной инкубации учитывают результат. Учетным признаком является наличие или отсутствие мутности бульона в пробирках. Величина МИС соответствует той минимальной концентрации препарата, при которой мутность в пробирке отсутствует. Этот метод является точным количественным методом. Применяется он в научной работе и в особо важных случаях в лабораториях больниц.

Задания

1. Приготовить серию двукратных разведений исследуемого антибиотика в жидких средах, последняя пробирка – отрицательный контроль (среда без антибиотика);

2. Засеять культуру микроорганизмов в каждую пробирку (по 50 мкл суспензии культуры);
3. Пробирки поставить в термостат при температуре 28 °С на сутки;
4. Провести учет результатов, заполнить таблицу 16, сделать выводы.

Таблица 16. Результаты эксперимента по определению МИС антибиотиков

№ п р- к и	Название микроорганизма 1				Название микроорганизма 2			
	Антибиотик 1		Антибиотик 2		Антибиотик 1		Антибиотик 2	
	Концентрация	Наличие роста	Концентрация	Наличие роста	Концентрация	Наличие роста	Концентрация	Наличие роста
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								

Контрольные вопросы

1. Какие соединения относят к антибиотикам?
2. Одинаково ли антибиотики действуют на все микроорганизмы?
3. Все ли микроорганизмы вырабатывают антибиотики? Приведите примеры.

4. В чем может заключаться различие у штаммов продуцентов?
Приведите примеры.
5. Могут ли разные организмы вырабатывать один антибиотик?
Приведите примеры.
6. Какими методами определяют чувствительность микроорганизмов к антибиотикам?
7. В чем состоит различие между минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентрациями антибиотика?
8. Каким методом можно определить минимальную ингибирующую концентрацию?
9. Как определить минимальную бактерицидную концентрацию?

РАЗДЕЛ 7: ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Генетический аппарат прокариот представлен у большинства групп прокариот одной кольцевой молекулой ДНК. В определенных условиях в клетке может находиться несколько копий бактериальной хромосомы. ДНК содержится также во внехромосомных генетических элементах плазмидах, в большинстве случаев кольцевых, автономно реплицирующихся небольших молекулах.

Совокупность всех генов организма называют генотипом, а совокупность присущих организму признаков — фенотипом. Спецификой генетических исследований микроорганизмов является изучение свойств не отдельной особи (клетки), а популяции в целом (микробной культуры).

Наследственную изменчивость у прокариотических микроорганизмов вызывают рекомбинации генетического материала трех основных типов: трансформация, конъюгация и трансдукция, широко используемые в генетических экспериментах.

Общим свойством всех трех процессов является их односторонность, т.е. одна клетка всегда выступает в роли донора ДНК, а другая в роли реципиента. Взаимного (реципрочного) обмена генетической информацией у бактерий не происходит.

В экспериментальной работе наиболее часто используют методы, основанные на процессах трансформации и конъюгации.

Лабораторная работа № 18

Генетика микроорганизмов. Перенос генетической информации у бактерий: конъюгация

Цель работы: изучить способы переноса генетического материала в бактериальную клетку методом конъюгации.

Материалы и оборудование: чистые культуры донора (F⁺) и реципиента (F⁻) в пробирках, стерильные пробирки, автоматические пипетки со стерильными наконечниками, спиртовки, чашки Петри с селективной питательной средой, термостат.

Основные положения

Конъюгация – однонаправленный перенос части генетического материала (плазмиды, бактериальной хромосомы) при контакте двух бактериальных клеток.

Этот процесс имеет большое значение в природе, т.к. способствует обмену полезными признаками при отсутствии истинного полового процесса. Возможность клетки стать донором определяется специфическим половым фактором – F-фактором.

F⁺ – клетка-донор;

F⁻ – клетка- реципиент.

Наличие в F⁺- клетки F-плазмиды обуславливает образование на поверхности клетки одной – двух половых фимбрий (F-пили), которые способствуют соединению клетки-донора с клеткой-реципиентом.

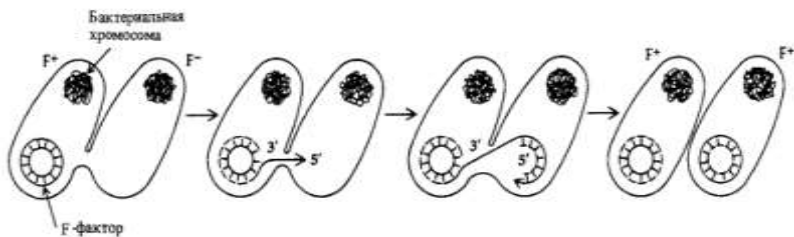


Рисунок 38. Схема процесса конъюгации у бактерий

Механизм конъюгации:

1. Прикрепление клетки – донора к реципиенту с помощью F-пили;
2. Формирование между клетками конъюгационного мостика;
3. Передача F-фактора и других плазмид в реципиентную клетку (рис. 38). Плазмидой кодируется *эндонуклеаза*, разрезающая одну из нитей её ДНК в определённой точке. Затем разрезанная цепь раскручивается и 5'-концом переносится в клетку-реципиент. Перенос идёт через поры в клеточной стенке. В первом сегменте поступающей в клетку реципиента нити ДНК расположены антирестрикционные гены, обеспечивающие накопление белков, блокирующих процесс разрушения ДНК *рестриктазами*. Наконец, переданная цепь замыкается в кольцо и на её основе восстанавливается двунитевая структура ДНК плазмиды. Весь процесс длится несколько минут. При попадании F-фактора в клетку – реципиент, она становится F⁺ и приобретает способность передавать F-фактор другим клеткам. В результате переноса F-фактора из клетки-донора в клетку-реципиента получается рекомбинант или трансконъюгант.

F-плазмида может включаться в определенные места бактериальной хромосомы и становиться ее частью, образуя Hfr-

штамм (*High frequency of recombination*– высокая частота рекомбинации). При конъюгации Hfr-штамма с клеткой-реципиентом F-фактор не передается, а передается определенная часть генов хромосомы бактерии.

Задания.

1. Внести в стерильную пробирку по 1 мл культуры донора и реципиента.
2. Пробирку закрыть пробкой и поставить в термостат не менее чем на 30 мин. при температуре 37 °С.
3. Чашку Петри со специфической питательной средой (отсутствуют в составе аминокислоты триптофан (Trp-), лейцин (Leu-) и тирозин (Tyr-)) разделить на 3 сектора, обозначив каждый согласно схеме (рис. 39).
4. В каждый сектор чашки провести посев 30 мкл культуры из соответствующей пробирки, растереть стеклянным шпателем.
5. Чашки поставить в термостат для культивирования при температуре 37 °С на 1-2 суток.
6. Сделать выводы по работе.

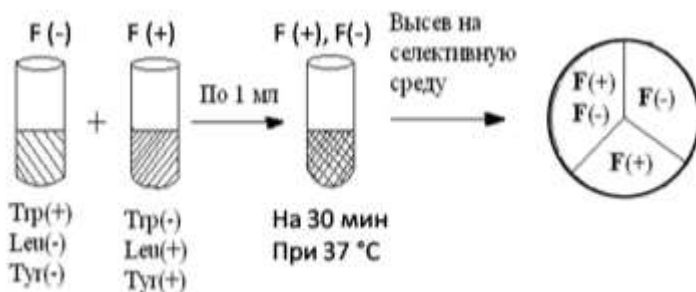


Рисунок 39. Схема опыта

Контрольные вопросы

1. Какой процесс называют конъюгацией?
2. Какой процесс называют конъюгацией?
3. Чем определяется возможность клетки стать донором?
4. Как клетку-донора можно отличить от клетки-реципиента?
5. В чем заключается механизм конъюгации? Перечислите все этапы.
6. Как называют штамм микроорганизма, который получается в результате конъюгации?
7. Как получают Hfr-штамм?
8. Что получает рекомбинант при конъюгации Hfr-штамма с клеткой-реципиентом F-фактор?

Лабораторная работа № 19

Генетика микроорганизмов. Перенос генетической информации у бактерий: трансдукция

Цель работы: изучить способы переноса генетического материала в бактериальную клетку методом трансдукции.

Материалы и оборудование: фаголизат *E. coli lac*⁺, культура *E. coli lac*⁻, стерильные пробирки, автоматические пипетки со стерильными наконечниками, спиртовки, чашки Петри со средой Эндо, термостат.

Основные положения

Фаговая инфекция может служить механизмом обмена генетическим материалом между бактериями. Трансдукция – перенос генетического материала от одной бактериальной клетки к другой посредством бактериофага (рис. 40).

Выделяют 3 типа трансдукции:

- *неспецифическая трансдукция*: передача различных фрагментов ДНК от бактерии – донора к реципиентам с помощью фагов. Фрагмент включается в гомологическую область ДНК в реципиенте при рекомбинации.

- *специфическая трансдукция*: фаги переносят только определенные гены, т.к. ДНК фага соединяется со строго определенными бактериальными генами, расположенными на хромосоме клетки – донора.

- *абортивная трансдукция*: перенесенный фагом фрагмент хромосомы клетки – донора не включается в хромосому клетки – реципиента, а располагается в ее цитоплазме автономно. При делении клетки этот фрагмент может передаваться только одной из двух дочерних клеток, т.о. утрачивается в потомстве.

Задания

1. В стерильные чашки Петри разлить среду Эндо. Чашки со средой подсушить.
2. В стерильную пробирку поместить по 1 мл фаголизата *E. coli lac*⁺ и суточной культуры *E. coli lac*⁻ (рис. 41).
3. Пробирку поместить в термостат не менее чем на 60 мин. при температуре 37 °C.

4. Чашку Петри разделить пополам и в одну половину внести и растереть стеклянным шпателем 30 мкл культуры *E. coli* lac⁻, а в другую – 30 мкл содержимого пробирки после инкубации.
5. Чашки поставить в термостат для культивирования при температуре 37 °С на 1-2 суток.
6. Сделать выводы по работе.

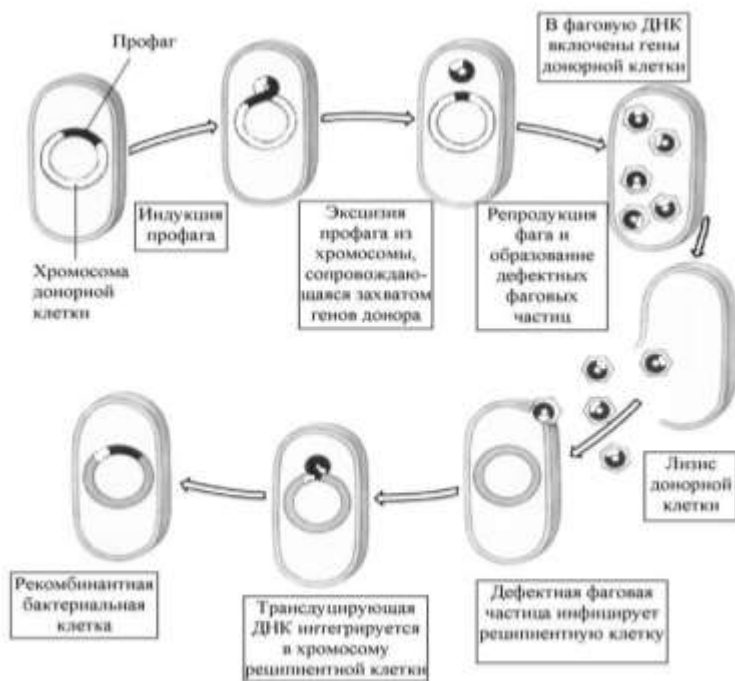


Рисунок 40. Этапы трансдукции

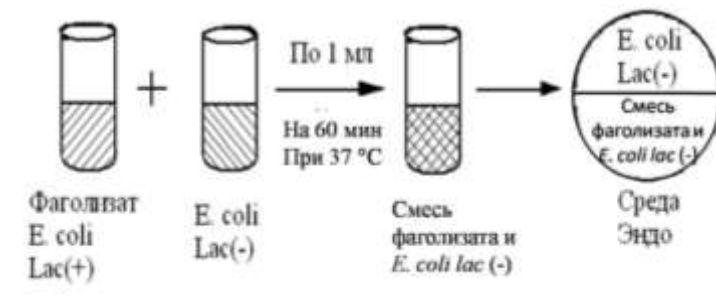


Рисунок 41. Схема опыта

Контрольные вопросы

1. Каким образом фаговая инфекция может служить механизмом обмена генетическим материалом между бактериями?
2. Какой процесс называют трансдукцией?
3. Какие типы трансдукции выделяют?

РАЗДЕЛ 8: БАКТЕРИОФАГИ

Лабораторная работа № 20

Бактериофаги

Цель работы: изучить действие бактериофага на чистую культуру микроорганизмов.

Материалы и оборудование: чистая культура микроорганизма, культура бактериофага, автоматические пипетки со стерильными наконечниками, спиртовки, чашки Петри со средой LB, термостат.

Основные положения

Бактериофаги (фаги) (с греч. "пожираю") - вирусы, избирательно пожирающие бактериальную клетку. Размер фагов достигает от 20 до 200 нм.

Бактериофаг был открыт канадским ученым Феликсом Эрлемом в 1917 году.

Бактериофаги - удобная модель для расшифровки генетического кода, изучения тонкой структуры гена, молекулярных механизмов мутагенеза, влияния ионизирующего излучения и других факторов на наследственные структуры организма. Система «фаг - бактериальная клетка» является идеальным объектом для изучения взаимоотношений вируса и клетки, в частности онкогенеза. Бактериофаги используют в генетической инженерии, для диагностики и лечения различных инфекционных болезней.

В зависимости от наличия и характера основных структурных компонентов (рис. 42) – головки и отростка – бактериофаги подразделяются на морфологические типы, в пределах которых, в свою очередь, возможны различные варианты, что делает мир бактериофагов очень разнообразным (рис. 43).

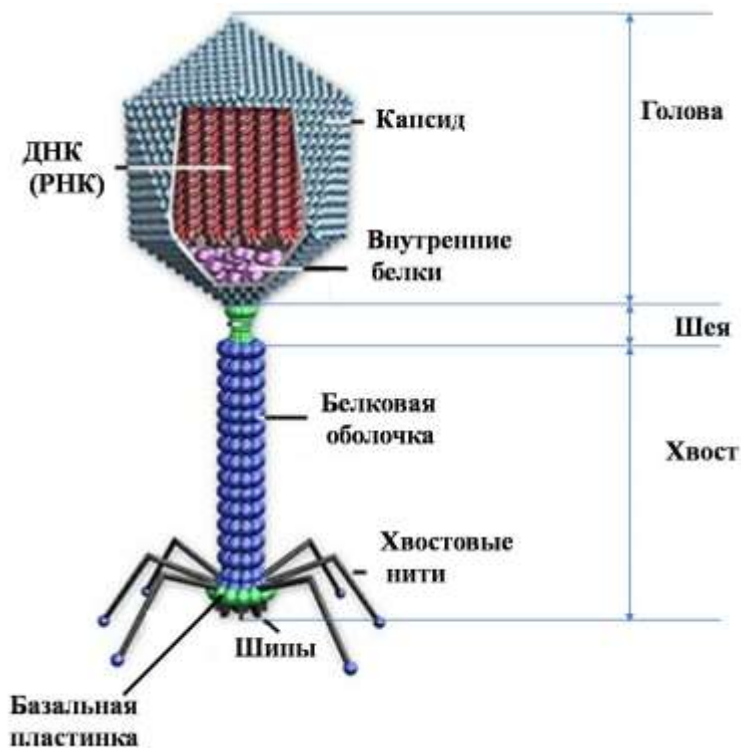


Рисунок 42. Схематическое строение бактериофага

Действие фага осуществляется следующим образом: фаг приближается к бактерии и хвостовые нити его связываются с рецепторными участками на поверхности бактериальной клетки.

Хвостовые нити изгибаются, а шипы и базальная пластинка прикрепляются к поверхности клетки. Хвостовая оболочка сокращается, и полый стержень проникает в клетку. В базальной пластинке находится фермент лизоцим, растворяющий клеточную оболочку бактериальной клетки. В результате ДНК или РНК вводится внутрь бактериальной клетки. Фаг инактивирует ДНК и РНК хозяина (происходит трансдукция) и подчиняет себе клеточный аппарат синтеза белка.

Нуклеиновая кислота фага реплицируется и образуются новые частицы фага. Под действием лизоцима клеточная оболочка лопается и новообразовавшиеся фаги высвобождаются, инфицируя другие бактерии. Весь цикл размножения бактериофага занимает 30 -40 мин, в результате может образоваться до 200 фаговых частиц.

Выявить бактериофаги можно при нанесении содержащего их материала на плотные питательные среды, засеянные чувствительной бактериальной культурой на которой появляются зоны лизиса бактерий - стерильные пятна, негативные колонии (рис. 44).

Важным свойством фагов, на котором основана фагодиагностика, является их специфичность, они лизируют культуры определенного вида, более того, существуют так называемые типовые бактериофаги, лизирующие варианты вида бактерий.

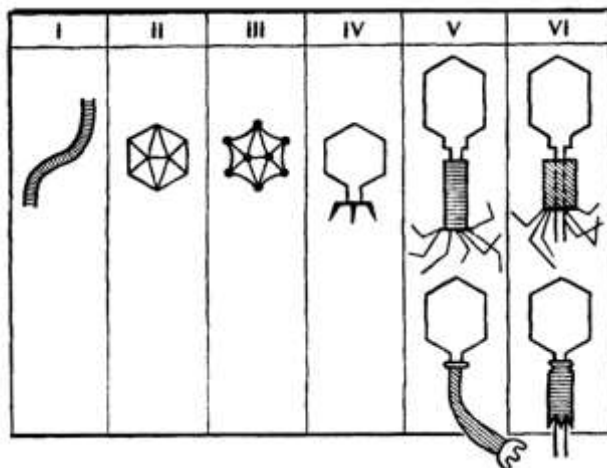


Рисунок43. Морфология бактериофагов. I –нитевидные фаги, II – фаги без отростка, III – фаги с аналогом отростка, IV – фаги с коротким отростком, V – фаги с несокращающимся отростком, VI - фаги с сокращающимся отростком.

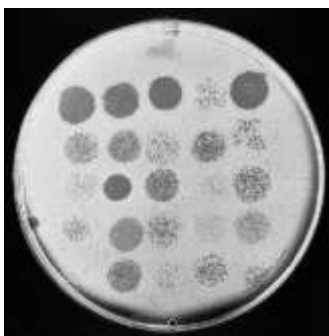


Рисунок 44. Стерильные пятна, образованные типовыми бактериофагами

Задания

1. В стерильные чашки Петри разлить питательную среду LB;
2. Взять 50 мкл чистой культуры микроорганизма и засеять сплошной газон в чашке;
3. На обратной стороне чашки Петри нарисовать в верхней части небольшой круг и опустить вниз прямую линию;
4. В отмеченный круг с внутренней стороны чашки на агаризованную среду капнуть 20 мкл бактериофага и дать капле стечь вниз по направлению линии;
5. Чашки поставить в термостат при температуре 28 °С на 2 суток;
6. Зафиксировать полученный результат, сделать вывод.

Контрольные вопросы

1. К какому классу организмов относятся бактериофаги?
2. В каких исследованиях применяют бактериофаги?
3. Какие морфологические типы бактериофага выделяют?
4. Как осуществляется действие фага на клетку?
5. Как выявить бактериофага?
6. На каком свойстве фага основана фагодиагностика?

Лабораторная работа № 21

Выращивание Т-четных бактериофагов. Титрование фага методом агаровых слоев

Цель работы: получение суспензий фага Т4 при использовании бактерий *E. coli* в качестве хозяина и определить титр полученных фагов

Материалы и оборудование: колба на 250мл со средой LB, ночная культура *E. coli*, суспензия фага T4, хлороформ, стерильные пробирки с 4,5 мл физраствором, агаризованная среда LB (0,8% и 1,5% агара), пустые пробирки, чашки Петри.

Основные положения

Получение фаговой суспензии с высоким титром требует определенного опыта работы с системой «фаг—клетка». При внесении небольшого количества фага в культуру чувствительных бактерий, активно размножающихся в жидкой питательной среде, частицы бактериофага адсорбируются на бактериальных клетках и после латентного периода лизируют их. Освободившееся в среду потомство частиц бактериофага заражает клетки, не вовлеченные в процесс инфекции, вызывая второй инфекционный цикл. Таким образом, последовательно заражаются все клетки суспензии, и процесс продолжается до тех пор, пока не произойдет лизис всех чувствительных бактерий. Теоретически выход фага равен численности популяций бактерий, умноженной на величину среднего выхода фага при лизисе клетки. Действительный выход часто меньше, так как некоторые из освободившихся вирусных частиц утрачиваются в результате повторной адсорбции на инфицированных, но не лизировавшихся бактериях или на обломках бактерий.

Период времени, необходимый для лизиса всех клеток, зависит главным образом от продолжительности латентного периода и числа введенных фаговых частиц. На процесс фаголизиса влияют также температура, степень аэрации, состав питательной среды, реакция среды и физиологическое состояние бактерий. Так, например,

заражение бактериальной культуры в стационарной фазе не приводит к появлению фагового потомства.

В конце логарифмической фазы роста концентрация клеток в питательном бульоне составляет около 1×10^9 в 1 мл. Если такую культуру заразить достаточным количеством фага (1×10^9 фаговых частиц в 1 мл), то все бактерии инфицируются почти одновременно и лизис культуры наступит через 1 - 2 ч. При этом можно ожидать, что 10^9 инфицированных бактерий в 1 мл могут дать 10^{11} фаговых частиц в 1 мл, поскольку средний выход (для Т-четных фагов) составляет 100 - 200 фаговых частиц.

Для получения высокоочищенных фаговых суспензий применяют синтетические среды. С этой целью обычно используют аэрируемые колбы или бутылки, а также всевозможные ферментеры.

Активность бактериофага определяют по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или твердых средах и численно выражают степень максимального разведения, в котором испытуемый фаг проявил свое литическое действие. Весьма точно активность бактериофага оценивается количеством инфекционных активных единиц в единице объема, т.е. определением титра бактериофага.

Для этой цели обычно пользуются методом агаровых слоев. Сущность метода состоит в том, что культуру индикаторных бактерий в «мягком» (0,8%-м) агаре при 48 °С заражают фагом в соответствующем разведении. Эту смесь выливают на поверхность застывшего 1,5%-го питательного агара, дают застыть верхнему слою агара и ставят на инкубацию в термостат. В течение 6 - 12 ч бактерии размножаются внутри мягкого слоя агара в виде множества мелких колоний, получая питание из нижнего слоя 1,5%-го агара, который

применяют как основу. Низкая концентрация верхнего слоя агара создает пониженную вязкость, что способствует хорошей диффузии фаговых частиц. В результате фаговые частицы заражают бактериальные клетки, находящиеся в непосредственном соседстве с ними, размножаются и лизируют их. Фаговое потомство инфицирует затем соседние бактерии, которые в свою очередь подвергаются лизису в результате появления второго поколения фага, и т.д. В конечном итоге на растущем бактериальном газоне образуются прозрачные зона отсутствия роста бактерий — негативные колонии, стерильные пятна, или «бляшки». Образование каждого стерильного пятна может быть вызвано единственной частицей бактериофага. Следовательно, число негативных колоний может служить количественным показателем содержания инфекционных фаговых частиц в исследуемом растворе.

Задания

1. Выращивание фагов

В стерильный флакон на 250 мл вносят 30 мл питательного бульона (LB) и 3 мл ночной бульонной культуры *E. coli*. Инкубационную смесь ставят на качалку при 37°C и аэрируют в течение 1,5 ч. После этого берут 3 мл для определения мутности культуры и установления точной концентрации бактерий.

Бактериальную суспензию заражают внесением суспензии фага с известным титром при множественности заражения 0,1 (отношение числа фаговых частиц к числу бактериальных клеток). Аэрацию инфицированных фагом клеток продолжают в течение 2 ч, затем добавляют несколько капель хлороформа для разрушения

нелизированных бактериальных клеток и продолжают встряхивание в течение 15 мин.

Полученный лизат центрифугируют при 3 - 4 тыс. g в течение 20 мин для удаления обломков клеток и фагоустойчивых бактерий и хранят в холодильнике для дальнейшей работы.

2. Определение титра фаговых частиц

В случае если титр фага предположительно составляет 10^{10} фаговых частиц в 1 мл, необходимо провести восемь десятикратных разведений исходной суспензии в стерильном физрастворе.

Агар для верхнего слоя (0,8 %), предварительно разлитый по 5 мл в пробирки, расплавляют и остужают в водяной бане до 48 °С. В таком состоянии агар можно хранить в водяной бане — 20 мин, так как при более продолжительном хранении он приобретает гелеобразную консистенцию. Готовят 2 пробирки (№ 1 и № 2). В каждую пробирку вносят 0,1 мл ночной бульонной культуры *E. coli*.

В обе пробирки с мягким агаром и индикаторной культурой добавляют соответственно по 0,1 мл седьмого и восьмого разведений фаговой суспензии, тщательно перемешивают и выливают содержимое на чашку Петри с 1,5 %-м питательным агаром, равномерно распределяя по поверхности агара. После застывания верхнего слоя агара (10-15 мин) чашки переворачивают вверх дном и оставляют в термостате при 37 °С на ночь.

На следующий день считают количество негативных колоний на каждой чашке и определяют титр фага в исходном препарате с учетом фактора разведения и объема вносимого материала. Например, если при нанесении на чашку 0,1 мл фаговой суспензии при

разведении 1×10^7 на этой чашке образовалось 150 стерильных пятен, то титр фаголизата будет равен $(150 \times 10) \times 10^7 = 1,5 \times 10^{10}$ частиц в 1 мл.

Контрольные вопросы

1. Что необходимо для выращивания бактериофагов?
2. Чему равен выход фага при выращивании?
3. От чего зависит период времени во время выращивания бактериофага?
4. Как определяют активность бактериофага?
5. В чем заключается метод агаровых слоев?

РАЗДЕЛ 9: САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Лабораторная работа № 22

Микрофлора воздуха

Цель работы: изучить микрофлору воздуха учебных помещений методом оседания.

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри, универсальная агаризованная питательная среда, горелки.

Основные положения.

Воздух не является средой обитания микроорганизмов, а является «транзитной» средой. Микрофлору условно делят на:

- постоянную;
- часто встречающуюся;
- переменную.

Постоянными представителями являются пигментообразующие кокки, палочки, спороносные бациллы, дрожжи, грибы и актиномицеты (т.е. микроорганизмы, устойчивые к свету и высушиванию, когда влажность воздуха не высока).

В процессе практической работы микробиологу постоянно приходится учитывать присутствие микробов в окружающей среде. При исследовании бактериальной загрязненности воздуха учитывается общее количество микробов, содержащиеся в определенном объеме воздуха, и качественный состав микрофлоры воздуха (табл. 17).

Для микробиологического исследования воздуха используют 2 метода:

- седиментационный (по Коху) - оседание микробов под действием силы тяжести;
- аспирационный - основан на активном просасывании воздуха.

Методом оседания можно получить общее представление о встречающихся в воздухе микроорганизмах. Это наиболее простой способ изучения микрофлоры воздуха. Он заключается в том, что чашки Петри со средой оставляют открытыми на определенное время (15-10 мин), затем их закрывают, подписывают и выдерживают от 1 до 5 дней в термосе при температуре 26-28 °С.

Аспирационный метод позволяет определить как качественное, так и количественное содержание микроорганизмов в определенном объеме воздуха. Для реализации этого метода применяют аппарат Кротова (рис. 45), снабженный системой перекачки воздуха. Аппарат Кротова смонтирован в портативном ящике и состоит из узла для отбора проб воздуха, микроманометра и электромотора. Исследуемый воздух просасывают через клиновидную щель прозрачного диска, установленного на центробежном вентиляторе. Засасываемый воздух распределяется по поверхности питательной среды чашки Петри, помещенной на вращающемся устройстве.

Чашка со средой должна вращаться со скоростью 60 об/мин, что гарантирует равномерное распределение оседающих микроорганизмов по поверхности питательной среды. Скорость просасывания должна быть 25 л/мин, время экспозиции 4-5 мин.

Для выявления санитарно-показательных микроорганизмов посев производят на кровяной агар для обнаружения стрептококков и на молочно-солевой агар для обнаружения стафилококков. Из

выросших колоний делают мазки и окрашивают по Граму. Выделенную культуру идентифицируют по общепринятым методикам.



Рисунок 45. Внешний вид аппарата Кротова для бактериологического исследования воздуха: 1 – вентиль микроманометра; 2 – микроманометр; 3 – накидные замки; 4 – вращающийся диск; 5 – крышка; 6 – диск; 7 – клиновидная щель; 8 – корпус; 9 – основание.

Таблица 17. Нормы микробного числа

Наименование помещений	Санитарно-микробиологические показатели	
	Общее количество микроорганизмов в 1 м ³ воздуха, (КОЕ/м ³)	
	до начала работы	во время работы
Операционные, послеоперационные палаты, реанимационные залы (палаты), в том числе для ожоговых больных, палаты интенсивной терапии, родовые, манипуляционные-туалетные для новорожденных	Не более 200	Не более 500
Послеродовые палаты, палаты для ожоговых больных, палаты для лечения пациентов в асептических условиях, в том числе для иммунокомпрометированных.	Не более 500	Не более 750
Чистая и стерильная зоны (контроля, комплектования и упаковки чистых инструментов, помещения для подготовки перевязочных и операционных материалов и белья, стерилизации, экспедиции)	Не более 500	Не более 750
Процедурные и асептические перевязочные, процедурные бронхоскопии	Не более 300	Не нормируется
Воздух производственных помещений считается чистым	Не более 1500	
Воздух жилых помещений считается чистым (по А.И.Шарифу)	Не более 1500 (летом) Не более 4500 (зимой)	

Задания

1. Подготовить чашки с питательной средой.
2. Поставить открытые чашки в разных точках помещений для экспозиции на 5 минут;

3. Закрыть чашки и поставить для культивирования на 3-5 дней при температуре 28 °С в термостат;

4. Рассчитать микробное число в воздухе по формуле:

$$X = \frac{5 \times a \times 100 \times 1000}{v \times 10 \times t},$$

Где X- количество микроорганизмов в 1м³ воздуха;

a - количество колоний в чашке;

v - площадь чашки(78,5см²),

t - время экспозиции (5мин);

10 - объем воздуха, из которого происходит оседание микроорганизмов за 5мин (л);

100 - площадь, на которой происходит оседание (см²);

1000 - объем воздуха (л).

5. Результаты занести в таблицу 18. Сравнить полученные результаты с показаниями в таблице 17.

6. Сделать вывод.

Таблица 18. Результаты исследования микрофлоры воздуха.

Помещение	Количество микроорганизмов в 1м ³ воздуха, X

Контрольные вопросы

1. Как подразделяют микрофлору воздуха?
2. Что учитывают при исследовании бактериальной загрязненности воздуха?

3. Какие методы используют для микробиологического исследования воздуха? В чем они заключаются?
4. Как устроен аппарат Кротова? Для чего он применяется?
5. На какие питательные среды используют при анализе микрофлоры воздуха? Почему?

Лабораторная работа № 23

Микрофлора организма человека

Цель: определить степень загрязненности кожи рук и предметов обихода. Описать микрофлору зубного налета, слизистой оболочки зева на основании данных микроскопического исследования.

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, автоматические пипетки со стерильными наконечниками, стерильные ватные палочки, микробиологические петли, микроскоп, стекла предметные и покровные. Стерильная водопроводная вода или физраствор, агаризованная среда LB, реактивы для окраски по Граму, 70% этанол.

Основные положения

Микрофлора организма человека включает различные микроорганизмы, обитающие на кожных покровах, слизистых оболочках органов: ротовой полости, зева, носоглотки, верхних участков респираторного тракта, кишечника, особенно толстой кишки, и т.д. Одни из них являются постоянными (или облигатными) обитателями организма человека, другие - временными (факультативными или транзиторными). Среди последних нередко встречаются патогенные микроорганизмы.

Микрофлора кожи человека включает постоянных обитателей не поверхности (сарцины, стафилококки, некоторые виды стрептококков, грибов) и в глубоких слоях - в волосяных мешочках, просветах сальных и потовых желез (эпидермальные стафилококки). Кроме характерной для кожи аутомикрофлоры, могут быть обнаружены транзитные микроорганизмы, быстро исчезающие под влиянием бактерицидных, стерилизующих свойств кожи. Большой способностью к самоочищению обладает чисто вымытая кожа. Бактерицидность кожи отражает общую резистентность организма.

Следует понимать, что загрязнение лекарств микроорганизмами в процессе их приготовления возможно через грязные руки, содержащие аутомикрофлору, так и транзитные микробы, способные вызвать порчу настоев, отваров и других препаратов.

В дыхательные пути вместе с воздухом попадают пылевые частички и микроорганизмы, треть которых задерживаются в носоглотке. Здесь чаще всего обнаруживаются анаэробные бактероиды, стафилококки, стрептококки, пневмококки. Трахеи и бронхи, как правило, стерильны.

Микрофлора желудочно-кишечного тракта наиболее обильна и разнообразна по видовому составу.

В полости рта обнаруживаются микроорганизмы более 100 видов, что объясняется наиболее благоприятными условиями существования: достаточная влажность, щелочная реакция среды, наличие остатков пищи, постоянная температура. В полости рта человека живут стрептококки стафилококки, лактобактерии, коринебактерии, спириллы и спирохеты, простейшие, грибы.

Микрофлора желудка очень скудна. Желудочный сок вызывает гибель микроорганизмов, попадающих в него с пищей, водой. При обследовании в содержимом желудка здорового человека можно обнаружить сарцины, дрожжи, молочнокислые бактерии.

Бедна также микрофлора тонкого кишечника. Высокие отделы по характеру микрофлоры приближаются к желудку; в нижних отделах, постепенно обогащаясь, микрофлора сближается с флорой толстой кишки.

Микрофлора толстой кишки наиболее обильна и многообразна: в 1 г фекалий содержится до 250 млрд клеток. По современным представлениям, в составе микрофлоры толстого отдела кишечника здорового человека превалируют анаэробные бактерии, составляющие 96% всех видов кишечной аутофлоры. Основные представители: неспоровые грамположительные (бифидиум-бактерии, лактобактерии, пептококки, катенобактерии) и грамотрицательные палочки, среди которых основное место занимают бактероиды.

Значительная роль в микрофлоре кишечника принадлежит кишечной палочке *E. coli* - грамотрицательной, подвижной бактерии, обладающей энергичной ферментативной деятельностью. Кишечная палочка имеет выраженные антагонистические свойства против патогенных представителей семейства *Enterobacteriaceae*, против стафилококков и грибов *Candida*. К представителям нормальной микрофлоры кишечника относятся энтерококки, или фекальный стрептококк, образующий цепочки из диплококков. Постоянно в кишечнике живут грибы, споровые анаэробы, спирохеты, простейшие, вирусы, включая фаги.

Качественный и количественный состав микрофлоры человека меняется в течение жизни и зависит от пола, возраста, питания и др.

Кроме того, колебания в составе микробной флоры тела человека могут быть обусловлены возникновением заболеваний и применением химиотерапевтических и иммунологических средств, прежде всего антибиотиков. Оценка качественного и количественного состава микрофлоры организма человека по определенным показателям позволяет установить ее нарушения и связанные с ними последствия - дисбактериоз.

Для качественного изучения состава микрофлоры используют микроскопический и микробиологический методы исследования. Препараты-мазки готовят из зубного налета, смывов со слизистой оболочки зева, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Из зубного налета можно приготовить прижизненные препараты в "раздавленной" капле и микроскопировать их в темнопольном или фазово-контрастном микроскопе для обнаружения подвижных микроорганизмов.

Для микробиологического исследования берут определенный объем исследуемого материала (например, смывы из зева), разводят в изотоническом растворе хлорида натрия (в зависимости от предполагаемой концентрации) и делают посевы соответствующих разведений на питательные среды: для выявления гемолитических стрептококков или стафилококка - на кровяной агар, для выделения *E. coli* - на среду Эндо, для выделения грибов рода *Candida* - на среду Сабуро. Посевы производят таким образом, чтобы получить сосчитываемое количество колоний. Такие исследования повторяют через определенные сроки, чтобы сделать заключение о количественных изменениях в составе микрофлоры (особенно важно - в динамике заболевания).

Задания

1. Определить микрофлору зубного налета, слизистой оболочки зева.

Из зубного налета и смывов со слизистой оболочки зева готовят препараты мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Возможная микрофлора зубного налета представлена на рисунке 46.

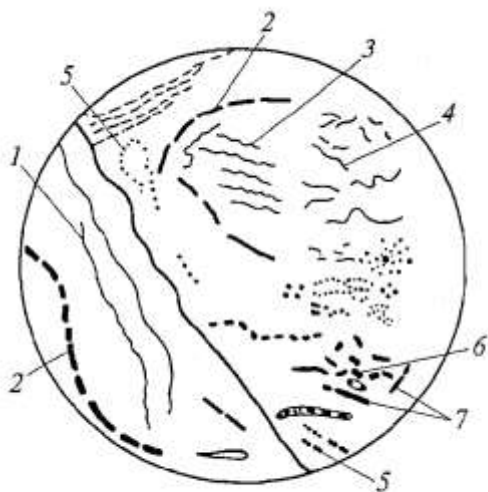


Рисунок 46. Микрофлора зубного налета (по Л.В. Борисову и др. 1993):
1 – *Leptotrichia buccalis*; 2 – *Lactobacillus* sp.; 3, 4 – *Treponema denticola*, *Treponema* sp.; 5, 6 – стрептококки и диплококки (*Streptococcus salivarius*, *S. maitis*, *S. sanguis*, *Veillonella* sp.); 7 – *Fusobacterium nucleatum*.

2. Сделать смывы с кожи лица, рук, зубного налета, слизистой оболочки зева для установления состава и количества имеющихся там бактерий.

Для получения смывов стерильную ватную палочку смачивают стерильной водопроводной водой. Смоченной ватной палочкой делают смыв с рук обследуемого (грязные руки или вымытые и обработанные 70% спиртом): тыл кисти, поверхность ладони, межпальцевые пространства, ногтевые ложа. После окончания процедуры ватную палочку помещают в пробирку с 10 мл стерильной водопроводной воды и тщательно ее обмывают. Таким образом, получают исходное разведение. Из него готовят ряд последовательных десятикратных разведений (3-4). Затем из различных разведений смыва берут по 1 мл, вносят в стерильные чашки Петри, заливают расплавленной и остуженной агаризованной средой LB. Посевы выдерживают сутки при комнатной температуре, после чего производят подсчет выросших колоний.

Устанавливают количество микроорганизмов в 1 мл исходного разведения смыва (количество колоний, выросших на чашке, умноженное на степень разведения смыва). Определяют количество микроорганизмов в 10 мл смыва, соответствующее общему числу микроорганизмов, на той поверхности, с которой произведен смыв.

Контрольные вопросы

1. На какие группы подразделяют микрофлору человека?
2. Какие группы микроорганизмов обитают на кожи человека?
3. Чем опасны транзиторные микроорганизмы?
4. В чем особенность микрофлоры дыхательных путей?

5. Какие органы человека характеризуются обильной и разнообразной микрофлорой?
6. Какие особенностей полости рта обуславливают многообразие микрофлоры?
7. По каким причинам в желудке и тонком кишечнике микрофлора практически не обитает?
8. Дайте характеристику микрофлоры толстого кишечника.
9. От чего зависит качественный и количественный состав микрофлоры человека?
10. Какие методы используют для изучения качественного и количественного состава микрофлоры человека?

РАЗДЕЛ 10: ОСНОВЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Лабораторная работа № 24

Серологические реакции

Цель работы: изучить иммунологические реакции с помощью реакций агглютинации, преципитации и бактериолиза.

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри, универсальная агаризованная питательная среда, стеклянный шпатель, горелки, пробирки, автоматические пипетки с наконечниками, иммунные сыворотки, антигены, физ. раствор.

Основные положения

1. Бактериолизис.

Одним из важнейших защитных свойств иммунной сыворотки при инфекции является ее способность растворять (лизировать) микроорганизмы или другие клеточные элементы, поступившие в организм. Специфические антитела, обуславливающие лизис клеток, называются *лизины*. Лизины способны проявлять свое лизирующее действие на антиген только в присутствии дополнительного фактора – **комплемента**. Комплемент является составной частью любой свежей сыворотки. *(При хранении или подогревании сыворотки комплемент разрушается. Для обеспечения постоянства результатов иммунную сыворотку заранее инактивируют нагреванием при 56°C в течение 30 мин. и далее прибавляют к ней строго определенное количество комплемента).*

Реакция бактериолизиса заключается в том, что при соединении иммунной сыворотки с соответствующими живыми бактериями в присутствии комплемента происходит лизис микробов (рис. 47).

Задание 1.

1. В опытной и контрольной пробирках делают смеси следующего состава:
 - 200 мкл инаktivированной иммунной сыворотки;
 - 100 мкл взвеси культуры вибриона Мечникова (антиген);
 - физиологический раствор - 1,7 мл в контрольной пробирке и 1,4 мл в опытной;
 - 300 мкл комплемента в опытной пробирке.
2. Пробирки помещают на 1,5-2 часа в термостат при температуре 37 °С.
3. Подготовить чашки Петри с универсальной питательной средой.
4. Сделать посев 100 мкл смеси из каждой пробирки на чашки с агаром и поставить в термостат на сутки.
5. Рассмотреть результаты и сделать вывод по работе.

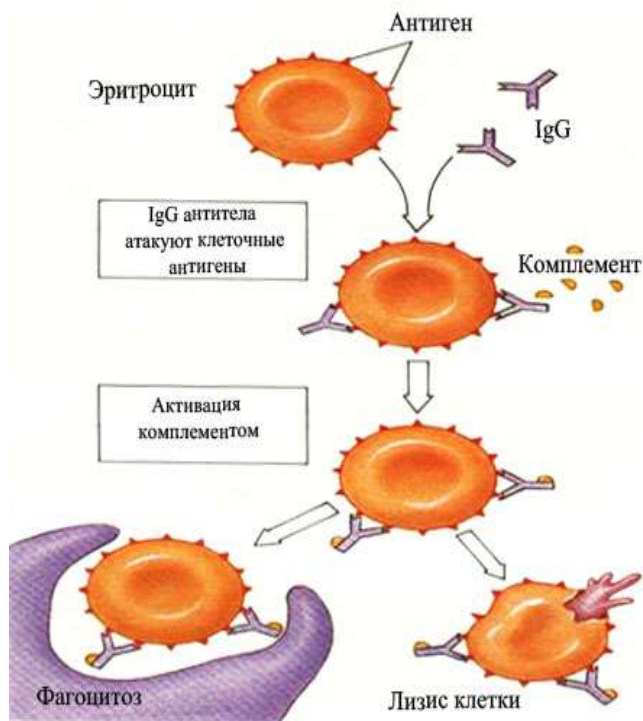


Рисунок 47. Бактериолизис на примере гемолиза эритроцитов

2. Реакция преципитации

Преципитацией называется явление осаждения антигена из раствора при воздействии на него иммунной сыворотки, содержащей антитела.

Внешнее проявление наступившей реакции преципитации выражается в следующем: при осторожном добавлении прозрачного жидкого антигена к иммунной преципитирующей сыворотке на

границе обеих жидкостей появляется мутное кольцо, выпадающее в осадок. Эту реакцию часто называют кольцепреципитацией (рис. 48).

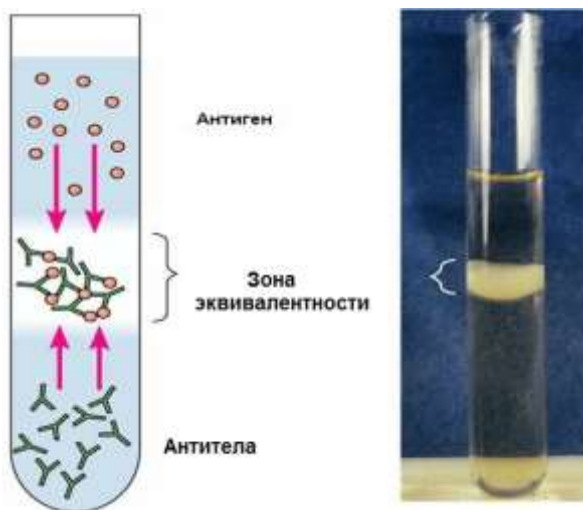


Рисунок 48. Кольцепреципитация

Реакция характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Она позволяет обнаружить минимальные следы белка – антигена (до разведения 1:100000 и выше).

Большое удобство в практике представляет особенность ряда бактериальных антигенов – их высокая резистентность к высокой температуре. На этом основана реакция термопреципитации по Асколи, когда антиген извлекают из исследуемого материала с помощью кипячения. Реакция Асколи применяется для идентификации сибиреязвенного, туляремийного, чумного антигена. Она нашла также применение в судебной медицине для определения видовой принадлежности белка, в частности кровяных пятен, в санитарной практике при выявлении фальсификации мясных, рыбных,

мучных изделий, примесей в молоке. Недостатком этой РП является нестойкость преципитата (кольца), который исчезает даже при легком встряхивании. Кроме того, с ее помощью нельзя определить количественный состав антигенов, участвующих в формировании преципитата.

Задание 2.

1. В узкую пробирку для преципитации налить 1 мл иммунной сыворотки на сибирскую язву.
2. При помощи пипетки медленно, по стенке пробирки налить 1 мл антигена (термофильный фильтрат из шкур умерших животных). Жидкость спустить по стенке пробирки так, чтобы она не смешивалась с сывороткой, а образовала над ней верхний слой. *(При положительном результате реакции сразу или в течение 5-10 мин. на границе обеих жидкостей образуется мутное кольцо от выпавшего в осадок антигена).*
3. Наблюдать образование кольца, сделать вывод по работе.

3. Реакция агглютинации.

Агглютинация - это склеивание и выпадение в осадок микроорганизмов или других клеток (корпускулярных антигенов) под действием специфических антител в присутствии электролитов (рис. 49).

Она применяется для серологической диагностики инфекционных заболеваний (реакция Видаля - при брюшном тифе и паратифах, реакция Вейгеля - при эпидемическом сыпном тифе, реакция Райта - при бруцеллезе и др.) и для серологической идентификации микробов.



Рисунок 49. Реакция агглютинации.

В реакции участвуют 3 ингредиента:

- 1) корпускулярный антиген (агглютиноген) в виде взвеси клеток;
- 2) антитело (агглютинин) в виде иммунной сыворотки;
- 3) изотонический раствор хлорида натрия (электролит).

Антигены - взвесь живых и убитых микроорганизмов.

Идентификацию вида (серотипа) микроба, выделенного от больного или внешней среды, определяют по известному антителу (диагностической иммунной сыворотки). Положительный результат реакции укажет на то, что неизвестный микроб идентичен тому, который был взят в качестве антигена для приготовления иммунной диагностической сыворотки.

Существует два основных метода постановки реакции:

- 1) ориентировочная - на предметном стекле, наступающая в течение нескольких минут. Применяется только с целью идентификации вида (серотипа) выделенной из организма больного чистой культуры по его специфичности как антиген к серотипу антитела;

2) развернутая - в пробирках, которая учитывается через 2 часа выдерживания при 37°C и на следующий день стояния при комнатной температуре. Применяется с целью идентификации микроба и обнаружения антител в сыворотке крови.

Реакции агглютинации входит в группу методов, в которых реакция протекает в две фазы:

- 1) соединение АГ с АТ (специфическая фаза);
- 2) выпадение образовавшегося комплекса АГ-АТ в растворе солей (электролите) в осадок (неспецифическая фаза).

Антигены поливалентны, а антитела - двух или более валентны. Соединение их приводит к образованию макроконгломератов, выпадающих в осадок. Причем характер осадка зависит от свойств антигена: жгутиковые бактерии склеиваются жгутиками, при этом образуются крупнохлопчатый осадок в течение двух часов при 37°C. У безжгутиковых бактерий происходит склеивание непосредственно самих клеток и образование мелкозернистого осадка. Такой осадок образуется медленно, в течение 18-24 часов при комнатной температуре.

Достоинства реакции является простота постановки и экспрессность. Недостаток - уступает по специфичности и чувствительности.

Задание 3.

Реакция Грубера

1. Подготовить 10 чистых пробирок.
2. Налить во все пробирки по 1 мл физ. раствора.
3. В первую и девятую пробирки налить 1 мл агглютинирующей сыворотки с разведением 1:50.

4. Со 2 по 8 пробирки провести серию разбавлений в 2 раза. В 10 пробирку сыворотку не добавлять.
5. В каждую пробирку добавить по 100 мкл антигена (диагностикум – взвесь убитых бактерий *Salmonella typhi*). В 9 пробирку антиген не добавлять.
6. Штатив с пробирками поместить в термостат на 2 часа при 37°C, а потом оставить на сутки при комнатной температуре.
7. Результаты опыта занести в таблицу, сделать вывод по работе.

Контрольные вопросы

1. Как называются специфические антитела, обуславливающие лизис клеток?
2. Как связаны лизины и комплемент?
3. В чем заключается реакция бактериолиза?
4. Какой процесс называется преципитацией?
5. Чем характеризуется реакция преципитации? Ее преимущества и недостатки.
6. На чем основана реакция термопреципитации по Асколи? Для каких целей применяется реакция Асколи?
7. Дайте определение термину "агглютинация".
8. Для каких целей применяют реакцию агглютинации?
9. Какие ингредиенты участвуют в реакции агглютинации?
10. Какие иммунологические реакции применяют для идентификации серотипа?
11. Какие стадии выделяют в реакции агглютинации?
12. Какие достоинства и недостатки у реакции агглютинации?

Лабораторная работа № 25

Моделирование процесса возникновения эпидемии на примере культуры пекарских дрожжей

Цель работы: получение экспериментальной модели возникновения эпидемии.

Материалы и оборудование: трех суточная культуры пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (выращенная при 30 °С, хранящаяся при 4 °С) в пробирках на скошенной агаризованной среде Сабуро, пробирки со стерильной водопроводной водой, пустые стерильные пробирки, автоматические пипетки со стерильными наконечниками, микробиологические петли, чашки Петри, агаризованная среда Сабуро, стерильные ватные палочки, микроскоп, покровные и предметные стекла, пинцет.

Основные положения

Эпидемия - относительно кратковременное, быстрое и непрерывное распространение инфекционного заболевания в пределах какой-то совокупности организмов в определенном регионе. При этом регистрируется заболеваемость намного выше обычно существующего уровня. Распространение инфекционного заболевания людей или животных на территории целой страны, континента или всей суши называется *пандемией*. Инфекционное заболевание, или инфекция (от лат. *infectio* — заражение), представляет собой совокупность физиологических и патологических адаптационных и репарационных реакций, которые возникают и развиваются в макроорганизме в процессе взаимодействия с патогенными микроорганизмами.

Формы инфекции разнообразны и носят различные наименования в зависимости от природы возбудителя, его локализации в макроорганизме и путей распространения. Так, экзогенная инфекция возникает в результате заражения патогенными микроорганизмами, поступившими в организм из окружающей среды с пищей, водой, воздухом, почвой, выделениями больного человека или микробоносителя. Часто распространение инфекционных болезней происходит при несоблюдении элементарных правил гигиены.

Задания

Основным методом работы является получение культуры дрожжей с поверхности ладоней и пальцев человека методом смыва с последующим высевом смывной суспензии на плотную питательную среду.

Группу студентов разделяют на подгруппы по 5 человека в каждой. На подгруппу готовится 10 чашки Петри со средой Сабуро (пептон – 10 г/л, глюкоза – 40 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, агар – 20 г/л). Каждую чашку нумеруют. Все студенты подгруппы тщательно моют руки с мылом и стерилизуют их 70%-м этанолом.

1. Контрольный тест для доказательства чистоты рук. Чтобы убедиться в отсутствии дрожжевых клеток на руках студентов, участвующих в эксперименте, делают смыв с ладоней и пальцев их правой руки. Один из студентов с помощью стерильной ватной палочки, смоченной в стерильной водопроводной воде, делает смыв с поверхности ладони и пальцев правой руки, участвующих в эксперименте студентов и проводит ею штрих по поверхности среды в чашке Петри со средой Сабуро (контрольный высев).

2. *Моделирование процесса возникновения эпидемии.* Делают суспензию из 3-суточной культуры дрожжей *S. cerevisiae*, выросшей при температуре 30 °С. Для этого в пробирку с выросшей культурой дрожжей, содержащую скошенную агаризованную среду Сабуро, стерильно вносят 3 — 4 мл стерильной водопроводной воды и с помощью бактериологической петли осторожно суспендируют дрожжевую массу с поверхности агара. Полученную суспензию переносят в стерильную пробирку. Студенты, участвующие в эксперименте, еще раз моют руки с мылом, протирают их 70%-м этанолом и дают высохнуть. Затем студент-инструктор протирает с помощью ватной палочки, смоченной суспензией *S. cerevisiae*, поверхность ладони и пальцев правой руки первого студента. Он обменивается энергичным рукопожатием правой рукой со вторым студентом. Тот пожимает правую руку третьего студента, а он в свою очередь обменивается рукопожатием с четвертым студентом.
3. *Выделение культуры возбудителя «инфекционного процесса».* Для выделения культуры дрожжей с поверхности ладоней и пальцев правой руки студентов используют стерильные ватные палочки, слегка смоченные стерильной водопроводной водой. Студент-инструктор делает смывы ладоней и пальцев правых рук студентов участвующих в эксперименте и высевает смывы на чашки Петри. Для получения отдельных колоний дрожжей, смывых тампонами с рук, штрих на чашке Петри со средой Сабуро распределяют по всей поверхности чашки бактериологической петлей методом «истощающего штриха». Делают контрольный высеv на чашку Петри со средой Сабуро суспензию дрожжей, использованную в эксперименте,

бактериологической петлей методом «истощающего штриха». Засеянные чашки со средой инкубируют в течение 3 сут при температуре 30 °С. Выросшие колонии на чашках просматривают, определяют интенсивность роста - скудный, умеренный или обильный. При возможности подсчитывают количество колоний на чашках. Делают препараты «раздавленная капля» из колоний дрожжей в чашках засеянных после эксперимента, а также дрожжей рабочей суспензии и просматривают их с объективом 40х. Делают выводы о способах возникновения и путях распространения экзогенной инфекции.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение термина «эпидемия»?
2. Что называют «пандемией»?
3. Что подразумевается под терминами «инфекционное заболевание» или «инфекция»?
4. От чего зависит форма инфекции? Приведите примеры.

Литература

1. Белясова, Н.А. Микробиология [Электронный ресурс]: учебник/ Белясова Н.А.— Электрон. текстовые данные.— Минск: Вышэйшая школа, 2012.— 443 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/20229>.— ЭБС «IPRbooks», по паролю
2. Березовская В.А., Белоусова И.Н., Клочкова Н.Г. Биология и микробиология: Учебно-методическое пособие (практикум). – Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2006. – 92 с.
3. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник для вузов/ Н.С.Егоров; МГУ им. М. В. Ломоносова.-6-е изд., перераб. и доп.- М.: Изд-во Моск.ун-та: Наука, 2004.-528с
4. Емцев, В.Т. Микробиология: учебник для вузов/ В.Т.Емцев, Е.Н.Мишустин.-6-е изд.,испр.- М.: Дрофа, 2006.- 444с.
5. Зимоглядова Т. В. И др. Практикум по микробиологии : учебное пособие / Т. В. Зимоглядова, И. А. Карташева, О. Г. Шабалдас. – М. : Колос; Ставрополь : АГРУС, 2007 – 148с.
6. Лебедев, В.Н. Микробиология с основами вирусологии. Часть I. Основы общей вирусологии [Электронный ресурс]: методическое пособие для студентов биологических специальностей/ Лебедев В.Н.— Электрон. текстовые данные.— СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2014.— 62 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/22556>.— ЭБС «IPRbooks», по паролю
7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник для высш. проф. образования : в 2 т. / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко .— М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010

8. Методы общей и специальной микробиологии: Учебное пособие. /Е.В.Никитина, О.А. Решетник; Казан. гос. технол. ун-т. Казань, 2006, 124 с.
9. Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования : методические указания к выполнению лабораторной работы по курсу «Основы микробиологии и биотехнологии» для студентов специальности 280201.65 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» / сост. Л. А. Гаретова, О. А. Кириенко. – Хабаровск : Изд-во Тихоокеан. гос. ун-та, 2010. – 16 с.
10. Петр С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Петр. – М. : Издательство «Мир», 1978. - 330 с.
11. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология: Учебник для мед.вузов/ О.К.Поздеев; под ред. В.И.Покровского.-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005.-768с.
12. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов/ А.И.Нетрусов [и др.]; под ред. А.И.Нетрусова. -М.: Академия, 2005.-608с.
13. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов/ Е.З.Теппер, В.К.Шильникова, Г.И.Переверзева; Под ред.В.К. Шильниковой.-5-е изд., перераб.и доп. -М.: Дрофа, 2004.-256с.

Учебное издание

Составители: Чепурнова М.А.

Акатова Е.В.

Нечаева И.А.

**Методические указания по выполнению
лабораторных работ по дисциплинам
«Микробиология с основами вирусологии» и
«Микробиология»**

Часть 2

Авторское редактирование

Изд.лиц.№0203300 от 12.02.1997. Подписано в печать 24.02.2016

Формат бумаги 60х84 1/16. Бумага офсетная.

Усл. печ.л. 4,1. Уч.-изд. л. 3,5.

Тираж 100 экз. Заказ 035

Тулский государственный университет

300012, г. Тула, просп. Ленина, 92

Отпечатано в Издательстве ТулГУ

300012, г. Тула, просп. Ленина, 95