

Лабораторная работа №1

Тема: Введение. Систематика, морфология и структура микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Микроскопы: БИОЛАМ, МБР-1, МБС-1; комплект постоянных микропрепаратов.

Микроскоп - это оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза.

Разрешающая способность микроскопа дает раздельное изображение двух близких друг другу линий. Невооруженный человеческий глаз имеет разрешающую способность около 1/10 мм или 100 мкм. Лучший световой микроскоп примерно в 500 раз улучшает возможность человеческого глаза, т. е. его разрешающая способность составляет около 0,2 мкм или 200 нм.

Разрешающая способность и увеличение не одно и то же. Можно получить большое увеличение, но не улучшить его разрешение.

Различают *полезное* и *неполезное* увеличения. Под полезным понимают такое увеличение наблюдаемого объекта, при котором можно выявить новые детали его строения. Неполезное - это увеличение, при котором, увеличивая объект в сотни и более раз, нельзя обнаружить новых деталей строения.

В учебных лабораториях обычно используют *световые микроскопы*, на которых микропрепараты рассматриваются с использованием естественного или искусственного света. Наиболее распространены *световые биологические микроскопы*: БИОЛАМ, МИКМЕД, МБР, МБИ и МБС. Они дают увеличение в пределах от 56 до 1350 раз. *Стереомикроскоп* (МБС) обеспечивает подлинно объемное восприятие микрообъекта и увеличивает от 3,5 до 88 раз.

В микроскопе выделяют две системы: *оптическую* и *механическую* (рис. 1). К *оптической системе* относят объективы, окуляры и осветительную систему (конденсор с диафрагмой и светофильтром, зеркало или электроосветитель).

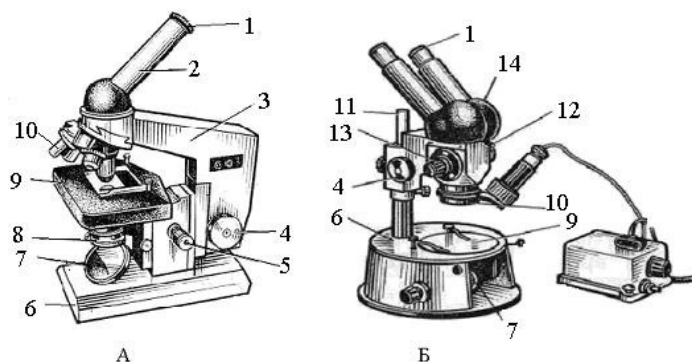


Рис. 1. Устройство микроскопов:

А - БИОЛАМ; Б - МБС-1.

1 - окуляр, 2 - тубус, 3 - тубусодержатель, 4 - винт грубой наводки, 5 - микрометрический винт, 6 - подставка, 7 - зеркало, 8 - конденсор, ирисовая диафрагма и светофильтр, 9 - предметный столик, 10 - объектив, 11 - стойка, 12 - оптическая головка, 13 - рукоятка переключения увеличения, 14 - бинокулярная насадка.

Объектив - определяет *полезное увеличение объекта*. Объектив состоит из нескольких линз. Увеличение объектива обозначено на нем цифрами. В учебных целях используют обычно объективы х8 и х40.

Окуляр состоит из 2-3 линз. Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: х7, х10, х15. Окуляры не выявляют новых деталей строения и в этом отношении их увеличение *бесполезно*.

Для определения *общего увеличения микроскопа* следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра.

Осветительное устройство состоит из зеркала или электроосветителя, конденсора с ирисовой диафрагмой и светофильтром, расположенных под предметным столиком. Они предназначены для освещения объекта пучком света.

Механическая система микроскопа состоит из подставки, коробки с микрометрическим механизмом и микрометрическим винтом, тубусодержателя, винта грубой наводки, кронштейна конденсора, винта перемещения конденсора, револьвера, предметного столика.

Правила работы с микроскопом

При работе с микроскопом необходимо соблюдать операции в следующем порядке:

1. Работать с микроскопом следует сидя;
2. Микроскоп осмотреть, вытереть от пыли мягкой салфеткой объективы, окуляр, зеркало;
3. Микроскоп установить перед собой, немного слева на 2-3 см от края стола. Во время работы его не сдвигать;
4. Открыть полностью диафрагму, поднять конденсор в крайнее верхнее положение;
5. Работу с микроскопом всегда начинать с малого увеличения;
6. Опустить объектив 8 х в рабочее положение, т. е. на расстояние 1 см от предметного стекла;
7. Глядя одним глазом в окуляр и пользуясь зеркалом с вогнутой стороной, направить свет от окна в объектив, а затем максимально и равномерно осветить поле зрения;
8. Положить микропрепарат на предметный столик так, чтобы изучаемый объект находился под объективом. Глядя сбоку, опускать объектив при помощи макровинта до тех пор, пока расстояние между нижней линзой объектива и микропрепаратом не станет 4-5 мм ;
9. Смотреть одним глазом в окуляр и вращать винт грубой наводки на себя, плавно поднимая объектив до положения, при котором хорошо будет видно изображение объекта. *Нельзя смотреть в окуляр и опускать объектив.* Фронтальная линза может раздавить покровное стекло, и на ней появятся царапины;
10. Передвигая препарат рукой, найти нужное место, расположить его в центре поля зрения микроскопа;
11. Если изображение не появилось, то надо повторить все операции пунктов 6, 7, 8, 9;
12. Для изучения объекта при большом увеличении сначала нужно поставить выбранный участок в центр поля зрения микроскопа при малом увеличении. Затем поменять объектив на 40 х, поворачивая револьвер, так чтобы он занял рабочее положение. При помощи микрометрического винта добиться хорошего изображения объекта. На коробке микрометрического механизма имеются две риски, а на микрометрическом винте - точка, которая должна все время находиться между рисками. Если она выходит за их пределы, ее необходимо вернуть в нормальное положение. При несоблюдении этого правила, микрометрический винт может перестать действовать;
13. По окончании работы с большим увеличением, установить малое увеличение, поднять объектив, снять с рабочего столика препарат, протереть чистой салфеткой все части микроскопа, накрыть его полиэтиленовым пакетом и поставить в шкаф.

Виды микроскопов: (биологический, люминесцентный, электронный)

Виды микроскопии:

I. Световая микроскопия и ее разновидности.

II. Электронная.

А. Нативная (прижизненная)– метод «висячей» капли (подвижность), **«раздавленной»** капли (возможна прижизненная (**витальная окраска**)) После прижизненной микроскопии препараты в дезраствор.

В. Фиксированные мазки-препараты

I. Световая.

1. **иммерсионная микроскопия** – применяют для увеличения разрешающей способности метода **световой микроскопии**. Объектив помещается в среду (определенные масла), имеющую высокий коэффициент преломления, препятствует рассеиванию света от объекта исследования.
2. **Микроскопия в проходящем поле** (светлопольная микроскопия) Используется для изучения окрашенных объектов в фиксированных препаратах.
3. **Темнопольная микроскопия** – применяется для прижизненного исследования микробов в нативных неокрашенных препаратах. Основана на явлении дифракции света при боковом освещении частиц (эффект Тинсдаля)
4. **Фазово-контрастная микроскопия** – нативный препарат. Дает возможность увидеть прозрачные объекты, за счет усиления различия в оптической плотности.
5. **Люминесцентная микроскопия** – основана на явлении фотолюминесценции. Люминесценция – свечение веществ, возникающее под воздействием внешнего излучения. Первичная – наблюдается без предварительного окрашивания за счет наличия собственных люминесцирующих в-в, вторичная – в результате окрашивания люминесцирующими красителями – флюорохромами.

II. Электронная микроскопия. – световые лучи заменяет поток электронов.

Тинкториальные свойства – это способность воспринимать и удерживать краситель.

Ход работы

Задание 1. Используя микроскопы, таблицы и практикумы, изучить устройство световых микроскопов (МБР-1 или БИОЛАМ и МБС-1) (рис. 1).

Задание 2. При малом и большом увеличении микроскопа научиться быстро находить объекты на постоянных микропрепаратах.

Контрольные вопросы

1. Что такое разрешающая способность микроскопа?
2. Как можно определить увеличение рассматриваемого под микроскопом объекта?
3. В чем отличие микроскопов МБР-1 и МБС-1?
4. Перечислить главные части микроскопа БИОЛАМ. В чем их назначение?
5. Назвать правила работы с микроскопом.

Морфология бактерий

Формы бактерий: Всем бактериям присуща определенная форма и размеры, которые выражаются в микрометрах (мкм).

Различают следующие основные **формы бактерий:**

1. **шаровидные** (сферические), или кокковидные;
2. **палочковидные** (цилиндрические);
3. **извитые** (спиралевидные);
4. нитевидные.

1. **Кокковидные патогенные бактерии** обычно имеют форму **правильного шара** диаметром 1,0— 1,5 мкм; некоторые — **бобовидную, ланцетовидную, эллипсоидную форму**. По характеру **взаиморасположения** образующихся после деления клеток кокки подразделяют на следующие группы:

1. Микрококки. Делятся в одной плоскости, располагаются одиночно и беспорядочно; сапрофиты; патогенных для человека нет

2. диплококки (от *лат*— двойной). Деление происходит в одной плоскости с образованием пар клеток, имеющих либо бобовидную либо ланцетовидную (гонококки, пневмококки)

3. Стрептококки (от *греч*— цепочка). Деление клеток происходит в одной плоскости, но размножающаяся клетки сохраняют между собой связь и образуют различной длины цепочки, напоминающие нити бус.

4. Стафилококки (от *лат.* гроздь винограда). Деление происходит в нескольких плоскостях, а образующиеся клетки располагаются скоплениями, напоминающими **гроздь винограда**.

5. Тетракокки (от *лат* - четыре). Деление клеток происходит в двух взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием тетрад. **Патогенные** для человека виды встречаются очень **редко**.

6. Сарцины (от *лат*— связка, тук). деление клеток происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием пакетов (тюков) из 8, 16, 32 и большего числа особей. Особенно часто встречаются в воздухе. Имеются **условно-патогенные** представители.

2. **Палочковидные (цилиндрические)** формы бактерий. Палочки бывают **длинными** — более 3 мкм, **короткими** — 1,5—3,0 мкм и **очень короткими** — менее 1,0 мкм — в виде коккобактерий.

Концы палочек могут быть **закругленными, заостренными, утолщенными, обрезанными**

Палочка может иметь овоидную (яйцевидную) форму.

По диаметру их делят на **тонкие** и **толстые**.

По взаиморасположению бактерий. их подразделяют на три группы:

1) **монобактерии** — палочки располагаются одиночно и беспорядочно, сюда относится большинство палочковидных форм

2) **диплобактерии**, располагающиеся попарно

3) **стрептобактерии**— бактерии, располагающиеся цепочкой.

3. **Извитые (спиралевидные) бактерии** по количеству и характеру завитков, а также по диаметру клеток подразделяют на две группы:

1) **вибрионы** (от *греч*— извиваюсь, изгибаюсь) имеют **один изгиб**, не превышающий четверти оборота спирали, однако могут иметь и форму прямой палочки, **без изгиба**

2) **спириллы** (от *греч.* — завиток) — клетки, имеющие большой диаметр и **малое (2-3) число завитков**.

3) Особую группу спиралевидных бактерий представляют **спирохеты**,

4. Нитевидные формы бактерий. Различают два типа нитевидных бактерий: образующие **временные нити** и **постоянные**.

Временные нити, иногда с ветвлениями, образуют палочковидные бактерии при нарушении условий их роста или регуляции клеточного деления (микобактерии, коринебактерии, а также риккетсии, микоплазмы, многие грамотрицательные и грамположительные бактерии). При восстановлении механизма регуляции деления и нормальных условий роста эти бактерии восстанавливают обычные для них размеры. **Постоянные нитевидные формы** образуются из палочковидных клеток, соединяющихся в длинные цепочки либо с помощью слизи, либо чехлами, либо мостиками. Влагалищами, или футлярами, называют трубковидные чехлы гетерополисахаридной природы. Слизь может связывать отдельные клетки в длинные нити или пленки.

Лабораторная работа №2

Тема: Физиология микроорганизмов.

Методы окраски микроорганизмов

Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. У кислых красителей ион, придающий окраску (хромофор) - анион, у основных - катион. К кислым красителям относятся эозин, кислый фуксин, эритрозин и др. Эти красители интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки. Основные красители - метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, сафранин - интенсивнее связываются с ядерными компонентами клетки. Высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетке бактерий делает ее более чувствительной к основным красителям. В микробиологической практике применяются почти исключительно основные красители.

Различают простые и сложные (дифференциальные) способы окраски микроорганизмов.

Простые методы окраски

Простая окраска позволяет быстро изучить морфологические особенности микроорганизмов. Наиболее пригодными являются основные и нейтральные анилиновые красители. Для простой окраски используют только один краситель, чаще всего красного цвета - фуксин, фиолетового - генцианвиолет (окраска производится в течение 1-2 мин) или синего - метиленовый синий (окраска производится в течение 3-5 мин).

Чтобы приготовить мазок, на середину чистого предметного стекла наносят небольшую каплю воды, с помощью бактериальной петли помещают в нее исследуемый материал и равномерно распределяют его на стекле до образования тонкого мазка. Препарат высушивают и фиксируют над пламенем горелки. После окраски промывают водой и высушивают, после чего его можно микроскопировать.

Метод Грама - метод окраски микроорганизмов для исследования, позволяющий дифференцировать бактерии по биохимическим свойствам их клеточной стенки. Предложен в 1884 году датским врачом Г.К. Грамом.

По Граму бактерии окрашивают анилиновыми красителями — генциановым или метиловым фиолетовым и др., затем краситель фиксируют раствором йода. При последующем промывании окрашенного препарата спиртом те виды бактерий, которые оказываются прочно окрашенными, называют грамположительными бактериями (обозначаются **Грам (+)**), — в отличие от грамотрицательных (**Грам (-)**), которые при промывке обесцвечиваются.

Использование в диагностике

Окраска по Граму имеет большое значение в систематике бактерий, а также для микробиологической диагностики инфекционных заболеваний.

Грамположительны кокковые (кроме представителей рода *Neisseria*) и спороносные формы бактерий, а также дрожжей, они окрашиваются в иссиня-чёрный (тёмно-синий) цвет.

Грамотрицательны многие неспороносные бактерии, они окрашиваются в красный цвет, ядра клеток приобретают ярко-красный цвет, цитоплазма — розовый или малиновый.

Техника проведения окраски

Окраска по Граму относится к сложному способу окраски, когда на мазок воздействуют двумя красителями, из которых один является основным, а другой — дополнительным. Кроме красящих веществ при сложных способах окраски применяют обесцвечивающие вещества: спирт, кислоты и др.

Для окраски по Граму чаще используют анилиновые красители трифенилметановой группы: генциановый, метиловый фиолетовый или кристаллвиолет. Грамположительные **Грам (+)** микроорганизмы дают прочное соединение с указанными красителями и йодом. При этом они не обесцвечиваются при воздействии на них спиртом, вследствие чего при дополнительной окраске фуксином **Грам (+)** микроорганизмы не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет.

Грамотрицательные Грам (–) микроорганизмы образуют с основными красителями и йодом легко разрушающееся под действием [спирта](#) соединение. В результате микробы обесцвечиваются, а затем окрашиваются фуксином, приобретая красный цвет.

Этапы приготовления мазков-препаратов.

1. Подготовка мазка исследуемый материал наносят на чистое обезжиренное предметное стекло.

Для взятия бактериальной культуры:

- нагревают до покраснения бактериальную петлю в пламени горелки;
- берут пробирку с исследуемой культурой в левую руку так, чтобы видеть поверхность среды; вращательным движением вынимают пробку из пробирки, прижимая ее мизинцем и безымянными пальцами правой руки к ладони;
- обжигают край пробирки, осторожно вводят петлю и берут исследуемый материал;
- вынимают петлю, обжигают край пробирки и закрывают пробкой.
- взятый материал осторожно распределяют по предметному стеклу тонким слоем, после чего бактериальную петлю стерилизуют в пламени спиртовки;
- если препарат готовят из бактериальной культуры, выращенной на плотной среде, то на предметное стекло предварительно наносят каплю стерильного физиологического раствора

2. Высушивание мазков производится на воздухе при комнатной температуре или в токе теплого воздуха, держа предметное стекло высоко над пламенем горелки. Нельзя допускать закипания материала, т.к. при этом может нарушиться структура микроорганизмов.

2. Фиксация препарата: высушенные мазки подвергают термической (предметное стекло (мазком вверх) проводят несколько раз через пламя горелки) или химической (фиксирующие растворы формалин, спирты, глутаральдегид, жидкость Карнау, ацетон, пары осмиевой кислоты) обработке, в результате которой бактерии погибают и плотно прикрепляются к поверхности стекла.

Физический способ фиксации

Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за рёбра мазком кверху и плавным движением проводят 2—3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с.

Надёжность фиксации проверяют следующим приёмом: свободную от мазка поверхность предметного стекла прикладывают к тыльной поверхности левой кисти. При правильном фиксировании мазка стекло должно быть горячим, но не вызывать ощущения [ожога](#) (70—80 °C).

Химический способ фиксации

Для фиксации мазков применяют [метиловый спирт](#), [ацетон](#), смесь Никифорова (смесь [этилового спирта](#) 96 % и наркотического [эфира](#) в соотношении 1:1), жидкость Карнуа (этилового спирта 96 % — 60 %, [хлороформа](#) 30 %, ледяной [уксусной кислоты](#) 10 %), спирт-формол (40 % [формалин](#) 5 мл, этиловый спирт 96° — 95 мл). Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом на 10—15 минут и затем высушивают на воздухе. Применяется также фиксация в парах 40 % формалина в течение нескольких секунд.

Процесс окрашивания мазков

1. На фиксированный мазок наливают один из основных красителей на 2—3 минуты. Во избежание осадков окрашивают через фильтровальную бумагу.

2. Сливают краску, аккуратно удаляют фильтровальную бумагу. Мазок заливают [раствором Люголя](#) или йодистым раствором по Граму (водный раствор йодида калия и кристаллического [йода](#) в соотношении 2:1) на 1—2 минуты до почернения препарата.

3. Раствор сливают, мазок прополаскивают 96° этиловым спиртом или [ацетоном](#), наливая и сливая его, пока мазок не обесцветится и стекающая жидкость не станет чистой (приблизительно 20—40—60 секунд).

4. Тщательно промывают стекла в проточной или дистиллированной воде 1—2 мин.

5. Для выявления грамотрицательной группы бактерий препараты дополнительно окрашивают [фуксином](#) или [сафранином](#) (2—5 мин).

6. Промывают в проточной воде и высушивают фильтровальной бумагой.

Техника окраски бактерий в гистологических срезах по Граму-Вейгерту

1. Депарафинированные срезы доводят до воды.

2. Окрашивают 20 мин в 1 % растворе парарозанилина или основного фуксина в 1 % уксусной кислоте (раствор красителя нагревают до кипения, охлаждают и фильтруют).

3. Промывают в 3 сменах дистиллированной воды.

4. Окрашивают 5 мин в 1 % кристаллического фиолетового в дистиллированной воде.

5. Быстро ополаскивают в 1 % растворе хлорида натрия.

6. Обрабатывают 30 с в смеси: 1 часть йода + 2 части йодида калия + 100 частей дистиллированной воды.

7. Промокают фильтровальной бумагой.

8. Дифференцируют, нанося на срез смесь равных объемов анилина и ксилола (1 — 2 мл); растворы сливают до тех пор, пока облачка красителя не перестанут отходить от среза.

9. Проводят через 3 смены ксилола.

10. Заключают в бальзам или любую смолу, растворенную в ксилоле.

Результат: грамположительные бактерии сине-черные, фибрин фиолетовый, ядра красные.

Метод окраски по Цилю-Нильсену

Метод Циля-Нильсена предназначен для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (возбудителей туберкулеза и лепры) от некислотоустойчивых.

1. Мазок окрашивают карболовым фуксином Циля (основной краситель) при нагревании 3-5 мин.

2. Обесцвечивают раствором серной кислоты (дифференцирующее вещество) в течение 1-2 мин.

3. Промывают водой.

4. Докрашивают 3-5 мин метиленовым синим (дополнительный краситель).

Клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий отличается высоким содержанием липидов. Они с трудом окрашиваются, но затем удерживают основной краситель при обесцвечивании кислотой. Некислотоустойчивые бактерии легко окрашиваются, а затем легко обесцвечиваются кислотой и окрашиваются дополнительным красителем.

Кислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в рубиново-красный цвет, некислотоустойчивые - в сине-голубой.

Лабораторная работа №3

Тема: Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы.

Жизнь микроорганизмов находится в тесной зависимости от условий окружающей среды. Как на растения, макроорганизмы, так и на микромир существенное влияние оказывают различные факторы внешней среды. Их можно разделить на три группы: химические, физические и биологические.

Физические факторы

Из физических факторов наибольшее влияние на микроорганизмы оказывают: температура, высушивание, лучистая энергия, ультразвук, давление.

Температура: жизнедеятельность каждого микроорганизма ограничена определенными температурными границами. Эту температурную зависимость обычно выражают тремя точками: минимальная (min) температура — ниже которой размножение прекращается, оптимальная (opt) температура — наилучшая температура для роста и развития микроорганизмов и максимальная (max) температура — температура, при которой рост клеток или замедляется, или прекращается совсем. Впервые в истории науки Пастером были разработаны методы уничтожения микроорганизмов при воздействии на них высоких температур.

Оптимальная температура обычно приравнивается к температуре окружающей среды.

Все микроорганизмы по отношению к температуре условно можно разделить на 3 группы:

- **Мезофильные виды** [от греч. mesos, средний, промежуточный, + phileo, любить] лучше растут в пределах 20-40 °С; к ним относится большинство патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

- **Термофильные виды** [от греч. therm{e}, тепло, + phileo, любить] быстрее растут при температуре выше 40 °С, верхний предел 70 °С (примеры — *Thermoactinomyces vulgaris*, *Bacillus stearothermophilus*). К термотолерантным относят микробов, растущих при повышении температуры до 50 °С (например, *Methylococcus capsulatus*); к крайне термофильным — виды, для которых оптимальная температура роста превышает 65 °С (*Sulfolobus*). Отдельные виды бактерий способны расти при температуре выше 70 °С: *Sulfolobus acidocaldarius* растёт при 80 °С, а *Pyrodicticum occultum* (строгий анаэроб, восстанавливающий серу) — при 105 °С.

- **Психрофильные виды** [от греч. psychros, холод, + phileo, любить] растут в диапазоне температур 0-10 °С; к ним относится большинство сапрофитов, обитающих в почве, пресной и морской воде (например, морские светящиеся бактерии, некоторые железобактерии рода *Galionella*).

Высокая температура вызывает коагуляцию структурных белков и ферментов микроорганизмов. Большинство вегетативных форм гибнет при 60 °С в течение 30 мин, а при 80-100 °С — через 1 мин. Для сохранения жизнеспособности относительно благоприятны низкие температуры (например, ниже 0 °С), безвредные для большинства микробов. Бактерии выживают при температуре ниже -100 °С; споры бактерий и вирусы годами сохраняются в жидком азоте. Простейшие и некоторые бактерии (спирохеты, риккетсии и хламидии) менее устойчивы к температурным воздействиям.

Высушивание. Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов нужна вода. Высушивание приводит к обезвоживанию цитоплазмы, нарушается целостность цитоплазматической мембраны, что ведет к гибели клетки. Некоторые микроорганизмы под влиянием высушивания погибают уже через несколько минут: это менингококки, гонококки. Более устойчивыми к высушиванию являются возбудители туберкулеза,

которые могут сохранять свою жизнеспособность до 9 месяцев, а также капсульные формы бактерий. Особенно устойчивыми к высушиванию являются споры. Например, споры плесневых грибов могут сохранять способность к прорастанию в течение 20 лет, а споры сибирской язвы могут сохраняться в почве до 100 лет.

Для хранения микроорганизмов и изготовления лекарственных препаратов из бактерий применяется метод лио-фильной сушки. Сущность метода состоит в том, что микроорганизмы сначала замораживают при -273°C , а потом высушивают в условиях вакуума. При этом микробные клетки переходят в состояние анабиоза и сохраняют свои биологические свойства в течение нескольких лет. Таким способом, например, изготавливают биопрепарат «колибактерин», содержащий штаммы *E. coli*.

Химические факторы

Влияние химических веществ на микроорганизмы различно. Оно зависит от химического соединения, его концентрации, продолжительности воздействия.

В малых концентрациях химическое вещество может являться питанием для бактерий, а в больших — оказывать на них губительное действие. Например, соль NaCl в малых количествах добавляют в питательные среды. Так же существуют галофильные микроорганизмы, которые предпочитают соленую среду. В больших концентрациях NaCl задерживает размножение микроорганизмов. Для примера можно привести консервирование в быту: при недостаточном количестве соли баллоны с овощами могут «взрываться».

Некоторые химические вещества используются в качестве антисептиков. Антисептики — это противомикробные вещества, которые используются для обработки биологических поверхностей. Антисептика — это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микробов в ране или организме в целом, на предупреждение и ликвидацию воспалительного процесса. К антисептикам относятся:

препараты йода (спиртовый раствор йода, йодиол, йодоформ, раствор Люголя);

* соединения тяжелых металлов (соли ртути, серебра, цинка);

* химические вещества нитрофуранового ряда (фуразо-лидон, фурациллин); окислители (перекись водорода, калия перманганат);

* кислоты и их соли (салициловая, борная);

* красители (метиленовый синий, бриллиантовый зеленый).

Уничтожение микроорганизмов в окружающей среде

Для уничтожения микроорганизмов в окружающей среде применяются стерилизация и дезинфекция.

Стерилизация — это полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор. Существуют физические, химические и механические способы стерилизации.

К наиболее распространенным способам физической стерилизации относятся автоклавирование и сухожаровая стерилизация.

Автоклавирование — это обработка паром под давлением, которая проводится в специальных приборах — автоклавах. Автоклав представляет собой металлический цилиндр с прочными стенками, состоящий из двух камер: парообразующей и стерилизующей. В автоклаве создается повышенное давление, что приводит к увеличению температуры кипения воды. Паром под давлением стерилизуют питательные среды, патологический материал, инструментарий, белье и т.д.

Наиболее распространенный режим работы автоклава — 2 атм., 120°C , 15—20 мин. Началом стерилизации считают момент закипания воды.

К работе с автоклавом допускаются подготовленные специалисты, которые точно и строго выполняют все правила работы с этим прибором.

Сухожаровая стерилизация — проводится в печах Пас-тера. Это шкаф с двойными стенками, изготовленный из металла и асбеста, нагреваемый с помощью электричества и снабженный термометром. Сухим жаром стерилизуют, в основном, лабораторную посуду. Обеззараживание материала в нем происходит при 160°C в течение 1 часа.

Микроорганизмы подвержены **постоянному воздействию факторов внешней среды**. Влияние этих факторов может быть благоприятным либо неблагоприятным. Неблагоприятные воздействия могут приводить к гибели микроорганизмов, то есть оказывать **микробицидный эффект** {например, фунги- или вирулицидный), либо подавлять размножение микробов, оказывая статическое действие (например, бактериостатическое).

Неблагоприятное **воздействие на микроорганизмы факторов внешней среды** люди использовали с древнейших времён. Например, погреба часто окуривали серой; во время эпидемий для обеззараживания предметов их прокаливали или обрабатывали специальными составами (например, смесью уксуса и винного спирта). Открытие и изучение свойств патогенных микроорганизмов стало началом направленной разработки методов подавления жизнедеятельности микробов. Было установлено, что некоторые воздействия оказывают избирательный эффект на отдельные виды, другие — проявляют широкий спектр активности.

Воздействие температуры на микробы. Стерилизация. Пастеризация. Стерилизация сухим жаром. Автоклавирование. Тиндализация.

Стерилизация. Температурные воздействия применяют для стерилизации — полного удаления микроорганизмов из различных сред и обеззараживания предметов. Разработано много режимов

стерилизации; следует помнить, что термическая обработка применима лишь в отношении термоустойчивых материалов (стекло, металлы). Наиболее простые и доступные методы — прокаливание и кипячение.

Пастеризация. Метод позволяет эффективно уничтожать микроорганизмы инкубацией материала при 71,7 °С в течение 15 с с последующим быстрым охлаждением (**быстрая пастеризация**). **Медленная пастеризация** подразумевает более длительную экспозицию (30 мин) при 60 °С. Строго говоря, **пастеризация** — не стерилизующий метод, так как к ней чувствительны не все микроорганизмы. Метод широко применяют при обработке пищевых продуктов для профилактики кишечных инфекций, желудочно-кишечных форм туберкулёза и Ку-лихорадки.

Стерилизация сухим жаром. Проводят в сухожаровых шкафах при 160 °С в течение 2 ч; метод позволяет уничтожать не только вегетирующие клетки (погибают в течение нескольких минут), но и споры микроорганизмов (необходима экспозиция в течение 2 ч). Такие воздействия разрушают структуру большинства органических соединений и ведут к значительному испарению жидкостей (например, воды из питательных сред).

Автоклавирование (стерилизация текучим паром) включает обработку горячим паром (121 °С) под высоким давлением (1,2-1,5 атм); наиболее эффективно для стерилизации термостабильных жидкостей. Термоустойчивые споры микроорганизмов погибают в течение 15 мин. Обработка больших объёмов (более 500 мл) требует более длительной экспозиции. В лабораториях применяют специальные паровые котлы-автоклавы с горизонтальной или вертикальной загрузкой. Текучий пар нельзя применять для стерилизации сред, содержащих углеводы, молоко и желатина.

Тиндализация — метод дробной стерилизации при низких температурах — ежедневное прогревание сред при 56-58 °С в течение 5~6 сут. В результате такого дробного прогрева погибают вегетативные клетки бактерий, проросших из термостойких спор. Основной недостаток — невозможность полной элиминации микроорганизмов, так как некоторые споры не успевают прорасти во временных интервалах между сеансами прогревания, а некоторые; вегетативные клетки успевают образовать термостабильные споры. Метод применяют для **стерилизации сыворотки крови**, асцит и чешской жидкости и т.д.

Лабораторная работа №4

Тема: Взаимоотношение микроорганизмов между собой и с другими существами.

Способы хранения пищевых продуктов без охлаждения

Людам всегда было необходимо найти способы сохранения продуктов, собранных в сезоны изобилия, для того, чтобы выжить в периоды их недостатка. Поэтому открытие и развитие сушки, копчения, маринования, засолки и других способов **сохранения пищевых продуктов** предшествовали развитию машинного охлаждения. Эти способы применялись еще до того, как люди узнали причины порчи продуктов. Хотя эти способы пригодны для сохранения некоторых видов пищевых продуктов, у них, тем не менее, есть некоторые недостатки, которые ограничивают их применение. Наибольшее неудобство этих способов — это серьезные **изменения внешнего вида** и вкуса пищевых продуктов. Кроме того, качество продуктов, обработанных этими способами, ограничено во времени. Если продукт нужно сохранить неопределенное или длительное время, необходимо использовать другие способы хранения.

Способы сохранения без охлаждения все еще используются во всем мире не только там, где нет других средств, но они также и дополняют более современные способы сохранения пищевых продуктов. Например, миллионы килограммов обезвоженных (сушеных) фруктов, молока, яиц, рыбы, мяса и картофеля потребляются ежегодно наряду с огромным количеством копченых, маринованных и соленых продуктов, таких как ветчина, бекон и колбаса.

Изобретение микроскопа и последующее открытие микроорганизмов в качестве основной причины порчи продуктов привело к развитию консервирования для их сохранения. Преимуществом консервированных пищевых продуктов является почти полное отсутствие порчи и легкость обработки, наряду с тем, что их удобно перевозить и хранить. В настоящее время способ консервирования занимает первое место среди всех других способов сохранения продуктов. Главный недостаток **консервирования** заключается в том, что пищевые продукты нужно стерилизовать, в процессе чего они подвергаются чрезмерной обработке. Поэтому, хотя

консервированные продукты нередко отличаются своеобразным и приятным вкусом, они значительно отличаются по структуре и аромату от свежих.

Единственным средством сохранения продуктов в первоначальном свежем состоянии является охлаждение. Это принципиальное **преимущество холода** перед другими способами. Однако у охлаждения есть следующие недостатки:

1. Когда пищевые продукты сохраняются холодом, **процесс охлаждения** необходимо начать сразу после сбора.
2. Процесс охлаждения должен быть непрерывным до потребления продуктов.
3. Способ сохранения холодом требует относительно дорогого и громоздкого оборудования.

Данные условия делают охлаждение неудобным и неэкономичным способом **сохранения пищевых продуктов** во многих случаях. Основываясь на этом, можно отметить, что нет ни одного способа, который был бы оптимальным во всех случаях. Выбор способа зависит от:

1. вида продукта;
2. длительности хранения;
3. цели использования;
4. наличия транспортных средств;
5. наличия **оборудования для хранения**.

Наконец, часто необходимо одновременно использовать несколько различных способов сохранения для получения желаемых результатов.

Лабораторная работа №5

Тема: Превращение микроорганизмами соединений углерода.

Исходные продукты для приготовления питательных сред. Для приготовления питательных сред используют:

- Продукты животного происхождения (мясо, рыба, казеин, молоко, яйца, кровь и т. д.).
- Продукты растительного происхождения (картофель и др.).
- Органические и неорганические соединения определенного химического состава.

Питательные среды, приготовленные из продуктов растительного и животного происхождения, несмотря на то, что они не могут быть стандартны и не имеют определенного химического состава, находят широкое применение в практике микробиологии. Синтетические питательные среды, составленные из химических соединений, используют преимущественно для изучения обмена веществ микробной клетки.

Требования, предъявляемые к питательным средам. Питательные среды должны:

- Содержать необходимые для питания микроба питательные вещества.
- Иметь реакцию pH, оптимальную для выращиваемого вида микроба.
- Иметь достаточную влажность, так как микробы питаются по законам диффузии и осмоса.
- Обладать изотоничностью.
- Быть стерильными, обеспечивая тем самым возможность выращивания чистых культур микробов.

Питательные среды подразделяются на среды общего назначения и специальные.

К первой группе относятся мясо-пептонные: агар, бульон, питательный желатин. Среда общего назначения используют для выращивания многих патогенных микробов и применяют в качестве основы для приготовления специальных сред, добавляя к ним кровь, сахар, молоко, сыворотку и другие ингредиенты, необходимые для размножения того или иного вида микроба.

К специальным питательным средам относятся элективные (избирательные) и дифференциально-диагностические.

Элективные (избирательные) среды. Принцип создания элективных питательных сред основан на удовлетворении основных биохимических и энергетических потребностей того вида микроба, для культивирования которого они предназначены. Определенный состав и концентрация питательных микроэлементов, ростовых факторов при строгом значении pH обеспечивают оптимальные условия для выращивания одного или нескольких

видов микроорганизмов. При посеве на них материала, содержащего смесь различных микроорганизмов, раньше всего будет проявляться рост того вида, для которого данная среда будет элективной.

Дифференциально-диагностические питательные среды.

Дифференциально-диагностические питательные среды используют для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ. По своему назначению дифференциально-диагностические питательные среды подразделяются следующим образом:

- Среда для выявления протеолитической и гемолитической способности микробов, содержащие в своем составе белковые вещества: кровь, молоко, желатин, свернутую кровяную сыворотку и т. д.
- Среда с индифферентными химическими веществами, которые служат источником питания для одних видов микробов и не усваиваются другими видами.
- Среда с углеводами и многоатомными спиртами для обнаружения соответствующих ферментов.
- Среда для определения редуцирующей способности микробов.

В состав дифференциально-диагностических сред, предназначенных для выявления сахаролитических и окислительно-восстановительных ферментов, вводят индикаторы: нейтральный красный, метиленовый синий, лакмусовую настойку, кислый фуксин, бромтимоловый синий, водный голубой краситель и розоловую кислоту. Изменяя свою окраску при различных значениях pH, индикатор указывает на наличие или отсутствие расщепления, окисления или восстановления введенного в среду ингредиента. Однако индикатор не является обязательной составной частью сред, предназначенных для выявления ферментов. Так, наличие желатиназы и других протеолитических ферментов в культуре определяют по разжижению желатина, свернутого яичного или сывороточного белка.

Сухие питательные среды.

Приготовление питательных сред — один из наиболее ответственных и трудных участков работы бактериологической лаборатории. В связи с этим биопромышленность выпускает стандартные, консервированные, сухие питательные среды, различного назначения, для культивирования микроорганизмов.

Приготовление обычных питательных сред. Основой для приготовления этих сред служит мясная вода, содержащая экстрактивные вещества.

Посуда.

Питательные среды готовят в кастрюлях, эмалированных или из нержавеющей стали. Готовые питательные среды разливают во флаконы, пробирки, чашки.

Новую стеклянную посуду кипятят в 1—2% растворе соляной кислоты для нейтрализации растворимой щелочи, затем тщательно промывают в проточной воде и сушат. Посуду, бывшую в употреблении, стерилизуют, затем моют, прополаскивают и сушат. Сухие флаконы, колбы, пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками.

Мясная вода.

1. 100 г свежей говядины или телятины освобождают от костей, жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, фарш заливают 1 литром водопроводной воды, хорошо размешивают. Оставляют на сутки в прохладном месте или помещают на 2 часа в термостат.

2. Мясную пасту отжимают через марлю, кипятят в течение 5 минут. Для свертывания белков дают остыть. Фильтруют через ватный фильтр, доливают водой до первоначального объема. Мясную воду разливают во флаконы, стерилизуют 20-30 минут при 120°C и сохраняют в темном месте. Она имеет вид прозрачной желтоватой жидкости слабокислой реакции (pH 6,2—6,4), без белков. В мясной воде содержится небольшое количество аминокислот, солей, углеводов, факторов роста и экстрактивных веществ. Для приготовления обычных питательных сред к мясной воде прибавляют сухой пептон, который является первичным продуктом гидролиза белка и состоит из смеси полипептидов и аминокислот, полученных путем пептического или триптического переваривания.

На мясокомбинатах для производства сухого пептона используют фибрин, кровь и другие отходы. Сушат пептон в распылительной вакуум-сушилке.

Жидкий пептон можно приготовить в лабораторных условиях путем пептического переваривания белков.

Пептон Мартена.

Свиные желудки (не промытые водой) с обильным слизистым слоем очищают от пленок, жира и пропускают через мясорубку. К фаршу прибавляют воду и соляную кислоту в следующем соотношении: фарш из свиных желудков 250 г, вода водопроводная, нагретая до 50°C, 1000 мл, соляная кислота (удельный вес 1,18) 10 мл. Смесь выдерживают в термостате при 50°C. Через 24 часа пептон прогревают в автоклаве при 100°C и фильтруют, фильтрат подщелачивают 10% раствором NaOH до щелочной реакции по лакмусу. После этого фильтрат разливают в колбы и стерилизуют при 115°C 30 минут.

Для приготовления бульона пептон Мартена смешивают с равным объемом мясной воды, устанавливают необходимую реакцию, кипятят 30 минут, фильтруют и стерилизуют при 115°C 30 минут.

Мясо можно переваривать с помощью трипсина — перевар Хоттингера, при этом более полно используют белки мяса, которые расщепляются до пептонов, полипептидов и свободных аминокислот. При триптическом переваривании мяса получают в 10 раз больше бульона, чем при обычном методе.

Мясо-пептонный бульон (МПБ).

1. В 1 л мясной воды растворяют при подогревании и помешивании 10 г пептона (1%) и 5 г (0,5%) хлористого натрия. Рекомендуется брать 3 части хлористого натрия и 2 части двузамещенного фосфорнокислого натрия. Смесь вводится в количестве 0,5%. Фосфорнокислый натрий стабилизирует реакцию среды и служит дополнительным источником фосфора. Устанавливают pH среды до 7,6—7,8, кипятят 30—45 минут до выпадения осадка.

2. Охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, доливают водой до первоначального объема, проверяют pH.

3. Разливают по пробиркам, флаконам и стерилизуют 15—20 минут в автоклаве при 120°C.

Концентрированный мясо-пептонный бульон готовят на особой мясной воде (1 кг мяса заливают 1 л воды). Такой бульон служит для выращивания анаэробных и других микробов.

Мясо-пептонный агар (МПА).

1. К мясо-пептонному бульону для придания плотности добавляют 2—2,5% мелко нарезанного и промытого агар-агара.

Агар-агар получают путем специальной обработки морских водорослей. Он является веществом полисахаридной природы, содержит незначительное количество азота и не представляет собой питательный субстрат. Студень, образуемый агар-агаром, расплавляется при 70—100°C и застывает при 40—50°.

2. Кипятят, помешивая, до полного расплавления агара. В некоторых случаях для просветления среды прибавляют белок одного куриного яйца, смешанного с двойным количеством холодной воды. Среду помещают в автоклав на 45 минут при 115°C. Свернувшиеся хлопья белка адсорбируют взвешенные частицы и осаждаются на дно.

3. Проверяют и исправляют реакцию среды. Отстаивают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр в горячем автоклаве или в специальной металлической воронке с двойными стенками, между которыми находится горячая вода.

4. Разливают среду через стеклянную воронку с зажимом в пробирки и флаконы и стерилизуют в автоклаве при 120°C в течение 15—20 минут.

5. Из расплавленного стерильного мясо-пептонного агара готовят скошенный и прямой агар (агар столбиком). В первом случае пробирки укладывают горизонтально до полного застывания, во втором — пробирки помещают в штатив вертикально.

Технология приготовления питательных сред из сухих препаратов проста. Навеску, указанную на этикетке, всыпают в стеклянную колбу или бутыл с холодной дистиллированной водой. Смесь следует хорошо размешать до полного смачивания порошка водой. Затем в водяной бане или лучше в текучепаровом аппарате смесь нагревают до кипения, периодически помешивая. Кипятят до тех пор, пока порошок окончательно не растворится. Растворение на голом огне возможно, но требует большого внимания, чтобы не допустить пригорания среды. Перед разливкой следует среду хорошо перемешать. Сухие среды выпускаются основные, элективные и дифференциальные.

Сухой питательный агар (рН 7,3—7,6).

К растворенному сухому агару (5—7,5 г сухого агара на 100 мл) рекомендуется добавлять в качестве факторов роста небольшое количество дрожжевого аутолизата, мясной воды или неразведенного триптического перевара мяса (около 1/3 растворяющей жидкости). Для выявления валлообразования паратифозной В палочки, а также расщепления бактерий Зонне на круглые и плоские варианты сухой агар растворяют дистиллированной водой, содержащей триптический перевар, в отношении 2:1. Если после растворения агар недостаточно прозрачен, его фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Разливают по пробиркам или флаконам. Стерилизуют под давлением 1 атм. в течение 20 минут.

Лабораторная работа №6

Тема: Синтез микроорганизмами белка и биологически активных веществ.

Физиологически активные соединения, образуемые бактериями

Микроорганизмы в процессе жизнедеятельности вырабатывают разнообразные соединения, имеющие важное значение для жизни высших: организмов — растений, животных и других микроорганизмов.

К физиологически активным веществам относят также ферменты, витамины, аминокислоты, антибиотики, пуриновые и пиримидиновые основания, гормоны, токсины и др.

Мир микробов — богатейший источник разнообразных физиологически активных веществ. Возможности микроорганизмов поистине неисчерпаемы. В настоящее время известно большое количество микробных метаболитов. С каждым годом наука открывает новые ценные соединения, некоторые из них ранее не были известны органической химии.

На основе использования микроорганизмов для получения ценных физиологически активных соединений была создана микробиологическая промышленность. С помощью микроорганизмов получают быстрее, проще, а главное, дешевле различные вещества, применяемые в самых разнообразных отраслях народного хозяйства — медицине, пищевой промышленности, в сельском хозяйстве и т. д.

Токсины

Некоторые бактерии образуют токсические вещества — токсины — соединения разнообразной химической природы, обладающие высокой физиологической активностью. Они значительно подавляют рост и развитие растений (рис. 203). Действие токсинов весьма существенно отражается на животных. Они оказывают значительное влияние на различные стороны обмена веществ живого организма, подавляя различные физиологические функции. Некоторые токсические вещества действуют также на микробную клетку. Токсины могут быть различного химического состава и различного биологического действия.

Витамины

Витамины представляют собой группу сравнительно низкомолекулярных органических соединений разнообразного химического строения, объединяемых по признаку их строгой необходимости для питания человека и животных. Витамины требуются в малых количествах и выполняют в организме те или иные каталитические функции, так как входят в состав ферментов.

Микроорганизмы обладают способностью к синтезу различных витаминов. Бактерии, актиномицеты в определенных условиях могут накапливать в среде значительные количества этих веществ. Активность различных видов микробов разнообразна в отношении синтеза витаминов. Каждый вид синтезирует только определенные витамины. Известны микробы, синтезирующие витамины В1, В2, биотин, пантотеновую кислоту, пиридоксин, никотиновую кислоту и др. Многие виды бактерий и актиномицетов, окрашенные в красно-розовый, краснооранжевый или желтый цвет, образуют предшественников витаминов, так называемые провитамины — каротины и каротиноиды. Бактерии, микобактерии, актиномицеты, метанобактерии могут синтезировать витамин В12, который имеет важное значение для организма человека и животного, так как применяется при лечении злокачественной анемии.

Витамины необходимы и для медицины, и для сельского хозяйства. Уже давно витамины получают в основном путем извлечения их из натурального сырья. Позже были разработаны методы химического синтеза ряда витаминов, применяемые сейчас главным образом в производстве медицинских витаминных препаратов. Использование витаминов в животноводстве как добавок в корма требует массового производства. В этих условиях оба способа оказываются во многих случаях невыгодными. Извлечение витаминов из натурального сырья связано с расходом ценных пищевых продуктов (например, витамин В12 извлекают из сырой печени крупного рогатого скота, бета - каротин из моркови и т. д.), а химический синтез, отличающийся в ряде случаев сложностью, делает конечные продукты слишком дорогими.

Аминокислоты

Многие микроорганизмы способны синтезировать аминокислоты.

Аминокислоты — важнейшие органические соединения, содержащие азот, являющиеся основными строительными «кирпичиками» белка. Аминокислоты необходимы для синтеза биологических катализаторов — ферментов. Ни одна химическая реакция в организме не протекает без ферментов. Поэтому обмен веществ живого организма невозможен без аминокислот. В центре обмена веществ организма стоит белковый обмен. Рост, развитие организма, передача наследственности, изменчивость — все это связано с синтезом белков. Поэтому значение аминокислот — основных структурных единиц белка — трудно переоценить. При нарушении белкового обмена в организме животного и человека наступают патологические явления, связанные с недостатком тех или иных аминокислот.

Часть аминокислот организмы животного и человека синтезируют сами, а некоторые, необходимые как человеку, так и животным, не синтезируются или синтезируются недостаточно быстро, чтобы удовлетворять потребности в них организма. Поэтому такие соединения надо вводить в организм с пищей или кормом. Аминокислоты, которые организм человека или животных не может синтезировать, но которые необходимы для нормальной жизнедеятельности, называются незаменимыми.

Широко используются аминокислоты в пищевой промышленности для повышения питательных и вкусовых качеств продуктов. Соль глутаминовой кислоты — глутамат натрия — называют «фактором вкуса»: при его добавлении пищевые продукты приобретают более высокие вкусовые качества. Аминокислоты используют при составлении синтетической пищи.

Аминокислоты все шире используются в сельском хозяйстве для подкормки животных, особенно молодняка. Рационально сбалансированное питание животных в настоящее время не мыслится без использования аминокислот. Аминокислоты в рационе животных и птиц резко сокращают расход белка и корма вообще, увеличивают суточный привес и укорачивают период откармливания.

В области микробиологии аминокислоты получили широкое применение для приготовления сред, например при выращивании тканевых культур, для приготовления вакцин.

Аминокислоты используются в качестве исходного материала при синтезе пептидов, гормонов, антибиотиков.

Посредством полимеризации аминокислот, прежде всего глутаминовой кислоты и аланина, предполагают получать синтетические волокна.

Алкалоиды

С помощью микроорганизмов в настоящее время можно получать некоторые алкалоиды — вещества растительного происхождения, являющиеся сложными гетероциклическими азотистыми основаниями и обладающие чрезвычайно высокой физиологической активностью; они оказывают сильное действие на животный организм. Многие из них являются ядами. Большинство алкалоидов парализуют и угнетают нервную систему, например кокаин, кураре, морфин, атропин. Некоторые из них продуцируют микроорганизмы.

В лабораторных условиях с помощью микроорганизмов получают алкалоиды спорыньи — эргоалкалоиды. Спорынья распространена на ряде злаков, вызывая их заболевание; рожки спорыньи можно увидеть на каждом поле при созревании злаков. Рожки собирают вручную, обрабатывают химическим путем. Такой способ получения эргоалкалоидов трудоемок и не всегда может удовлетворять потребность медицины в этом алкалоиде.

Некоторые культуры грибов при выращивании на искусственных питательных средах могут синтезировать эргоалкалоиды.

Большой интерес представляют алкалоиды типа атропина. В зерне пшеницы и других злаков, хранившихся при неблагоприятных условиях, образуются токсические вещества. В таком зерне были найдены алкалоиды атропиновой группы, которые продуцируются развивающимися в зерне бактериями. Из культур этих бактерий были получены вещества типа атропина.

Ферменты

Ферменты — биологические катализаторы — образуются в живом организме и отличаются необычайной мощностью каталитического действия и высокой специфичностью действия. Эти свойства ферментов обусловлены тем, что они являются белками.

Микроорганизмы, обладающие очень интенсивным обменом веществ, имеют активный ферментативный аппарат. Они синтезируют самые разнообразные ферменты, которые могут катализировать разложение и синтез всех органических веществ, входящих в живую клетку.

Часть ферментов содержится внутри клетки — эндоферменты, некоторые выделяются микроорганизмами в среду — экзо-ферменты.

Ферменты имеют большое практическое значение, так как многие отрасли промышленности — хлебопечение, виноделие, пивоварение, выработка спирта, сыроделие, производство чая, органических кислот, аминокислот, изготовление витаминов и антибиотиков и многие другие — основаны на использовании различных ферментативных процессов.

Продуцентами многих ферментов, которые получают сейчас в производстве, являются грибы. Бактерии и актиномицеты также используются для этой цели. Например, амилазы — ферменты, которые используются в хлебопечении, — получают из грибов и бактерии *Bac. subtilis*; протеолитические ферменты, расщепляющие белки, — из актиномицета *Act. griseus*; кератиназа и протеиназа продуцируются актиномицетом *Act. fradiae*.

Пектинолитические ферменты, расщепляющие пектиновые вещества в растениях, используются при мочке льна. Хорошими их продуцентами являются анаэробные бактерии (процесс идет в анаэробных условиях). Целлюлазы, разрушающие клетчатку и потому используемые для приготовления кормов, продуцируются в очень активной форме целлюлазными бактериями.

Нуклеазы — группа ферментов, участвующих в разложении нуклеиновых кислот, — широко используются для расшифровки строения рибонуклеиновой кислоты (РНК). Нуклеазы были получены из культур актиномицетов, микобактерий и других микроорганизмов.

Этот список можно было бы продолжить, и, вероятно, он очень расширится в ближайшие годы, так как изучение ферментов микроорганизмов и ферментная промышленность развиваются быстрыми темпами.

Лабораторная работа №7

Тема: Распространение микробов в природе.

1. Микрофлора воздуха

Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры воды и почвы, над которыми расположены слои воздуха. В почве и воде микробы могут размножаться, в воздухе они не размножаются, а только некоторое время сохраняются.

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха

Бактериологическое исследование воздушной среды предусматривает:

- определение общего содержания микробов в 1 м³ воздуха;

- определение содержания золотистого стафилококка в 1 м³ воздуха.

Методы отбора проб воздуха:

Существуют два основных способа отбора проб воздуха для исследования:

1. седиментационный — основан на механическом оседании микроорганизмов;

2. аспирационный — основан на активном просасывании воздуха (этот метод дает возможность определить не только качественное, но и количественное содержание бактерий).

Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью аппарата Кротова, который состоит из трех основных частей: основания, корпуса и крышки. В крышке укреплен диск из прозрачного органического стекла с клиновидной щелью для засасывания воздуха. Для определения количества воздуха, прошедшего через прибор, на наружной стенке корпуса помещен ротаметр. В верхней части корпуса расположен вращающийся диск, на который устанавливается чашка Петри. Засасывание воздуха в прибор осуществляется центробежным вентилятором, насаженным на ось электродвигателя. Поступающая в прибор струя воздуха ударяется о поверхность находящейся в чашке питательной среды, оставляя на ней микроорганизмы, и, обтекая электродвигатель, выходит через ротаметр наружу.

Скорость протягивания воздуха составляет 25 л в минуту. Количество пропущенного воздуха должно составлять 100 литров для определения общего содержания бактерий и 250 литров для определения наличия золотистого стафилококка.

При отборе проб в разных помещениях необходимо обрабатывать поверхность аппарата, столик, внутренние стенки дезинфицирующим раствором 70° спиртом.

Определение микробного числа, патогенных микроорганизмов

Для определения общего содержания бактерий в 1 м³ воздуха забор проб проводят на 2% питательный агар. Посевы инкубируют при температуре 37° С в течение 24 часов, затем оставляют на 24 часа при комнатной температуре, подсчитывают количество выросших колоний и производят перерасчет на 1 м³ воздуха. Если на чашках питательного агара выросли колонии плесневых грибов, их подсчитывают и делают перерасчет на 1 м³ воздуха. В протоколе количество плесневых грибов указывают отдельно.

Расчет. Например, за 10 минут пропущено 125 литров воздуха, на поверхности выросло 100 колоний.

$100 \times 1000 \text{ л} \text{ Число микробов в } 1 \text{ м}^3 \text{ воздуха} = \frac{100}{125} \times 1000 = 800 \text{ л}$, т.е. количество выросших колоний -1000 л количество пропущенного воздуха

Для определения наличия золотистого стафилококка забор проб проводят на желточно-солевой агар (ЖСА). Чашки помещают в термостат при температуре 37° С на 24 часа и выдерживают еще 24 часа при комнатной температуре, можно на 48 часов при температуре 37°С. Колонии, подозрительные на стафилококк, подлежат обязательной микроскопии и дальнейшей идентификации.

С желточно-солевого агара снимают в первую очередь колонии стафилококков, которые образуют радужный венчик вокруг колонии (положительная лецитовителлазная реакция). Дальнейшему изучению подвергают также пигментированные колонии и с отрицательной лецитовителлазной реакцией не менее двух колоний различного вида. Подозрительные колонии пересевают на чашки с кровяным или молочным агаром. Дальнейшее изучение их проводят по схеме.

Бактериологическое исследование на стафилококк

1-й день. Посев на элективные среды (желточно-солевой, мол очно-солевой или молочно-желточно-солевой агар). Засеянные среды выдерживают в термостате при 37° С в течение 2 суток, либо одни сутки в термостате и дополнительно 24 часа на свету при комнатной температуре.

2—3-й день. Просмотр чашек, фиксация в журнале характера и массивности роста. На вышеуказанных средах стафилококк растет в виде круглых блестящих, малянистых, выпуклых пигментированных колоний. На средах, содержащих желток, золотистый стафилококк, выделенный от человека, в 60— 70% случаев образует радужный венчик вокруг колонии (положительная лецитовителлазная реакция).

Отбивка на скошенный агар для дальнейшего исследования не менее 2 колоний, подозрительных на стафилококк. Для исследования отбивают прежде всего колонии, дающие положительную лецитовителлазную реакцию.

Пробирки с посевом помещают в термостат при 37°С на 18—20 часов.

4-й день. После суточной инкубации у выделенных штаммов проверяют морфологию, тинкториальные свойства (окраска по Граму) и наличие плазмокоагулирующей активности и хло-пьеобразующего фактора.

Под микроскопом окрашенные по Граму стафилококки имеют вид фиолетово-синих кокков, располагающихся гроздьями или небольшими кучками («кружево»).

5-м день. Учет результатов фаготипирования, определения чувствительности к антибиотикам, ДНКазной активности. Окончательная выдача ответа.

Исследование воздуха седиментационным методом допускается в исключительных случаях.

Чашки Петри с питательной средой (МПА) устанавливают в открытом виде горизонтально, на разном уровне от пола. Метод основан на механическом оседании бактерий на поверхность агара в чашках Петри. Чашки со средой экспонируют от 10 до 20 минут, в зависимости от предполагаемого загрязнения воздуха. Для выявления патогенной флоры используют элективные среды. Экспозиция в этих случаях удлинняется до 2—3 часов. После экспозиции чашки закрывают, доставляют в лабораторию и ставят в термостат на 24 часа при температуре 37 °С. На следующий день изучают выросшие колонии.

Допустимое общее количество КОЕ в 1 м³ воздуха

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Произвести отбор пробы воздуха в учебной комнате седиментационным способом.
2. Произвести отбор пробы воздуха в учебной комнате аспирационным способом (аппаратом Кротова).
3. Определить общее микробное число в 1 м³ воздуха (использовать заранее подготовленные чашки с выросшими колониями).
4. Изучить тинкториальные и ферментативные свойства выросших колоний.
5. Решить задачу: за 10 минут было пропущено 250 литров воздуха. Выросло 150 колоний. Рассчитайте количество колоний в 1 м³ воздуха.

Допустимое количество колоний золотистого стафилококка в 1 м³ воздуха

ВОПРОСЫ для САМОКОНТРОЛЯ

1. Что изучает санитарная микробиология?
2. Назовите основные задачи санитарной микробиологии.
3. Какие микроорганизмы являются санитарно-показательными?
4. Какова роль микроорганизмов в круговороте веществ?
5. Является ли воздух благоприятной средой для развития микроорганизмов ?
6. В каких учреждениях проводят плановое исследование микрофлоры воздуха?
7. От чего зависит микрофлора воздуха?
8. Назовите методы отбора проб воздуха.
9. Какие основные показатели определяют при исследовании воздуха?
10. Какова схема бактериологического исследования воздуха на стафилококк?

2. Санитарно-микробиологическое исследование воды

Микрофлора воды

Вода является естественной средой обитания многих микробов. Основная масса микробов поступает из почвы. Количество микробов в 1 мл воды зависит от наличия в ней питательных веществ. Чем вода сильнее загрязнена органическими остатками, тем больше в ней микробов. Наиболее частыми являются воды глубоких артезианских скважин, а также родниковые воды. Обычно они не содержат микробов. Особенно богаты микробами открытые водоемы и реки. Наибольшее количество микробов в них находится в поверхностных слоях (в слое 10 см от поверхности воды) прибрежных зон. С удалением от берега и увеличением глубины количество микробов уменьшается.

Патогенные микробы попадают в реки и водоемы со сточными водами. Возбудители таких кишечных инфекций, как брюшной тиф, паратифы, дизентерия, холера и др., могут сохраняться в воде длительное время. В этом случае вода становится источником инфекционных заболеваний.

Особенно опасно попадание болезнетворных микробов в водопроводную сеть. Поэтому за состоянием водоемов и подаваемой из них водопроводной воды установлен санитарно-микробиологический контроль.

Санитарно-микробиологический анализ питьевой

Отбор пробы воды:

Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов. Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) пробками и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги). Многократная посуда, в том числе пробки, должны выдерживать стерилизацию сухим жаром или автоклавированием.

Пробу отбирают в стерильные емкости с соблюдением правил стерильности. Емкость открывают непосредственно перед отбором, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора пробка и края емкости не должны чего-либо касаться. Ополаскивать посуду запрещается.

При исследовании воды из распределительных сетей отбор проб из крана производят после предварительной его стерилизации обжиганием и последующего спуска воды не менее 10 минут при полностью открытом кране. Если отбирают воду после обеззараживания химическими реагентами, то для нейтрализации остаточного количества дезинфектанта в емкость, предназначенную для отбора проб, до стерилизации вносят натрий серноватистокислый в виде кристаллов или концентрированного раствора из расчета 10 мг на 500 мл воды.

После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой и колпачком. Отобранную пробу маркируют и сопровождают актом отбора проб воды с указанием названием пробы, места забора, даты (год, месяц, число, час), цель исследования, куда направляется проба для исследования, подпись лица, взявшего пробу.

Доставка проб осуществляется в контейнерах-холодильниках при температуре 4—10°C. В холодный период года контейнеры должны быть снабжены термоизолирующими материалами, обеспечивающими предохранение проб от промерзания. При соблюдении указанных условий срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 6 часов.

Если пробы нельзя охладить, их анализ следует провести в течение 2 часов после забора.

При несоблюдении времени доставки пробы и температуры хранения анализ проводить не следует.

Подготовка посуды к анализу

Лабораторная посуда должна быть тщательно вымыта, ополоснута дистиллированной водой до полного удаления моющих средств и других посторонних примесей и высушена.

Пробирки, колбы, бутылки, флаконы должны быть заткнуты силиконовыми или ватно-марлевыми пробками и упакованы так, чтобы исключить загрязнение после стерилизации в процессе работы и хранения. Колпачки могут быть металлические, силиконовые, из фольги или плотной бумаги.

Новые резиновые пробки кипятят в 2%-м растворе натрия двууглекислого 30 минут и 5 раз промывают водопроводной водой (кипячение и промывание повторяют дважды). Затем пробки 30 минут кипятят в дистиллированной воде, высушивают, заворачивают в бумагу или фольгу и стерилизуют в паровом стерилизаторе. Резиновые пробки, использованные ранее, обеззараживают, кипятят 30 минут в водопроводной воде с нейтральным моющим средством, промывают в водопроводной воде, высушивают, монтируют и стерилизуют.

Пипетки со вставленными тампонами из ваты должны быть уложены в металлические пеналы или завернуты в бумагу.

Чашки Петри в закрытом состоянии должны быть уложены в металлические пеналы или завернуты в бумагу.

Подготовленную посуду стерилизуют в сухожаровом шкафу при 160—170°C 1 час, считая с момента достижения указанной температуры. Простерилизованную посуду можно вынимать из сушильного шкафа только после его охлаждения ниже 60°C.

После выполнения анализа все использованные чашки и пробирки обеззараживают в автоклаве при $(126 \pm 2)^\circ\text{C}$ 60 минут. Пипетки обеззараживают кипячением в 2%-м растворе NaHCO_3 .

После охлаждения удаляют остатки сред, затем чашки и пробирки замачивают, кипятят в водопроводной воде и моют с последующим ополаскиванием дистиллированной водой.

Подготовка проб воды

Прежде чем приступить к посеву, пробу необходимо тщательно перемешать и обработать горячим тампоном край емкости с тем, чтобы устранить его возможное загрязнение во время транспортирования. На используемых для посева пробирках и чашках необходимо обозначить номер пробы, объем воды или разбавление, дату посева.

Перед каждым отбором новой порции воды для анализа пробу необходимо перемешать стерильной пипеткой.

Определение колиформных бактерий в воде методом мембранных фильтров

Фильтровальный аппарат обтирают ватным тампоном, смоченным спиртом, и фламбируют. После охлаждения на нижнюю часть фильтровального аппарата (столик) фламбированным пинцетом кладут стерильный мембранный фильтр, прижимают его верхней частью прибора (стаканом, воронкой) и закрепляют устройством, предусмотренным конструкцией прибора.

В верхнюю часть прибора наливают точно отмеренный объем воды, затем создают вакуум в нижней части прибора.

При фильтровании 1 мл исследуемой воды или ее разбавлении в воронку предварительно следует налить не менее 10 мл стерильной водопроводной воды, а затем внести анализируемую воду.

После окончания фильтрования воронку снимают, фламбированным пинцетом фильтр осторожно приподнимают за край при сохранении вакуума для удаления излишка воды на нижней стороне фильтра, а затем переносят его, не переворачивая, на питательную среду, разлитую в чашки Петри, избегая пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.

На одну чашку можно поместить 3—4 фильтра с условием, чтобы фильтры не соприкасались.

Выполнение анализа

При исследовании воды на выходе с водопроводных сооружений и в распределительной сети необходимо анализировать 3 объема по 100 мл. Точно отмеренный объем воды фильтруют через мембранные фильтры с соблюдением вышеуказанных требований.

Фильтры помещают на среду Эндо, ставят в термостат вверх дном и инкубируют посевы при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 часов.

Учет результатов

Результат считается отрицательным, если на фильтрах вообще не выросли колонии или выросли колонии с неровными краями и поверхностью (пленчатые, губчатые, плесневые, прозрачные, слизистые).

При сливном росте на всех фильтрах проводят рассев на среде Эндо для получения изолированных колоний обычными бактериологическими методами.

При наличии типичных лактозоположительных колоний, дающих отпечаток на обратной стороне мембранного фильтра и среде — темно-красных, красные с металлическим блеском и без него, а также лактозоотрицательных — розовых без отпечатков, подсчитывают число колоний каждого типа.

Для идентификации отбирают не менее 5 колоний каждого вида, делают их посев на скошенный агар и далее изучают биохимические тесты. В качестве подтверждающих используют оксидазный тест и тест образования кислоты и газа при ферментации лактозы или маннита (глюкозы).

Для определения оксидазной активности на фильтровальную бумагу надо поместить 2—3 капли свежеприготовленного реактива для оксидазного теста. Заранее приготовленные бумажки смачивают дистиллированной водой. Стеклопалочкой помещают мазок свежей культуры на подготовленную бумагу. Реакция считается положительной, если в течение 10—30 с появляется фиолетово-коричневое или синее окрашивание.

Культуры, давшие оксидазоположительные реакции, дальнейшему исследованию не подлежат, так как к общим колиформным бактериям относятся грамотрицательные, не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу или маннит с образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 37°C в течение 24 часов.

Термотолерантные колиформные бактерии являются показателями свежего фекального загрязнения и обладают всеми признаками общих колиформных бактерий, которые кроме того способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44°C в течение 24 часов.

Все типичные лактозоположительные колонии засевают в подтверждающие среды с лактозой и маннитом и инкубируют в течение 24 часов при температуре 37 °C для определения общих колиформных бактерий.

Для определения термотолерантных бактерий посев производят в среду, предварительно прогретую до температуры 44 °С, и инкубируют при этой же температуре в течение 24 часов.

Колонии учитывают как общие колиформные бактерии при отрицательном оксидажном тесте, ферментации лактозы или маннита (глюкозы) при температуре 37°С с образованием кислоты и газа. Среди этих колоний учитывают как термотолерантные колиформные бактерии при оксидажном тесте и ферментации лактозы при температуре 44 °С с образованием кислоты и газа.

Если при выборочной проверке колоний одного типа получены неодинаковые результаты, то для вычисления числа колиформных бактерий среди этих колоний используют формулу:

где x — число колоний одного типа; a — общее число колоний этого типа; b — число проверенных из них; c — число колоний с положительным результатом.

Вычисление и представление результатов

Результат анализа выражают числом колоний образующих единиц (КОЕ) общих колиформных бактерий в 100 мл воды. Для подсчета результата суммируют число колоний, подтвержденных как общие колиформные бактерии, выросших на всех фильтрах, и делят на 3.

Примеры. При посеве трех фильтров по 100 мл выросло две колонии на одном, на остальных двух фильтрах нет роста. Число общих колиформных бактерий будет: $2:3 = 0,7$ КОЕ в 100 мл.

Определение общего числа микроорганизмов, образующих колонии на питательном агаре

Метод определяет в питьевой воде общее число мезо-фильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (ОМЧ), способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37°С в течение 24 часов, видимые с увеличением в 2 раза.

Выполнение анализа

Из каждой пробы отобранной воды должен быть сделан посев не менее двух объемов по 1 мл. После тщательного перемешивания пробы воды вносят по 1 мл в стерильные чашки Петри, сразу же в каждую чашку вливают 6—8 мл расплавленного и остуженного до 45—46°С питательного агара. Затем смешивают содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки.

После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат при температуре 37 °С на 24 часа.

Вычисление и представление результатов

Должны быть подсчитаны все выросшие на чашке колонии, наблюдаемые при увеличении в 2 раза. Подсчет следует производить только на тех чашках, на которых выросло не более 300 изолированных колоний.

Подсчитанное количество колоний на каждой чашке суммируют и делят на два. Результат выражают числом колоний образующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Произвести отбор пробы воды из крана по всем правилам для бактериологического исследования.
2. Произвести посевы из каждой отобранной пробы по 1 мл воды в стерильные чашки Петри с расплавленным питательным агаром для определения общего числа микробов.
3. Произвести подсчет выросших на чашках (заранее подготовленных) колоний и выразить результат в колоний-образующих единицах (КОЕ).

ВОПРОСЫ для САМОКОНТРОЛЯ

1. От чего зависит микрофлора воды?
2. Назовите основные требования к отбору проб водопроводной воды для бактериологического исследования.
3. Каковы правила транспортировки и хранения проб воды ?
4. Как правильно готовить лабораторную посуду к проведению анализа?
5. Дайте определение колиформных бактерий при использовании метода мембранных фильтров.
6. В каких единицах выражаются результаты баканализа воды ?
7. В чем выражается методика определения общего микробного числа в исследуемой воде?

3. Микрофлора почвы

Почва — это смесь частиц органических и неорганических веществ, воды и воздуха.

Неорганические частицы почвы — это минеральные вещества, окруженные пленкой коллоидных веществ органической или неорганической природы.

Органические частицы почвы — остатки растительных и животных организмов, т.е. гумус. Почва обильно заселена микроорганизмами, так как в ней есть все необходимое для жизни: органические вещества, влага, защита от солнечных лучей.

В почве встречаются все формы микроорганизмов, которые есть на Земле: бактерии, вирусы, актиномицеты, дрожжи, грибы, простейшие, растения.

Общее микробное число в 1 г почвы может достигать 1— 5 млрд. В 1 га почвы содержится 1 тонна живого веса бактерий, однако в разных слоях количество микроорганизмов неодинаково. В самом верхнем слое почвы микроорганизмов очень мало (слой « 0,5 см). На глубине 1—2—5 см до 30— 40 см число микроорганизмов больше всего. В этом слое ОМЧ в среднем 10—50 млн в 1 г. В относительно чистых почвах этот показатель равен 1,5—2 млн в 1 г. Глубже 30— 40 см число микроорганизмов снижается и в более глубоких слоях их опять мало.

Лабораторная работа №8

Тема: Учение об инфекции и иммунитете. Пищевые инфекции и отравления.

Постановка реакции агглютинации на стекле и в пробирках

Во всех иммунологических реакциях основным компонентом является антиген, который обладает двумя свойствами:

- 1) способностью вызывать иммунологический процесс в организме;
- 2) способностью соединяться с антителами в серологических реакциях.

Реакции взаимодействия антитела с антигеном называются серологическими (от лат. serum - сыворотка). Серологические реакции используют:

- 1) для обнаружения в сыворотке крови антител к тому или иному микробу с помощью известного специфического антигена;
- 2) для установления вида или типа выделенного микроба по его антигенной структуре с помощью диагностической сыворотки, содержащей известные специфические антитела.

Посуда и аппаратура для постановки серологических реакций

Посуда:

- 1) пробирки химические и центрифужные;
- 2) колбы Эрленмейера и плоскодонные;
- 3) пипетки пастеровские объемом 10 и 5 мл с делениями на 0,1 мл;
- 4) градуированные цилиндры.

Посуда должна быть чистой и сухой. Для ее обработки нельзя применять дезинфицирующие средства (карболовая кислота, хлорамин), кислоты и щелочи. Посуду кипятят в простой воде. Стерилизовать серологическую посуду не обязательно.

Аппаратура:

1. Штативы с гнездами.
2. Термостат и водяная баня с терморегуляторами.
3. Центрифуга на 2000—3000 об/мин.
4. Агглютиноскоп.

Реакция агглютинации (РА)

Используются культуры только в S-форме (гладкие, блестящие колонии с ровными краями).

Приготовление разведений сыворотки больного:

Из сыворотки готовят ряд последовательных разведений, от 1:50— 1:100 до 1:1600— 1:3200. В отдельной пробирке готовят первое разведение сыворотки 1:50 или 1:100. Для этого градуированной пипеткой набирают 0,1 мл сыворотки, другой пипеткой прибавляют к ней 4,9 мл (1:50) или 9,9 мл (1:100) физиологического раствора. Основным раствором сыворотки используется для приготовления последовательных, двукратных разведений. По окончании разведений во все пробирки ряда (кроме контрольной) прибавляют по 2—3 капли антигена. Пробирки встряхивают и ставят на 2 часа в термостат при температуре 37 °С. Затем учитывают предварительный результат реакции. Окончательный результат реакции агглютинации регистрируют через 18—20 часов стояния пробирок при комнатной температуре.

Положительный результат реакции агглютинации характеризуется образованием на дне пробирки осадка с выраженным просветлением надосадочной жидкости.

Осадок на дне пробирки, образовавшийся в результате склеивания микробных тел, называется агглютинатом.

Для регистрации результатов реакции агглютинации пользуются четырехкрестовой системой обозначения: + + + н— полная агглютинация, при которой большой осадок на дне располагается кучкой или в форме открытого перевернутого зонтика. Надосадочная жидкость прозрачная; + + + — почти полная агглютинация, осадок такой же, надосадочная жидкость почти прозрачная; + + — слабая агглютинация, осадок едва заметен, жидкость непрозрачная; + — отмечаются следы агглютинации;

— отрицательная реакция, содержимое пробирки равномерно мутное.

Последнее разведение сыворотки, в котором наблюдается агглютинация, считают ее титром.

Постановка реакции агглютинации на стекле

Эта реакция считается ориентировочной. Ею часто пользуются для определения вида микроба.

1. На поверхность обезжиренного предметного стекла наносят с помощью пастеровской пипетки 2 капли агглютинирующей сыворотки.

2. В сыворотку вносят исследуемую бактериальную культуру, снятую с поверхности плотной питательной среды.

3. Внесенную культуру тщательно перемешивают. Реакция протекает при комнатной температуре. Результат учитывают с помощью лупы через 5—10 мин.

При положительной реакции в капле отмечается окучивание бактерий в виде зернышек или хлопьев.

Факторы естественной резистентности организма. Методы их изучения. Фагоцитоз

У человека и высших животных фагоцитарной способностью обладают клетки ретикуло-эндотелиальной системы: лейкоциты крови и лимфы, фиксированные купферовские клетки печени, ретикулярные клетки селезенки, костного мозга, лимфатических узлов, гистиоциты рыхлой соединительной ткани.

В борьбе с патогенными микробами большую роль играют лейкоциты. Судьба микроорганизмов, захваченных лейкоцитами, может иметь три исхода:

1) полное внутриклеточное переваривание микробов, приводящее к их исчезновению в лейкоците, — завершённый фагоцитоз;

2) выталкивание микробов из лейкоцитов обратно, в окружающую среду;

3) активное размножение микробов внутри лейкоцитов, — незавершённый фагоцитоз.

В последнем случае фагоцитоз приобретает отрицательное значение для организма, так как микробы, находящиеся внутри клеток, становятся менее доступными действию антител. Незавершённый фагоцитоз имеет место при заболевании туберкулезом, бруцеллезом, туляремией, гонореей.

Представление о фагоцитарной способности лейкоцитов крови можно получить по данным фагоцитарной активности лейкоцитов.

Определение фагоцитарной активности лейкоцитов

Фагоцитарная активность лейкоцитов выражается процентом активных лейкоцитов (фагоцитов) к общему числу подсчитанных нейтрофильных лейкоцитов.

В стерильную центрифужную пробирку наливают 0,2 мл 2% лимоннокислого натрия, прибавляют 0,1 мл исследуемой крови, взятой из пальца, и 0,05 мл микробной взвеси. Пробирку осторожно встряхивают, помещают на 30 мин в термостат при температуре 37 °С. Затем смесь центрифугируют при 2000—3000 об/мин до расслоения жидкости на верхний — соломенно-желтый прозрачный слой плазмы, нижний — слой эритроцитов и среднюю серебристую пленку между ними — слой лейкоцитов. Пастеровской пипеткой отсасывают вначале верхний слой, затем очень осторожно снимают средний, делают из него 3—5 мазков и окрашивают их.

При микроскопии мазка подсчитывают число фагоцитировавших нейтрофильных лейкоцитов из общего числа подсчитанных лейкоцитов. Для получения достоверных результатов количество последних должно быть не меньше 100. Полученный результат выражают в процентах.

Анафилактический шок

1. На фоне или сразу после введения лекарственного препарата, сыворотки, укуса насекомого и т. д. появились слабость, головокружение, затруднение дыхания, чувство нехватки воздуха, беспокойство, чувство жара во всем теле, иногда рвота.

2. Кожа бледная, холодная влажная, дыхание частое, поверхностное. Систолическое давление 90 мм рт. ст. или ниже. В тяжелых случаях угнетение сознания и дыхания.

ВОПРОСЫ для САМОКОНТРОЛЯ

1. Что такое «иммунитет»?
2. Что такое «естественный приобретенный иммунитет»?
3. Что такое «искусственный приобретенный иммунитет»?
4. Какие вы знаете неспецифические факторы защиты ?
5. Что такое «фагоцитоз»?
6. Что такое «антигены»?
7. Что такое «антитела» ?
8. Каковы свойства антигенов?
9. Где локализуются антигены в микробных клетках?
10. Назовите основные классы иммуноглобулинов.
11. Какие вы знаете реакции иммунитета?
12. На чем основана реакция агглютинации?
13. Какие вы знаете иммунопрофилактические препараты ?
14. Что такое «аллергия»?