

Министерство сельского хозяйства РФ  
ФГБОУ ВО «Брянский государственный аграрный университет»

Институт ветеринарной медицины и биотехнологии

Кафедра эпизоотологии, микробиологии, паразитологии и  
ветеринарно-санитарной экспертизы

## **ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ**

учебно-методическое пособие

для проведения практических занятий и самостоятельной работы  
по дисциплине «Общая микробиология и общая санитарная микробиология»  
студентами, обучающимися по направлению  
19.03.03 «Продукты питания животного происхождения»  
профиль «Технология мяса и мясных продуктов»



Брянская область, 2023

УДК 579 (076)  
ББК 28.4  
Р 98

Рябичева, А. Е. **Общая микробиология**: учебно-методическое пособие для проведения практических занятий и самостоятельной работы по дисциплине «Общая микробиология и общая санитарная микробиология» студентами, обучающимися по направлению 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» профиль «Технология мяса и мясных продуктов» / авторы-сост. А. Е. Рябичева, Н. С. Андрюшина. – Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2023. - 135 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с типовой учебной программой по изучению дисциплины «Общая микробиология и общая санитарная микробиология» для проведения практических занятий и самостоятельной работы студентами, обучающимися по направлению 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» профиль «Технология мяса и мясных продуктов»

Рецензенты:

Е.Е. Адельгейм, доцент кафедры нормальной и патологической морфологии и физиологии животных БГАУ

В.И. Ивашин, директор ГБУ Брянской области «Дубровская зональная ветлаборатория»

*Рекомендовано к изданию решением методической комиссии института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянского государственного аграрного университета, протокол №3 от 8.11.2023 г.*

© Брянский ГАУ, 2023  
© Рябичева А.Е., 2023  
© Андрюшина Н.С., 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Тема 1. Правила работы и оборудование микробиологической лаборатории. Изучение устройства микроскопа и правила работы с ним. Методы исследований, применяемые в микробиологической практике.	5
Тема 2. Систематика микроорганизмов. Морфология палочковидных, кокков и извитых.	14
Тема 3. Морфология риккетсий, хламидий, микоплазм, грибов.	20
Тема 4. Строение бактериальной клетки.	30
Тема 5. Методы приготовления препаратов микроорганизмов.	37
Тема 6. Приготовление красителей. Методы окрашивания микроорганизмов.	42
Тема 7. Питательные среды. Техника посева микробов.	51
Тема 8. Культивирование и рост микроорганизмов.	57
Тема 9. Методы выделения чистой культуры аэробных и анаэробных микроорганизмов. Принципы идентификации.	61
Тема 10. Культуральные и биохимические свойства микроорганизмов.	69
Тема 11. Методы стерилизации. Общая характеристика противомикробных средств.	78
Тема 12. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и бактериофагам	84
Тема 13. Биологический метод исследования. Определение вирулентности и факторов патогенности микроорганизмов.	91
Тема 14. Биологические препараты и их контроль	98
Тема 15. Реакция агглютинации, непрямой гемагглютинации, реакция Кумбса.	103
Тема 16. Реакция преципитации, кольцепреципитации, диффузной преципитации	112
Тема 17. Реакция связывания комплемента.	119
Тема 18. Иммуноферментный анализ. Реакция нейтрализации.	127

## ВВЕДЕНИЕ

Мир микроорганизмов обширен и разнообразен. К ним относятся одноклеточные бактерии, микроскопические водоросли, актиномицеты и грибы, простейшие животные организмы и ультрамикроскопические существа – вирусы. Они широко распространены в природе. Академик В.Л. Омельянский так характеризовал микробов. «Поистине они вездесущи... Незримо они сопутствуют человеку на всем его жизненном пути, властно вторгаясь в его жизнь то в качестве врагов, то как друзья. В громадном количестве они встречаются в пище, которую мы принимаем, в воде, которую пьем, и в воздухе, которым дышим».

Микробиология – наука, которая изучает морфологию, физиологию, генетику, экологию мельчайших живых существ – микробов, их роль и значение в жизни животных, растений и человека. Название науки было предложено Э. Дюкло. Оно состоит из трёх греческих слов: «микрос», что означает малый, «биос» – жизнь и «логос» – наука.

Общая микробиология изучает закономерности строения и жизнедеятельности микроорганизмов на всех уровнях: молекулярном, клеточном, популяционном; генетику и взаимоотношения их с окружающей средой.

Целями изучения дисциплины является получение фундаментального образования, способствующего развитию личности;

формирование понимания роли фундаментальной подготовки в усвоении дисциплин естественнонаучного цикла для дальнейшей профессиональной деятельности.

Задачами дисциплины являются: формирование целостного представления о теоретических основах общей микробиологии; строения, физиологии, разнообразии, распространении микроорганизмов; их роли в отдельных отраслях промышленности, методами их контроля и прогнозирования; приобретение навыков необходимых для профессиональной деятельности.

В результате изучения дисциплины студент должен освоить компетенции предусмотренные учебным планом.

**ТЕМА 1**  
**ПРАВИЛА РАБОТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**  
**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.**  
**ИЗУЧЕНИЕ УСТРОЙСТВА МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ**  
**С НИМ. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ**  
**В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

**Цель занятия:** ознакомить студентов с правилами работы и оборудованием микробиологической лаборатории, устройством светового микроскопа, его характеристиками и правилами работы с ним.

**Материалы и оборудование:** автоклавы, термостаты, шкафы сухожаровые, микроскопы, холодильники, весы технические, аппарат Кротова для анализа микрофлоры воздуха помещений, прибор для подсчета колоний микроорганизмов, анаэроустат для культивирования анаэробных бактерий, рН-метр, петли и иглы бактериологические, шпатели Дригальского, ножницы, пинцеты, штативы, посуда лабораторная (чашки Петри, пробирки, пипетки – чаще всего на 1,0 и 0,1 см<sup>3</sup>, предметные и покровные стекла, флаконы для красок и растворов), вата, марля, плакаты.

**Правила работы в микробиологической лаборатории**

Специфика работы в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения порядка и чистоты. В связи с этим при работе в лаборатории необходимо соблюдать следующие правила.

1. Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде, головном уборе, вносить посторонние вещи.
2. Запрещается находиться в лаборатории в период обработки воздуха помещения ультрафиолетовыми лампами.
3. Перед занятиями необходимо надеть хлопчатобумажный халат.
4. Не разрешается выходить в халате за пределы лаборатории и надевать на халат верхнюю одежду.
5. Нельзя класть на лабораторный стол личные вещи (сумки, папки и др.), их следует держать на специально отведенных местах.
6. В лаборатории запрещается принимать пищу, пить воду, не допускаются излишние разговоры и хождения.
7. На лабораторном столе не должно быть никаких лишних предметов, не имеющих отношения к работе.
8. Соблюдать осторожность при работе с открытым огнем спиртовки или газовой горелки.
9. Во избежание распыления спор микроорганизмов не допускается оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами плесневых грибов, часто являющихся аллергенами.
10. Суспензии микроорганизмов набирают только с помощью груши или дозирующего устройства.

11. Перед использованием лабораторной посуды, пипеток, оборудования проверить целостность и исправность.

12. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла следует опускать в раствор с дезинфицирующей жидкостью.

13. В конце занятий следует привести в порядок рабочее место:

– засеянные чашки Петри или пробирки, культуры микроорганизмов сдать лаборанту;

– снять масло с иммерсионного объектива микроскопа фильтровальной бумагой, смоченной бензином, с помощью револьверной насадки установить над столиком объектив 8х, подложить под него мягкую ткань и поставить микроскоп на место;

– вымыть посуду, протереть рабочий стол дезинфицирующим средством (70% р-р спирта).

14. Дежурному по группе следует проверить рабочие места студентов.

### **Оборудование микробиологической лаборатории**

Микробиологическая лаборатория должна включать следующие помещения:

- лабораторные комнаты для проведения исследований;
- застекленный ламинарный бокс для выполнения работ, требующих соблюдения повышенной стерильности;
- моечную, оборудованную для мытья посуды;
- препараторскую, приспособленную для приготовления питательных сред, подготовки посуды для стерилизации, приготовления реактивов;
- отделение для стерилизации, в котором установлены автоклавы.

Все помещения лаборатории должны иметь хорошее естественное и искусственное освещение. Поверхность столов и полы покрывают легко моющимся материалом (пластик, линолеум); в боксе, автоклавной и моечной стены и полы покрывают плиткой. Для стерилизации воздуха в помещениях лаборатории устанавливают бактерицидные лампы (БУВ-15, БУВ-30 и др.).

### **Требования к действиям при ликвидации аварий во время работы с биологическим материалом**

1. При каждой организации, проводящей работу с возбудителями I-II групп патогенности, должен быть изолятор для сотрудников на случай обнаружения у них симптомов вероятных на заболевание и допустивших аварию.

2. В изоляторе предусматривается запас основных и резервных специфических лекарственных препаратов, медикаментов для оказания помощи по жизненным показаниям (кардиологических, противошоковых, антидотов) и дезинфицирующих средств.

3. При авариях во время работы с инфекционным материалом, ее немедленно прекращают и включают аварийную сигнализацию.

4. В случае возникновения аварии с разбрызгиванием инфекционного

материала, вся проводящаяся работа в комнате прекращается. Защитную одежду (начиная с косынки или шлема) погружают в дезинфицирующий раствор или помещают в бикс (бак) для автоклавирования. В глаза, нос закапывают растворы антибиотиков, к которым чувствителен возбудитель. В случае аварии, при работе с возбудителями глубоких микозов, в глаза и нос закапывают 1 % борную кислоту, рот и горло прополаскивают 70о этиловым спиртом.

5. При аварии с ботулиническим токсином глаза и рот промывают водой и антитоксической сывороткой, разведенной до 10 международных единиц в 1 миллилитре. При попадании ботулинического токсина на открытые участки кожи смывают его большим количеством воды с мылом.

6. Если авария произошла при работе с неизвестным возбудителем, проводится профилактическое лечение антибиотиками широкого спектра действия.

7. Если авария произошла без разбрызгивания биологического материала, накладывают тампон (салфетку) с дезинфицирующим раствором на место соприкосновения биологического материала с поверхностью оборудования.

8. Если авария произошла в боксе (или БББ) – прекращают работу, на место попадания материала накладывают салфетки, обильно смоченные дезинфицирующим раствором. В боксе включают на 30 минут бактерицидные облучатели, включают аварийную сигнализацию, затем проводят дезинфекцию. Вытяжная вентиляция во время аварии и дезинфекции должна оставаться включенной.

9. Если авария связана с ранением или другим нарушением целостности кожных покровов:

1) работу прекращают, руки обрабатывают дезинфицирующим раствором, снимают перчатку и выдавливают из ранки кровь в дезинфицирующий раствор, на место ранения ставят на 4-5 минут компресс из дезинфицирующего раствора или 70о этилового спирта;

2) при работе с возбудителем сибирской язвы место ранения тщательно промывают водой с мылом и смазывают йодом, без применения дезинфицирующих растворов;

3) при аварии с возбудителями глубоких микозов место ранения обрабатывают соответствующим дезинфицирующим раствором, моют водой с мылом, смазывают йодом;

4) при работе с вирусами I-II групп патогенности, кровь выдавливают в сухую стерильную салфетку и обрабатывают рану йодом без применения дезинфицирующего раствора;

5) при работе с ВИЧ после обработки раны и слизистых, пострадавшему не позднее 72 часов назначается профилактическая антиретровирусная терапия (АРВТ) и устанавливается наблюдение в течение 12 месяцев после несчастного случая. Пострадавший должен быть предупрежден, что он может послужить источником инфекции. В случае отрицательных анализов на ВИЧ через 6 недель, 12 недель, 6 месяце и 1 год после несчастного случая наблюдение прекращают.

10. Если авария произошла при транспортировке материала (в автоклавную и между подразделениями), персонал, оставив на местах переносимые емкости, покидает опасную зону и сообщает о случившемся руководителю подразделения. Лица, допустившие аварию, проходят санитарную обработку. Обработка помещения при аварии должна проводиться в противочумном костюме 1-типа.

11. Обо всех случаях лабораторного заражения микроорганизмами I-IV групп патогенности информация должна немедленно предоставляться в государственный уполномоченный орган в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

### **Устройство микроскопа и правила работы с ним**

Изучение клеток микроорганизмов, невидимых невооруженным глазом, возможно только при помощи микроскопов. Эти приборы позволяют получать изображение исследуемых объектов, увеличенное в сотни раз (световые микроскопы), в десятки и сотни тысяч раз (электронные микроскопы).

Биологический микроскоп называется световым, так как он обеспечивает возможность изучать объект в проходящем свете в светлом и темном поле зрения.

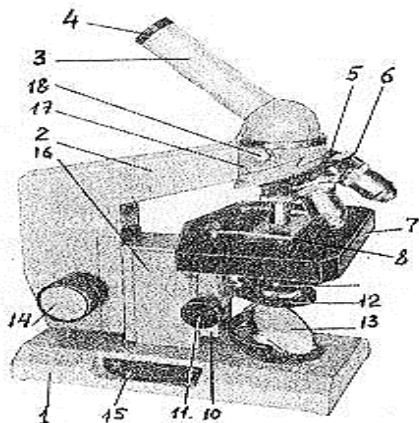
Основными элементами современных световых микроскопов являются механическая и оптическая части (рис. 1).

К механической части относятся штатив, тубус, револьверная насадка, коробка микромеханизма, предметный столик, макрометрический и микрометрический винты.

**Штатив** состоит из двух частей: основания и тубусодержателя (колонки). **Основание** микроскопа прямоугольной формы имеет снизу четыре опорные площадки, что обеспечивает устойчивое положение микроскопа на поверхности рабочего стола. **Тубусодержатель** соединяется с основанием и может перемещаться в вертикальной плоскости при помощи макро- и микрометрического винтов. При вращении винтов по часовой стрелке тубусодержатель опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается от препарата. В верхней части тубусодержателя укреплена **головка** с гнездом для монокулярной (или бинокулярной) насадки и направляющей для револьверной насадки. Головка крепится **винтом**.

**Тубус** – это труба микроскопа, позволяющая поддерживать определенное расстояние между основными оптическими деталями – окуляром и объективом. Вверху в тубус вставляется окуляр. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус.

**Револьверная насадка** представляет собой вогнутый диск с несколькими гнездами, в которые ввинчиваются 3–4 объектива. Вращая револьверную насадку, можно быстро установить любой объектив в рабочее положение под отверстие тубуса.



*Рис. 1. Устройство микроскопа:*

*1 – основание; 2 – тубусодержатель; 3 – тубус; 4 – окуляр;  
 5 – револьверная насадка; 6 – объектив; 7 – предметный столик;  
 8 – клеммы, прижимающие препарат; 9 – конденсор; 10 – кронштейн  
 конденсора; 11 – рукоятка перемещения конденсора; 12 – откидная линза;  
 13 – зеркало; 14 – макровинт; 15 – микровинт; 16 – коробка с механизмом  
 микрометрической фокусировки; 17 – головка для крепления тубуса  
 и револьверной насадки; 18 – винт для крепления головки*

**Коробка микромеханизма** несет с одной стороны направляющую для кронштейна конденсора, а с другой – направляющую для тубусодержателя. Внутри коробки находится механизм фокусировки микроскопа, представляющий собой систему зубчатых колес.

**Предметный столик** служит для размещения на нем препарата или другого объекта исследования. Столик может быть квадратным или круглым, подвижным или неподвижным. Подвижный столик перемещается в горизонтальной плоскости при помощи двух боковых винтов, что позволяет рассматривать препарат в разных полях зрения. На неподвижном столике для обследования объекта в разных полях зрения препарат перемещают рукой. В центре предметного столика имеется отверстие для освещения снизу лучами света, направляемыми от осветителя. На столике имеются две пружинные **клеммы**, предназначенные для закрепления препарата.

Некоторые системы микроскопов снабжены препаратоводителем, необходимым при исследовании поверхности препарата или при подсчете клеток. Препаратоводитель позволяет производить передвижение препарата в двух взаимно-перпендикулярных направлениях. На препаратоводителе имеется система линеек – нониусов, с помощью которых можно присвоить координаты любой точке исследуемого объекта.

**Макрометрический винт** (макрвинт) служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта. При вращении макровинта по часовой стрелке тубус микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается.

**Микрометрический винт** (микровинт) используют для точной установки изображения объекта. Микрометрический винт является одной из наиболее легко повреждаемых частей микроскопа, поэтому с ним надо обращаться осторожно – не вращать с целью грубой установки изображения во избежание самопроизвольного опускания тубуса. При полном повороте микровинта тубус передвигается на 0,1 мм.

Оптическая часть микроскопа состоит из основных оптических деталей (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор).

**Объективы** (от лат. *objektum* – предмет) – наиболее важная, ценная и хрупкая часть микроскопа. Они представляют собой систему линз, заключенных в металлическую оправу, на которой указаны степень увеличения и числовая апертура. Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной. Именно она обеспечивает увеличение. Остальные линзы называются коррекционными и служат для устранения недостатков оптического изображения, возникающих при рассмотрении исследуемого объекта.

Объективы бывают сухие и иммерсионные, или погружные. *Сухим* называется объектив, у которого между фронтальной линзой и рассматриваемым объектом находится воздух. Сухие объективы обычно имеют большое фокусное расстояние и увеличение 8х или 40х. *Иммерсионным* (погружным) называют объектив, у которого между фронтальной линзой и препаратом находится специальная жидкая среда. Вследствие разницы между показателями преломления стекла (1,52) и воздуха (1,0) часть световых лучей преломляется и не попадает в глаз наблюдателя. В результате этого изображение получается нечетким, более мелкие структуры остаются невидимыми. Избежать рассеивания светового потока можно путем заполнения пространства между препаратом и фронтальной линзой объектива веществом, показатель преломления которого близок к коэффициенту преломления стекла. К таким веществам относятся глицерин (1,47), кедровое (1,51), касторовое (1,49), льняное (1,49), гвоздичное (1,53), анисовое масло (1,55) и другие вещества. Иммерсионные объективы имеют на оправе обозначения: **I** (*immersion*) – иммерсия, **HI** (*homogen immersion*) – однородная иммерсия, **OI** (*oil immersion*) или **MI** – масляная иммерсия. В настоящее время в качестве иммерсионной жидкости чаще используют синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу.

Объективы различают по их увеличению. Величина увеличения объективов обозначена на их оправе (8х, 40х, 60х, 90х). Кроме того, каждый объектив характеризуется определенной величиной рабочего расстояния. Для иммерсионного объектива это расстояние составляет 0,12 мм, для сухих объ-

ективов с увеличением 8х и 40х – 13,8 и 0,6 мм соответственно.

**Окуляр** (от лат. *okularis* – глазной) состоит из двух линз – глазной (верхней) и полевой (нижней), заключенных в металлическую оправу. Окуляр служит для увеличения изображения, которое дает объектив. Увеличение окуляра обозначено на его оправе. Существуют окуляры с рабочим увеличением от 4х до 15х.

При длительной работе с микроскопом следует пользоваться бинокулярной насадкой. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах 55–75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около 1,5х) и коррекционные линзы.

**Конденсор** (от лат. *condenso* – уплотняю, сгущаю) состоит из двух-трех короткофокусных линз. Он собирает лучи, идущие от зеркала, и направляет их на объект. При помощи рукоятки, расположенной под предметным столиком, конденсор может перемещаться в вертикальной плоскости, что приводит к увеличению освещенности поля зрения при поднятом конденсоре и уменьшению его при опущенном конденсоре. Для регулировки интенсивности освещения в конденсоре имеется ирисовая (лепестковая) диафрагма, состоящая из стальных серповидных пластинок. При полностью открытой диафрагме рекомендуется рассматривать окрашенные препараты, при уменьшенном отверстии диафрагмы – неокрашенные. Под конденсором расположена **откидная линза** в оправе, используемая при работе с объективами малого увеличения, например, 8х или 9х.

**Зеркало** имеет две отражающие поверхности – плоскую и вогнутую. Оно закреплено на шарнирах в основании штатива и его можно легко поворачивать. При искусственном освещении рекомендуется пользоваться вогнутой стороной зеркала, при естественном – плоской.

**Осветитель** выполняет функцию искусственного источника света. Он состоит из низковольтной лампы накаливания, закрепляющейся на штативе, и понижающего трансформатора. На корпусе трансформатора имеется рукоятка реостата, регулирующего накал лампы и тумблер для включения осветителя.

Во многих современных микроскопах осветитель вмонтирован в основание.

### **Правила работы с микроскопом**

1. Микроскоп берут одной рукой за колонку штатива, а другой поддерживают за основание. Брать и поднимать микроскоп за другие детали категорически запрещается.

2. На рабочем столе микроскоп помещают колонкой к себе. Перед началом работы следует осторожно удалить пыль с оптических частей микроскопа мягкой сухой тканью, не касаясь пальцами линз.

3. С помощью револьверной насадки устанавливают нужный объектив. Характерный щелчок фиксатора внутри револьвера свидетельствует о

центрированном положении объектива. Необходимо помнить, что чем меньше увеличение объектива, тем больше фокусное расстояние. При работе с объективом 8х расстояние между препаратом и объективом около 9 мм, с объективом 40х оно составляет 0,6 мм, и с объективом 90х – около 0,15 мм.

4. На предметный столик помещают предметное стекло и закрепляют его клеммами.

5. Тубус микроскопа опускают вниз с помощью макрометрического винта осторожно, наблюдая за объективом сбоку, и приближают к препарату (не касаясь его) на расстояние, меньше рабочего. Затем, глядя в окуляр, медленным вращением макровинта поднимают тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение изучаемого предмета.

6. Вращением микрометрического винта фокусируют объектив таким образом, чтобы изображение предмета было четким.

7. При работе с иммерсионным объективом на предметное стекло наносят каплю кедрового масла и, глядя сбоку на объектив, макрометрическим винтом осторожно опускают тубус так, чтобы фронтальная линза объектива погрузилась в масло. Затем, глядя в окуляр, медленным движением макровинта поднимают тубус до тех пор, пока не появится изображение. Для точной фокусировки пользуются микрометрическим винтом, который вращают в пределах одного оборота.

*Внимание!* Запрещается искать изображение препарата с помощью микрометрического винта.

8. Препарат рассматривают в нескольких полях зрения, передвигая предметный столик при помощи боковых винтов, или перемещают его рукой на предметном столике. Находят наиболее подходящее поле зрения на участке препарата, на котором микроорганизмы видны отчетливо, в достаточном для просмотра количестве и зарисовывают микроскопическую картину.

9. При смене объективов следует регулировать интенсивность освещения рассматриваемого объекта. Желаемую степень освещения получают, опуская или поднимая конденсор.

10. По окончании работы поднимают тубус, снимают препарат с предметного столика, удаляют масло с фронтальной линзы иммерсионного объектива фильтровальной бумагой, смоченной бензином, устанавливают при помощи револьверной насадки объектив в увеличение 8х, кладут на предметный столик кусочек чистой марли и опускают тубус.

### **Методы исследований, применяемые в микробиологической практике**

При изучении микроорганизмов применяют следующие методы лабораторной диагностики:

Микроскопический – основан на изучении микробов в препаратах - отпечатках из патологического материала или препаратах – мазках из чистых культур, обработанных простыми или сложными методами окраски с использованием светового, люминесцентного или электронного микроскопов. При

этом описывают морфологические и тинкториальные свойства.

Бактериологический (микробиологический) – метод основан на проведении посевов микробов на искусственные обычные или специальные питательные среды с целью выделения чистой культуры и изучения ее свойств.

Биологический (биопроба) – основан на выявлении и изучении патогенных и токсигенных свойств у выделенных микробов путем инфицирования (заражения) наиболее чувствительных лабораторных животных.

Серологический – основан на обнаружении иммунных тел (антител) в сыворотках крови больных животных с помощью стандартных известных бактериальных антигенов, а также на идентификации, т.е. определения вида выделенной чистой культуры (антигена) с помощью стандартных специфических иммунных сывороток (содержащих антитела).

### ***Вопросы для самопроверки:***

1. Каковы основные правила работы в микробиологической лаборатории?
2. Какие помещения включает микробиологическая лаборатория?
3. Назовите основные элементы механической части микроскопа.
4. Назовите основные элементы оптической части микроскопа.
5. Чем отличаются сухие объективы от иммерсионных?
6. Каково назначение макро- и микрометрического винтов?
7. Для чего нужна револьверная насадка?
8. Как определить увеличительную способность микроскопа?
9. Как регулировать степень освещенности препарата?
10. Перечислите методы исследований применяемы в микробиологической практике?

## ТЕМА 2

### СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ.

#### МОРФОЛОГИЯ ПАЛОЧКОВИДНЫХ, КОККОВ И ИЗВИТЫХ

**Цель занятия:** ознакомить студентов с основными формами микроорганизмов.

**Материалы и оборудование:** плакаты, красители для окраски бактерий, микроскопы, обезжиренные предметные стекла, фильтровальная бумага, культуры бактерий на питательных средах, мазки из культур различных микроорганизмов (палочковидных, шаровидных, извитых).

Микроорганизмы - это организмы, невидимые невооруженным глазом из-за их незначительных размеров. Этот критерий - единственный, который их объединяет. В остальном мир микроорганизмов еще более разнообразен, чем мир макроорганизмов.

Согласно современной систематике, микроорганизмы относятся к трем царствам:

*Vira* - к ним относятся вирусы;

*Eucariotae* - к ним относятся простейшие и грибы;

*Procariotae* - к ним относятся истинные бактерии, риккетсии, хламидии, микоплазмы, спирохеты, актиномицеты.

Основные отличия прокариот от эукариот состоят в том, что прокариоты не имеют:

морфологически оформленного ядра (нет ядерной мембраны и отсутствует ядрышко), его эквивалентом является нуклеоид, или генофор, представляющий собой замкнутую кольцевую двунитевую молекулу ДНК, прикрепленную в одной точке к цитоплазматической мембране; по аналогии с эукариотами эту молекулу называют хромосомной бактерией;

сетчатого аппарата Гольджи;

эндоплазматической сети;

митохондрий.

Имеется также ряд признаков или органелл, характерных для многих, но не для всех прокариот, которые позволяют отличать их от эукариотов:

многочисленные инвагинации цитоплазматической мембраны, которые называются мезосомы, они связаны с нуклеоидом и участвуют в делении клетки, спорообразовании, и дыхании бактериальной клетки;

специфический компонент клеточной стенки - муреин, по химической структуре - это пептидогликан (диаминопиеминовая кислота);

плазмиды - автономно реплицирующиеся кольцевидные молекулы двунитевой ДНК с меньшей, чем хромосома бактерий молекулярной массой. Они находятся наряду с нуклеоидом в цитоплазме, хотя могут быть и интегрированы в него, и несут наследственную информацию, не являющуюся жизненно необходимой для микробной клетки, но обеспечивающую ей те

или иные селективные преимущества в окружающей среде. Наиболее известны плазмиды:

(F-плазмиды), обеспечивающие конъюгационный перенос между бактериями;

(R-плазмиды) - плазмиды лекарственной устойчивости, обеспечивающие циркуляцию среди бактерий генов, детерминирующих устойчивость к используемым для лечения различных заболеваний химиотерапевтическим средствам.

Также как для растений и животных, для названия микроорганизмов применяется бинарная номенклатура, - то есть родовое и видовое название, но если видовую принадлежность исследователям определить не удастся и определена только принадлежность к роду, то употребляется термин "species". Чаще всего это имеет место при идентификации микроорганизмов имеющих нетрадиционные пищевые потребности или условия существования.

Название рода обычно или основано на морфологическом признаке соответствующего микроорганизма (например, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Mycobacterium*) либо являются производными от фамилии автора, который открыл или изучил данный возбудитель (например, *Neisseria*, *Shigella*, *Escherichia*, *Rickettsia*, *Gardnerella*).

Видовое название часто связано с наименованием основного вызываемого этим микроорганизмом заболевания (например, *Vibrio cholerae* - холеры, *Shigella dysenteriae* - дизентерии, *Mycobacterium tuberculosis* - туберкулеза) или с основным местом обитания (например, *Escherichia coli* - кишечная палочка).

Кроме того, в русскоязычной медицинской литературе возможно использование соответствующего русифицированного названия бактерий (например, вместо *Staphylococcus epidermidis* - эпидермальный стафилококк; *Staphylococcus aureus* - золотистый стафилококк и т.д.).

Царство прокариот включает в себя отдел цианобактерий и отдел эубактерий, который, в свою очередь, подразделяется на порядки:

собственно бактерии (отделы *Gracilicutes*, *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Mendosicutes*);

актиномицетов;

спирохет;

риккетсий;

хламидий.

Бактерии - это прокариотические, преимущественно одноклеточные микроорганизмы, которые могут также образовывать ассоциации (группы) сходных клеток, характеризующиеся клеточными, но не организменными сходствами.

Порядки подразделяются на группы. Основными таксономическими критериями, позволяющими отнести штаммы бактерий к той или иной группе, являются:

морфология микробных клеток (кокки, палочки, извитые);

отношение к окраске по Граму - тинкториальные свойства (грамположительные и грамотрицательные);

тип биологического окисления - аэробы, факультативные анаэробы, облигатные анаэробы;

способность к спорообразованию.

Дальнейшая дифференциация групп на семейства, рода и виды, которые являются основной таксономической категорией, проводится на основании изучения биохимических свойств. Этот принцип положен в основу классификации бактерий, приведенной в специальных руководствах - определителях бактерий.

Вид является эволюционно сложившейся совокупностью особей, имеющих единый генотип, который в стандартных условиях проявляется сходными морфологическими, физиологическими, биохимическими признаками. Для патогенных бактерий определение "вид" дополняется способностью вызывать определенные нозологические формы заболеваний.

Существует внутривидовая дифференцировка бактерий на варианты:

по биологическим свойствам (биовары или биотипы);

по биохимической активности (ферментовары);

по антигенному строению (серовары или серотипы);

по чувствительности к бактериофагам (фаговары или фаготипы);

по устойчивости к антибиотикам (резистентовары).

В микробиологии широко применяют специальные термины - культура, штамм, клон.

Культура - это видимая глазом совокупность бактерий на питательных средах. Культуры могут быть чистыми (совокупность бактерий одного вида) и смешанными (совокупность бактерий двух или более видов).

Штамм - это совокупность бактерий одного вида, выделенных из разных источников или из одного источника в разное время. Штаммы могут различаться по некоторым признакам, не выходящим за пределы характеристики вида.

Клон - это совокупность бактерий, являющихся потомством одной клетки.

### **Палочковидные бактерии**

Основными морфологическими признаками палочковидных бактерий, которые определяются путем микроскопии, являются размеры палочек (средняя длина палочек - 2...7 мкм, диаметр в поперечнике - 0,5...1 мкм), взаимное расположение клеток, способность образовывать споры, подвижность.

Палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (*диплобактерии*) и цепочками (*стрептобактерии*).

При микроскопии легко определить спорообразующие и не спорообразующие формы палочковидных бактерий. Vegetативные клетки хорошо адсорбируют красители на своей поверхности и полностью окрашиваются. Оболочка споры малопроницаема, краски в них почти не проникают и под микроскопом споры имеют вид округлых или овальных блестящих зерен.

Палочки, образующие споры называются *бациллами* и *кlostридиями*. У бацилл размер споры не превышает ширину клетки и поэтому при образовании споры форма клетки не меняется. У кlostридий диаметр споры больше толщины клетки и поэтому при созревании споры клетка приобретает форму веретена (если спора располагается в центре клетки) или барабанной палочки (если спора располагается на одном из полюсов клетки).

Палочковидные бактерии бывают подвижные и неподвижные; клетки подвижных форм палочковидных бактерий снабжены специальными приспособлениями для движения – *жгутиками*.

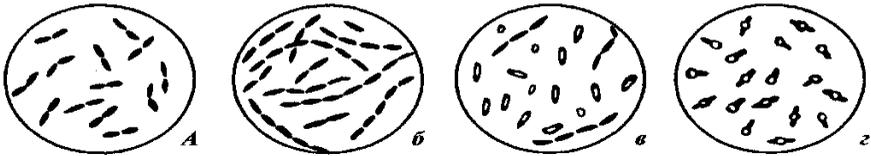


Рис. 2. Морфология палочковидных бактерий: а - диплобактерии; б - стрептобактерии; в - бациллы; з - кlostридии

### Шаровидные бактерии (кокки)

Кокками называют сферические или шаровидные бактерии. Различные виды бактерий этой группы различаются между собой:

- диаметром (диаметр шаровидных бактерий не превышает 1-2 мкм);
- взаимным расположением клеток.

У разных видов бактерий закономерность расположения клеток после деления неодинакова. В зависимости от этого кокковые формы делятся на:

*монококки* или *микрoкокки* - клетки кокков располагаются поодиночке;

*диплококки* - кокки располагаются попарно, так как деление клетки происходит в одной плоскости;

*стрептококки* - кокки располагаются в виде цепочек, напоминающих нити бус, деление клеток происходит в одной плоскости, причем клетки после деления не отделяются друг от друга;

*стафилококки* - скопления кокков неправильной формы, напоминающих гроздь винограда. Деление этих кокков осуществляется в нескольких плоскостях;

*тетракокки* - образуют скопления из четырех клеток, что обусловлено делением клеток в двух взаимно перпендикулярных плоскостях;

*сарцины* - имеют вид скоплений кубической формы в результате деления в трех взаимно перпендикулярных плоскостях.

Все кокки неподвижны и не образуют спор.

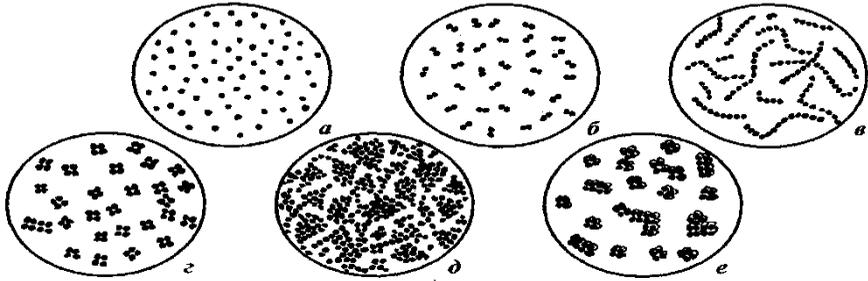


Рис. 3. Взаимные расположения кокков: а - микрококки; б - диплококки; в - стрептококки; г - тетракокки; д - стафилококки; е - сарцины

### Извитые бактерии

Извитые формы бактерий в зависимости от степени изогнутости подразделяются на вибрионы, спириллы и спирохеты.

*Вибрионы* - имеют вид запятой, самые мелкие из извитых форм. Длина клетки вибрионов не превышает 1-3 мкм.

Клетки *спирилл* длиной от 5 до 30 мкм имеют один или несколько завитков.

Характерная особенность *спирохет* - крайне малый диаметр клетки (0,1-0,6 мкм) при относительно большой (5-500 мкм) длине клетки. Клетки спирохет имеют вид штопора, покрыты эластичной оболочкой, позволяющей им винтообразно изгибать тело.

Все извитые формы подвижны. Движение осуществляется с помощью жгутиков (у вибрионов и спирилл) или за счет сокращения всей клетки (у спирохет).

Кроме этих наиболее распространенных в природе форм бактерий в почве и водоемах обнаружены новые формы бактерий: торроиды, простеки, нитчатые бактерии.

*Торроиды* имеют вид разомкнутого или замкнутого кольца.

*Простеки* имеют форму шестиугольной звезды, розетки, клетки с выростами.

*Нитчатые бактерии* - типичные водные организмы. Нити их имеют толщину в среднем 1 -7 мкм.

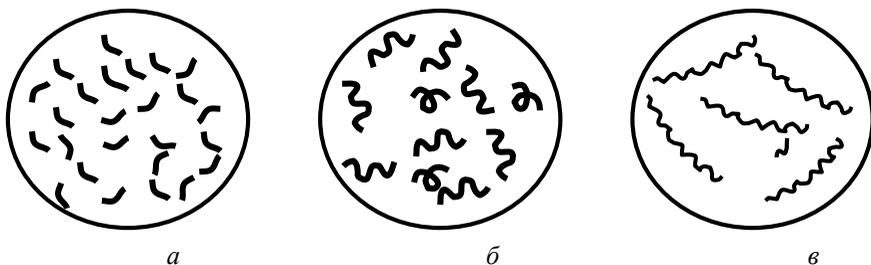


Рис. 4. Морфология извитых бактерий: а - вибрионы; б - спириллы; в – спирохеты

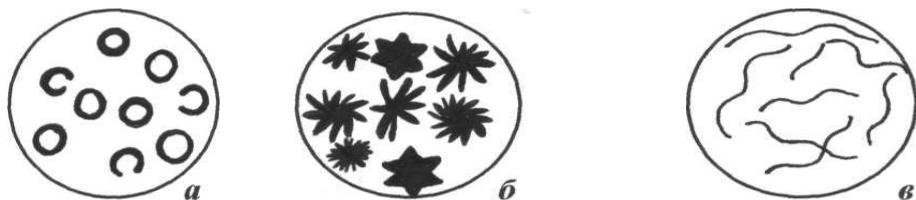


Рис. 5. Новые формы бактерий: а – торроиды; б – простеки; в – нитчатые бактерии

### **Вопросы для самопроверки**

1. Перечислить основные внешние признаки, по которым микробов определяют как палочковидные?
2. Перечислить основные внешние признаки, по которым микробов определяют как шаровидные?
3. Перечислить основные внешние признаки, по которым микробов определяют как извитые?
4. Как осуществляется движение у бактерий?
5. Что такое «бациллы» и «кlostридии» и в чем их различия?
6. Какие новые формы бактерий Вам известны?
7. Какие взаимные расположения палочковидных бактерий Вам известны?
8. Какие извитые формы бактерий Вы знаете?

### ТЕМА 3

## МОРФОЛОГИЯ РИККЕТСИЙ, ХЛАМИДИЙ, МИКОПЛАЗМ, ГРИБОВ

**Цель работы:** ознакомить студентов с основными формами микроорганизмов, изучить морфологические особенности микроскопических грибов.

**Материалы и оборудование:** плакаты, мазки из культур различных микроорганизмов, культуры бактерий на питательных средах, грибные культуры родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* на плотных средах в чашках Петри, суспензия дрожжей в бактериологических пробирках, красители для окраски бактерий, микроскопы, обезжиренные предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, препаровальные иглы, световые микроскопы.

### Риккетсии

Риккетсии (*Rickettsia*) относятся к бактериоподобным микроорганизмам, так как они имеют ряд признаков, свойственных бактериям. Вместе с тем риккетсии обладают и некоторыми свойствами вирусов. Поэтому другие ученые отводят им промежуточное положение между бактериями и вирусами. Третьи — убеждены в том, что риккетсии составляют самостоятельную группу микроорганизмов и классифицируют их на роды, виды и типы.

Форма риккетсий кокковидная, палочковидная, нитевидная. При окраске по Романовскому—Гимза в них обнаруживают зерна. На основе изложенного П. Ф. Здродовский различает формы риккетсий: а) кокковидные однозернистые (до 0,5 мкм); б) палочковидные двузернистые (1 —1,5 мкм); в) бациллярные трех-четырёхзернистые (3—4 мкм) и д) нитевидные многозернистые (от 10 до 40 мкм). Все формы взаимобратимы: а—>б—>в—>д—>а и т. д. В фазе активного и быстрого размножения многие риккетсии подвижны. Окрашиваются по Романовскому—Гимза в синий, по Цилю—Нильсену — в розовый, импрегнируются серебром по Морозову в коричнево-черный цвета. Структурно имеют наружную и внутреннюю стенки, цитоплазму, гранулы, вакуоли, нуклеоид.

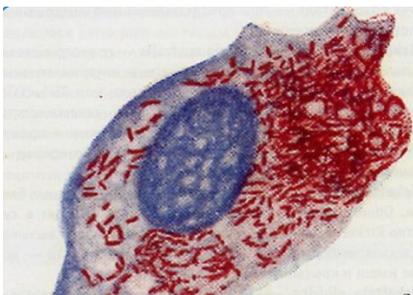


Рис. 6. Окраска риккетсий по Здродовскому

Размножаются риккетсии при помощи бинарного деления. Исследователи считают, что их размножение происходит за счет получения ими макроэнергических (богатых энергией) соединений от клеток организма хозяина. Последние данные ученых свидетельствуют о том, что риккетсии репродуцируются подобно крупным вирусам. Попав в животную клетку, они проделявают в ней семь стадий цикла развития, затем выходят наружу, внедряются в новые клетки и повторяют все сначала. На пятой стадии делятся, как бактерии, на мелкие кокковидные частицы.

Являются внутриклеточными паразитами. Культивируются в тканевых культурах, куриных эмбрионах; их поддерживают в легких зараженных мышей, в организме вшей, клещей, блох. Риккетсии волынской лихорадки и пароксизмального клещевого риккетсиоза выращивают и на бесклеточных искусственных средах; в организме могут расти и в межклеточных пространствах, тогда как остальные представители этого класса — только в ядрах или цитоплазме животных клеток.

Риккетсии вырабатывают ферменты и витамины, необходимые для самостоятельного биосинтеза белков и липидов, для извлечения энергии из углеводов. Находясь же в живой клетке, они используют часть готовых веществ на свои нужды.

Более сорока видов риккетсий непатогенны для человека и животных, обитают в членистоногих насекомых; свыше тридцати разновидностей обуславливают болезни млекопитающих.



*Рис. 7. Морфология и строение риккетсий (по Здродовскому); а - кокковидные формы; б — палочковидные формы; в — бациллярные формы; г — нитевидные формы; д — дробление нитевидных форм*

### **Хламидии**

Хламидии, или гальпровии, относятся к облигатным внутриклеточным кокковидным грамотрицательным бактериям. Геном хламидий содержит в 4 раза меньше генетической информации, чем геном кишечной палочки. Хламидии размножаются только в живых клетках: их рассматривают как энергетических паразитов. По-видимому, у хламидий отсутствует система регенерации АТФ. Вне клеток хламидии имеют сферическую форму (0,3 мкм), яв-

ляясь элементарными тельцами. Внутри клеток они превращаются в делящиеся ретикулярные тельца, образуются их скопления-включения. У человека хламидий вызывают трахому, орнитоз и др.

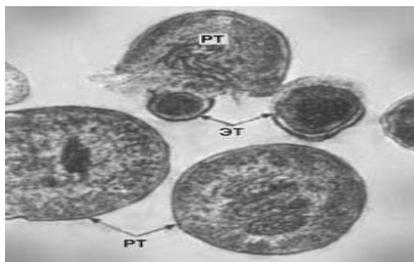


Рис. 8. Хламидии (ЭТ - элементарные тельца; РТ - ретикулярные тельца)

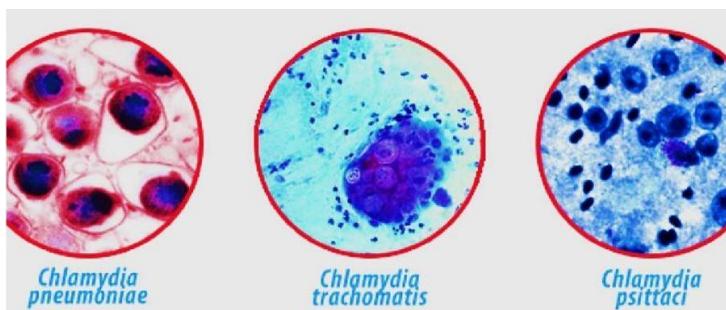


Рис. 9. Виды хламидий

### Микоплазмы

Микоплазмы (*Mycoplasma*)—мельчайшие микроорганизмы размером 100—150 нм, редко 200—700 нм, лишённые стенки и оформленного ядра, спор не образуют.

Из-за отсутствия наружной оболочки микоплазмы полиморфны, имеют зернистую, шаровидную, гроздевидную, нитевидную и кольцеобразную формы, проходят через многие бактериальные фильтры (рис. 9). Химический состав их близок к составу бактерий. Культивируются преимущественно в аэробных условиях, на средах, содержащих сыворотку животных. Первичные культуры нуждаются; также в добавлении к средам ДНК и РНК. Некоторые разлагают углеводы, другие нет. Дифференцируются по антигенной структуре.

Насчитывают 35 видов микоплазм. Широко распространены в природе. Имеются сапрофитные и патогенные для человека, животных и птиц виды. Вызываемая микоплазмами инфекция называется микоплазма-инфекция.

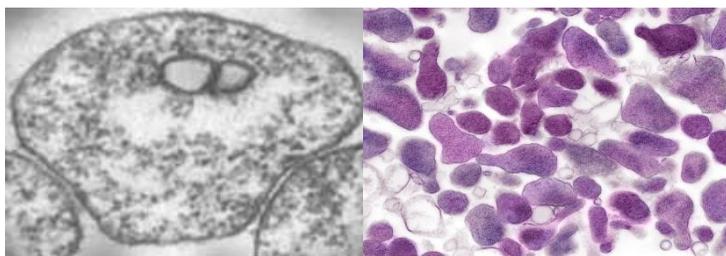


Рис. 10. Микоплазмы

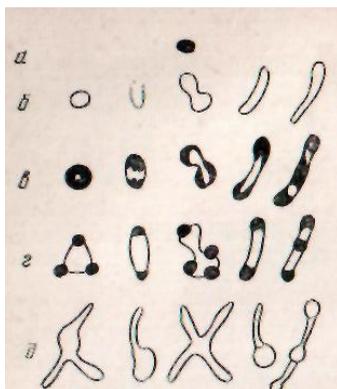


Рис. 11. Развитие микоплазм на жидкой питательной среде  
(по Klicnberger — Nobel, 1962):

*а* — основной структурный элемент;  
*б, в, г, д* — стадии образования  
разнообразных клеток

### Морфология грибов

Микроскопические грибы относятся к надцарству эукариот, царству грибов, отделу истинных грибов и являются представителями трех из четырех классов: фикомицетов, аскомицетов и дейтеромицетов. Представители царства грибов являются аэробными микроорганизмами и по типу питания относятся к хемоорганогетеротрофам. Большинство грибов – сапрофиты, но некоторые вызывают заболевания и являются паразитами.

Вегетативное тело грибов называется *мицелием*. Мицелий состоит из множества переплетающихся нитей-трубочек, называемых *гифами*. Диаметр гифов, колеблется от 5 до 50 мкм. В зависимости от строения мицелия грибы делятся на высшие и низшие. У высших грибов гифы разделены перегородками (септами) в центре которых имеется большая пора. В класс фикомицетов объединяются низшие грибы, представители классов аскомицетов и дей-

теромицетов являются высшими грибами.

Грибы – это *циноцитные* микроорганизмы. Это значит, что они растут и при этом происходят деления ядер, но не происходит клеточных делений. Таким образом, вегетативное тело гриба представляет собой одну большую многоядерную клетку.

Все микроскопические грибы могут размножаться вегетативно кусочком мицелия.

При бесполом размножении у фикомицетов образуются *спорангиеносцы*, а у аскомицетов – *конидиеносцы*. Дейтеромицеты могут размножаться *многоклеточными конидиями*.

Фикомицеты и аскомицеты являются *совершенными грибами*. Это значит, что представители этих классов могут размножаться половым путем. Дейтеромицеты относятся к *несовершенным грибам*.

### ***Культуральные признаки микроскопических грибов***

Колонии микроскопических грибов по размерам во много раз превосходят колонии одноклеточных организмов (бактерий, грибов) и нередко разрастаются по всей поверхности питательной среды в чашках Петри. Консистенция грибных колоний различная. Чаще образуются войлокообразные и кожистые колонии, реже крошковатые. Поверхность колоний может быть пушистой, как вата, бархатистой, мучнистой, паутинообразной, нитевидной, кожистой или гладкой. При росте на плотных и жидких средах часть гифов врастает в питательную среду, образуя *субстратный* мицелий, а другая часть гифов образует *воздушный* мицелий в виде пушистого налета, видимого невооруженным глазом. Мицелий может быть также бесцветным (белым, сероватым) или окрашенным (черным, бурым, зеленым, желтым и т.д.). Пигментирован только плодоносящий мицелий.

### ***Характеристика микроскопических грибов различных классов***

Морфологические особенности грибов различных классов представлены на рис. 12.

Род *Mucor* относится к классу фикомицетов. Эти грибы имеют несептированный мицелий. Они могут размножаться бесполом и половым путем с образованием спорангиеносцев (рис. 12). Снаружи спорангий покрыт тонкими шипами из кристаллов щавелевокислого кальция. При созревании спорангий разрывается, спорангиеспоры высвобождаются и разносятся воздушными потоками. На спорангиеносце после освобождения спорангия от спор остается колонка, а в нижней ее части – воротник. Цвет мицелия муко-ровых грибов вначале белый, затем серовато-оливковый, вид – войлокоподобный.

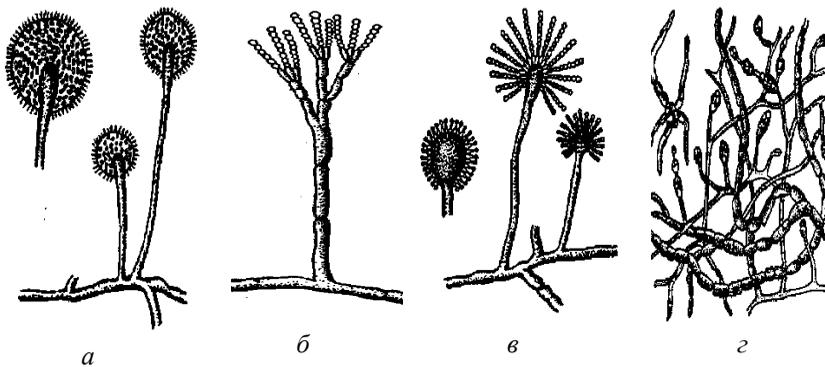


Рис. 12. Морфологические особенности грибов различных классов:  
 а - *Mucor*; б - *Penicillium*; в - *Aspergillus*; г - *Alternaria*

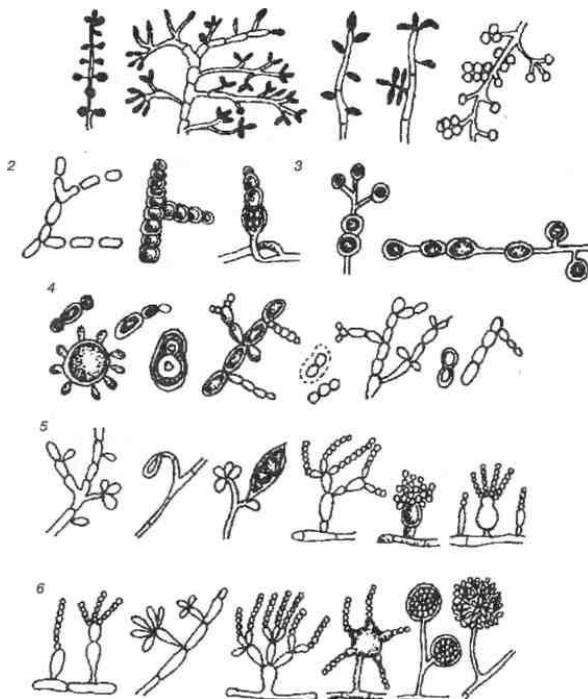


Рис. 13. Формы спорообразования у грибов:  
 1 – алейрии; 2 – артроспоры; 3 – хламидоспоры; 4 – бластоспоры;  
 5 – конидии разных типов; 6 – спорангиоспоры

Мукоровые грибы растут на поверхности влажного зерна, солода, корнеплодов, на пищевых продуктах, на стенах сырых помещений в виде сероватого пушистого налета. *Mucor nigricans* является возбудителем кагатной гнили сахарной свеклы. Многие мукоровые грибы используются в промышленности для производства различных органических кислот и спирта (грибы видов *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus*), ферментных препаратов, каротиноидов, стероидов.

Представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* относятся к классу аскомицетов, который объединяет высшие микроскопические совершенные грибы. При бесполом размножении с помощью спор эти грибы образуют конидиеносцы (рис. 12). Аспергиллы и пенициллы относятся к плодосумчатым грибам. Это значит, что при половом размножении у них на специальных плодовых телах образуются аски (сумки), в которых находятся 8 аскоспор.

К роду *Penicillium* относится около половины всех плесневых грибов. Они широко распространены в почве, в воздухе плохо проветриваемых помещений и вызывают порчу различных продуктов и материалов. Этот гриб имеет ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов – 2...3 мкм) и септированные конидиеносцы (напоминают кисточки), которые на конце разветвляются в виде отростков – стеригм. От них отходят конидии, состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.). Многие пенициллы используются в промышленности для получения различных ценных продуктов. Среди выделенных штаммов этого рода 25 % обладают антибиотической активностью, а такие виды как *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* используются как продуценты пенициллина. Некоторые виды пенициллов используются как продуценты ферментов и липидов. В производстве мягких сыров рокфор и камамбер используются благородные плесени *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camamberti*.

Грибы рода *Aspergillus* насчитывают более 200 видов. Эти грибы имеют хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы, верхние их концы грушевидно или шаровидно расширены в виде небольшой головки. На головке располагаются кеглеобразные стеригмы с цепочками конидий, которые напоминают струйки воды, выливающиеся из лейки. Отсюда возникло название «леечная плесень» (*aspergere* по латыни – поливать, опрыскивать). Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску, что наряду с другими признаками определяет их видовую принадлежность.

Так же как и пенициллы, представители рода *Aspergillus* широко распространены в природе и играют важную роль в минерализации органических веществ. Они вызывают плесневение многих пищевых продуктов. Эти грибы являются продуцентами многих ценных веществ и широко используются в промышленности. Так, *Aspergillus niger*, применяют в промышленности для производства лимонной кислоты; *Aspergillus terreus* – итаконовой кислоты *Aspergillus flavus* и *Aspergillus terricola* образуют наиболее актив-

ный комплекс протеолитических ферментов; *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus awamori* являются лучшими продуцентами амилалитических ферментов.

Грибы рода *Alternaria* относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов. Это высшие грибы. Они имеют септированный мицелий и короткие несептированные конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или лимоновидной формы (рис. 12). Гриб является возбудителем черной гнили – болезни корнеплодов и плодов, а также возбудителем порчи пищевых продуктов.

### ***Морфология дрожжей и их характеристика***

*Дрожжи* – это высшие одноклеточные грибы. Большинство дрожжей относится к двум классам грибов – аскомицетам и дейтеромицетам.

Дрожжи по отношению к кислороду делятся на факультативные анаэробы (в аэробных условиях осуществляют дыхание и активно накапливают биомассу, а в анаэробных условиях вызывают спиртовое брожение) и аэробы.

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах; от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Морфологическое разнообразие форм дрожжей изображено на рис. 14.

Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования.

В зависимости от вида дрожжи вегетативно могут размножаться почкованием (так размножаются дрожжи овальной формы), бинарным делением (характерно для дрожжей цилиндрической или палочковидной формы) или почкующимся делением. Кроме вегетативного размножения, дрожжи – аскомицеты могут размножаться половым путем с образованием аскоспор.

Из дрожжей, относящихся к классу аскомицетов, большое значение имеют дрожжи-сахаромицеты рода *Saccharomyces*, которые широко используются в пищевой промышленности. Главным биохимическим признаком этих дрожжей является то, что они сбраживают сахара с образованием этилового спирта и диоксида углерода. Дрожжи, используемые в промышленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопекарном производстве и в производстве спирта используются верховые дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются низовые дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Дрожжи-сахаромицеты имеют овальную форму, вегетативно размножаются почкованием, в неблагоприятных условиях размножаются половым путем аскоспорами.

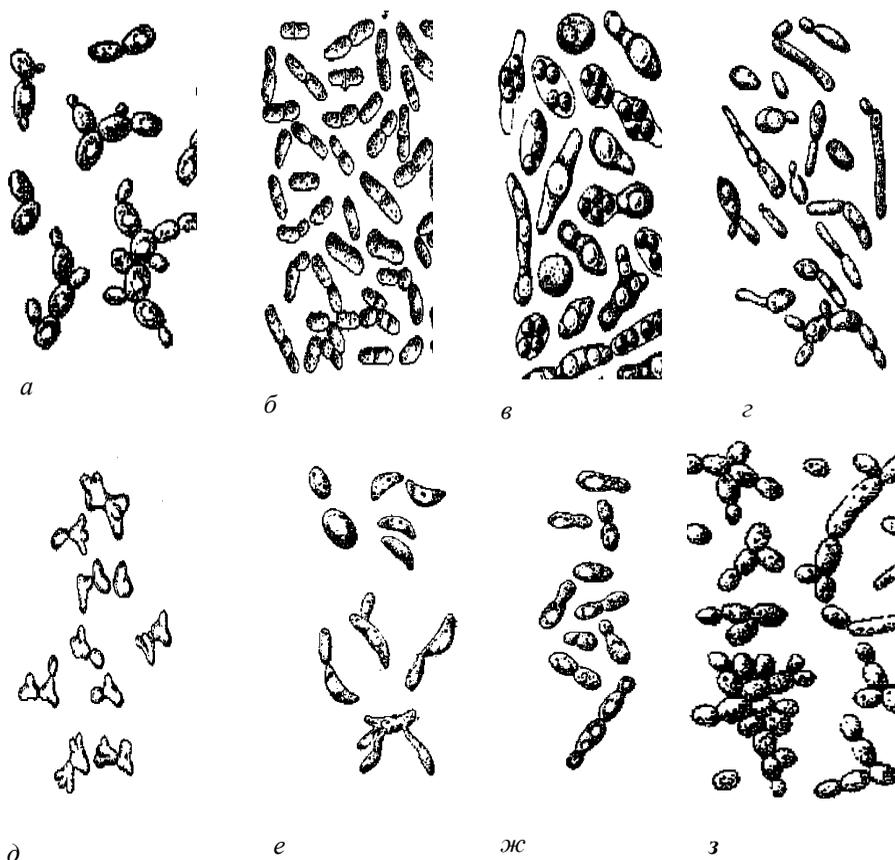


Рис. 14. Формы дрожжевых клеток: а - овальная яйцевидная; б - цилиндрическая; в - апикулятная; лимоновидная; г - стреловидная; д - треугольная; е - серповидная; ж - колбовидная; з, и - мицелиевидная

Некоторые спорогенные дрожжи являются *дикими дрожжами*. Эти дрожжи так же, как и культурные, способны осуществлять спиртовое брожение, но помимо спирта образуют много побочных продуктов (таких как альдегиды, высшие спирты, эфиры и др.) и поэтому ухудшают органолептические показатели продукта. Эти дрожжи являются вредителями производства различных напитков (пива, вина, безалкогольных напитков), а также возбудителями порчи многих пищевых продуктов.

Дрожжи - дейтеромицеты могут размножаться только вегетативным способом. Некоторые из этих дрожжей (например, дрожжи рода *Candida*) используются в промышленности для получения кормового белка, органиче-

ских кислот, витаминов и других продуктов микробного синтеза. Дрожжи вида *Torulopsis kefir* входят в состав симбиотической закваски – кефирного грибка. Другие представители несовершенных (аспорогенных) дрожжей являются дикими дрожжами и вызывают порчу многих пищевых продуктов. К дрожжам- вредителям производства относятся дрожжи родов *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycoderma*, *Trichosporon* и др. Среди аспорогенных дрожжей встречаются *ложные дрожжи*, которые образуют псевдомицелий и растут на жидких субстратах в виде пленок.

### ***Вопросы для самопроверки***

1. Перечислите основные внешние признаки риккетсий.
2. Перечислите основные внешние признаки микоплазм и хламидий.
3. Охарактеризуйте морфологические и культуральные свойства микроскопических грибов.
4. Какие грибы используются в промышленности для получения органических кислот, ферментов, антибиотиков и других ценных продуктов?
5. Охарактеризуйте морфологические свойства дрожжей.
6. Что такое культурные дрожжи? В каких отраслях пищевой промышленности они используются?

## ТЕМА 4 СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

**Цель занятия:** ознакомить студентов со строением бактериальной клетки.

**Материалы и оборудование:** плакаты, презентации.

Клетка прокариотических организмов имеет сложное строго упорядоченное строение и обладает принципиальными особенностями субмикроскопической организации и химического состава.

Структурные компоненты бактериальной клетки делят на основные и временные (рис. 15). Основные структуры — это клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана с ее производными, цитоплазма с рибосомами и различными включениями, нуклеоид.

Временные — капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки, эндоспores, образующиеся лишь на определенных этапах жизненного цикла бактерии; у некоторых видов они отсутствуют полностью.

У прокариотической клетки структуры, расположенные снаружи от цитоплазматической мембраны, называют поверхностными (клеточная стенка, капсула, жгутики, ворсинки).

Термин «оболочка» используют для обозначения клеточной стенки и капсулы бактерий или только клеточной стенки; цитоплазматическая мембрана не входит в состав оболочки и относится к протопласту.

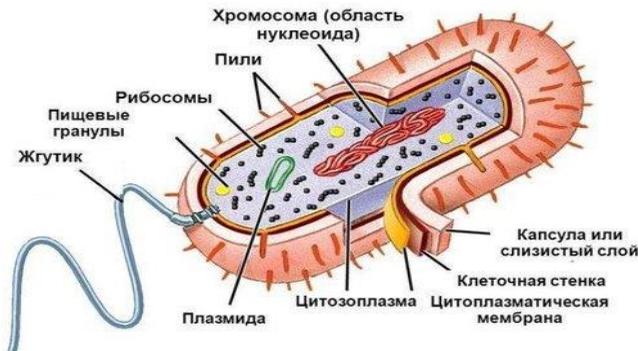


Рис. 15. Структура бактериальной клетки

**Клеточная стенка.** Важный структурный элемент бактериальной клетки, находится между цитоплазматической мембраной и капсулой; у бескапсульных бактерий — это внешняя оболочка клетки. Она имеется у всех прокариот, за исключением микоплазм и L-форм бактерий. Выполняет ряд функций: защищает бактерии от осмотического шока и других повреждающих

щих факторов, определяет их форму, участвует в метаболизме, а у многих видов патогенных бактерий токсична за счет поверхностных антигенов или несет на поверхности специфические рецепторы для фагов. Клеточная стенка пронизана порами, через которые происходит транспорт экзотоксинов и других экзобелков бактерий. Толщина клеточной стенки 10... 100 нм; она содержит от 5 до 50 % сухого вещества клетки.

Основным компонентом клеточной стенки бактерий является *пептидогликан*, или *муреин* (от лат. *murus* — стенка), — опорный полимер сетчатой структуры, образующий ригидный (жесткий) наружный каркас бактериальной клетки.

*Клеточная стенка грамположительных бактерий* плотно прилегает к цитоплазматической мембране, массивна, ее толщина составляет 20...100нм. Для нее характерно наличие тейхоевых кислот, которые связаны с пептидогликаном и представляют собой полимеры трехатомного спирта — глицерина — или пятиатомного спирта — рибита, остатки которых соединены фосфодиэфирными связями. Тейхоевые кислоты связывают ионы магния и участвуют в транспортировке их в клетку. В составе клеточной стенки также присутствуют в небольших количествах полисахариды, белки и липиды.

*Клеточная стенка грамотрицательных бактерий* многослойна, ее толщина составляет 14... 17 нм. Внутренний слой — пептидогликан, образует тонкую (2 нм) непрерывную сетку. Пептидогликан содержит только мезодиаминопимелиновую кислоту и не имеет лизина. Внешний слой клеточной стенки — наружная мембрана — состоит из фосфолипидов, липопротеина и белков.

Структурные компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий ограничены от цитоплазматической мембраны и разделены промежуток, называемым периплазмой или периплазматическим пространством.

**Протопласты и сферопласты.** Протопласты — это формы прокариот, полностью лишённые клеточной стенки, образуемые обычно грамположительными бактериями. Сферопласты — бактерии с частично разрушенной клеточной стенкой с сохранением элементов наружной мембраны. Наблюдаются у грамотрицательных бактерий и значительно реже — у грамположительных. Образуются в результате разрушения пептидогликанового слоя литическими ферментами, например лизоцимом, или блокирования биосинтеза пептидогликана пенициллином в среде с соответствующим осмотическим давлением.

Протопласты и сферопласты имеют сферическую или полисферическую форму и в 3—10 раз крупнее исходных клеток. В обычных условиях в результате осмотического лизиса они погибают, а при повышенном осмотическом давлении способны некоторое время переживать, расти и даже делиться. Протопласты при снятии фактора, разрушающего пептидогликан, как правило, отмирают, но могут превращаться в L-формы; сферопласты легко реверсируют в исходные бактерии, иногда трансформируются в L-формы или же гибнут.

**Л - ф о р м ы б а к т е р и й** — это фенотипические модификация, или мутанты, бактерии, частично или полностью утратившие способность синтезировать пептидогликан клеточной стенки. Таким образом, L-формы — бактерии с дефектной клеточной стенкой. Образуются при воздействии L-трансформирующих агентов — антибиотиков (пенициллина, полимиксина, бацитрацина, стрептомицина), аминокислот (глицина, метионина, лейцина и др.), фермента лизоцима, ультрафиолетового и рентгеновского излучения. В отличие от протопластов и сферопластов L-формы обладают относительно высокой жизнеспособностью и выраженной способностью к репродукции. Клетки L-форм имеют хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран и миелиноподобные структуры. Вследствие дефекта клеточной стенки они осмотически неустойчивы и их можно культивировать только на специальных средах с высоким осмотическим давлением; они проходят через бактериальные фильтры.

Различают стабильные и нестабильные L-формы бактерий. Стабильные полностью лишены ригидной клеточной стенки, что сближает их с протопластами, и крайне редко реверсируют в исходные бактериальные формы. Нестабильные могут обладать элементами клеточной стенки, в чем они проявляют сходство со сферопластами, в отсутствие фактора, вызвавшего их образование, реверсируют в исходные клетки.

Процесс образования L-форм получил название L-трансформации, или L-индукции. Способностью к L-трансформации обладают практически все виды бактерий, в том числе и патогенные (возбудители бруцеллеза, туберкулеза, листерии и др.).

**Цитоплазматическая мембрана и ее производные.** Цитоплазматическая мембрана (плазмолемма) — полупроницаемая липопротеидная структура бактериальных клеток, отделяющая цитоплазму от клеточной стенки. Она является обязательным полифункциональным компонентом клетки и составляет 8...15 % ее сухой массы. Разрушение цитоплазматической мембраны приводит к гибели бактериальной клетки. На ультратонких срезах в электронном микроскопе выявлено ее трехслойное строение — два ограничивающих осмиофильных слоя толщиной 2...3 нм каждый и один ос-миофобный центральный слой толщиной 4...5 нм.

Цитоплазматическая мембрана представляет собой белково-липидный комплекс, состоящий из 50...75 % белков и 15...20% липидов. Цитоплазматическая мембрана играет роль осмотического барьера клетки, контролирует поступление питательных веществ и выход продуктов метаболизма наружу; ее субстратспецифические ферменты — пермеазы, осуществляют активный избирательный перенос органических и неорганических молекул.

Ферменты цитоплазматической мембраны катализируют конечные этапы синтеза мембранных липидов, компонентов клеточной стенки, капсулы и экзоферментов; на мембране локализованы ферменты окислительного фосфорилирования и ферменты транспорта электронов, ответственные за синтез энергии.

В процессе роста клетки цитоплазматическая мембрана образует многочисленные инвагинаты, формирующие внутрицитоплазматические мембраны структуры. Локальные инвагинаты мембраны получили название *мезосом*. Они хорошо выражены у грамположительных бактерий, хуже — у грамотрицательных и плохо — у риккетсий и микоплазм.

Установлена связь мезосом с хромосомой бактерии; такие структуры называются *нуклеоидосомами*. Мезосомы, как и цитоплазматическая мембрана, представляют собой центры дыхательной активности бактерий, поэтому их иногда называют аналогами митохондрий. Мезосомы увеличивают рабочую поверхность мембран, возможно, выполняют только структурную функцию, производя разделение бактериальной клетки на относительно обособленные отсеки, что создает более благоприятные условия для протекания ферментативных процессов. У патогенных бактерий они обеспечивают транспортировку белковых молекул экзотоксинов.

**Цитоплазма.** Это содержимое бактериальной клетки, ограниченное цитоплазматической мембраной. Состоит из *цитозоля* — гомогенной фракции, включающей растворимые компоненты, РНК, вещества субстрата, ферменты, продукты метаболизма, и *структурных элементов* — рибосом, внутрицитоплазматических мембран, включений и нуклеоида.

*Рибосомы* — органоиды, осуществляющие биосинтез белка. Состоят из белка и РНК, соединенных в комплекс водородными и гидрофобными связями.

В цитоплазме бактерий присутствуют (непостоянно) различного типа *включения*: твердые, жидкие и газообразные, с белковой мембраной или без нее. Значительная их часть представляет собой запасные питательные вещества и продукты клеточного метаболизма. К запасным питательным веществам относятся: полисахариды, липиды, полифосфаты, отложения серы и др. Из включений полисахаридной природы чаще обнаруживают гликоген и крахмалоподобное вещество гранулезу, которые служат источником углерода и энергетическим материалом. К включениям, окруженным мембраной, также относятся газовые *вакуоли*, или *аэросомы*, которые встречаются у водных прокариот. Они снижают удельную массу клеток.

**Нуклеоид.** Ядро у прокариот состоит из одной замкнутой в кольцо двухспиральной нити ДНК длиной 1,1...1,6 нм, которую рассматривают как одиночную бактериальную хромосому, или *генофор*. Нуклеоид не отделен от остальной части клетки мембраной, т.е. у него отсутствует ядерная оболочка.

В состав структур нуклеоида входят РНК-полимераза, основные белки, (гистоны отсутствуют). Хромосома закрепляется на цитоплазматической мембране, а у грамположительных бактерий — на мезосоме. Нуклеоид не имеет митотического аппарата, и расхождение дочерних ядер обеспечивает рост цитоплазматической мембраны.

Бактериальное ядро — дифференцированная структура. В зависимости от стадии развития клетки нуклеоид может быть дискретным (прерывистым) и состоять из отдельных фрагментов. В нуклеоиде сосредоточен ос-

новой объем генетической информации бактериальной клетки.

Кроме нуклеоида в клетках многих бактерий обнаружены внехромосомные генетические элементы — *плазмиды*, представленные небольшими кольцевыми молекулами ДНК, способными к автономной репликации.

**Капсула.** Слизистый слой над клеточной стенкой бактерии. Вещество капсулы четко отграничено от окружающей среды. В зависимости от толщины слоя и прочности соединения с бактериальной клеткой различают видимую *макрокапсулу*, толщиной 0,2 мкм, в световом микроскопе, и *микрокапсулу*, толщиной менее 0,2 мкм, обнаруживаемую лишь при электронной микроскопии или выявляемую химическими и иммунологическими методами.

Вещество капсул состоит из высокогидрофильных мицелл, химический же состав их весьма разнообразен. Основные компоненты большинства капсул прокариот — гомо- или гетерополисахариды (энтеробактерии и др.).

Капсула — полифункциональный органоид, выполняющий важную биологическую роль. Служит местом локализации капсульных антигенов, определяющих вирулентность, антигенную специфичность и иммуногенность бактерий. Утрата капсулы у патогенных бактерий резко снижает их вирулентность. Капсулы обеспечивают выживание бактерий, защищая их от механических повреждений, высыхания, токсических веществ, заражения фагами, а у патогенных форм — от действия защитных сил макроорганизма: инкапсулированные клетки плохо фагоцитируются. У некоторых видов бактерий, в том числе и патогенных, капсула способствует прикреплению клеток к субстрату.

**Жгутики.** Органы движения бактерий в виде тонких, длинных, нитевидных структур белковой природы. Их длина превышает бактериальную клетку в несколько раз и составляет 10...20 мкм, а у некоторых спирилл достигает 80...90 мкм. Нить жгутика (фибрилла) — полный спиральный цилиндр диаметром 12...20 нм. Жгутик состоит из трех частей: спиральной нити, крюка и базального тельца. *Крюк* — изогнутый белковый цилиндр, выполняющий функцию гибкого связывающего звена между базальным и жесткой нитью жгутика. *Базальное тельце* — сложная структура, состоящая из центрального стержня (оси) и колец.

Жгутики не жизненно важные структуры бактериальной клетки: существуют фазовые вариации бактерий, когда в одной фазе развития клетки они имеются, в другой — отсутствуют.

Количество жгутиков (от 1 до 50 и более) и места их локализации у бактерий разных видов неодинаковы, но стабильны для одного вида. В зависимости от этого выделяют следующие группы жгутиковых бактерий: *монотрихи* — бактерии с одним полярно расположенным жгутиком, *амфитрихи* — бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах; *лофотрихи* — бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки; *перитрихи* — бактерии с множеством жгутиков, расположенных по бокам клетки или на всей ее поверхности (рис. 16).

Бактерии, не имеющие жгутиков, называют *атрихиями*.

Будучи органами движения, жгутики типичны для плавающих палочковидных и извитых форм бактерий и лишь в единичных случаях встречаются у кокков. Они обеспечивают эффективное перемещение в жидкой среде и более медленное по поверхности твердых субстратов.

Бактерии передвигаются беспорядочно, однако они способны к направленным формам движения — *таксисам*, в зависимости от внешних стимулов. Реагируя на различные факторы окружающей среды, бактерии за короткое время локализуются в оптимальной зоне обитания. Таксис может быть положительным и отрицательным. *Хемотаксис* происходит в результате разницы в концентрации химических веществ в среде, *аэротаксис* — сислорода, *фототаксис* — интенсивности освещения, *магнитотаксис* обусловлен способностью микроорганизмов ориентироваться в магнитном поле.



Рис. 16. Жгутики

*а- монотрихи, б- амфитрихи, в-лофотрихи, г-перитрихи*

**Пили** (фимбрии, ворсинки) — прямые, тонкие, полые белковые цилиндры толщиной 3...25нм и длиной до 12 мкм, отходящие от поверхности бактериальной клетки. Образованы специфическим белком — пилином; берут начало от цитоплазматической мембраны. Встречаются у подвижных и неподвижных форм бактерий и видимы только в электронном микроскопе. На поверхности клетки может быть от 1...2, 50...400 пилей до нескольких тысяч.

Существует два класса пилей: половые (секс-пили) и пили общего типа, которые чаще называют *фимбриями*. У одной и той же бактерии могут быть пили разной природы. *Половые* пили на поверхности бактерий в процессе конъюгации выполняют функцию органелл, через которые происходит передача генетического материала (ДНК) от донора к реципиенту.

Пили *общего типа* располагаются перитрихально (кишечная палочка) или на полюсах (псевдомонады); на одной бактерии их может быть сотни. Они принимают участие в слипании бактерий в агломераты, прикреплении микробов к различным субстратам, в том числе к клеткам (адгезивная функция), в транспорте метаболитов, а также способствуют образованию пленок на поверхности жидких сред; вызывают агглютинацию эритроцитов.

**Споры** (эндоспоры) бактерий — особое состояние покоящихся ре-

продуктивных клеток, характеризующееся резко сниженным уровнем метаболизма и высокой резистентностью.

Бактериальная спора формируется внутри материнской клетки и называется *эндоспорой*. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора.

Основная функция спор — сохранение бактерий в неблагоприятных условиях окружающей среды. Переход бактерий к спорообразованию наблюдается при истощении питательного субстрата, недостатке углерода, азота, фосфора, накоплении в среде катионов калия и марганца, изменении pH, повышении содержания кислорода и др.

В световом микроскопе споры видны в виде овальных, иногда округлых, сильно преломляющих свет образований размером 0,8...1,0—1,2...1,5 мкм; они могут располагаться *центрально* (*B. anthracis*), *субтерминально* — ближе к концу (*C. botulinum*), *терминально*—на конце палочек (*C. tetani*). Строение зрелой споры сложное и однотипное у разных видов бактерий. Центральная ее часть представлена *сердцевиной*, или *спороплазмой*, содержащей нуклеоид, рибосомы и нечетко выраженные мембраны структуры. Спороплазма окружена *цитоплазматической мембраной*, к которой прилегает зачаточный *пептидогликановый слой*, затем специфическим для спор массивным слоем *кортекса*, или *коры*. Кортекс состоит из мукопептидов, весьма сходных с мукопептидами клеточных стенок. В кортексе содержится также диаминопимелиновая кислота. Внутренняя плотная часть кортекса, прилегающая к мембране сердцевины, при прорастании спор оформляется в клеточную стенку молодой вегетативной клетки. На поверхности кортекса имеется внешняя мембрана. Снаружи спора окружена *многослойной оболочкой*. У многих бактерий по окружности наружного слоя споровой оболочки располагается *экзоспорум*.

### **Вопросы для самопроверки**

1. Образование протопластов, сферопластов, L-форм.
2. Цитоплазматическая мембрана и ее производные.
3. Мезосомы, типы, функции.
4. Транспортные и другие функции ЦПМ.
5. Органоиды прокариотной клетки.
6. Нуклеоид, плазмиды, эписомы.
7. Механизмы репликации бактериальной хромосомы.
8. Капсула, химизм, структура, функции.
9. Жгутики: строение, расположение, движение.
10. Типы движения у бактерий.
11. Фимбрии (пили): строение, типы, функции.
12. Эндоспоры, их биологический смысл, строение, типы, формирование, прорастание.

## ТЕМА 5

### МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Цель занятия:** ознакомиться с условиями работы с чистыми культурами микроорганизмов, научиться готовить фиксированные и прижизненные препараты микроорганизмов.

**Материалы и оборудование:** набор красок, спирт ректификат 96,6%, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, предметные стекла, бактериологические петли, пинцеты, пробирки с микробными взвесями, кусочки органов и тканей, кровь, микроскопы, плакаты.

#### Приготовление мазков.

Исследуемый материал распределяют тонким слоем по поверхности предметного хорошо обезжиренного стекла.

Мазки готовят из культур микробов, патологического материала (мокрота, гной, моча, кровь и др.) и из органов трупов. Приготовление препарата для микроскопии складывается из следующих этапов:

1. Приготовление мазка на обезжиренном предметном стекле.
2. Высушивание препарата.
3. Фиксация мазка.
4. Окраска мазка.

В правильно приготовленном препарате микробные клетки должны быть расположены в один слой.

*Техника приготовления мазков определяется характером исследуемого материала.*

*1. Приготовление мазков из микробных культур с жидкой питательной среды и из жидкого патологического материала (моча и др.).* Маленькую каплю исследуемой жидкости наносят бактериальной петлей на предметное стекло и круговыми движениями петли распределяют равномерным слоем в виде кружка диаметром в копеечную монету.

*2. Приготовление мазков из крови.* На предметное стекло, ближе к одному из его концов, наносят каплю крови. Второе - шлифованное - стекло, которое должно быть уже предметного, ставят на первое под углом 45° и подводят к капле крови до соприкосновения с ней. После того как кровь растечется по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по всей поверхности стекла. Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет светлорозовую окраску и одинаковую толщину на всем протяжении.

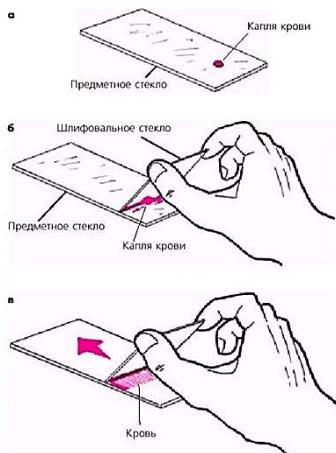


Рис. 17. Приготовление мазка из крови

3. *Приготовление толстой капли.* На середину предметного стекла пастеровской пипеткой наносят каплю крови или прикладывают стекло непосредственно к капле крови, выступающей из пальца. Нанесенную на стекло кровь размазывают бактериальной петлей так, чтобы диаметр образующегося мазка соответствовал величине копеечной монеты. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Кровь в “толстой капле” распределяется неравномерно, образуя неровный край.

4. *Приготовление мазка из вязкого материала (мокрота, гной).* Мокроту или гной, нанесенные на предметное стекло ближе к узкому краю, накрывают другим предметным стеклом. Стекла слегка придавливают друг другу. После этого свободные концы стекол захватывают 1 и 2 пальцами обеих рук и разводят в противоположные стороны так, чтобы при движении оба стекла плотно прилегали друг к другу. Получаются мазки с равномерно распределённым материалом, занимающим большую часть.

5. *Приготовление мазка из культур с плотных питательных сред.* На середину чистого, хорошо обезжиренного стекла наносят каплю физиологического раствора или дистиллированной воды, в нее вносят бактериальную петлю с небольшим количеством исследуемой микробной культуры так, чтобы капля жидкости стала слегка мутноватой. После этого излишек микробного материала на петле сжигают в пламени горелки и приступают к приготовлению мазка по описанному выше способу.

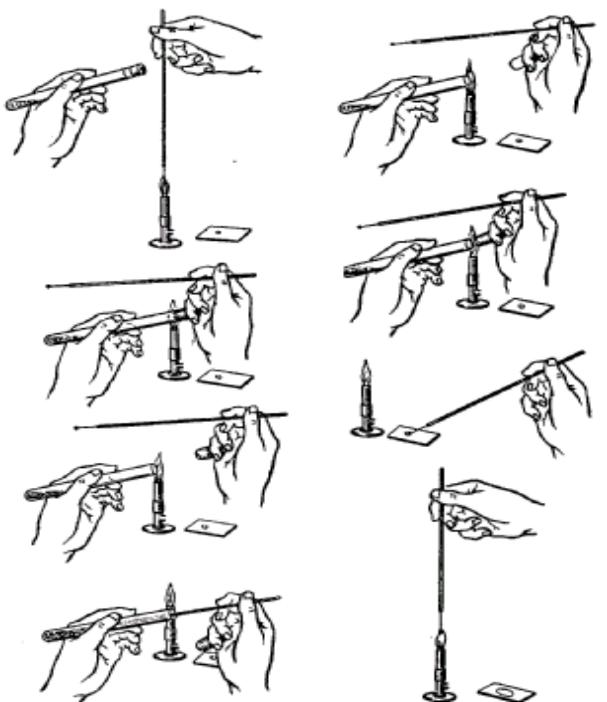


Рис. 18. Схема приготовления препарата-мазка

6. *Приготовление мазков из органов и тканей.* Поверхность органа с целью обеззараживания прижигают накалившими браншами пинцета, делают по этому месту надрез и из глубины остроконечными ножницами вырезают небольшой кусочек ткани, который помещают между двумя предметными стеклами. Далее поступают так же, как при приготовлении мазка из гноя и мокроты. Если ткань органа плотная, то из глубины разреза делают скальпелем соскоб. Полученный при соскабливании материал распределяют тонким слоем по поверхности стекла скальпелем или бактериальной петлей. Для изучения взаимного расположения элементов ткани и находящихся в ней микроорганизмов делают мазки-отпечатки. Для этого вырезанный из середины органа небольшой кусочек ткани захватывают пинцетом и прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу несколько раз последовательно, получая, таким образом, ряд мазков-отпечатков.

7. *Препарат «раздавленная капля».* На чистое предметное стекло наносят из флакона каплю воды. В нее из пробирки вносят петлей небольшое количество исследуемой культуры, и осторожно перемешивают, не размазывая по стеклу. Культуру, выращенную в жидкой среде, наносят на предметное стекло пипеткой.

Суспензию микроорганизмов накрывают сверху покровным стеклом так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха, мешающих исследованию. Избыток выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой, прикладывая ее к краям покровного стекла.

На покровное стекло наносят каплю кедрового масла и препарат рассматривают с помощью иммерсионного объектива при опущенном конденсоре. Активно движущиеся бактерии проплывают через все поле зрения, меняют направления, совершают вращательные и круговые движения.

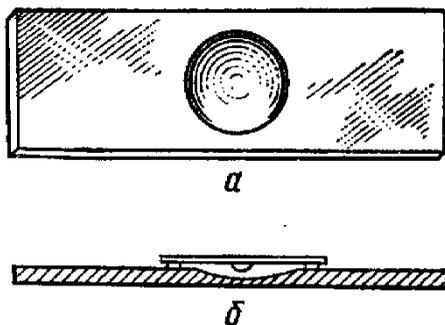


Рис. 19. Исследование микробов на подвижность  
а - стекло с луночкой;  
б - «висячая капля»

8. *Препарат «висячая капля».* Для приготовления такого препарата требуются специальное предметное стекло с лункой посередине и обычное покровное стекло. Края лунки предметного стекла смазывают вазелином. Небольшую каплю бульонной культуры микроорганизмов (суспензию) наносят на середину покровного стекла. Предметное стекло переворачивают лункой вниз и опускают ее на покровное стекло таким образом, чтобы находящаяся на нем капля суспензии приходилась на центр лунки.

Предметное стекло слегка прижимают к покровному, и стекла склеиваются. Препарат приподнимают и быстро переворачивают покровным стеклом кверху. Получается герметическая камера, в которой капля долго не высыхает. В правильно подготовленном препарате капля должна свободно свисать с покровного стекла и не соприкасаться с дном или краями лунки.

На покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают с объективом 90х в затемненном поле зрения (при суженной диафрагме и опущенном конденсоре).

**Высушивание и фиксирование мазков.** Приготовленный на предметном стекле мазок высушивают и после высыхания фиксируют. При фиксировании мазок закрепляется на поверхности предметного стекла, и поэтому при последующей окраске препарата микробные клетки не смываются. Кро-

ме того, убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые. Различают физический способ фиксации, в основу которого положено воздействие высокой температуры на микробную клетку, и химические способы, предусматривающие применение средств, вызывающих коагуляцию белков

**Физический способ фиксации.** Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за ребра мазком кверху и плавным движением проводят 2—3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с. Надежность фиксации проверяют следующим простым приемом: 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.

**Химический способ фиксации.** Для фиксации мазков применяют химические вещества такие как: Безводный метиловый спирт. Этиловый (винный) спирт 96%. Жидкость Никифорова (смесь спирта и наркозного эфира в соотношении 1:1). Жидкость Карнуа (спирта 96% 60 мл, хлороформа 30 мл, уксусной кислоты ледяной 10 мл)

Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом и затем высушивают на воздухе.

**Техника окраски мазков.** Для окраски мазков пользуются растворами красок или красящей бумагой, что предложено А. И. Синевым. Простота приготовления, удобство применения, а также возможность хранения красящих бумаг в течение долгого времени явились основанием для широкого их использования при различных способах окраски.

### ***Вопросы для самопроверки***

1. Какие условия необходимо соблюдать при взятии культуры для мазка?
2. Какие препараты применяются в микробиологии для изучения морфологии микроорганизмов?
3. Каковы цели фиксации мазка?
4. Как готовят прижизненные препараты микроорганизмов?

## ТЕМА 6 ПРИГОТОВЛЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ. МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Цель занятия:** ознакомить студентов с красителями применяемыми в микробиологии и методами окрашивания микроорганизмов.

**Материалы и оборудование:** набор сухих бактериологических красок и их растворов, культуры бактерий на МПА и в МПБ, световые микроскопы, обезжиренные предметные стекла, фуксин Пфейффера, красящие бумажки по Синеву, раствор метиленовой сини, фильтровальная бумага, красители для окраски бактерий по методам Грамма и Циля-Нильсена, петли бактериологические, 96% этанол, плакаты.

Наиболее часто в микробиологической практике используются следующие анилиновые краски: фуксин (основной), метиловый красный, нейтральный красный — в растворе имеют красный цвет; карболовый кристаллвиолет, метилвиолет, генцианвиолет, готовая жидкая краска Гимза (азур-эозин) фиолетового цвета; метиленовая синь, бриллиантовая и малахитовая зелень.

Из сухих кристаллических или порошкообразных красителей готовят водные или спиртовые растворы красок. Последние обычно готовят впрок, так как они хорошо сохраняются в темноте (посуда из темного стекла, темное помещение). Для усиления действия красящих растворов на микробную клетку используют различные протравители, которые добавляют в раствор красителя (фенол, едкий калий) или ими обрабатывают препарат перед окрашиванием (слабые растворы соляной, серной или хромовой кислот). Также с целью протравливания препарат с налитой на него краской прогревают или заливают предварительно подогретым раствором краски. Краски, нестойкие в растворе, не сохраняющиеся длительное время, готовят только непосредственно перед употреблением в виде 1-2% -ного раствора.

**Спиртоводные растворы.** *Карболовый фуксин (фуксин Циля).* Кристаллы основного фуксина предварительно растворяют в 96% -ном этиловом спирте. Сначала готовят насыщенный спиртовой раствор (на 5-10 г краски 100 мл спирта). Для лучшего и более быстрого растворения кристаллы краски предварительно растирают в фарфоровой ступке в небольшом количестве спирта с добавлением нескольких капель глицерина. Чисто спиртовой раствор для окраски непригоден, поэтому готовят спирто-водный раствор: к 10-20 мл насыщенного спиртового раствора фуксина добавляют 100 мл дистиллированной воды с 5% фенола (протрава). Полученный раствор фуксина фильтруют через фильтровальную бумагу. В ряде случаев фуксин Циля перед использованием разбавляют еще раз дистиллированной водой (1:10) и получают его рабочий раствор (фуксин Пфейффера).

*Карболовый кристаллвиолет, метилвиолет, генцианвиолет.* Первые

два красителя в растворе очень быстро выпадают в осадок и при окрашивании могут исказить микроскопическую картину. Чаще используют генцианвиолет, который получают смешением метил- и кристаллвиолета с добавлением декстрина; он дает более ровное окрашивание. Для приготовления спирто-водного раствора 1 г сухого генцианвиолета растворяют в 10 мл спирта, растирая в ступке с глицерином и кристалликами фенола (2%), затем добавляют дистиллированную воду. Чтобы избежать образования осадка при хранении раствора, листы фильтровальной бумаги пропитывают насыщенным спиртовым раствором краски, высушивают их на воздухе, нарезают мелкими полосками или квадратиками и сохраняют в темной банке с притертой пробкой.

При окраске препарата на него накладывают высушенную полоску с генцианвиолетом, сверху наливают несколько капель воды, выдерживая 2-3 мин.

*Раствор метиленовой сини (щелочная синь Леффлера).* Для приготовления раствора 3 г краски настаивают длительное время (3-4 мес.) в 100 мл 96% -ного спирта, затем 30 мл насыщенного раствора разбавляют в 100 мл дистиллированной воды, содержащей 1 мл 1%-ного раствора едкого калия (протрава). Фильтруют.

**Водные растворы.** *2%-ный сафранин:* 2 г сухого красителя заливают 100 мл горячей дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр и сразу используют свежий раствор для окрашивания.

*1%-ный раствор малахитовой зелени:* 1 г кристаллической краски растворяют в 100 мл горячей дистиллированной воды, фильтруют ее, остужают и используют для окрашивания.

*Готовую жидкую краску азур-эозин (краска Гимза)* применяют при специальных методах окрашивания бактериальных препаратов. Перед употреблением ее необходимо разбавить дистиллированной водой (1:10), но при этом сразу образуется осадок. Чтобы последний не влиял на препарат, окрашивание проводят, по рекомендации Романовского, следующим образом: на дно чашки Петри кладут стеклянные палочки или спички с обломанными головками, на них помещают препарат мазком вниз, раствор краски подливают под препарат (метод Романовского-Гимза).

**Простой метод окраски.** При данном методе используют только один краситель. На фиксированный препарат, помещенный на мостике над сливной чашкой, наливают раствор либо метиленовой сини (окрашивают 4-5 мин), либо карболовый фуксин Пфейффера (1-2 мин), либо карболовый генцианвиолет (1-2 мин). Краску смывают водой из бутылки, препарат высушивают фильтровальной бумагой и наносят каплю иммерсионного масла. Готовый препарат помещают на предметный столик и микроскопируют.

**Сложные (дифференцирующие) методы окраски.** Они отличаются от простых методов тем, что препарат окрашивают несколькими красками, а в отдельных случаях используют еще специальные реактивы (раствор Люголя, кислоты и др.). Сложные методы позволяют выявить наличие (или отсут-

ствии) отдельных структурных элементов и некоторых органических соединений клетки, чем и определяют тинкториальные свойства каждого вида микроба.

Метод окраски по Граму. Фиксированный препарат окрашивают карболовым генцианвиолетом в течение 2-3 мин. Не смывая водой, краску сливают и на 2-3 мин на препарат наносят раствор Люголя (йода кристаллического — 1 г; йодистого калия как растворителя йода — 2 г; дистиллированной воды — 300 мл). Раствор Люголя сливают; препарат, не промывая водой, обрабатывают 96% -ным спиртом в течение 30 с, затем хорошо промывают водой. После этого препарат дополнительно окрашивают рабочим раствором фуксина (до 1 мин), вновь промывают водой, сушат фильтровальной бумагой и микроскопируют.

При окраске по Граму одни виды бактерий не обесцвечиваются спиртом после первичного окрашивания и сохраняют фиолетовый цвет; их называют *грамположительными*. Другие виды обесцвечиваются спиртом, а затем воспринимают дополнительную окраску фуксином и приобретают розово-красный цвет; их называют *грамотрицательными*. Окрашивание по Граму обусловлено структурными особенностями клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных групп микробов, длиной и формой ее пор, неодинаковым химическим составом и строением пептидогликанового слоя клеточной стенки микроорганизмов. Генцианвиолет (или кристаллвиолет) и нуклеиновые кислоты цитоплазмы в присутствии йода (раствор Люголя) образуют прочный комплекс, нерастворимый в воде и слаборастворимый в спирте. Поэтому при действии спиртом в течение 30 с бактерии с многослойным пептидогликановым каркасом (грамположительные) не обесцвечиваются. У грамотрицательных бактерий пептидогликановый слой имеет более крупные поры, что облегчает прохождение спирта; образовавшийся комплекс разрушается, клетка обесцвечивается.

Методы окраски кислото-, спирто-, щелочеустойчивых бактерий. Микробы данной группы (микобактерии туберкулеза, паратуберкулезного энтерита крупного рогатого скота, проказы человека и др.) принадлежат к грамположительным бактериям. Для их дифференциации применяют специальные методы окрашивания, основанные на различной химической структуре цитоплазмы и клеточной оболочки. В состав этих бактерий входит значительное количество жиро-восковых веществ, в частности стеариновых кислот (в том числе фтионовой кислоты до 40%), поэтому они трудно воспринимают краски. Но если они окрасились при воздействии протравителя, то трудно уже обесцвечиваются кислотами, спиртами и щелочами.

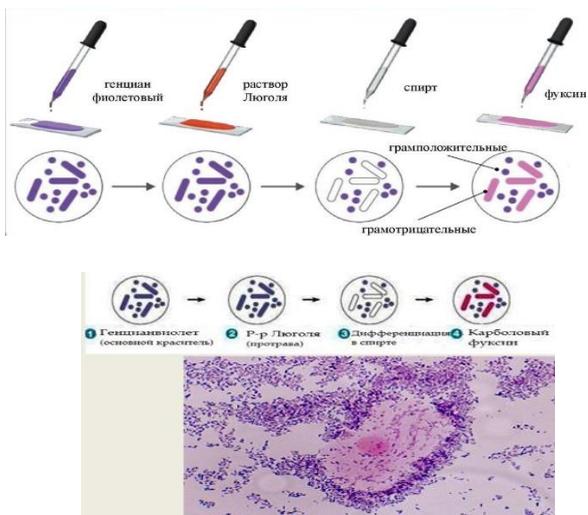


Рис. 20. Метод окраски по Граму

Наиболее распространенным методом окраски бактерий данной группы является метод Циля-Нильсена. На фиксированный препарат кладут кусок белой фильтровальной бумаги (для предохранения от осадка), на него наливают раствор карболового фуксина, снизу препарат подогревают над пламенем до появления паров и оставляют на «мостике» (5-7 мин). Затем краску с бумажкой сливают (не промывая) и обесцвечивают 3-5% -ным раствором серной кислоты (5-7 с), хорошо промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовой синью Леффлера (4-5 мин). Далее препарат промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой. Кислотоустойчивые (спирто-, щелочеустойчивые) бактерии окрашиваются в красный цвет (не обесцвечиваются кислотой), а некислотоустойчивые — в синий, так как легко окрасившись фуксином, они легко обесцвечиваются кислотой и воспринимают вторичную окраску синью.

*Методы окраски непостоянных элементов микробной клетки.* В структуре микробной клетки различают постоянные и непостоянные элементы. Постоянные — это цитоплазма, оболочка, ядерное вещество; непостоянные — спора, капсула, жгутики, которые при определенных условиях формируются лишь у бактерий отдельных видов, поэтому служат видовым признаком.

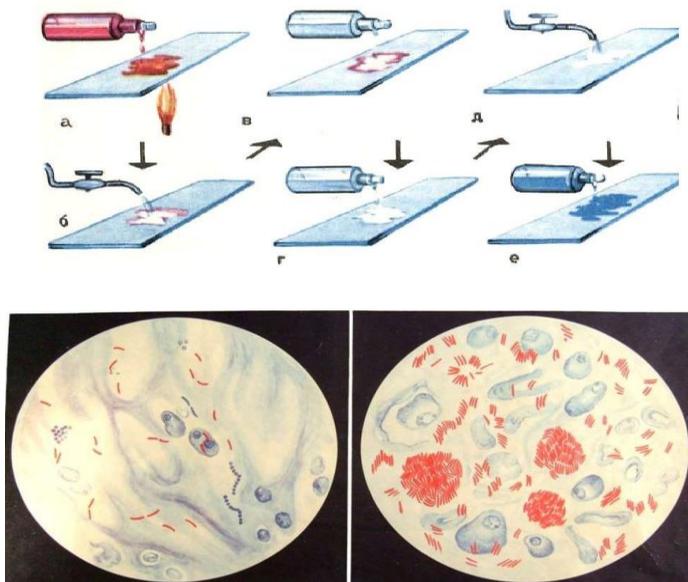


Рис. 21. Метод окраски Циля-Нильсена

**Окраска спор.** Палочковидные микробы, образующие во внешней среде (почве, воде, кормах, на питательных средах) стойкую форму существования — спору, называют бациллами. При спорообразовании в клетке происходят процессы, обуславливающие сгущение цитоплазмы, уменьшение свободной воды (до 40%). Цитоплазматическое содержимое покрывается многослойными оболочками, химический состав которых обеспечивает высокую стойкость споры к нагреванию, высушиванию, действию многих кислот, щелочей, красителей. При законченном спорообразовании спора лежит свободно, без остатков вегетативной клетки; при незаконченном процессе спора, в зависимости от вида микроба, располагается либо в центре клетки, либо на конце (терминально), либо между концом и центром клетки (субтерминально). При микроскопировании препаратов, окрашенных простым методом или по Граму, видна окрашенная вегетативная часть клетки и неокрашенные, хорошо преломляющие свет споры.

**Метод Аuesки.** Высушенный на воздухе препарат, не фиксируя, про-  
 травливают 0,5% -ной соляной кислотой с подогреванием (2-3 мин), охлажда-  
 ют, промывают водой и фиксируют над пламенем. Затем на препарат кладут  
 кусочек фильтровальной бумаги, наливают на него карболовый фуксин Циля,  
 окрашивают с подогреванием до паров (7-8 мин), краску сливают, препарат  
 обрабатывают 5% -ным раствором серной кислоты (5-7 с), хорошо промывают  
 водой. Дополнительно окрашивают метиленовой синью (4-5 мин), опять про-

мывают водой и просушивают фильтровальной бумагой. Микроскопируют под иммерсией: вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Ожешко. На нефиксированный мазок наливают 0,5% раствор хлористоводородной кислоты и подогревают 1-2 мин. С препарата сливают кислоту, промывают его водой и после высыхания фиксируют на пламени. Фиксированный препарат красят по способу Циля - Нильсена. Тела бактерий окрашиваются в синий цвет, споры - в красный.

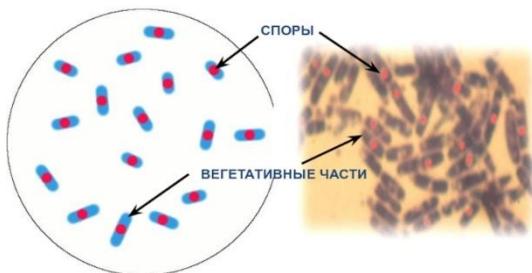


Рис. 22. Метод окраски по Ожешко

Метод Меллера. Фиксированный на пламени препарат протравливают 5% -ной хромовой кислотой (2-3 мин), промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой. Далее поступают, как в предыдущем методе. Результат окраски тот же: вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Златогорова. Процесс окраски, как в предыдущих двух методах, только без протравы. После окрашивания вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Пешкова. Мазок фиксируют, красят метиленовой синью с подогреванием до кипения, смывают. Докрашивают 1%-ным водным раствором нейтральрота (10 с), смывают, просушивают. Споры окрашиваются в синий цвет, вегетативные клетки — в красный.

Метод Шеффера-Фултона. На фиксированный мазок наносят 5%-ный водный раствор малахитового зеленого и нагревают до появления паров. Мазок промывают водой и дополнительно прокрашивают 5 %-ным водным раствором сафранина 30-60 с. Краску смывают и просушивают фильтровальной бумагой. Микрокартина: споры – зеленые, вегетативные клетки – красные.

**Окраска капсул.** Капсула — производное наружного слоя оболочки. Представляет собой муциноподобное вещество, высокомолекулярный полисахарид. У патогенных капсулообразующих бактерий наличие капсулы наблюдают только в инфицированном организме как защитное приспособление против фагоцитоза (на искусственных питательных средах капсулы образуются лишь при добавлении кровяной сыворотки или дефибринированной крови). Капсулообразование отмечают у возбудителей сибирской

язвы, злокачественного отека, диплококковой септицемии. Капсульное вещество плохо окрашивается, поэтому для его выявления применяют специальные методы окраски, основанные на явлении метахромазии.

Метод Михина. Фиксированный мазок из крови или препарат-отпечаток из ткани органа (печени, селезенки, почки) окрашивают метиленовой синью с подогреванием до появления паров (5-7 мин). Краску сливают, быстро промывают водой (можно не промывать), просушивают фильтровальной бумагой. Микробная клетка окрашивается в синий цвет, капсула — в светло-розовый.

Метод Романовского-Гимза. Фиксированный препарат окрашивают, как было указано выше: мазок-препарат помещают в чашку Петри на стеклянные или деревянные палочки отпечатком вниз, под препарат подливают краску, окрашивают 40-50 мин. Результат тот же, что и при окраске по Михину: микробная клетка окрашивается в синий цвет, капсула — в светло-розовый.

Метод Ольта. Свежий водный 2% -ный раствор сафранина наливают на препарат и выдерживают 5-7 мин. Затем слегка промывают водой и высушивают. Вегетативная клетка — кирпично-красного цвета, капсула — желто-оранжевого.

Метод окраски по Ребигеру. Особенностью данного метода окраски является то, что препарат фиксируют не пламенем, а формалином, причем фиксация происходит одновременно с окраской. Для этой цели готовят следующий раствор: 15-20г генцианвиолета растворяют в 100 мл 40% формалина, дают раствору постоять несколько часов. Затем этот насыщенный при комнатной температуре раствор фильтруют, после чего он готов к употреблению.

Проведение окрашивания. Предметное стекло перед исследованием обезжиривают и делают на нем мазки исследуемых культур. Мазки следует делать тонкими, чтобы клетки равномерно распределялись на поверхности стекла и не образовывали скоплений. Препарат высушивают при температуре 20-22 °С. На мазок наносят краситель Ребигера на 15-20 секунд. Затем быстро промывают водой и высушивают на воздухе. Микроскопируют с иммерсионной системой. Микроскопическая картина: капсулы бактерий окрашиваются в красновато-фиолетовый цвет, бактерии - в темно-фиолетовый.

Метод Муромцева. Фиксированный препарат окрашивают готовой краской Муромцева 20-30 с, промывают водой и высушивают. Капсулы окрашиваются в бледно-розовый цвет, микробная клетка - в темно-синий.

Метод Боголепова. Смешать на предметном стекле капсульную культуру с каплей колларгола (спиртовый раствор коллоидного серебра), приготовить тонкий мазок, высушить на воздухе. Микроскопическая картина: капсула неокрашена, фон светло – коричневый.

Метод Бурри-Гинса. Готовят препарат по Бурри: смешивают каплю взвеси микробов с каплей туши и при помощи стекла со шлифованным краем растирают смесь по предметному стеклу. Затем его высушивают и фиксируют. На мазок наносят водный раствор фуксина на 1-2 мин. Промывают

водой, высушивают на воздухе и микроскопируют. При этом бактерии окрашиваются в красный цвет, а неокрашенные капсулы контрастно выделяются на черно-розовом фоне.

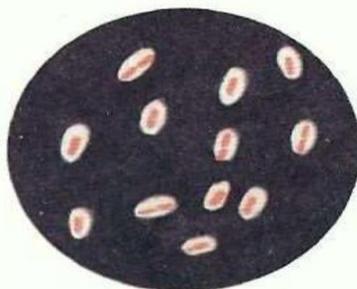


Рис. 23. Окраска капсул по Бурри-Гинса

**Окраска жгутиков.** Жгутики - органоиды движения некоторых видов бактерий. У разных бактерий они различаются по своей толщине (12-18 нм), длине (до 20 мкм) и амплитуде витка. Нити жгутика состоят из фибриллярного белка флагеллина. Аминокислотный состав флагеллина у разных видов микроорганизмов несколько различен. Строение жгутиков винтообразное: субъединицы располагаются по спирали вокруг свободного внутреннего пространства. У некоторых бактерий нить окружена чехлом. Расположение жгутиков и их число на поверхности клетки относительно постоянно. Для каждого вида бактерий это является диагностическим признаком. Жгутики характерны для плавающих палочковидных и извитых форм бактерий и лишь в единичных случаях встречаются у кокков. Жгутики бактерий по характеру работы подобны корабельному винту. Жгутики вращаются сравнительно быстро.

Метод Леффлера На высушенный и зафиксированный мазок наливают протраву (1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина, 10 мл 20% водного раствора танина, 5,5 мл насыщенного на холоду водного раствора сульфата закислого аммиачного железа (соль Мора)) в таком количестве, чтобы покрыть всю поверхность покровного стекла и выдерживают 3 – 5 минут при комнатной температуре. По истечении указанного времени препарат осторожно и тщательно промывают проточной водой. На препарат наносят раствор фуксина (1 часть насыщенного спиртового раствора фуксина на 10 частей воды) и препарат прогревают над пламенем до появления пара. Препарат промывают водой и микроскопируют.

Метод серебрения по Морозову (обнаружение жгутиков). Готовят 4 раствора. Раствор А: вода дистиллированная-100 мл, 40% раствор формалина-2 мл, ледяная уксусная кислота- 1 мл. Раствор Б: танин-5 г, жидкая карболовая кислота-1 мл, вода дистиллированная –100 мл. Раствор В: нитрат сере-

бра-5 г, дистиллированная вода –100 мл. К 80 мл этого раствора по каплям добавляют аммиак до растворения осадка. Для окраски раствор серебра разводят дистиллированной водой 1:10.

На препарат наносят раствор А на 1 минуту, затем раствор сливают, препарат промывают водой, обрабатывают раствором Б и подогревают 1 минуту до охлаждения паров, промывают водой, наносят раствор В и подогревают 1-2 минуты до появления темно-коричневой окраски мазка, промывают водой, подсушивают.

Микроскопическая картина: тела бактерий угольно-черного цвета, жгутики в виде тончайших волнообразно извитых нитей коричневого или янтарно-черного цвета на прозрачном или желтоватом фоне.

В повседневной бактериологической работе чаще используют косвенные методы обнаружения жгутиков – выявляют подвижность клеток исследуемой культуры в препарате «раздавленной капли» или «висячей капли»

### ***Вопросы для самопроверки***

1. Основные краски, предназначенные для окраски мазков.
2. Назначение и способы простого метода окрашивания.
3. Значение сложных методов окраски микробов при бактериологическом исследовании с использованием микроскопии.
4. Сущность, техника и практическое значение окраски по Граму.
5. Методы окраски для выявления кислотоустойчивых бактерий и спор.
6. Значение и сущность окраски по Романовскому — Гимза.
7. Методы выявления капсул у капсулообразующих бацилл.
8. На чем основаны методы окраски капсул?
9. В чем суть окраски по Гинсу —Бурри?

## ТЕМА 7 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. ТЕХНИКА ПОСЕВА МИКРОБОВ

**Цель занятия:** ознакомить студентов с рецептами и методиками приготовления питательных сред. Освоить технику посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды.

**Материалы и оборудование:** колбы, воронки, марля, гигроскопическая вата, пробирки с ватными пробками, градуированные пипетки различной емкости, электроплитка, набор полуфабрикатов питательных сред, весы, чашки Петри, пробирки, бактериологические петли, стеклянные шпатели, плакаты, презентации.

### **Требования, предъявляемые к питательным средам**

1. *В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы;*

2. *Среда должна быть сбалансирована по химическому составу.* Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органических элементов - C:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;

3. *Среды должны иметь достаточную влажность,* обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %.

4. *Среда должна иметь определенное значение pH среды.* Среди микроорганизмов различают *ацидофилы* (кислотолюбивые микроорганизмы), *алкалофилы* (щелочелюбивые микроорганизмы) и *нейтрофилы* (лучше всего растут в нейтральной среде с pH около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. pH является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения pH в среду добавляют буферные системы (например: фосфатный буфер), CaCO<sub>3</sub> (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например: аминокислоты, полипептиды, белки) и др.;

5. *Среды должны быть изотоничными* для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.

6. *Среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (rh<sub>2</sub>),* определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают rh<sub>2</sub>=41, насыщенный водородом rh<sub>2</sub>=0. Obligатные анаэробы размножаются при rh<sub>2</sub> не выше 5, аэробы

– не ниже 10.

7. *Среды должны быть стерильными*, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

### **Классификация питательных сред**

По составу различают синтетические и натуральные питательные среды.

*Синтетические* среды представляют собой водные растворы определенных химически чистых соединений в установленных дозировках, т.е. их состав полностью известен. Однако лишь для немногих, не требовательных к питанию микроорганизмов, используют синтетические питательные среды.

*Натуральные* или *естественные* среды состоят из продуктов растительного или животного происхождения и имеют сложный неопределенный химический состав. К ним относятся мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА), солодовое сусло и сусло-агар, обезжиренное или гидролизованное молоко, отвары различных овощей и т.д.

По целевому назначению питательные среды делят на основные, элективные и дифференциально-диагностические.

*Основными* являются среды, которые применяют для выращивания многих бактерий. Это МПБ, триптические гидролизаты мясных, рыбных продуктов, казеина. Такие среды служат основой для приготовления сложных питательных сред

*Элективные* среды предназначены для избирательного выделения и накопления микроорганизмов определенного вида (или определенной группы) из объектов, содержащих разнообразную микрофлору. Сопутствующие микроорганизмы или совсем не растут на таких средах, или развитие их сильно подавлено. Разработка элективных сред основана на биологических особенностях, отличающих данные микроорганизмы от многих других.

*Дифференциально-диагностические* среды позволяют по возможности быстро установить и отличить (дифференцировать) одни виды или группы микроорганизмов от других. Их состав подбирается с таким расчетом, чтобы он позволил четко выявить наиболее характерные свойства данного вида. Часто это достигается введением в среды специальных красителей-индикаторов, которые окрашивают колонии выявляемых микроорганизмов в определенный цвет. В частности, для культивирования бактерий группы кишечной палочки используют дифференциально-диагностические среды Эндо, Плоскирева, Левина и др.

По физическому состоянию среды разделяют на жидкие, полужидкие, плотные, сухие.

*Жидкие* среды (бульоны) используют для накопления биомассы микроорганизмов или продуктов их метаболизма, а также для выявления физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов.

*Полужидкие* среды содержат от 0,08 до 0,7 % агара.

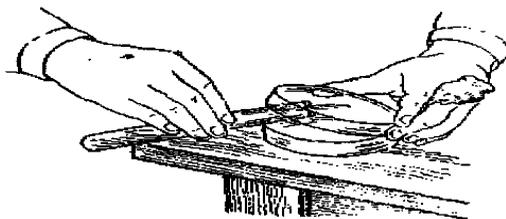
*Плотные* среды готовят из жидких путем добавления к ним желиру-

ющих веществ – желатина или агара (1,5–2,0 %). Оба эти вещества при растворении в горячей воде образуют коллоидный раствор, дающий при охлаждении плотный студень (гель). Студнеобразные среды можно вновь расплавлять нагреванием. Плотные среды используют для выделения чистых культур микроорганизмов, в диагностических целях (описание выросших на среде колоний), для количественного учета микроорганизмов, определения антагонистической, протеолитической активности и т. д.

Сухие питательные среды, выпускаемые специальными предприятиями, используют в микробиологических целях путем добавления в них воды с последующей стерилизацией.

### **Техника посевов микроорганизмов на питательные среды**

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические петли, иглы, шпатели, пипетки. Посевы всегда проводят около пламени горелки. Около работающего с чистой культурой нельзя делать резких движений, ходить, кашлять и т. п., так как движение воздуха увеличивает опасность попадания посторонних микроорганизмов в пробирку с культурой. Поэтому посевы и пересевы микроорганизмов рекомендуется проводить в боксе.



*Рис. 24. Правила разливания питательной среды в чашки Петри*

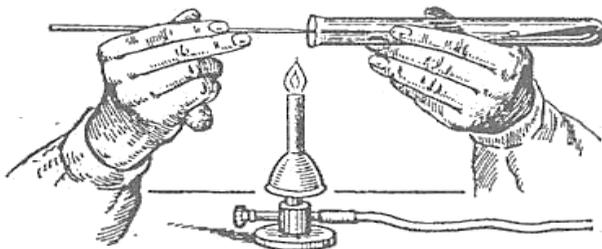
**Посев в жидкую питательную среду.** Посев производят петлей или градуированной пипеткой. Посевной материал бактериологической петлей осторожно вносят в пробирку и легко встряхивают в верхнем слое питательной среды или растирают по стенке, смывая его жидкой средой.

Стерильную пипетку фламбируют (обжигают) в пламени горелки, опускают в пробирку с культурой, отбирают определенное количество материала и переносят его в пробирку со свежей питательной средой, выпуская жидкость по стенке пробирки, или вносят пипетку вглубь среды и выдувают содержащийся в ней материал.

**Посев штрихом в пробирку со скошенным агаром.** Пробирку с культурой и пробирку со скошенным питательным агаром берут в левую руку и держат в наклонном положении. В правую руку берут бактериологическую иглу и прокалывают ее в пламени спиртовки до покраснения, затем проносят сквозь пламя иглодержатель. Мизинцем правой руки вынимают

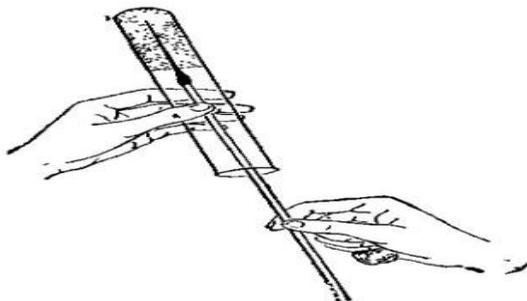
пробки из обеих пробирок, обжигают края пробирок. Петлю вводят в пробирку с культурой, охлаждают ее о края пробирки и осторожно снимают небольшое количество микробной культуры. Петлю с посевным материалом быстро переносят в пробирку со стерильной средой и опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной влаги. Слегка касаясь агара, проводят зигзагообразную линию, при этом петлю не отрывают от поверхности питательной среды. После посева петлю вынимают из пробирки и обжигают вместе с остатками посевного материала.

Затем обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают. На наружной поверхности пробирки пишут дату посева и наименование культуры.



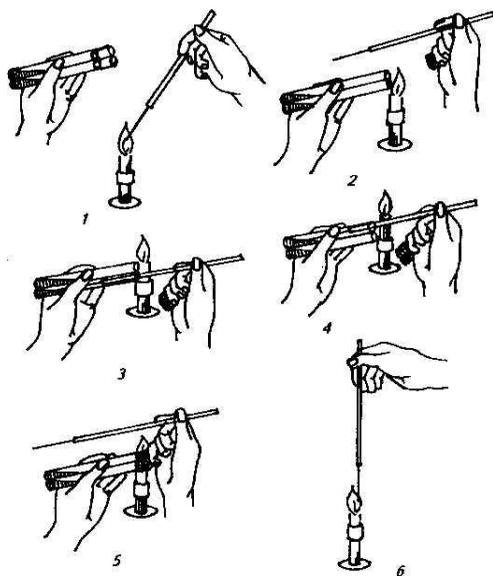
*Рис. 25. Посев микроорганизмов «штрихом» на скошенный агар*

**Посев уколом.** Профламбированной бактериологической иглой берут исследуемую культуру. Пробирку со столбиком питательной среды берут в правую руку, переворачивают вверх дном, вынимают из нее пробку, прижимая ее мизинцем к ладони. Подняв пробирку на уровень глаз, в центре столбика прокалывают плотную среду иглой снизу вверх на всю глубину. Затем иглу извлекают и обжигают вместе с остатками посевного материала, пробирку закрывают пробкой, подписывают и помещают в термостат для выращивания.

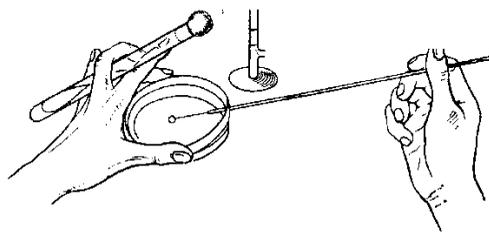


*Рис. 26. Посев уколом на плотную питательную среду*

**Посев на поверхность среды в чашку Петри.** В чашки Петри заливают расплавленный агар, дают ему застыть и подсушивают в термостате. Посев проводят бактериологической петлей или шпательем Дригальского (стеклянная палочка, согнутая в виде треугольника). При использовании петли посев осуществляют штриховым методом. Крышку чашки Петри слегка приоткрывают настолько, чтобы в образующуюся щель проходила петля. Петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее, и наносят микробную культуру зигзагообразными движениями (штрихом) по всей поверхности агара, не отрывая от среды, что дает возможность получить изолированные колонии.

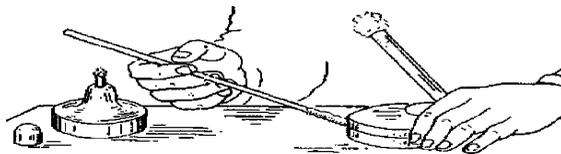


*Рис. 27. Пересев культуры микроорганизмов в пробирки*



*Рис. 28. Посев на плотную питательную среду в чашки Петри*

**Посевы «газоном»** производят шпателем. Для этого, приоткрыв левой рукой крышку чашки Петри, петлей или пипеткой наносят посевной материал на поверхность питательного агара. Затем проводят шпатель сквозь пламя горелки, остужают его о внутреннюю сторону крышки и растирают материал по всей поверхности среды. После посева шпатель вынимают и обжигают вместе с остатками посевного материала. После инкубации посевов в чашке появляется равномерный газон выросшей культуры.



*Рис. 29. Посев на агар в чашки Петри шпателем Дригальского*

**Глубинный посев в чашку Петри.** Определенное количество подготовленного к посеву исследуемого материала ( $1,0$  или  $0,1 \text{ см}^3$ ) вносят пипеткой в пустую чашку Петри. Из пробирки или колбы с расплавленной и остуженной до  $45^\circ \text{C}$  питательной средой вынимают пробку, обжигают края в пламени горелки и, слегка приоткрыв крышку, выливают на дно чашки.

Пробирки и чашки с посевами помещают в термостат с температурой, оптимальной для конкретного микроорганизма. Как правило, мезофильные бактерии выращивают при температуре  $37 \pm 1^\circ \text{C}$ , термофильные бактерии – при  $40\text{--}55^\circ \text{C}$ , дрожжи и плесени – при  $30 \pm 1^\circ \text{C}$ .

### ***Контрольные вопросы***

1. Как классифицируют питательные среды по составу компонентов и назначению?
2. Какие среды позволяют получить преимущественный рост одних микробов при одновременном подавлении роста других?
3. Какими методами производят посев микроорганизмов на питательные среды?
4. Как классифицируют питательные среды по составу компонентов и назначению?

## ТЕМА 8 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Цель занятия:** ознакомить студентов с методами культивирования микроорганизмов.

**Материалы и оборудование:** анаэробат, эксикатор, термостат, стерильные пипетки Пастера, шпатели, бактериологические петли, питательные среды, плакаты.

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется *культивированием*, а развившиеся в таких средах микроорганизмы – *культурой*. При культивировании происходит рост культуры – физиологический процесс, в результате которого увеличивается *биомасса* – масса клеточного вещества данного микроорганизма.

*Чистой культурой микроорганизма* называют культуру, которая представлена потомством одной клетки. Естественным путем получить чистую культуру почти невозможно, поэтому ее получают искусственно. Для выделения чистой культуры используют плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде *изолированной колонии* – популяции микроорганизмов одного вида.

Перед выделением чистой культуры из какого-либо пищевого продукта или природного субстрата (например: почвы, воды), в котором данный микроорганизм находится в небольших количествах, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в элективных условиях.

*Накопительные культуры* состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. *Элективные* (накопительные) *условия* – условия, способствующие развитию одной культуры и ограничивающие развитие сопутствующих микроорганизмов. Создать накопительные условия можно путем использования накопительных сред. Примером элективных условий может быть повышенная температура (для выделения термоустойчивых форм бактерий), повышенная кислотность, повышенная концентрация соли и т.д.

*Инкубация* – культивирование микроорганизмов при определенной температуре.

Хранят чистые культуры обычно на плотных питательных средах в пробирках. При этом постоянно необходимо делать пересевы на свежую питательную среду.

К другим способам хранения чистых культур относятся сохранение их на накопительной среде под слоем вазелинового масла и хранение в лиофилизованном состоянии (сушка под вакуумом замороженных клеток микроорганизмов).

В пищевой промышленности применяют чистые культуры дрожжей, молочнокислых, уксуснокислых, пропионовокислых бактерий, обладающих ценными свойствами для производства. В последнее время находят успешное применение многокомпонентные чистые культуры, состоящие из двух и бо-

лее видов микроорганизмов.

Работа по получению и поддержанию чистых культур промышленных микроорганизмов осуществляется в научно-исследовательских лабораториях. Там они выделяются из различных субстратов, изучаются, и наиболее продуктивные, пригодные для производства, хранятся в коллекции музея чистых культур, откуда рассылаются отраслевыми научно-исследовательскими институтами на предприятия. В заводской лаборатории микробиолог подготавливает культуру для производственного цикла, проверяет ее биологическую чистоту, активность.

Способ культивирования зависит от конечной цели культивирования (целью является либо накопление биомассы, либо получение определенного продукта жизнедеятельности – метаболита).

*Поверхностное культивирование* заключается в выращивании аэробных микроорганизмов на поверхности жидких и сыпучих питательных сред. При этом микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха. При поверхностном культивировании на жидких средах микроорганизмы растут в виде пленок. Осуществляется поверхностное культивирование в специальных ваннах – *кюветах*.

*Глубинное культивирование* проводится на жидких питательных средах, в которых микроорганизмы развиваются во всем объеме питательной среды. Сочетание питательной среды и растущих в ней микроорганизмов называют *культуральной жидкостью*. Осуществляется глубинное культивирование в специальных аппаратах – *ферментаторах*, снабженных мешалками и системой подвода стерильного воздуха для обеспечения роста аэробных микроорганизмов. *Аэрирование* – продувание стерильного воздуха через культуральную жидкость.

При *периодическом культивировании* весь объем питательной среды засевают чистой культурой, которую выращивают в оптимальных условиях определенный период времени до накопления нужного количества целевого продукта. Следует отметить, что, так как культивирование ведется на невозобновляемой питательной среде (в стационарных условиях), то клетки все время находятся в меняющихся условиях. Таким образом, периодическую систему можно рассматривать как замкнутую систему.

При *непрерывном культивировании* культура находится в специальном аппарате, куда постоянно притекает питательная среда и откуда с такой же скоростью отводится культуральная жидкость. Для микроорганизма создаются неизменные условия среды, поэтому непрерывную систему можно рассматривать как открытую систему.

Поверхностное культивирование может быть только периодическим, в то время как глубинное культивирование может осуществляться и периодическим, и непрерывным способом.

При периодическом способе культивирования популяция микроорганизмов проходит 7 стадий (фаз) роста (рис. 30).

1. *Лягфаза*. В этот период культура адаптируется к новой среде обитания. Активизируются ферментные системы, возрастает количество нуклеиновых кислот, клетка готовится к интенсивному синтезу белков и других соединений. Клетки не размножаются (скорость размножения равна нулю). Концентрация живых клеток постоянна и равна количеству внесенных клеток. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизма и от состава питательной среды.

2. *Фаза ускорения роста*. Эта фаза характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы и постоянным увеличением скорости роста культуры. Эта фаза обычно непродолжительна.

3. *Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста*. В этот период микроорганизмы размножаются с постоянной максимальной скоростью. При этом логарифм числа клеток линейно зависит от времени. К концу этой фазы среда истощается вследствие катаболических и анаболических процессов, в среде накапливаются продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Возникает и пространственная ограниченность, так как клетки мешают друг другу.

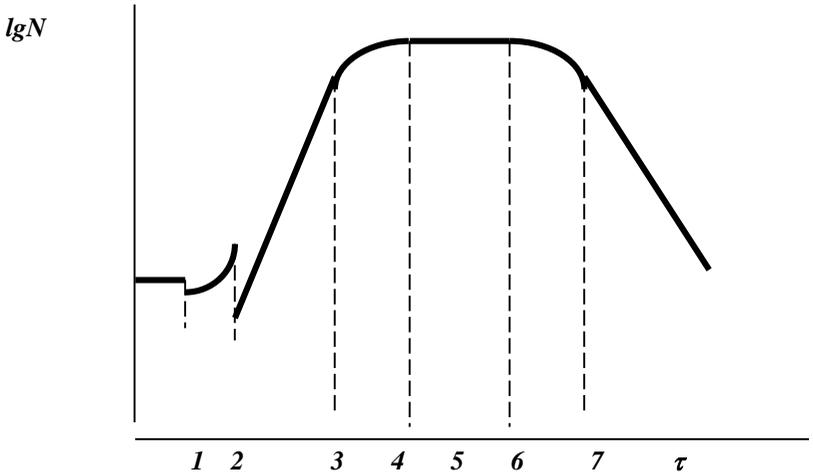


Рис. 30. Кривая роста статической культуры:  
 $N$  – концентрация жизнеспособных клеток;  
 $\tau$  – продолжительность культивирования

4. *Фаза замедления роста*. В этот период снижается скорость роста, небольшая часть клеток гибнет. Скорость роста выше скорости отмирания.

5. *Стационарная фаза*. Количество живых клеток достигает максимума. Скорость роста равна скорости отмирания клеток, поэтому концентрация жизнеспособных клеток остается постоянной.

6. *Фаза ускорения отмирания*. Количество отмерших клеток (скорость отмирания) становится больше количества образовавшихся клеток.

7. *Фаза отмирания.* Масса живых клеток значительно уменьшается, так как в среде нет питательных веществ, а запасные вещества клетки исчерпываются.

При непрерывном способе культивирования культура поддерживается в какой-то фазе роста.

Если цель культивирования – получение биомассы продуцента, процесс целесообразно вести в режиме логарифмической фазы, когда микроорганизм способен обеспечить максимальную скорость роста популяции.

Для поддержания культуры в логарифмической фазе культивирования микробной популяции проводят в условиях хемостата или турбидостата.

*Рост в хемостате.* Хемостат состоит из сосуда, в который вводят с постоянной скоростью питательный раствор. По мере поступления питательного раствора из него вытекает суспензия микроорганизмов с той же скоростью. При культивировании в условиях хемостата поддерживается постоянная концентрация одного из компонентов среды (например, углерода). Благодаря этому в условиях хемостата поддерживается постоянная скорость роста культуры. Культура микроорганизма находится в условиях динамического равновесия.

*Рост в турбидостате.* Работа турбидостата основана на поддержании постоянной концентрации живых клеток. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, а скорость роста бактерий приближается к максимальной.

Если же целью культивирования является получение метаболита (например, этилового спирта), выход которого в среду обитания не соответствует логарифмической фазе роста, применяется способ непрерывного выращивания в двух или нескольких последовательно соединенных аппаратах, что позволяет как бы расчленить процесс на несколько стадий.

### ***Контрольные вопросы***

1. Что такое «культивирование»?
2. Какие способы культивирования микроорганизмов Вы знаете?
3. Чем поверхностное культивирование отличается от глубинного?
4. Что такое «чистая культура» микроорганизма?
5. Как получают и хранят чистые культуры?
6. Дать определение «накопительной культуре» микроорганизма.
7. Каким образом можно получить накопительную культуру?
8. Охарактеризовать логарифмическую фазу роста периодической культуры.
9. Как поддерживают условия хемостата при росте непрерывной культуры?
10. Как поддерживают условия турбидостата при росте непрерывной культуры?
11. Чем отличается периодическое культивирование от непрерывного?
12. Охарактеризуйте стационарную фазу роста периодической культуры.
13. Какие микроорганизмы можно культивировать поверхностным способом?
14. Каким образом осуществляется культивирование микроорганизмов глубинным способом?

## ТЕМА 9

### МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. ПРИНЦИПЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

**Цель занятия:** ознакомиться со способами выделения микроорганизмов чистых культур аэробов и анаэробов, освоить некоторые методы, оценить диагностическую значимость получения чистой культуры.

**Материалы и оборудование:** пастеровские стерильные пипетки, резиновые груши, пробирки со смесью культур, чашки Петри с МПА, плакаты, микроанаэроостаты, эксикаторы, аппарат Аристовского, питательные среды, бактериологические петли, спиртовки, плакаты.

#### **Выделение чистой культуры аэробных микроорганизмов**

Чистой культурой микробов называют популяцию микроорганизмов, принадлежащих к одному виду, т.е. видимый рост микробных клеток одного вида, выращенных на жидкой или плотной питательной среде.

Культуры микроорганизмов одного вида, выделенные из разных источников или одного источника, называют штаммами. Кроме того, многие виды микробов отличаются друг от друга по способности ферментировать определенные углеводы, по чувствительности к специфическим бактериофагам и др. Их называют типами, или биотипами (биоварами), а по антигенным признакам - сероварами (серотипами).

Культура, полученная в результате размножения одной микробной клетки, извлеченной с помощью манипулятора или другим путем, называется клоном. Такого рода культуры используют главным образом в производственных и научно-исследовательских целях.

Бактерии одного вида, выросшие в результате размножения одной или нескольких клеток в виде изолированного скопления микробной массы, составляют колонию.

Чистые культуры микроорганизмов необходимы для изучения свойств отдельных видов, типов и даже клонов, для определения их родовой, видовой и типовой принадлежности (для идентификации), а также для приготовления лечебных (сывороток, глобулинов), профилактических (вакцин), диагностических (антигены, антитела, аллергены) препаратов, получения в производственных условиях спирта, витаминов, органических кислот (лимонная и др.), ферментов, антибиотиков и других веществ. Таким образом, выделение чистых культур является обязательным этапом любого бактериологического исследования.

Для выделения чистых культур микробов из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору, предложено много различных методов в зависимости от целей использования и свойств изучаемого материала. В большинстве их чистую культуру получают из одной клетки с последую-

щим ее пересевом.

Наиболее часто используется **метод Дригальского** - метод пластинчатого посева. Его еще называют фракционным, т.е. посева осуществляют по частям, фракциям. Берут 4 чашки Петри с МПА (или другой плотной питательной средой, лучше с селективной, с учетом биологических свойств выделяемого возбудителя болезни, брожения, гниения и др.), в первую из них, приподняв крышку, стерильной пастеровской пипеткой вносят каплю жидкости со смесью культур, тщательно растирают посевной материал стерильным шпателем (рис. 31) по всей поверхности питательной среды (шпатель можно приготовить на пламени спиртовки из другой или этой же пастеровской пипетки), затем шпатель с оставшимися на нем микроорганизмами переносят во вторую чашку, снова рассеивают на поверхности среды микробов и т.д. При наличии двух чашек Петри с МПА дно их делят восковым карандашом пополам на два сектора, при наличии одной - на четыре сектора. Затем чашки переворачивают, заворачивают в ту же бумагу и инкубируют в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  1—2 суток. Как правило, в последнем секторе образуются отдельные колонии. Их изучают, отвивают на МПА и МПБ для идентификации вида. Причем посев производят от колоний, отличающихся друг от друга по культуральным свойствам (цвету, величине, форме и др.), так как каждый вид микробов образует характерные колонии.

Выделение чистой культуры из смеси микробов можно сделать посевом петлей-штрихом. Простерилизованной на пламени горелки и охлажденной петлей берут материал для посева и осторожно, приподняв крышку чашки Петри с МПА, вводят и на поверхности среды распределяют посевной материал смешанных культур параллельными штрихами на расстоянии 0,5 см один от другого от одного края чашки к другому, держа петлю плашмя, но не царапая питательную среду. При избытке посевного материала на петле после первых штрихов ее вводят в среду вертикально для истощения, после чего рассев продолжают. Далее поступают, как описано выше.



*Рис. 31. Посев микробиологическим шпателем на МПА в чашках Петри*

**Метод Коха.** Р. Кох в качестве плотной питательной среды использовал МПЖ, сейчас - МПА. Сущность метода: вначале готовят разведения исследуемого материала в расплавленном и остуженном до  $43 - 48^{\circ}\text{C}$  МПА в пробирках столбиком по 12 — 15 мл, затем содержимое пробирок выливают в стерильные чашки Петри, среду распределяют равномерным

слоем, оставляют для застывания, затем чашку переворачивают и заворачивают в бумагу. Через 1 — 2 суток при 37 °С в термостате на поверхности МПА в чашках, где концентрация микробов была наименьшей, вырастают изолированные колонии. Далее поступают, как при использовании фракционного метода исследований. Следует заметить, что в толще МПА аэробы тоже растут до тех пор, пока им хватает растворенного в среде молекулярного кислорода, но затем рост их приостанавливается, поэтому обнаруживают колонии очень мелкие.

**Химические методы** основаны на применении химических веществ, действующих на одни микроорганизмы бактерицидно, в то время как другие при этом остаются жизнеспособными, после чего производят пересев на элективные или селективные среды. Иногда химические вещества добавляют в питательные среды, что способствует задержке роста (бактериостатическое действие веществ) посторонней микрофлоры.

**Метод прогревания.** При необходимости выделения спорных форм материал, содержащий споры, прогревают в водяной бане при температуре 80 °С 30 мин для уничтожения истинных бактерий и вегетативных форм бацилл, после чего производят посев на питательные среды.

**Биологический метод** основан на заражении лабораторных и других животных с целью выделения патогенных культур после падежа: как правило, из паренхиматозных и других органов выделяют чистую культуру, т.е. организм животных служит своеобразным фильтром для болезнетворных микробов.

### **Выделение чистой культуры анаэробных микроорганизмов**

Термин анаэробноз был введен в 1861 г. Л. Пастером, впервые открывшим анаэробный спороносный сахаро-литический микроб *Cl. butyricum*. В микробиологии различают строгие (облигатные) и условные (факультативные) анаэробы. Последние могут размножаться в питательных средах как при доступе кислорода воздуха, так и при его отсутствии. Кислород и необходимую для жизнедеятельности энергию анаэробы получают при разложении сложных органических соединений.

Анаэробноз можно создавать непосредственно в питательных средах или при помощи физических, химических, биологических и комбинированных методов защиты анаэробных посевов от атмосферного воздуха, используя специальные приборы.

Для культивирования анаэробных микроорганизмов используют жидкие и плотные питательные среды. Питательные среды должны быть защищены от свободного доступа атмосферного воздуха и удовлетворять потребности в анаэробном обмене веществ у культивируемых микробов. Из жидких питательных сред в практике ветеринарных лабораторий наиболее широко применяют среду Китта — Тароцци. Нередко применяют и другие мясные и казеиновые гидролизатные среды (казеиново-дрожжевую, казеиново-кислотную, мясо-казеиновую, бульон Хоттингера и др.). Жидкие среды

наливают в пробирки высоким столбиком, затем на поверхность наслаивают вазелиновое масло. Слой масла толщиной 5 — 8 мм предотвращает доступ атмосферного воздуха. Для редукции и абсорбции кислорода в питательные среды добавляют редуцирующие и легко окисляемые вещества: кусочки животных тканей (печень, яичный белок, мозг, мышцы, кровь), углеводы (глюкоза, лактоза), аскорбиновую и пировиноградную кислоты, цистеин, муравьинокислый натрий и др. Из плотных сред чаще всего для культивирования анаэробов используется кровяной агар с глюкозой по Цейсслеру в чашках Петри, среду Вильсона — Блэра, МПА с глюкозой.

Непосредственно перед посевом патологического материала или микробной культуры жидкие питательные среды (которые могут быть подвергнуты кипячению) кипятят на водяной бане 10—15 мин для удаления воздуха, растворенного в них, и затем быстро охлаждают до + 40 — 45 °С.

В полужидких средах с содержанием 0,25 — 0,75 % агар-агара рост анаэробов достигается благодаря коллоидальному состоянию среды, поэтому особого ограждения анаэробов от атмосферного воздуха в этом случае не требуется.

Техника посева анаэробов на питательные среды в основном аналогична той, которая применяется при работе с аэробными микроорганизмами. Особенностью является то, что при этом требуется большое количество (0,3 — 0,6 мл) патматериала, который вносят пастеровскими пипетками в глубину среды (на жидкие - под слой вазелинового масла). На плотные и полужидкие среды можно производить посев уколом до дна пробирки. На такие среды, как МПА с глюкозой, Вильсона—Блэра, посевы обычно проводят в расплавленную и охлажденную до 45 °С среду, тщательно перемешивая ее с патматериалом. После высева среды выдерживают под струей холодной воды для ускорения застывания.

Посевы в пробирках на специальных жидких и плотных питательных средах можно выращивать в термостате без особых ограждений от атмосферного воздуха. Посевы же в чашки с кровяным агаром необходимо быстро помещать в анаэробные условия, так как строгие анаэробы при доступе кислорода быстро погибают.

Наиболее надежным и простым методом создания анаэробноза являются **физические методы**, основанные на механическом удалении воздуха из плотно закрывающихся сосудов. Для этого пользуются электрическими вакуумными насосами. Ручной насос Комовского создает небольшое разрежение, и, пользуясь им, получать рост строгих анаэробов не представляется возможным.

Для культивирования анаэробов на плотных питательных средах в чашках выпускают специальные микроанаэростаты (рис. 32), которые представляют собой переносные металлические сосуды цилиндрической формы с герметически закрывающейся крышкой, краном для соединения с вакуумным насосом и манометром для контроля разрежения. После заполнения микроанаэростата чашками Петри с посевами из него удаляют воздух

(отрицательное давление 0,5 — 0,8 атм.) под контролем манометра, закрывают кран и переносят в обычный термостат.

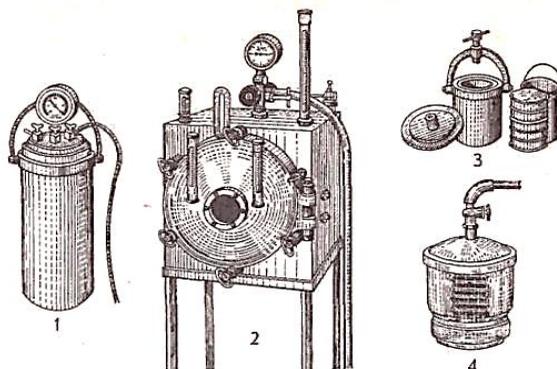


Рис. 32. Приборы для создания условий анаэробнозиса:  
1 - анаэростат портативный; 2 - анаэростат стационарный;  
3 - аппарат Аристовского; 4 - вакуумный эксикатор

Выпускают также стационарные анаэростаты (вакуумные термостаты), которые имеют систему выкачивания воздуха вакуумным насосом, манометр для контроля разрежения, герметически закрывающуюся дверцу и устройство для поддержания заданной температуры. При отсутствии специальных анаэростатов можно использовать стеклянные эксикаторы или другие сосуды с притертой крышкой и краном. Притертые поверхности для обеспечения герметичности смазывают вазелином или специальной замазкой, приготовленной путем смешивания при кипячении равных частей вазелина и воска. Иногда воздух в анаэростатах вытесняют при помощи индифферентного для анаэробов газа - водорода, азота, углекислого газа и др.

**Химические методы** создания анаэробных условий основаны на поглощении кислорода из замкнутого сосуда (аппарат Аристовского, анаэростат, эксикатор и др.) при помощи реактивов. Для этих целей чаще применяют аппарат Аристовского - металлический цилиндр, диаметр которого соответствует диаметру чашки Петри. Аппарат герметически закрывается крышкой, внутри располагается ведро для чашек. Для поглощения кислорода используется смесь гидросульфита натрия с карбонатом натрия. Гидросульфит натрия тонким слоем насыпают в 2 чашки Петри на слой карбоната натрия и увлажняют при помощи пульверизатора. Не закрывая крышками, одну из чашек помещают на дно ведра, вторую сверху. Между ними располагают чашки с посевами анаэробных микроорганизмов. Прибор герметически закрывают и ставят в термостат. В результате химического взаимодействия гидросульфита натрия с карбонатом натрия происходит связывание

кислорода и таким образом в сосуде создаются анаэробные условия. При помощи химического метода возможно получение поверхностного роста отдельных колоний строгих анаэробов.

**Биологические методы** основаны на раздельном культивировании в одном сосуде анаэробов и аэробов. Например, по методу Фортнера в чашку Петри толстым слоем наливают глюкозо-кровоный агар и после застывания из середины стерильно вырезают полоску агара шириной 1 — 1,5 см, разделяя таким образом среду на две половины. На одну из них засевают культуру облигатного аэроба (*Bas. subtilus*), на другую - культуру анаэроба или исследуемый материал. Используют и специальные чашки, дно которых разделено стеклянным валиком на две половины. Чашку герметически заклеивают лейкопластырем или заливают парафином и помещают в термостат. В первую очередь развиваются аэробные бактерии. Когда они израсходуют весь кислород, начинают размножаться анаэробы. Если культивирование происходит на жидких питательных средах, то открытые пробирки с посевами аэробов и анаэробов помещают в эксикатор, герметически его закрывают и ставят в термостат. Однако этим методом не удается получать рост строгих анаэробов и в лабораторной практике им пользуются редко.

**Комбинированные методы** основаны на сочетании физического с химическим или биологическим методами.

Для получения чистой культуры анаэробов используют специальные методы.

**Метод Цейслера** сводится к фракционному посеву на чашки с глюкозокровяным агаром. Культивирование производят в анаэробных условиях при температуре 37 — 38 °С. Получив отдельные изолированные колонии микроорганизмов, пересевают их в пробирки с МППБ.

При выделении чистой культуры спорообразующих анаэробов (*Cl. perfringens*, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum*) патологический материал вначале прогревают на водяной бане при 60 — 65 °С в течение 30 мин или при 80 °С 10—15 мин, а затем производят посев в МППБ, культивируя в условиях термостата, и в дальнейшем поступают, как по методу Цейслера.

**Метод Виньяля—Вейона.** Изолированные колонии строгих анаэробов можно получать по данному методу в МПА с 1%-ным раствором глюкозы. Для этого несколько пробирок со средой расплавляют и охлаждают до 42 — 45 °С, затем засевают их исследуемым материалом в разных разведениях, тщательно перемешивают и после застывания ставят в обычный термостат. Чтобы получить изолированную колонию, пробирки надпиливают и извлекают ее петлей или пипеткой. Лучшей разновидностью является метод Виньяля—Вейона, основанный на том, что подготовленный, как указано выше, материал, набирают в пастеровские пипетки или трубки Вейона (стеклянные трубки длиной 30 см, диаметром 3 — 6 мм с одного конца вытянуты в капилляр, а на другом конце, закрытом ватной пробкой, имеют перетяжку), капиллярный конец которых после заполнения засеянным агаром запаивают.

**Метод Перетца.** Для разведения материала запаянную пастеровскую пипетку погружают вначале в этот материал, затем в 3 пробирки с 10 мл физраствора и в 3 пробирки с 20 мл охлажденного до 45 — 50 °С МП А с глюкозой (10 %), к которому добавлено 0,1 мл 8%-ного раствора аскорбиновой кислоты (на 10%-ном карбонате натрия). Содержимое пробирок быстро перемешивают и выливают в 3 чашки Петри под стеклянные пластинки (6х6 см), размещенные перед стерилизацией на стеклянных палочках. Через 12 — 18 ч инкубации в термостате под пластинкой вырастают колонии анаэробов. Их изучают и, сдвинув пластинку стерильным пинцетом, пересевают на другую питательную среду.

**Метод заражения лабораторных животных.** Животному (преимущественно морским свинкам) подкожно или внутримышечно вводят материал, содержащий анаэробные микроорганизмы. В результате оно погибает от заболевания, вызванного патогенным анаэробом. Путем посева материала из органов и тканей павшего животного выделяют чистую культуру данного микроорганизма.

### **Принципы идентификации**

Основная задача бактериологического диагностического исследования — это определение таксономического положения выделенного микроорганизма путем сравнения его свойств со свойствами известных видов.

В рутинной бактериологической практике микроорганизм идентифицируют, изучая его фенотипические признаки (морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические, патогенные). Стали получать распространение некоторые методы идентификации по генотипическим признакам, которые ранее в основном применяли в научной работе для классификации микроорганизмов с неясным таксономическим положением.

В бактериологии для идентификации используют определители микроорганизмов. Наиболее популярный — определитель бактерий Берджи — включает в себя описание свойств известных видов микроорганизмов. Бактерии в этом руководстве по ограниченному числу морфологических и физиологических признаков объединены в большие группы. В пределах этих групп при помощи нескольких дифференцирующих признаков бактерии подразделены на семейства, роды и виды. Распределение микроорганизмов в этом определителе не отражает иерархической классификации, а преследует сугубо практическую цель — как можно быстрее и экономичнее установить таксономическое положение изучаемого микроорганизма.

Идентификация неизвестного микроорганизма представляет собой процесс последовательного его отождествления с той или иной большой группой микробов, характеризующихся и общими свойствами, затем с семейством в пределах группы, далее с тем или иным родом в пределах установленного семейства, и на конечном этапе исследуемый микроорганизм отождествляют (идентифицируют) по совокупности морфологических, тинк-

ториальных, культуральных, биохимических, патогенных свойств с каким-либо видом в пределах рода. В случае необходимости внутри вида устанавливают принадлежность культуры к биовару, серовару, фаговару. Работа с определителем Берджи предполагает использование достаточно большого количества тестов, характеризующих различные свойства микроорганизма. В практических диагностических лабораториях, исходя из эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, обычно проводят бактериологические исследования, заранее ориентированные на обнаружение возбудителя определенной инфекционной болезни, по схеме, предусмотренной официальной инструкцией.

### ***Контрольные вопросы***

1. Дайте определение понятиям чистая культура, вид, штамм, тип, биовар, серовар.
2. Для каких целей получают чистую культуру микроорганизмов?
3. Какие методы выделения чистых культур вы знаете и какие из них наиболее рациональны с вашей точки зрения и почему (дайте обоснование).
4. Методы выделения чистой культуры анаэробов.
5. Методы создания анаэробных условий при культивировании анаэробных микроорганизмов.
6. Наиболее употребимые среды и принцип их изготовления для культивирования анаэробов.

## ТЕМА 10

### КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

**Цель занятия:** ознакомиться с основными культуральными свойствами микроорганизмов, с лабораторными методами определения ферментативной активности, используемыми при идентификации. Освоить некоторые методы определения биохимических свойств микробов. Усвоить, в чем значимость определения культуральных и биохимических свойств микроорганизмов.

**Материалы и оборудование:** культуры сальмонелл и стафилококка в полужидком агаре, культуры корневидного микроба и сенной палочки на МПА, в МПБ. Посевы с этими микроорганизмами на агаре в чашках Петри, пробирки с чистыми культурами золотистого стафилококка, сальмонелл, эшерихий, стерильные пастеровские пипетки, 5% раствор перекиси водорода, стерильные пинцеты, стерильные питательные среды: полужидкий МПА с глюкозой, лактозой, сахарозой и индикатором ВР (состоит из смеси водного голубого и розоловой кислоты), или пробирки с жидкими средами Гисса – индикатором Андраде с углеводами и поплавками, молоко с метиленовым синим и с лакмусом, МПА, МПБ, МПЖ, чашки Петри с агаром Эндо и Левина и кровавым агаром, среды Симонса и Клигера, индикаторные бумажки для определения сероводорода, индола, аммиака, пробирки с питательными средами: МПБ с глюкозой, лактозой, сахарозой, молоко с лакмусом, молоко с метиленовым синим, МПБ с закрепленными индикаторными бумажками для определения сероводорода, индола, аммиака, две чашки Петри с агаром Эндо и Левина, плакаты.

#### Культуральные свойства микробов

Культуральные признаки микробов определяются характером роста их на питательных средах. Будучи постоянными, для каждого вида микроба, они являются важным диагностическим признаком.

#### Рост микробов на плотной питательной среде

Для изучения свойств колоний микробы культивируют на плотных питательных средах в чашках Петри. При посеве материала стараются получить изолированный рост колоний. Чашки с посевом просматривают сначала невооруженным глазом или через лупу, затем помещают их на столик микроскопа вверх дном и просматривают колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения и с суженной диафрагмой. Колонии характеризуют по величине, форме, контуру края, рельефу, поверхности, цвету, структуре и консистенции.

**Величина колонии** определяется ее диаметром. В зависимости от диаметра различают колонии точечные (диаметр меньше 1 мм), мелкие (диаметр 1—2 мм), средние (диаметр 2—4 мм) и крупные (диаметр 4—6 мм и более).

**Форма колонии** бывает правильная — круглая, неправильная — амебовидная, ризоидная — корневидная, напоминающая переплетающиеся корни деревьев.

**Характер контура края** определяют при рассмотрении колонии под лупой или микроскопом с малым увеличением. Различают ровные края в виде четко выраженной линии и неровные. Последние делят на:

1. фестончатый край, состоящий из крупных, слегка округлых или уплощенных зубцов правильной формы;
2. волнистый край, который несколько отличается от фестончатого тем, что крупные зубцы его выражены нечетко;
3. эрозированный, или зазубренный, край, состоящий из острых зубцов различной величины и формы;
4. бахромчатый край, имеющий нежные ворсинки.

В некоторых случаях четко выраженная линия, отграничивающая колонию от поверхности среды, отсутствует. Такой край колонии называется расплывчатым.

**Рельеф (профиль) колонии** характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Определяется рельеф колонии невооруженным глазом или с лупой при рассматривании сверху и сбоку.

Различают:

- 1) каплеобразные и куполообразные колонии правильной круглой формы с различно выраженной степенью выпуклости, которые в вертикальном разрезе представляют собой сегмент шара и отличаются только длиной радиуса. Колонии слабовыпуклые имеют большую длину радиуса; куполообразные — меньшую;
- 2) колонии плосковыпуклые с плоским верхом, пологими или круто обрывающимися краями; имеют в вертикальном разрезе форму трапеции;
- 3) колонии конусообразные, имеющие в вертикальном разрезе форму треугольника;
- 4) колонии с приподнятой в виде соска серединой и валиком по периферии;
- 5) колонии с вдавленным центром;
- 6) колонии плоские, стелющиеся по поверхности среды.

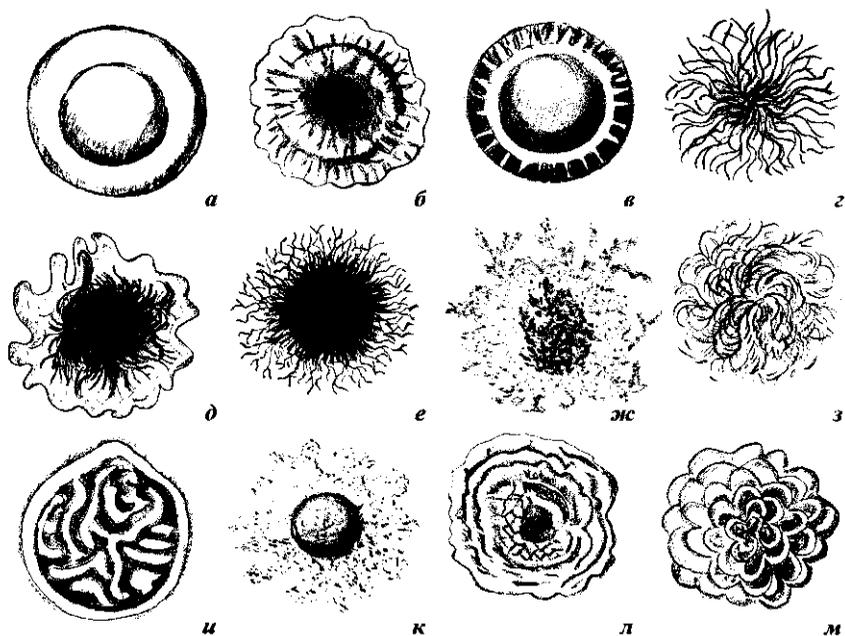


Рис. 33. Форма колоний: а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краю; г; д – ризоидная; е – с ризоидным краем; ж – амебовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная

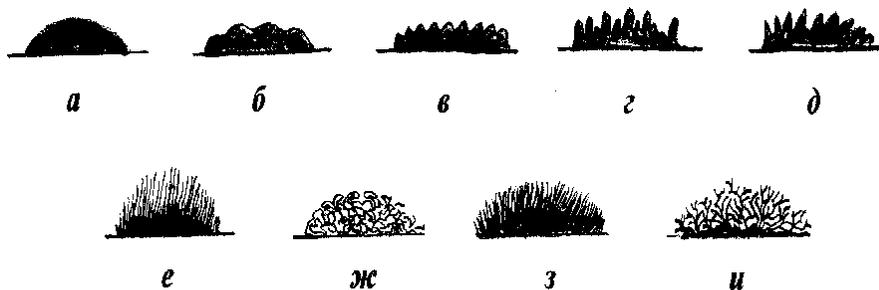
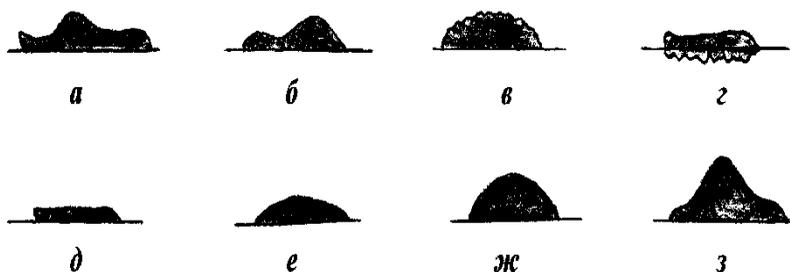


Рис. 34. Край колоний: а - гладкий; б – волнистый; в – зубчатый; г – лопастный; д – неправильный; е – реснитчатый; ж – нитчатый; з – ворсинчатый; и - ветвистый

Поверхность колонии изучают с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колоний бывает матовая или блестящая с глянцем, сухая или влажная, гладкая или шероховатая. Гладкие колонии обозначают буквой S (smooth), шероховатые — буквой R (rough), что означает соответственно “гладкий” и “шероховатый”. Механизм формирования гладких и шероховатых форм колоний обусловлен различием процессов клеточного деления. Микробные клетки в колониях S-форм располагаются, соприкасаясь своими боковыми поверхностями, клетки R-форм, сохраняя при делении цитоплазматические мостики, образуют цепочки, которые, накладываясь, друг на друга, обуславливают шероховатую поверхность и неровный край колонии.



*Рис. 35. Профиль колоний: а – изогнутый; б – кратерообразный; в – бугристый; г – растущий в агар; д – плоский; е – выпуклый; ж – каплевидный; з – конусовидный*

**Цвет колонии** определяется пигментом, который продуцирует культура микробов. Преобладающее большинство патогенных бактерий пигмента не образует, вследствие чего колонии их бесцветны или молочно-мутного цвета, похожи на опал. В проходящем свете такие колонии в большей или меньшей степени прозрачны. Пигментообразующие виды микробов дают колонии различных цветов: кремовые, желтые, золотисто-оранжевые, синие, красные, сиреневые, черные и др.

**Структура колоний** определяется в проходящем свете при слабом увеличении микроскопа, суженной диафрагме или при несколько опущенном конденсоре. У пигментированных колоний и колоний, не пропускающих света, она не определяется.

По характеру структуры различают следующие виды колоний:

- 1) гиалиновые — бесцветные, прозрачные, без видимой определенной структуры;
- 2) зернистые, которые в зависимости от величины зерен разделяются на мелко- и грубозернистые;

3) нитевидные или волокнистые, характеризующиеся наличием длинных, густо переплетающихся нитей в толще колонии.

Колонии бывают однородные и неоднородные. Строение первых одинаково во всех частях, у вторых центральная часть отличается от периферической или отдельные сектора имеют строение, неодинаковое с остальной массой.

**Консистенцию колонии**, определяющую ее физическое состояние, исследуют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериальной петлей. По характеру консистенции колонии бывают:

1) пастообразные, легко снимающиеся и разрывающиеся по поверхности питательной среды наподобие сливочного масла;

2) вязкие или слизистые, прилипающие и тянущиеся за петлей;

3) волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки, соответствующей величине и форме колонии;

4) хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли.

### **Особенности микробного роста на жидких питательных средах**

На жидких питательных средах характер роста микробов менее разнообразен, чем на плотных питательных средах. Однако и здесь выявлены следующие формы роста бактерий.

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

2. **Придонный рост** бактерий характеризуется образованием осадка на дне пробирки с жидкой питательной средой. Осадок может быть скудным или обильным, крошковидным, гомогенным, волокнистым или в виде крупных рыхлых хлопьев, по консистенции вязким, слизистым, хрупким или пастообразным. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Цвет осадка и среды, находящейся над ним, определяется наличием пигмента, продуцируемого культурой микробов. Если культура пигмента не образует, цвет среды не изменяется, а осадок приобретает, как правило, серовато-белый или желтоватый цвет. Придонный рост специфичен для бактерий с анаэробным типом дыхания.

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

4. **Поверхностный рост** бактерий характеризуется появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки, внешний вид и характер которой могут быть различны:

а) пленка тонкая, нежная, бесцветная, имеет вид едва заметного налета, исчезающего при встряхивании пробирки и взбалтывании среды;

б) пленка влажная, толстая, хорошо видимая простым глазом, вязкой, слизистой консистенции, прилипает к петле и тянется за ней;

в) пленка плотная, сухая, внешним видом напоминает кусочки кожи и при попытке взятия из нее материала снимается целиком в виде круглого диска, соответствующего диаметру пробирки:

г) пленка плотная, сухая, со сморщенной, а иногда бородавчатой поверхностью, краями прикрепленная к стенкам сосуда; при взбалтывании жидкости или прикосновении бактериальной петли разбивается на кусочки, погружающиеся в глубь жидкости.

Цвет пленки, как и питательной среды, зависит от пигмента, вырабатываемого растущей культурой микробов. Рост бактерий в виде поверхностной пленки характерен для микробов-аэрофилов.

### **Рост на полужидкой питательной среде**

Для выявления особенностей микробного роста на полужидкой питательной среде исследуемую культуру засевают в столбик 0,2—0,5% полужидкого агара. Для того чтобы особенности роста проявлялись наиболее четко, прокол среды делают в непосредственной близости к стенке пробирки. Посев, произведенный таким образом, дает возможность выявить подвижные расы микробов и дифференцировать их от неподвижных.

Подвижные микробы в столбике полужидкого агара вызывают выраженное помутнение, распространяющееся более или менее равномерно по всей толщине среды.

Неподвижные формы микробов растут только по ходу прокола среды, напоминая сосульки цилиндрической или конической формы. При этом окружающая среда остается совершенно прозрачной.

### **Биохимические свойства микробов**

По биохимическим признакам бактерий исследуют их отношение к кислороду, ферментативную активность, способность расщеплять различные углеводы, накапливающиеся продукты метаболизма.

**Отношение к кислороду воздуха.** По отношению к кислороду воздуха микроорганизмы делят на облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы и облигатные анаэробы. Об отношении бактерий к кислороду судят по росту культуры при посеве уколом в столбик с питательным агаром. Аэробы развиваются в верхней части укола, анаэробы – в нижней части, а факультативные анаэробы – равномерно по всему уколу.

Среди биохимических свойств культуры наиболее важно определение их ферментативной активности.

**Использование углеводов и спиртов** культурами микроорганизмов определяют путем посева 0,1–0,2 см<sup>3</sup> суспензии исследуемых клеток в пробир-

ки с жидкой или полужидкой средой, содержащей углеводов и индикатор. Для обнаружения образования газа при расщеплении углеводов в жидкую среду опускают поплавки. Набор сред с углеводами и индикатором называют «цветным» рядом Гисса. Название «цветной» ряд связано с тем, что под действием ферментов клетки одни сахара расщепляются с накоплением кислоты или щелочи, за счет чего изменяется цвет индикатора и среды, другие сахара не расщепляются, и цвет среды не изменяется. Короткий ряд Гисса включает среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и маннитом. В длинный ряд дополнительно вводят среды с арабинозой, ксилозой, рамнозой, галактозой и др., полисахариды (инулин, крахмал, декстрин), спирты (глицерин, дульцит, инозит).

Засеянные пробирки помещают в термостат при оптимальной температуре. Результаты учитывают через 2–4 суток (для медленно растущих микроорганизмов через 7–10 суток). Отмечают изменение цвета индикатора или отсутствие изменения цвета среды, а также появление или отсутствие газа в поплавке.



Рис.36 Рост *S. typhi* на средах Гисса



Рис. 37. Рост *E. coli* на средах Гисса

На основании полученных данных делают вывод, какие сахара ассимилирует исследуемая культура бактерий.

**Протеолитическая активность.** Микроорганизмы, обладающие протеолитической активностью, разжижают желатину, пептонизируют молоко. Для определения этого признака культуру исследуемых бактерий засевают уколом в пробирки с желатиной и культивируют в течение 4–10 сут. при комнатной температуре, отмечая при этом скорость разжижения и его харак-

тер: послойный, воронкообразный, пузырчатый и т. п. (рис. 38).

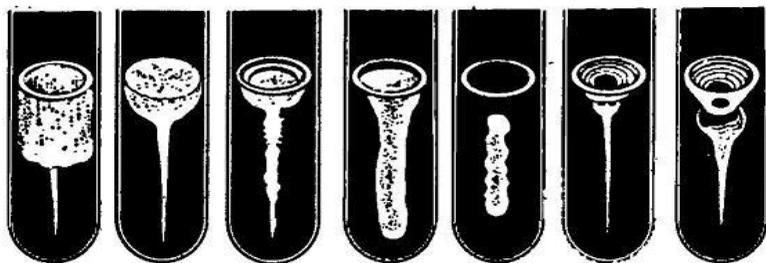


Рис. 38. Варианты разжижения желатины

*Каталазная активность.* Фермент каталазу образуют многие аэробные микроорганизмы. Для проведения исследования каплю 10 %-го раствора пероксида водорода наносят на 24-часовую колонию микроорганизма, выросшую на плотной среде в чашке Петри. Выделение кислорода в виде пузырьков газа свидетельствует о наличии в клетках бактерий каталазы.

*Характер роста в молоке.* Обезжиренное молоко разводят водой в соотношении 4:1, добавляют индикатор бромкрезоловый пурпурный (2 см<sup>3</sup> 1,6 %-го спиртового раствора на 1 дм<sup>3</sup> молока) или лакмус (10 см<sup>3</sup> 4 %-го раствора на 1 дм<sup>3</sup> молока), разливают в пробирки по 8–10 см<sup>3</sup> и стерилизуют в автоклаве при 0,05 МПа в течение 20 мин. Пробирки с молоком засевают исследуемой культурой бактерий и культивируют 6–14 сут. при оптимальной температуре. Образование микроорганизмами кислот при расщеплении лактозы отмечают по изменению цвета индикатора. Если кислота накапливается в значительном количестве, то образуется сгусток. Бактерии, обладающие активными протеазами, расщепляют казеин, вызывая пептонизацию молока.

*Образование индола.* Некоторые микроорганизмы обладают способностью расщеплять аминокислоту триптофан с образованием индола, что также является диагностическим признаком при определении вида бактерий. Для определения индола применяют метод Мореля. Пробирки с 8–10 см<sup>3</sup> стерильного мясоепептонного бульона с добавлением 0,01 % триптофана (или без него) засевают исследуемой культурой бактерий. Под ватной пробкой укрепляют полоску фильтровальной бумаги, пропитанную щавелевой кислотой. Пробирки инкубируют при оптимальной температуре в течение 24 ч. При образовании индола нижняя часть полоски окрашивается в розовый цвет.

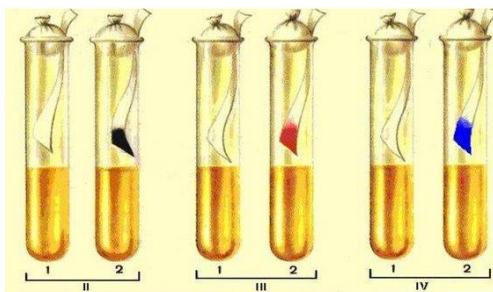


Рис. 39. Определение протеолитической активности бактерий  
 Выявление образования сероводорода (под цифрой II),  
 образования индола (под цифрой III), образования аммиака (под цифрой IV)  
 пропитанной соответствующим раствором

**Образование аммиака.** Аммонификация белковых веществ под влиянием ферментов микроорганизмов сопровождается выделением аммиака. Эту способность бактерий устанавливают путем засева исследуемой культуры в пробирки с мясопептонным бульоном, которые инкубируют в термостате при 37 °С в течение 2–3 сут. Образование аммиака устанавливают по изменению окраски полоски лакмусовой бумажки, укрепленной между пробкой и горлышком пробирки так, чтобы полоска не касалась питательной среды. Выделение аммиака определяется изменением цвета лакмусовой бумажки из красного в синий.

**Образование сероводорода.** При расщеплении микроорганизмами серосодержащих аминокислот (цистеин, метионин) образуется сероводород. Для определения образования сероводорода пробирки с мясопептонным бульоном засевают исследуемой культурой бактерий и под пробкой укрепляют полоску фильтровальной бумаги, пропитанную раствором ацетата свинца. Засеянные пробирки помещают в термостат при оптимальной температуре на 7–10 сут. Выделение сероводорода фиксируют по почернению полоски вследствие образования сернистого свинца.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие признаки используются при определении вида бактерий?
2. По каким признакам характеризуют колонии бактерий на плотной питательной среде?
3. Как характеризуется рост бактерий в жидкой среде?
4. Как выявляется у бактерий протеолитическая активность?
5. Как определить способность бактерий сбраживать сахара?
6. Какие изменения могут наблюдаться при развитии бактерий в молоке и как их объяснить?
7. По каким признакам устанавливают образование бактериями аммиака, сероводорода, индол.

## ТЕМА 11

### МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ.

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СРЕДСТВ

**Цель работы:** ознакомить студентов с назначением и основными методами стерилизации, применяемыми в микробиологии.

**Материалы и оборудование:** автоклав, сушильный шкаф, аппарат Коха, керамические, асбестовые и мембранные фильтры, бактерицидные лампы, пипетки, чашки Петри, шпатели, пробирки, колбы, предметные стекла, пергаментная бумага, вата, марля, петли и иглы бактериологические, шпатели Дригальского, ножницы, пинцеты, штативы, плакаты.

Стерилизация (от лат. *sterilis* – бесплодный) в микробиологической практике и пищевой промышленности означает уничтожение в материалах всех вегетативных клеток микроорганизмов и их спор.

#### Физические методы стерилизации

*Фламбирование (прокаливание)* – стерилизация путем прокаливания мелких предметов в пламени спиртовки или горелки (предметные стекла, бактериологические петли, иглы, пинцеты, ланцеты и т.п.). В пламени обжигают также горлышки колб, пробирок при пересевах культур и розливе питательных сред.

*Кипячение* применяют для стерилизации металлических инструментов, игл, резиновых трубок. Инструменты кипятят в специальных металлических стерилизаторах с крышками в течение 30–40 мин. Однако даже весьма продолжительное кипячение не обеспечивает полной стерильности объекта, так как споры ряда анаэробных клостридий могут выдерживать кипячение в течение 3 ч.

*Стерилизация сухим жаром.* Стеклопосуду (пипетки, пробирки, колбы, чашки Петри др.) выдерживают в сухожаровом шкафу при температуре 160...180 °С в течение 1,0–1,5 ч. При такой обработке погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов.

Посуду перед стерилизацией моют и высушивают. Пробирки и колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Пробирки заворачивают в бумагу по 10–20 штук. На колбы надевают бумажные колпачки, предохраняющие горлышко от пыли. Пипетки помещают в специальные стеклянные или металлические пеналы или заворачивают в бумагу. При работе пипетки вынимают из пенала только за верхний конец, в который вставлен тампон. Чашки Петри заворачивают в бумагу (каждую отдельно или по 2–3 шт.). Посуду, подготовленную для стерилизации, загружают в сушильный шкаф не слишком плотно, чтобы обеспечить равномерный ее нагрев. По окончании стерилизации шкаф отключают, но не открывают до тех пор, пока температура в нем не снизится до 100...70 °С, чтобы предохранить посуду от растрескивания. Для сохранения стерильности посуду разворачивают непосредственно

перед работой.

*Стерилизация паром под давлением* – один из наиболее распространенных и эффективных методов, основанный на том, что пар, образующийся при кипячении воды, скапливается в замкнутом пространстве и повышает давление. При увеличении давления повышается температура пара (табл. 1).

**Таблица 1 - Соотношение показаний манометра и температуры насыщенного пара**

Показания манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С	Показания манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С
0,00	100	0,15	128
0,05	112	0,20	134
0,10	121	0,30	144

Стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся двустенных аппаратах – автоклавах. В автоклавах стерилизуют питательные среды, физиологические растворы, резиновые предметы, стеклянную посуду с резиновыми пробками. Режим стерилизации (температура и продолжительность обработки) определяется составом питательной среды, значением рН. Среда, содержащая сахара, молоко, витамины, стерилизуют при давлении 0,05 МПа в течение 15–20 мин, мясопептонные среды – при давлении 0,10 МПа в течение 20–30 мин. Время стерилизации отсчитывают от момента установления необходимого давления.

При низком значении рН некоторые вещества, входящие в состав питательной среды, в процессе стерилизации подвергаются гидролизу. Во избежание этого растворы некоторых компонентов (аминокислоты, витамины) стерилизуют отдельно и добавляют в среду после стерилизации.

*Стерилизация текучим паром* (дробная стерилизация) – метод, применяемый для обеспложивания питательных сред, изменяющих свой состав при воздействии температур выше 100 °С. Сущность дробной стерилизации состоит в том, что нагревание среды проводят при температуре 100 °С по 15–30 мин в течение трех дней подряд. После первого прогревания погибают вегетативные клетки, некоторые споры при этом сохраняются и затем прорастают. Образовавшиеся из термоустойчивых спор вегетативные формы погибают при повторном нагревании. Дробную стерилизацию проводят в аппарате Коха или в автоклаве при открытом спускном кране.

*Тиндализация* – дробная стерилизация материалов, легко разрушающихся при высокой температуре (сыворотки, витамины, некоторые антибиотики). Стерилизацию проводят прогреванием объекта при температуре 60–65 °С в течение 60 мин подряд 5–6 дней.

*Стерилизация облучением.* Стерилизация ультрафиолетовыми луча-

ми применяется для уничтожения микроорганизмов в воздухе помещений, на поверхности пищевых продуктов, на линиях упаковки. Ее проводят с помощью бактерицидных ламп различной мощности (длина волны 253–265 нм). Ионизирующее излучение применяют для стерилизации некоторых упаковочных материалов, используемых в пищевой промышленности.

### Механические методы стерилизации

*Фильтрование* через бактериальные фильтры. Фильтрование через мелкопористые фильтры применяют в тех случаях, когда повышенная температура может резко изменить качество стерилизуемых материалов. Кроме того, стерилизация фильтрованием используется для очистки бактериальных токсинов и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Существуют два основных типа фильтров: глубинные и мембранные.

*Глубинные фильтры* состоят из волокнистых материалов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в материале фильтра. Бактериальные фильтры изготавливаются из разного материала и с разным диаметром пор, что указывается на упаковке. Для стерилизации фильтрованием используют пластинчатые асбестовые фильтры Зейтца, свечи Шамберлана, изготовленные из каолина с примесью кварцевого песка, свечи Беркефельда из инфузорной земли и асбеста.

*Мембранные фильтры* имеют непрерывную структуру, они состоят из нитроцеллюлозы, и захват ими частиц определяется размером пор. Мембранные фильтры обозначают номерами от 1 до 5 в зависимости от диаметра пор (350–1200 нм).

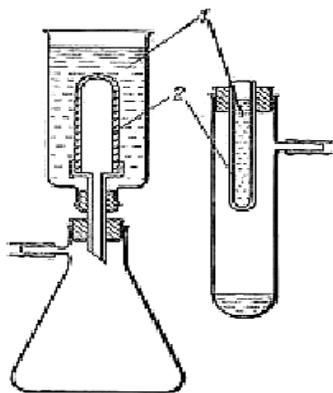


Рис. 40. Монтаж свечей Шамберлана (схема):  
1 – фильтруемая жидкость; 2 – фильтровальная свеча

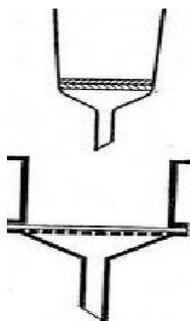


Рис. 41. Стеклянные фильтры с пластинами из мелкопористого стекла (схема)

Стерилизацию фильтрованием осуществляют под вакуумом с использованием вакуумного или водоструйного насоса. Перед началом работы фильтры закрепляют в специальном держателе, который соединяют с колбой Бунзена. Установку для фильтрования стерилизуют в автоклаве в течение 30–40 мин при 0,15 МПа. Мембранные и асбестовые фильтры используют однократно. Свечи Шамберлана и Беркефельда после окончания фильтрования промывают дистиллированной водой, просасывая ее в обратном направлении, и обрабатывают для повторного использования.

### Химические средства стерилизации

Уничтожение микроорганизмов при помощи химических веществ называется *дезинфекцией* (от лат. *infektia* – инфекция и франц. отрицательной приставки *des*). Химические вещества применяются для уничтожения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды – на рабочем месте, в помещениях, на рабочей одежде, руках, технологическом оборудовании и инвентаре.

К веществам, используемым с целью дезинфекции, предъявляется целый ряд требований:

- они должны хорошо растворяться в воде;
- в короткие сроки проявлять бактерицидное действие;
- не оказывать токсического действия на человека и животных;
- не вызывать порчу обеззараживаемых предметов.

Дезинфицирующие вещества подразделяют на несколько групп:

1. *Хлорсодержащие соединения (хлорная известь, натрия гипохлорит, хлорамин, пантоцид, хлордезинсульфохлорантин и др.).*

2. *Соединения на основе йода и брома (йодопирин, дибромантин).*

3. *Окислители (пероксид водорода, перманганат калия и др.).*

4. *Фенолы и их производные (фенол, лизол, креолин, гексахлорофен).*

5. *Соли тяжелых металлов (мертиолят натрия, сулема).*

Антимикробным действием обладают также кислоты и их соли (борная, салициловая), щелочи, спирты (70 %-й раствор этанола) альдегиды

(формальдегид).

Выпускаются также бактерицидные мыла: феноловое, дегтярное, «Гигиена», содержащее 3–5 % гексахлорофена.

### **Общая характеристика противомикробных средств**

Значительное количество заболеваний человека вызывают бактерии, вирусы, грибы, спирохеты, а также некоторые гельминты. Вещества, которые обезвреживают возбудителей в окружающей среде или в организме человека, называются противомикробными средствами.

Фармакологический эффект веществ этой группы - бактериостатический (способность прекращать рост и размножение микроорганизмов) или бактерицидный (свойство обезвреживать микроорганизмы).

Противомикробные средства делят на две группы:

#### **I. Антисептические и дезинфицирующие средства**

Препараты, не проявляют выборочной противомикробного действия и имеют значительную токсичность для человека.

Антисептические средства способны привести к гибели или прекратить рост и развитие микроорганизмов на поверхности тела человека (коже или слизистых оболочках).

Дезинфекционные средства обезвреживают патогенные микроорганизмы в окружающей среде, их применяют для обработки помещений, белья, посуды, медицинских инструментов, аппаратуры, предметов ухода за больными.

#### **Классификация антисептических и дезинфицирующих средств**

*I. Антисептические и дезинфицирующие средства неорганической природы*

1. Галогены (галоиды)

1.1. Препараты, содержащие хлор, - хлорная известь, хлорамин Б, хлоргексидин биглюконат, хлорантоин, натрия гипохлорид

1.2. Препараты, содержащие йод - раствор йода спиртовой, йодонатом, йодоформ (трийодметан), раствор Люголя, йод-дицерин, йодиол, повидон-йод (бетадин)

2. Окислители - раствор перекиси водорода (водорода пероксида) разведен и концентрированный, калия перманганат, бензоилпе-гидроксид (окси 5, 10)

3. Кислоты и основания - кислота борная, бензойная кислота, раствор аммиака, натрия тетраборат (бура)

4. Соли тяжелых металлов - ртути дихлорид (сулема), серебра нитрат, колларгол, протаргол, цинка сульфат, дерматол, ксероформ

*II. Антисептические и дезинфицирующие средства органического*

*происхождения*

1. Фенолы - фенол чистый (кислота карболовая), деготь березовый, резорцин, Трикрезол, поликрезулен (ваготил)
2. Дегте и смолы - ихтиол (ихтаммол), винизоль
3. Красители - бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, стакридину лактат (риванол)
4. Производные нитрофурана - фурацилин (Нитрофурал), фуропласт, фурагин (фуразидин)
5. Альдегиды и спирты - спирт этиловый, формальдегид (формалин), Лизоформ
6. Детергенты - мыло зеленое, Церигель, этоний, декаметоксин (септефрил), мирамистин.

## **II. Химиотерапевтические препараты**

Препараты, которые оказывают выборочную противомикробное действие, проявляют значительный спектр терапевтического действия. их применяют для лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

Для контроля стерилизаций существуют биологические и химические индикаторы. Изменению окраски индикатора указывает на то, полностью ли прошел цикл стерилизации.

### ***Контрольные вопросы***

1. Какие методы стерилизации Вы знаете?
2. Как подготовить лабораторную посуду для стерилизации?
3. Какие факторы определяют режим стерилизации?
4. В каких случаях используют химические методы стерилизации?
5. Какие требования предъявляют к дезинфицирующим веществам?
6. Какие вещества используют для дезинфекции?
7. На какие группы делят противомикробные средства?
8. Перечислите классификацию антисептических и дезинфицирующих средств?



мл питательного бульона. Поскольку эта единица действия пенициллина принята во всех странах, ее иногда обозначают символом МЕ (международная единица).

За единицу действия других антибиотиков принимаются минимальные количества микрограммов каждого из них, подавляющие рост соответствующего тест-микроба в 1 мл питательной среды.

Антибиотики широко применяются при лечении многих инфекционных заболеваний животных и человека. Одним из основных элементов рационального их применения в ветеринарии при инфекционных болезнях животных является определение чувствительности выделенного возбудителя к этим препаратам. Это необходимо для того, чтобы рекомендовать наиболее эффективный из предлагаемых при данном заболевании.

Установлено, что большинство антибиотиков в 1 мг вещества содержат 1000 ЕД. Единица биологической активности у разных антибиотиков неодинакова: 1 ЕД пенициллина эквивалентна 0,6 мкг, стрептомицина - 1 мкг, неомицина - 0,3 мкг чистого вещества.

Весовое количество антибиотика, эквивалентное 1 ЕД, называют международной единицей (МЕ) действия.

Чувствительность микроба (возбудителя болезни) к антибиотикам выражается задержкой его роста или гибелью от минимальной концентрации препарата (мкг, ЕД/мл) в течение 16 — 18 ч.

### **Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам**

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяют следующими методами:

1. Методом серийных разведений в жидкой или плотной питательной среде.
2. Методом диффузии с применением дисков, содержащих антибиотики.

**Методом серийных разведений** определяют концентрацию антибиотика в 1 мл питательной среды, подавляющую рост выделенного возбудителя или тест-микроба.

Вначале готовят основное разведение антибиотика (пенициллина) с таким расчетом, чтобы в 1 мл МПБ было 16 ЕД/мл. 2 мл такого МПБ вносят в первую пробирку, содержащую 2 мл, т.е. в 1 мл МПБ будет 8 ЕД/мл, затем 2 мл такого МПБ вносят во вторую пробирку, где получают 4 ЕД/мл в 1 мл, и так делают последовательные разведения антибиотика, получая ряд пробирок с убывающей его концентрацией. Затем в каждую пробирку вносят по 0,2 мл 1 млн. взвеси микробов, концентрация которых в рабочих пробирках будет составлять 100 тыс. микробных клеток в 1 мл среды. Пробирки ставят в термостат при 37 °С на 16— 18 ч. При учете результатов отмечают пробирку, в которой отсутствует рост (МПБ остается прозрачным), — концентрация

антибиотика в этой пробирке будет бактериостатической.



Рис. 42. Определение чувствительности к антибиотикам методом серийных разведений

Бактериостатической концентрацией антибиотика называют наименьшую его концентрацию, при которой наблюдается угнетение роста и размножения бактерий.

Для определения бактерицидной активности антибиотика из пробирок с отсутствием видимого роста делают посев в пробирки с МПА. Если после инкубирования в термостате в них не появится рост, это значит, что проявилось бактерицидное действие антибиотика.

Чувствительность микроба к антибиотику выражают средней арифметической из концентрации антибиотика в двух смежных пробирках — последней, с прозрачной средой и первой — с помутневшей.

**Метод диффузии в агар с применением дисков.** Для получения сплошного роста производят посев 1 — 2 мл микробной взвеси, содержащей по оптическому стандарту 500 млн. микробных тел в 1 мл. Осторожным покачиванием чашки взвесь распределяют равномерным слоем по всей ее поверхности, после чего избыток жидкости отсасывают пастеровской пипеткой и сливают в банку с дезраствором, а чашку с засеянной средой подсушивают в термостате.

На поверхность чашек с подсушенной и засеянной питательной средой стерильным остроконечным пинцетом накладывают диски, пропитанные антибиотиками. Последние представляют собой кружки фильтровальной бумаги диаметром 10 мм, пропитанные различными антибиотиками и высушенные под вакуумом. Диски накладывают по одному на поверхность засеянной питательной среды и, не сдвигая с места, слегка прижимают браншами пинцета, чтобы они всей поверхностью плотно прилегли к поверхности агара. Диски должны находиться на равном расстоянии друг от друга и на рас-

стоянии 2,5 мм от центра чашки. Каждая чашка может быть использована для испытания штамма по отношению к 4—5 антибиотикам.

Для большей достоверности получаемых результатов испытание с каждой культурой следует производить параллельно на двух чашках.

Антибиотическое вещество, диффундируя в агар, формирует вокруг диска зону угнетения роста бактерий. Процесс диффузии антибиотика диска в агар заканчивается через 3—4 ч после нанесения диска. Наибольшая концентрация антибиотика находится в центре - в месте расположения диска, по направлению к периферии содержание его снижается.

Засеянные чашки с нанесенными на них дисками оставляют при комнатной температуре на 30—60 мин, а затем помещают в термостат на 16—18 ч при 37 °С вверх дном, чтобы избежать попадания конденсационной воды на поверхность посева.

Бактерии, чувствительные к антибиотику, при испытании образуют вокруг соответствующего диска зоны угнетения роста, четко выделяющиеся на фоне сплошного микробного роста. Величина зон угнетения роста определяет степень чувствительности микроба к антибиотикам. Измерение зоны угнетения производят с помощью циркуля или миллиметровой линейки. Измеряемый диаметр зоны должен проходить через центр диска. Иногда зона угнетения имеет овальную форму. В таких случаях измеряют наибольший и наименьший ее диаметры и вычисляют среднюю величину, которая и принимается за показатель.

Между степенью чувствительности микроба к антибиотику и размером диаметра зоны угнетения имеются следующие соотношения:

Степень чувствительности микроба к антибиотику	Размер зоны угнетения
Высокочувствительные	Больше 26 мм
Чувствительные	15—25 мм
Малочувствительные	11—14 мм
Устойчивые	10 мм



*Рис. 43. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом «бумажных дисков»*

Чтобы эти соотношения были стандартными при испытании микроба с различными антибиотиками, концентрации последних при пропитывании дисков подбирают таким образом, чтобы они с одинаково чувствительными микробами давали примерно одинаковые диаметры зон угнетения.

**Бактериофаги** - группа вирусов, паразитирующих на бактериях. Бактериофаги в зависимости от типа вызываемой инфекции делятся на вирулентные и умеренные. Вирулентные бактериофаги дают литическую продуктивную инфекцию, в результате чего образуется новая генерация фага. Литический цикл состоит из фаз адсорбции на рецепторах клеточной стенки, инфицирования клетки нуклеиновой кислотой или цельным фагом, репликации нуклеиновой кислоты и синтеза белка головки и отростка, сборки фаговых частиц и выхода фага с лизисом бактерии-хозяина.

На жидких средах лизис проявляется в просветлении бактериальной суспензии, на плотных - в формировании участков отсутствия роста, которые называют "стерильными" пятнами, бляшками или негативными колониями. Размеры и формы этих образований имеют дифференциально-диагностическое значение.

Бактериофаги обладают специфичностью действия. Литический спектр их может охватывать все особи того или иного вида. Такие фаги называют универсальными, или поливалентными, их применяют при идентификации соответствующих бактерий, а также фаготерапии и фагопрофилактике. Типовые фаги способны лизировать лишь группу особей того или иного вида (фаговар), на чем основано типирование бактерий.

В качестве индикаторного признака, определяющего видовую принадлежность микроба и его фаготипаж, служит феномен лизиса данной культуры на плотной питательной среде при совместном культивировании ее с заведомо определенным специфическим бактериофагом.

### **Техника выявления бактериофага на плотной среде**

Бульонную культуру высевают на агар в чашках Петри: одну каплю культуры растирают стеклянным шпателем по всей поверхности агара, чашки помещают в термостат при 37 °С на 3 — 4 ч. Затем в чашку с подрощенной культурой вносят одну каплю бактериофага и вновь помещают в термостат на сутки. По истечении этого времени в контрольной чашке без фага отмечается сплошной рост бактерий по всей поверхности среды, в чашке с добавленным фагом наблюдается задержка роста бактерий в местах нанесения фага. Можно использовать метод "стекающей дорожки".

### **Техника фаготипирования микробов**

В основу фаготипирования положен принцип совместного выращивания типлируемой культуры с типовым бактериофагом. Наступление лизиса является индикаторным признаком, определяющим типовую принадлежность бактерий.

Для фаготипирования бактерий рекомендуется применять хорошо подсушенный 1,5%-ный МПА с 5% глицерина. Суточную агаровую культуру испытуемого штамма отсевают на бульон и помещают в термостат при 37 °С. С появлением хорошо заметного роста культуру набирают в пастеровскую пипетку с тонко оттянутым капилляром и наносят небольшими каплями на поверхность хорошо подсушенной питательной среды. На поверхности агара перед нанесением культуры намечают кружки диаметром 5 — 8 мм. На одной чашке можно нанести 32 — 34 таких кружка. На кружок наносится капля исследуемой культуры, избыток которой стекает в бороздку вокруг капли. После подсыхания капель наносят соответствующие типовые фаги. Учет результатов фаготипирования может быть проведен предварительно через 6 — 8 ч инкубации чашек, окончательный — через 20 — 24 ч.

Типовые фаги употребляются для типирования в критическом тест-разведении, так как концентрированный фаг может дать неспецифический лизис бактериальных культур. За критическое тест-разведение фага принимается максимальное десятикратное разведение его, еще дающее сливной лизис индикаторной культуры. Обычно в критическом тест-разведении фаги содержат в 1 мл около 10 частиц.

Можно проводить фаготипирование в чашках с агаром, на поверхности которого выращена исследуемая культура. Чашка делится на участки по числу типовых фагов, на которые наносятся капли типовых фагов пастеровской пипеткой или петлей диаметром около 4 мм.

Учет фаготипирования производят как в проходящем, так и в падающем свете. Интенсивность лизиса отмечают с помощью четырехкратной системы.

++++ — характеризуют полный лизис культуры. В месте нанесения капли бактериофага образуется пятно, совершенно прозрачное в проходящем свете с резко очерченным краем и абсолютно гладкой поверхностью агара.

+++ — неполный лизис. В месте нанесения капли образуется про-

зрачное в проходящем свете пятно с четкими краями и матовой слегка шероховатой поверхностью.

++ — слабо выраженный лизис, характеризуется значительным просветлением культуры в месте нанесения капли, контуры края слабо очерчены.

+ — намечающийся лизис, незначительное просветление культуры в месте нанесения капли бактериофага, контуры зоны просветления расплывчатые.

Положительной реакцией, определяющей фаготип, являются +++++ и +++++.

Отсутствие лизиса культуры с любым из примененных бактериофагов указывает на то, что в имеющемся наборе для типизируемой культуры нет соответствующего фага.

### ***Контрольные вопросы***

1. Что собой представляют антибиотики?
2. Классификация антибиотиков по происхождению.
3. Действие антибиотиков на бактериальную клетку.
4. Чем характеризуется бактериостатическое и бактерицидное воздействие антибиотиков на бактериальную клетку?
5. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.
6. Единицы измерения активности антибиотиков.
7. Что собой представляют бактериофаги?
8. Практическое использование бактериофагов.
9. Техника определения чувствительности (фаготипирование) бактериофагов.

**ТЕМА 13**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ.**  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ И**  
**ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Цель занятия:** ознакомить студентов с основными видами лабораторных животных, способами их заражения и целями использования, определением вирулентности микроорганизмов, вскрытием и бактериологическим исследованием трупов.

**Материалы и оборудование:** лабораторные животные (мыши, морские свинки, белые крысы, кролики, голуби, куры), трупы мышей, морских свинок, стерильный изотонический раствор хлорида натрия, стерильные шприцы и иглы, градуированные пипетки на 1 мл, стерильные бактериологические пробирки, ватные тампоны, раствор карболовой кислоты, стерильные пастеровские пипетки, набор стерильных инструментов в стерилизаторах для вскрытия животных, скошенный МПА в пробирках и МПБ, плакаты.

Методы исследования, связанные с использованием животных, называются биологическими, или экспериментальными, а используемые для этих целей животные - экспериментальными, или лабораторными. В эксперименте могут быть использованы около 250 видов позвоночных и беспозвоночных. Традиционными или наиболее часто употребляемыми в микробиологической практике являются мыши, крысы, морские свинки, кролики, хомяки, голуби, куриные развивающиеся эмбрионы.

В микробиологии экспериментальное заражение лабораторных животных используют с целью:

- 1) выделения микроорганизмов из патмериала;
- 2) идентификации выделенной культуры;
- 3) определения патогенности и вирулентности исследуемой культуры;
- 4) контроля иммуногенности, безвредности, токсичности, стерильности и пирогенности биопрепаратов (бакпрепаратов);
- 5) определения вида токсина рН на лабораторных животных.

Лабораторных животных, кроме того, используют для получения комплемента, иммунных и флюоресцирующих сывороток, а также крови и ее компонентов.

Для содержания лабораторных животных используют виварий - экспериментально-биологическую лабораторию, предназначенную не только для их содержания, но и для проведения на них экспериментов.

Виварий для содержания здоровых (незараженных) и подопытных (зараженных) животных должен размещаться в обособленном помещении или в отдельно стоящем здании.

В вивариях предусматривают помещения чистые, где содержат незараженных животных (с отдельным инвентарем), и помещения, где проводят

эксперименты. Кроме того, в вивариях должны быть санитарный блок (санпропускник с душем, туалет), карантинное помещение (для вновь поступающих животных), операционная и вскрывочная, секция для взятия проб (анализов), дезинфекционное и моечное отделения, диагностический кабинет, помещение для чистого инвентаря, холодильная камера для хранения трупов животных, кормокухня с комнатой для хранения и приготовления кормов, комната специалистов, бытовые помещения для обслуживающего персонала, обособленное помещение для технического узла.

При входе в виварий и в каждое из его помещений должны быть устроены дезинфекционные барьеры.

Для получения необходимых результатов биопробы животные должны получать полноценные корма.

В зависимости от цели исследования используют различные способы заражения: внутрикожный, подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, пероральный, интраназальный и др.

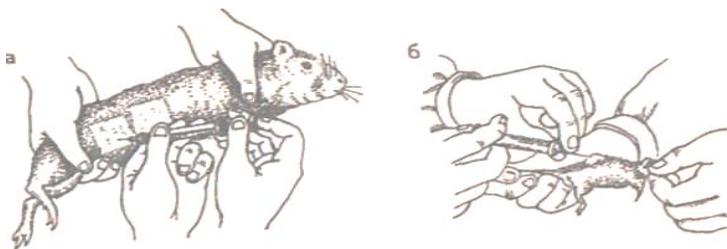
**Накожное заражение (скарификация).** Скальпелем делают небольшие насечки кожи и в них втирают жесткой щеточкой исследуемый материал или культуру (бактериальную).

Шерсть на месте заражения предварительно выстригают и кожу дезинфицируют.

**Внутрикожное (в/к) заражение.** Для этого используют очень тонкие острые иглы с небольшим скосом. Пальцами левой руки оттягивают кожу и в образовавшуюся складку вводят кончик иглы. Вводимая доза не должна превышать 0,2 мл. Показатель правильного введения - небольшая припухлость величиной с горошину.

**Подкожное (п/к) заражение.** Кожу в месте введения материала приподнимают большим и указательным пальцами левой руки. Иглу шприца вкалывают снизу образовавшейся складки. Проколов кожу и пройдя вглубь на несколько мм, иглу отклоняют вправо или влево и медленно вводят материал, содержащийся в шприце.

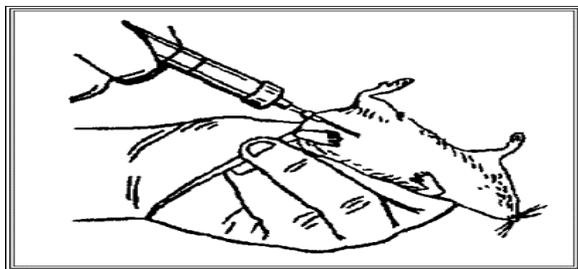
Наиболее удобным местом введения у морской свинки и кроликов является область спины или живота несколько ниже подмышечных впадин, у мышей и крыс - область крестца. Объем вводимого материала не должен превышать для мышей 1 мл, крыс и морских свинок - 10 мл, кроликов - 20—35 мл (рис. 44).



*Рис. 44. Подкожное заражение: а - морской свинки; б - мыши*

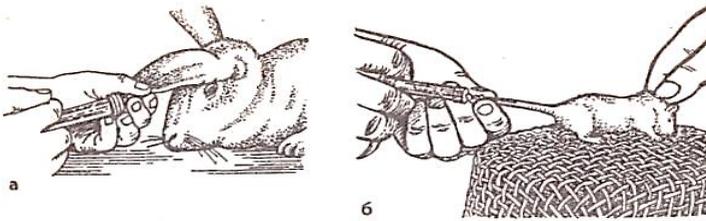
**Внутримышечное (в/м) заражение.** Материал чаще вводят с внутренней поверхности бедра. Голубей и кур заражают также и в грудную мышцу. Объем вводимого материала мышам - 0,5 мл, морским свинкам и крысам— 3—5, кроликам — 5—8 мл, большие дозы следует вводить дробно в 2—3 места.

**Внутрибрюшинное (в/б) заражение.** Животное фиксируют головой вниз. В этом положении кишечник смещается в сторону диафрагмы, что в значительной мере уменьшает возможность его повреждения в момент прокола. Иглу шприца вводят в нижнюю часть, чуть отступив от белой линии. Доза не должна превышать 0,2 мл (рис. 45).



*Рис. 45. Внутрибрюшинное заражение*

**Внутривенное (в/в) заражение.** Исследуемый материал кроликам вводят в краевую вену уха, мышам и крысам - в вену хвоста. Перед введением место протирают тампоном, смоченным ксилолом или толуолом, чтобы вызвать наполнение сосудов кровью (рис. 46).



*Рис. 46. Внутривенное заражение: а - кролика; б - мыши*

**Заражение через пищеварительный тракт.** Заразить животное через рот можно двумя способами. Материал, предназначенный для заражения, примешивают к корму или питью животного. Такой способ является простым и естественным, однако в лабораторной практике применение его ограничено, поскольку количество материала, попадающего в организм животного, не подлежит точному учету. Поэтому чаще материал, предназначенный для заражения, вводят животному принудительно. Крыс и мышей фиксируют в вертикальном положении: одной рукой помощник держит животное за складку кожи на затылке, около ушей, другой - за конец хвоста.

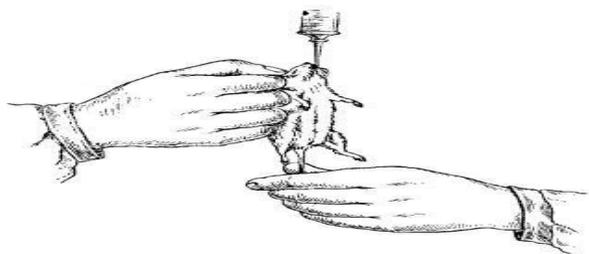
Материал вводят шприцем, игла которой имеет незначительный изгиб и утолщение на конце в виде оливы. Наличие изгиба допускает введение иглы в пищевод животного. Диаметр иглы для мышей должен быть не более 1 мм, крыс — 1 — 1,5 мм, длина соответственно - 35—45 и 70 — 75 мм.

Животному открывают рот браншами пинцета, вставляя их между верхней и нижней челюстями. Иглу, введенную в рот, продвигают по задней стенке глотки на глубину 1 см у мыши и 2 — 2,5 см у крысы. На указанной глубине игле придают вертикальное положение. Процесс введения иглы, как правило, затруднений не представляет, конец ее проникает непосредственно в желудок или нижний отдел кишечника. Количество материала, вводимого за один раз в желудок мыши, должно быть не более 0,5 — 0,7 мл, взрослой крысы - не более 3,5 мл.

Морских свинок и кроликов перед заражением фиксируют в нормальном для животного положении. Удобнее всего завернуть их в полотенце и посадить помощнику на колени.

Заразный материал вводят через эластический зонд. Для этой цели обычно выбирают катетер из наиболее мягкой и эластичной резины длиной 7,5—8 см и толщиной не более 0,3 — 0,5 см. Перед введением зонда в рот животного вставляют роторасширитель (зевник), представляющий собой дощечку с круглым отверстием в середине. Ширина дощечки для кролика равна 2 см, для морской свинки - 1 см. Через отверстие вставленного в рот зевника осторожно вводят в пищевод зонд, смазанный вазелином. Для облег-

чения его введения животному вливают пипеткой в рот несколько капель воды, вызывая глотательные движения, во время которых зонд легко продвигается в глубь пищевода. Наружный конец введенного зонда присоединяют к шприцу, наполненному исследуемым материалом, который вводят в желудок медленно в количестве 2,5 — 3,5 мл морским свинкам и 3,5 — 5 мл кроликам (рис. 47).



*Рис. 47. Заражение через пищеварительный тракт*

**Интраназальное заражение** осуществляют капельным способом, используя глазную пипетку. Предварительно животное слегка наркотизируют, прикладывая к носу вату, смоченную эфиром.

**Интрацеребральное заражение** проводят на животных, фиксированных в спинном положении. У кроликов трепанируют череп на участке между надбровным углом и гребнем. Поле операции выстригают и дезинфицируют кожу, пальцами левой руки растягивают ее над глазницей параллельно черепному гребню и рассекают (края раздвигают), крестообразно нарезают надкостницу, маленьким трепаном осторожно прокалывают кость, легким осторожным поворотом выпиливают диск и извлекают. Шприцем вводят 0,2 мл исследуемого материала. После этого осторожно соединяют края надкостницы. Кожную рану закрывают тампоном и заливают коллодием.

У мышей и крыс трепанацию не делают, а легким проколом костной ткани черепа вводят кончик тонкой иглы и инъецируют материал (рис. 48, 49).



*Рис. 48. Трепанация черепа для внутримозгового заражения кролика*

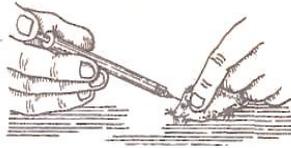


Рис. 49. Внутримозговое заражение белых мышей

### Определение патогенных свойств микробов

Патогенные свойства микробов определяются их способностью вызывать гибель (заболевание) зараженного животного либо о патогенности судят по косвенным признакам - наличию отдельных факторов патогенности, например, токсинов.

В повседневной диагностической практике обычно ограничиваются установлением факта патогенности, токсигенности и реже - вирулентности.

**Вирулентность** - биологическое свойство микроба, характеризующее степень его патогенности в данный момент. Являясь индивидуальным свойством микроба, вирулентность может усиливаться или ослабляться под влиянием различных факторов внешней среды. Определяют вирулентность заражения лабораторных животных различными дозами культуры.

Наименьшая доза микроба, которая убивает 2/3 зараженных животных в течение определенного времени, называется минимальной смертельной дозой (*Dlm* - *dosis letalis minima*). Это условно принятая единица, характеризующая вирулентность микроба. Чем меньше доза, тем выше вирулентность.

Для ее определения чаще всего используют белых мышей. Если белые мыши не восприимчивы к исследуемому возбудителю заболевания, используют другие виды животных: крыс, морских свинок, кроликов и др.

Исследуемую культуру (18 — 24-часовую), выращенную на скошенном МПА, смывают физиологическим раствором и стандартизируют по оптическому стандарту, так чтобы в 2 мл физиологического раствора содержалось определенное количество микробных тел.

Пользуются стандартом мутности и при работе с антибиотиками, бактериофагом, когда возникает необходимость посева определенного количества микробных тел в жидкую или плотную питательную среду.

Сравнение степени мутности в опытной и эталонной пробирках производят невооруженным глазом при хорошем дневном освещении в лучах падающего света, подложив под обе пробирки шрифтовую таблицу.

Для определения летальной минимальной дозы из бульонной культуры готовят ряд последовательных десятикратных разведений: 1:10, 1:100,

1:1000 и т.д. Исследуемую взвесь вводят различными способами в зависимости от целей и задач исследования.

При оценке биопрепаратов используют и другие условные единицы, характеризующие вирулентность используемого микроба: абсолютная летальная доза (*Del - dosis certae letalis*) - вызывает гибель 100% зараженных животных; минимальная летальная доза (*D<sub>Lm</sub> — dosis letalis minima*) - вызывает гибель 95% животных; 50%-ная летальная доза (*LD<sub>50</sub>*) - вызывает гибель 50% зараженных животных; 50%-ная инфицирующая доза (*ID<sub>50</sub>*) - вызывает заболевание 50% зараженных животных. 50%-ные летальная и инфицирующая дозы являются наиболее точными показателями.

Токсигенность микробов определяют так же, как и вирулентность.

Для определения токсигенности бульонную культуру микроба выдерживают в термостате 2 — 3 недели для накопления токсина, затем фильтруют через бактериальный фильтр. Полученный фильтрат разводят физиологическим раствором в сотни, тысячи и миллионы раз. Каждую дозу испытывают одновременно на 3 — 4 животных. Определяют токсигенность, которую выражают в вышеуказанных условных единицах.

### **Вскрытие трупов лабораторных животных при бактериологическом исследовании**

Трупы лабораторных животных вскрывают с целью выявления причин гибели, выделения введенного возбудителя и изучения патологоанатомических изменений, наступающих в результате перенесенной инфекции.

Рекомендуется вскрывать животных в агональном состоянии, усыпив их эфиром, или тотчас же после наступления смерти, так как в ближайшие часы после смерти проницаемость тканей нарушается и бактерии из одного органа могут проникнуть в другой. Особую опасность в этом отношении представляет кишечник, содержимое которого изобилует микробами.

Труп животного брюшком кверху прикалывают к доске за вытянутые лапки. Доску помещают в металлический оцинкованный или эмалированный лоток. Грудь и брюшко протирают ватой, смоченной 5%-ным раствором карболовой кислоты или 5%-ным раствором хлорамина или лучше смачивать спиртом и поджигать шерсть, чтобы содержащиеся на ней микробы, в том числе спороносные палочки, не разлетались и не загрязняли стерильные инструменты и органы вскрытого трупа.

### **Контрольные вопросы**

1. С какой целью проводят заражение лабораторных животных?
2. Методы заражения лабораторных животных.
3. Вскрытие и бактериологическое исследование трупа лабораторного животного.
4. Определение вирулентности.

## ТЕМА 14

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ И ИХ КОНТРОЛЬ

**Цель занятия:** ознакомить студентов с вакцинами различных типов, лечебно-профилактическими и диагностическими иммунными сыворотками, антигенами, аллергенами и принципами их контроля.

**Материалы и оборудование:** вакцины (против рожи свиней из штамма ВР-2, против сальмонеллеза из штамма ТС-177, против лептоспироза, ботулизма, пастереллеза), лечебно-профилактические иммунные сыворотки (против пастереллеза, рожи свиней), диагностические агглютинирующие и флуоресцирующие сальмонеллезные сыворотки, диагностические аллергены (бруцеллин, туберкулин, маллеин), стерильные МПА, МПБ, среда Китта-Тароцци в пробирках, агар Сабуро; стерильные пипетки Пастера, масло, люминесцентный микроскоп; сенсibiliзированные бруцеллами морские свинки с положительной реакцией ГЗТ, плакаты.

#### Вакцины

Эти биологические препараты содержат в качестве активного начала цельные микробные клетки или их компоненты. Вакцины предназначены для создания искусственного активного иммунитета. Различают несколько основных типов вакцин против инфекционных болезней сельскохозяйственных животных.

**Контроль вакцин.** Вакцины всех типов после приготовления проверяют в основном по трем параметрам.

*Стерильность* (инактивированные) или *чистоту роста* (живые) контролируют посевом на питательные среды.

*Безвредность* проверяют введением вакцины тем или иным лабораторным животным. Вакцина не должна вызывать заболевание и гибель животных.

*Активность (иммуногенность)* обычно контролируют следующим образом. Вакцину вводят лабораторным животным, и через промежуток времени, достаточный для выработки активного иммунитета (15-20 сут.), эту группу вместе с контрольной группой нещипитых животных заражают летальной дозой возбудителя. 80% и более контрольных животных должны погибнуть, вакцинированные должны выжить. В некоторых случаях об иммуногенности препарата судят по косвенным показателям: количеству агглютининов у привитых животных (лептоспирозная вакцина), антитоксинов в РН (вакцина против ботулизма).

Например, сухую живую вакцину против рожи свиней ВГНКИ из штамма ВР-2 контролируют следующим образом. Для контроля чистоты сухую (лиофилизированную) вакцину разводят стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:10. Из суспензии бактерий готовят мазки, красят по Граму, микроскопируют. В препарате должны быть типичные мелкие грамположительные палочковидные клетки при отсутствии посторонних микроорганизмов. Одновременно проводят посевы на МПА, МПБ, среду Китта-Тароцци и агар Сабуро. Посевы выдерживают 10 сут при 37-38°С, по-

севы на грибы — 15 сут при 20-25°C. Рост посторонней микрофлоры в указанные сроки на всех питательных средах должен отсутствовать при наличии типичного роста на МПА и МПБ культуры возбудителя рожи.

С целью контроля вакцины на безвредность и активность 20 белым мышам массой 17-18 г вводят подкожно 0,2 мл препарата. Вакцину считают безвредной, если погибает не более пяти мышей. Через 14 сут всех оставшихся в живых вакцинированных и пять контрольных мышей заражают летальной дозой культурой вирулентного штамма возбудителя рожи свиней. Вакцину признают активной, если погибают в течение 3-4 сут контрольные и выживает не менее 75% вакцинированных мышей.

### **Лечебно-профилактические иммунные сыворотки и иммуноглобулины**

Данные биопрепараты применяют для создания пассивного иммунитета при профилактике или лечении. Под пассивной иммунизацией понимают введение готовых иммуноглобулинов (антител) животному. Пассивный иммунитет возникает через 20-24 ч после инъекции и длится максимум 2-3 нед. Иммунные сыворотки получают путем многократного введения антигена животным-продуцентам (волам, лошадям и др.). Для получения каждого типа иммунных сывороток разработаны регламенты приготовления соответствующего антигена, схемы иммунизации и методы, с помощью которых контролируют количество антител в сыворотке крови.

По направленности действия иммунные сыворотки подразделяют на антибактериальные, антиоксические, антивирусные. По достижении необходимого уровня антител у животного берут кровь обычно в объеме 1% массы животного или осуществляют тотальное обескровливание. Полученную кровь сепарируют для получения сыворотки, которую стерилизуют фильтрованием и консервируют 0,25-0,5%-ным фенолом, 0,01-0,03% -ным тиомерсалом или другими веществами.

**Контроль сывороточных препаратов.** Он включает в себя проверку на стерильность, безвредность и специфическую активность.

*Стерильность* препаратов определяют посевом на питательные среды (МПА, МПБ, МППВ, агар Сабуро или Чапека).

Безвредность каждой серии обычно контролируют введением сыворотки морским свинкам. Специфическую активность сыворотки проверяют в зависимости от направленности ее действия.

*Определение превентивных (защитных) свойств* на естественно-восприимчивых или лабораторных животных заключается и в том, что животным вводят подкожно, внутримышечно или внутривентриально сыворотку, а через 20-24 ч иммунизированным и контрольным животным вводят подтитрованную дозу гомологичного вирулентного микроорганизма. Иммунизированные животные должны остаться здоровыми. Контрольные переболевают с проявлением характерных признаков заболевания.

*Активность* антиоксических и ряда противовирусных сывороток определяют в реакциях нейтрализации (РН). Количество антител в сыворотках устанавливают при помощи серологических реакций (РСК, РА, РИГА, РДП и др.).

Для концентрирования антител иммунной сыворотки, удаления серологически неактивных белков и соответственно повышения специфической активности препарата применяют методы, с помощью которых выделяют глобулиновую фракцию белков иммунной сыворотки. Готовые препараты иммуноглобулинов контролируют, как и иммунные сыворотки: на стерильность, безвредность и специфическую активность.

### **Диагностические антитела**

Принцип получения диагностических иммунных сывороток такой же, как и лечебно-профилактических. Диагностические сыворотки должны обладать не только высокой активностью в серологических реакциях, но и специфичностью. С помощью диагностических сывороток обнаруживают микробные антигены в тканевых материалах и идентифицируют выделенные микроорганизмы. В зависимости от целевого назначения различают видовые сыворотки (предназначены для идентификации микроорганизмов на уровне вида), групповые (идентификация на уровне серологической группы), серовариантные (на уровне серовара). Иммунные сыворотки готовят для использования в различных серологических реакциях (РА, РП, РДП, РСК, РИГА, РН). При получении антител, меченных флуорохромом и ферментами, из иммунных сывороток предварительно выделяют и очищают иммуноглобулиновую фракцию. В основном диагностические сыворотки (диагностикумы) контролируют на стерильность, активность и специфичность.

**Получение моноклональных антител.** Обычные иммунные диагностические сыворотки, выпускаемые биофабриками, представляют собой смесь антител против различных антигенных детерминант возбудителя инфекционной болезни. Использование таких сывороток для идентификации возбудителя сопряжено с получением перекрестных реакций между сыворотками одного вида и даже между различными видами микроорганизмов за счет общих антигенных детерминант. Избежать таких нежелательных перекрестных реакций пытаются различными способами. Один из методов заключается в использовании в качестве антигенов для иммунизации животных-продуцентов компонентов клеток возбудителя, несущих преимущественно специфические антигены. Часто такие вещества получают, разделяя антигенную смесь фильтрованием через сефадексы.

Другое традиционное направление в получении специфических реагентов — **метод адсорбции иммунных сывороток**, когда перекрестно реагирующие антитела удаляют, насыщая сыворотку клетками антигеннородственных бактерий. Клетки бактерий связывают перекрестно реагирующие антитела, и потом их вместе с антителами отделяют от адсорбированной сыворотки центрифугированием. Подобным образом получают адсорбированные агглютинирующие сыворотки для идентификации сальмонелл и некоторых других видов бактерий.

В качестве специфических антителных реагентов все чаще исполь-

зуют моноклональные антитела. Обычные диагностические сыворотки — поликлональные, поскольку содержат антитела, синтезированные разными линиями (клонами) В-лимфоцитов к различным антигенным детерминантам. Моноклональные антитела представляют собой иммуноглобулины, продуцируемые одним клоном клеток и реагирующие с определенным антигенным эпитопом микроорганизма.

Чтобы получить моноклональные антитела, изолируют и поддерживают линию лимфоцитов, синтезирующих антитела определенной специфической направленности. Клетки-продуценты антител не способны расти *in vitro*. Злокачественная опухоль (миелома) синтезирует в больших количествах аномальные иммуноглобулины и способна к неограниченному росту *in vitro*. Была разработана методика слияния клеток миеломы с лимфоцитами, при этом гибридная клетка (гибридома), как и опухолевая, способна к неограниченному росту и одновременно синтезирует антитела, как лимфоидная. Необходимо обнаружить клон клеток, продуцирующих антитела необходимой специфической направленности. Получение моноклональных антител включает в себя несколько этапов.

Известным антигеном иммунизируют животных. Затем из селезенки выделяют В-лимфоциты.

Проводят слияние (гибридизацию) В-лимфоцитов и миеломных клеток. Получают смесь лимфоцитов гибридных и миеломных клеток.

Смесь клеток культивируют в среде, содержащей ГАТ (гипоксантин — аминоптерин — тимидин), что приводит к гибели лимфоцитов и миеломных клеток, так как на этой среде растут только гибридомы.

Гибридомные клетки рассеивают (клонировуют) таким образом, чтобы в лунке панели для микрокультивирования оказалась только одна клетка, дающая начало клону. После размножения клеток оценивают их способность синтезировать нужные антитела (проводят скрининг). Клонирование повторяют. В конечном итоге выбирают стабильный клон, продуцирующий антитела заданной специфичности.

Клетки гибридомы можно длительно хранить в замороженном состоянии (в жидком азоте).

Моноклональные антитела выделяют либо из культуральной жидкости (клетки гибридомы выращивают *in vitro*), либо из асцитической (выращивание *in vivo*).

Моноклональные антитела используют для диагностики инфекционных болезней в иммуноферментном, радиоиммунном и иммунофлуоресцентном анализах.

### **Диагностические антигены**

Предназначены для постановки различных серологических реакций с целью серодиагностики инфекционных болезней животных. В зависимости от типа серологической реакции антигены могут быть корпускулярными

(РА, РСК), на носителях (эритроцитарные антигенные диагностикумы для РИГА), растворимые (РП, РДП). Технология приготовления антигенов разнообразна, но основой для антигенов любого типа служат исходные селекционированные, без признаков диссоциации культуры микроорганизмов.

**Контроль диагностических антигенов** проводят по определенным параметрам:

- контроль стерильности;
- антиген для серологических реакций должен быть определенной оптимальной концентрации, выраженной, например, числом микробных клеток в 1 мл;
- активность антигена определяют в той или иной серологической реакции с заведомо положительной сывороткой. Антиген должен давать четкую положительную реакцию. В некоторых случаях сначала устанавливают предельный титр антигена — разведение, в котором он дает положительную реакцию с наибольшим разведением стандартной положительной сыворотки. Для постановки серологической реакции при диагностических исследованиях используют рабочий титр антигена — двойную дозу предельного титра (единый бруцеллезный антиген);
- специфичность антигена испытывают в серологической реакции с заведомо отрицательной сывороткой. Корпускулярные антигены для серологических реакций осадочного типа контролируют на спонтанную агглютинацию — выпадение в осадок в отсутствие антител.

### **Диагностические аллергены**

Данные биопрепараты (бруцеллин, туберкулин, маллеин) представляют собой экстракты из клеток возбудителя и содержат продукты их метаболизма. Аллергическая диагностика основана на выявлении гиперчувствительности замедленного типа, которая развивается при ряде инфекционных болезней, особенно хронических. В основе этих диагностических тестов лежит специфическая реакция иммунного воспаления с участием сенсибилизированных Т-лимфоцитов.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое вакцины?
2. Какие существуют контроли вакцин?
3. Что такое лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины?
4. Как осуществляют контроль сывороточных препаратов?
5. Что такое диагностические антигены?
6. Что такое диагностические аллергены вы знаете?
7. Что такое диагностические антитела?

## ТЕМА 15 РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ, НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ, РЕАКЦИЯ КУМБСА

**Цель занятия:** ознакомить студентов с реакциями агглютинации, гемагглютинации и реакцией Кумбса, с техникой их постановки и учета результатов.

**Материалы и оборудование:** культуры *E. coli* различной серогрупповой принадлежности на МПА, О-агглютинирующие диагностические эшерихиозные сыворотки, бруцеллезный роз-бенгал антиген, положительная бруцеллезная сыворотка, планшеты с результатами титрования иммунной сыворотки в РНГА, единый бруцеллезный антиген, мерные пипетки.

Взаимодействие микробного антигена и антител носит строго специфический характер и направлено в животном организме на нейтрализацию возбудителя и его токсинов. Взаимодействие антигена и антител *in vitro* при определенных условиях сопровождаются видимыми феноменами (агглютинация, преципитация, иммунный лизис), что позволяет использовать АГ—АТ-реакции, получившие название серологических (лат. *serum* - сыворотка), в практических целях. Биофабрики выпускают антигены и иммунные сыворотки (антитела) известной специфической направленности (диагностические). При помощи таких сывороток в серологических реакциях можно идентифицировать неизвестный микроорганизм или, применяя известный антиген, обнаружить в организме антитела, синтезированные в ответ на внедрение возбудителя, и таким образом поставить диагноз (серологическая диагностика). Кроме того, серологические реакции можно использовать для оценки интенсивности иммунного ответа после вакцинации или перенесенной инфекционной болезни.

Реакции агглютинации, непрямой гемагглютинации и Кумбса основаны на взаимодействии *in vitro* корпускулярных антигенов с антителами и способности образовавшихся комплексов выпадать в осадок. В качестве корпускулярных антигенов используют бактериальные клетки или растворимые антигены, экстрагированные из микроорганизмов и сорбированные на корпускулах носителей: эритроцитах, частицах латекса и т.д.

Антигенные детерминанты корпускулярных антигенов специфически взаимодействуют с гомологичными антителами (специфическая, невидимая фаза реакции), а затем комплексы антиген — антитело образуют крупные, видимые невооруженным глазом конгломераты, которые выпадают в осадок — агглютинат (неспецифическая, видимая фаза реакции). Антигены и антитела взаимодействуют лишь в присутствии электролита (в 0,8%-растворе хлорида натрия).

**Реакция агглютинации (РА).** Разработано несколько вариантов реакции агглютинации, различающихся по методическому исполнению и цели исследования.

*РА на стекле.* 1. Для идентификации микроорганизма на обезжиренное предметное стекло наносят раздельно каплю известной агглютинирующей диагностической сыворотки, например сальмонеллезной, и каплю физиологического раствора (контроль). Затем бактериологической петлей берут бактериальную массу изучаемой культуры из колонии в чашке Петри или с поверхности скошенного МПА в пробирке и суспендируют раздельно в иммунной сыворотке и физиологическом растворе до получения гомогенной взвеси. Результат учитывают через 2..4 мин.



*Рис. 50. Реакция агглютинации*

Учет результатов: в контрольной пробе изменения должны отсутствовать. При специфическом соответствии культуры бактерий иммунной сыворотке появляются хлопья агглютината (положительный результат), в случае отсутствия феномена агглютинации делают заключение о том, что исследуемая культура бактерии не соответствует иммунной сыворотке.

2. Обнаружение антител в исследуемой сыворотке крови рассмотрим на примере роз-бенгал пробы, применяемой при серодиагностике бруцеллеза. На предметное стекло наносят 0,3 мл исследуемой сыворотки крови животного и 0,03 мл бруцеллезного антигена (окрашенные розовым-бенгалским клетки бруцелл). Компоненты тщательно перемешивают покачиванием стекла и через 4 мин учитывают результат.

Учет результатов: при положительной реакции появляются розовые хлопья агглютината. Серологическую реакцию подобного типа относят к качественной, так как с ее помощью можно выявлять антитела к возбудителю в сыворотке крови животного, но невозможно оценить их количественное содержание.

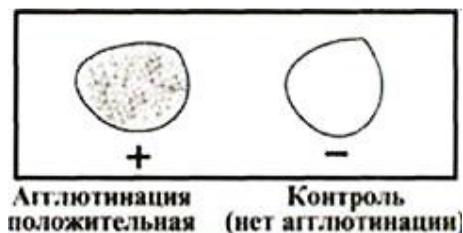


Рис. 51. Реакция агглютинации на предметном стекле в капле сыворотки – ориентировочная

Пробирочная РА. 1. Обнаружение антител в сыворотке крови рассмотрим на примере РА для серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Схема постановки опыта приведена в таблице 2. Общий объем компонентов реакции 1 мл.

Таблица 2 - Схема постановки пробирочной РА для обнаружения антител в сыворотке крови

Компонент реакции	Количество компонента (мл) в пробирке					
	1-й (исходное разведение и контроль антигена)	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й (контроль антигена)
Физиологический раствор	2,4	-	0,5	0,5	0,5	0,5
Исследуемая сыворотка крови	0,1	0,5 из 1-й проб.	0,5 из 1-й проб.	Последовательный перенос по 0,5 мл, начиная с 3-й проб.		-
Полученное разведение	1:25	1:25	1:50	1:100	1:200	
Бруцеллезный антиген, $10^9$ кл/мл	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Конечное разведение	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	
	Перемешивают встряхиванием. Инкубирование при 37-38°C 18-20 ч.					

Из 5-й пробирки удаляют 0,5 мл жидкости перед добавлением антигена.

Одновременно по аналогичной схеме исследуют заведомо положительную и отрицательную сыворотки (положительный и отрицательный контроли).

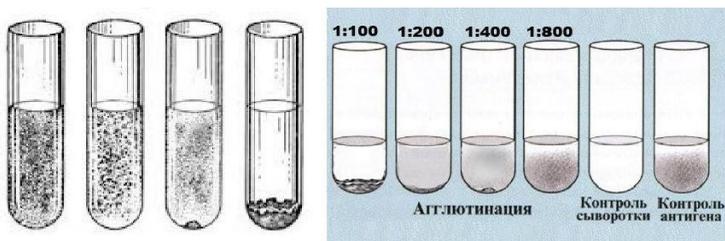


Рис. 52. Пробирочная реакция агглютинации

Учет результатов начинают с контрольных пробирок — не должно быть спонтанной (неспецифической) агглютинации в 6-й пробирке (контроль антигена) и хлопьев осадка в 1-й пробирке (контроль сыворотки). В остальных пробирках наличие и интенсивность агглютинации учитывают визуально и оценивают в крестах:

1) (++++)— полная агглютинация — хорошо выраженный осадок в виде «зонтика» и полное просветление жидкости, при легком встряхивании «зонтик» разбивается на хлопья и комочки, а жидкость остается прозрачной (агглютинировало 100 % антигена);

2) (+++) — неполная агглютинация с хорошо выраженным осадком в виде «зонтика» и неполным просветлением жидкости (агглютинировало 75% антигена);

3) (++) — частичная агглютинация с неполным просветлением жидкости, «зонтик» умеренно выражен (агглютинировало 50% антигена);

4) (+) — едва заметное просветление жидкости, «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество хлопьев или комочков (агглютинировало 25 % антигена);

5) (—) — просветление жидкости и образование «зонтика» не наступило, на дне пробирки по центру образуется небольшой осадок микробов антигена в виде точки или пятна.

Для более объективной оценки результатов РА в крестах готовят стандарты мутности, соответствующие 75, 50, 25 и 0% просветления жидкости.

В четыре пробирки последовательно наливают 1, 2, 3 и 4 мл антигена, разведенного 1:10. Затем в том же порядке в три первые пробирки добавляют 3, 2 и 1 мл фенолизированного раствора. В четвертую пробирку раствор не добавляют. После встряхивания пробирок из каждой из них переносят по 0,5 мл в серологические пробирки и добавляют по 0,5 мл физиологического раствора. Полученные стандарты соответствуют 75, 50 и 25% просветления жидкости. В четвертой пробирке просветление отсутствует. Стандарты мутности готовят каждый раз при постановке РА и выдерживают в термостате одновременной с основной реакцией.

За положительный результат принимают агглютинацию минимум на два креста. Максимальное разведение исследуемой сыворотки крови, обеспе-

чивающее агглютинацию минимум на два креста или более, называют титром сыворотки. Титр сыворотки отражает количественное содержание антигенов в крови исследуемого животного.

Таблица 3 - Учет результатов РА для обнаружения антител в сыворотке крови

Сыворотка крови	Номера пробирок (разведение сыворотки)					
	1 (контроль сыворотки)	2 (1:50)	3 (1:100)	4 (1:200)	5 (1:400)	6 (контроль антигена)
Исследуемая	-	++++	++++	+++	+	-
Положительная (контроль)	-	++++	++++	++++	+++	-
Отрицательная (контроль)	-	-	-	-	-	-

Из приведенного примера (табл. 3) видно, что антиген специфичен, так как отсутствует спонтанная агглютинация с физиологическим раствором и нормальной (отрицательной) сывороткой, и активен — взаимодействует с заведомо положительной сывороткой. Следовательно, можно учитывать результаты РА с исследуемой сывороткой крови. Титр исследуемой сыворотки (титр антител) в данном случае составляет 1 : 200.

Пробирочную РА используют не только для серодиагностики инфекционных болезней, но также для оценки активности диагностических агглютинирующих сывороток или интенсивности поствакцинального иммунологического ответа.

Количество антител может служить диагностическим критерием. Под диагностическим титром понимают минимальное количество антител к данному антигену в исследуемой сыворотке, заведомо превышающее количество нормальных антител к используемому в реакции антигену в сыворотке животного того же вида. При диагностическом титре антител и выше животное рассматривают как больное или переболевшее. При некоторых инфекциях этот подход не всегда продуктивен, и тогда исследуют «парные сыворотки», т.е. сыворотки, взятые от животного дважды с интервалом три-четыре недели, причем первую пробу необходимо брать не позднее двух-трех суток после появления клинических симптомов болезни. На активный инфекционный процесс указывает существенное повышение титра антител во второй пробе.

2. Для идентификации микроорганизмов используют пробирочную РА, если из-за антигенного родства с различными видами или внутривидовыми сероварами в РА на стекле микроорганизм идентифицировать не удалось.

Например, если культура *E. coli* дает в РА на стекле положительный результат одновременно с иммунными сыворотками против нескольких *O*-сероваров, ее испытывают как антиген с теми же сыворотками уже в пробирке.

рочной РА и относят к той О-серо группе, с сывороткой которой она дает максимальные титры.

**Реакция не прямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА).** Данную реакцию относят к серологической реакции осадочного типа. В ней используют растворимые микробные антигены, сорбированные на эритроцитах как носителях (антигенный диагностикум), или сорбированные на эритроцитах антитела известной иммунной сыворотки (антительный диагностикум). Антигенные диагностикумы применяют для серологической диагностики, антительные — для обнаружения антигенов в исследуемом материале.

*Приготовление антигенных диагностикумов.* Дефибринированную кровь отмывают ФСБР (рН 7,2) три раза. Для стабилизации (фиксации) эритроциты обрабатывают формальдегидом, глутаровым или акриловым альдегидом. Наиболее распространена формализация эритроцитов: 50%-ю суспензию эритроцитов смешивают с 50%-м раствором формалина в соотношении 1:1, выдерживают, периодически встряхивая, при 37 °С 2 ч и затем отмывают ФСБР три раза.

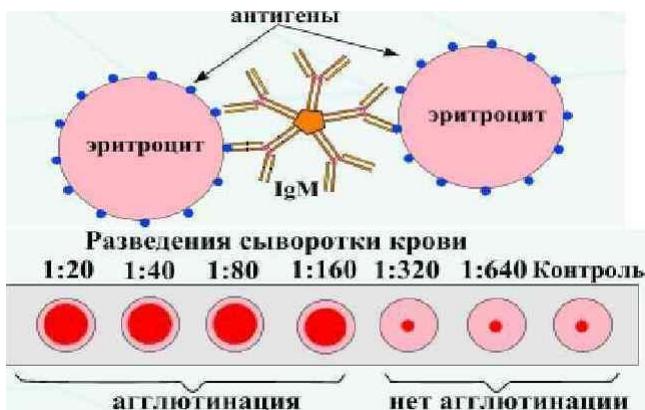


Рис. 53. Реакция не прямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)

Эритроциты легко сорбируют на своей поверхности полисахариды, а после обработки танином и белки. Танинизацию проводят, смешивая 2,5%-ю суспензию эритроцитов и раствор танина (1:20 000) в соотношении 1 : 1 с последующим выдерживанием при 37°С в течение 15 мин. Затем эритроциты отмывают ФСБР (три раза) и доводят концентрацию до исходной. Для сенсibilизации 1 мл 2,5%-й взвеси отмытых танинизированных эритроцитов объединяют с 1 мл антигена и 4 мл ФСБР (рН 6,4) и выдерживают при 37 °С 2 ч. После сенсibilизации эритроциты отмывают три раза и суспендируют в ФСБР (рН 7,2), который содержит 1 % нормальной кроличьей сыворотки, обеспечивающей стабильность суспензии. Следует отметить, что оптималь-

ное количество антигена для сенсибилизации эритроцитов определяют опытным путем в каждом случае.

*Обнаружение антител в сыворотке крови.* Сыворотку крови перед исследованием инактивируют в водяной бане при 56 °С 30 мин и проверяют на наличие антител к антигенам собственно эритроцитов. Для удаления антиэритроцитарных антител исследуемую сыворотку крови предварительно адсорбируют несенсибилизированными эритроцитами.

РНГА на стекле применяют для диагностики пуллороза — тифа птиц (качественная кровекapelная реакция непрямо́й гемагглютинации — ККРНГА). На сухое обезжиренное стекло глазной пипеткой наносят антиген и свежую кровь (в соотношении 1:1), взятую из гребня или подкрыльцовой вены птицы, и смешивают, покачивая стекло. Реакцию считают положительной при выпадении в течение двух минут в смеси крови с антигеном хлопьев коричневого цвета. Параллельно ставят контроли с позитивной и негативной сыворотками.

Пробирочная РНГА рекомендована для серологической диагностики многих инфекционных болезней. Например, для диагностики сальмонеллез используют количественную РНГА. Эритроцитарный антиген содержит О-антигены сальмонелл. Исследуемую сыворотку разводят физиологическим раствором в полистироловых планшетах в объеме 0,5 мл от разведения 1:100 до 1:800. Затем в каждую лунку вносят 0,25 мл диагностикума. Компоненты перемешивают покачиванием планшета и выдерживают в термостате при 37 °С 2...2,5 ч. Результат РНГА оценивают в крестах.

1) (++++) — все эритроциты агглютинированы и в виде «зонтика» покрывают дно лунки;

2) (+++) — агглютинированы почти все эритроциты. На фоне «зонтика» сформировано малозаметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов;

3) (++) или (+) — «зонтик» плохо выражен, замечен осадок из неагглютинированных эритроцитов в виде кольца;

4) (—) — эритроциты не склеены и осели на дно в виде узкого колечка с ровными краями либо в виде пунктата или колечка.

Параллельно ставят контроли с заведомо положительной и отрицательной сыворотками.

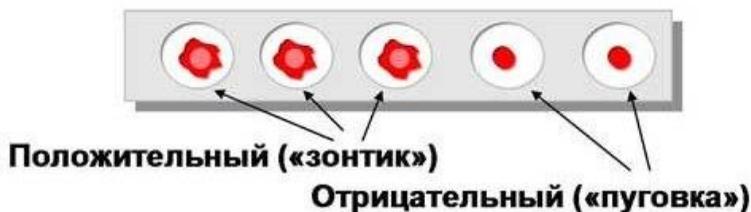


Рис. 54 Результат РНГА

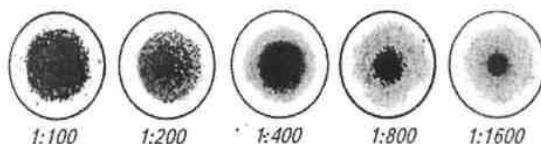


Рис. 55. Реакция гемагглютинации  
1:100...1:1600 – разведения сыворотки

**Реакция Кумбса (РК).** Данная серологическая реакция также основана на феномене агглютинации: Предназначена для выявления так называемых «неполных» антител, у которых только один активный центр, и по этой причине они могут специфически взаимодействовать с детерминантами антигена, но реакция не завершается формированием макроскопически видимых комплексов антиген — антитело. В частности, РК используют для серодиагностики бруцеллеза животных.

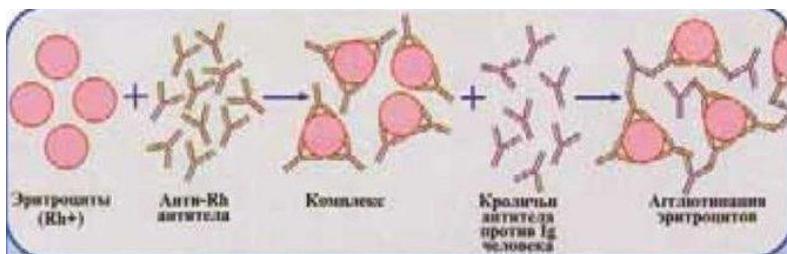


Рис. 56. Реакция Кумбса

Предварительно сыворотки крови исследуют в обычной пробирочной РА. Исходя из результатов РА, для исследования берут пробирки с разведениями сыворотки, где нет агглютинации, но возможно произошло специфическое связывание «неполных» антител с бруцеллезными антигенами.

Антиген из этих пробирок отмывают от несвязавшихся (свободных) белков сыворотки крови центрифугированием. К отмывтому осадку корпускулярного бруцеллезного антигена добавляют 1 мл разведенной антиглобулиновой сыворотки, содержащей антитела к иммуноглобулинам сыворотки крови животных того вида, который исследуют на бруцеллез. Пробирки со смесью выдерживают при 37 °С 18 ч, затем при комнатной температуре 2...4 ч.

Учет результатов: в положительном случае бруцеллезный антиген будет агглютинировать, так как полные антитела антиглобулиновой сыворотки взаимодействуют с «неполными» антителами на поверхности бруцелл и вызывают агглютинацию корпускул антигена.

### ***Контрольные вопросы***

1. Какие типы антигенов используют в РА?
2. В чем сущность феномена агглютинации?
3. Что такое качественная и количественная РА?
4. Каким образом неизвестный микроорганизм идентифицирует в РА?
5. Как определить титр сыворотки в пробирочной РА?
6. Каким образом получают эритроцитарные диагностикумы для РНГА?
7. В чем сущность реакции Кумбса?

## ТЕМА 16 РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ, КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ, ДИФФУЗНОЙ ПРЕЦИПИТАЦИИ

**Цель занятия:** ознакомить студентов с сущностью и техникой постановки реакций, рассмотреть их практическое использование.

**Материалы и оборудование:** сибирязевенная преципитирующая сыворотка, стандартный сибирязевенный антиген, стерильный физиологический раствор, пипетки Пастера, пробирки Уленгута, 1,5%-й агаровый гель с мертиолатом (конечное разведение 1:10 000), стерильные чашки Петри, штампы для РДП.

Реакция преципитации (РП), как и реакция агглютинации, принадлежит к разряду серологических реакций осадочного типа, но в отличие от РА в ней используют не корпускулярные, а растворимые антигены микроорганизмов. Образование комплексов антиген — антитело сопровождается изменением оптической плотности среды (помутнением) — преципитацией (от лат. *praecipitatio* — падение вниз), что расценивают как положительный результат реакции.

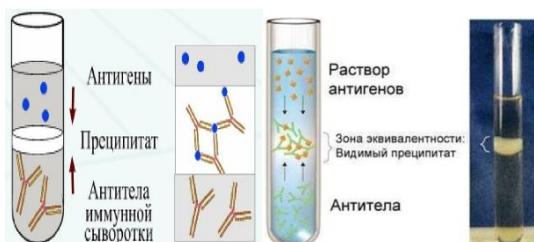


Рис. 57. Реакция преципитации

Антиген для РП готовят из чистых культур микроорганизмов, если антиген предназначен для серодиагностики, или из тканевого материала, содержащего микроорганизмы, если РП ставят, чтобы при помощи известной иммунной сыворотки обнаружить возбудитель в патологическом материале.

Физические методы экстрагирования антигенов основаны на механическом разрушении микробных клеток посредством растирания с кварцевым песком, встряхивания на шюттель-аппарате в колбе со стеклянными шариками, многократного замораживания и оттаивания или воздействия ультразвуком. Полисахаридные термостойкие антигены выделяют термической обработкой (кипячением, автоклавированием).

Из химических методов получения антигенов достаточно широко используют экстрагирование трихлоруксусной кислотой (полный антиген Буавена); кислотный или щелочной термогидролиз—прогревание материала,

например, в 1%-м растворе уксусной кислоты или 0,1 н. растворе гидроксида натрия; экстрагирование при помощи ацетона, мочевины, этилового спирта, эфира и других растворителей; часто применяют различные детергенты — дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия и т.д.; используют методы ферментативного разрушения микробных клеток, например, посредством воздействия трипсином.

Выбор того или иного способа выделения растворимого антигена зависит от его химической природы. Главное требование к любому из методов — эффективное извлечение антигена без его денатурации.

На основе феномена преципитации разработаны реакция кольцепреципитации (РКП), реакция диффузионной преципитации (РДП).

**Реакция кольцепреципитации (РКП).** Известна по имени автора как реакция Асколи (1911); разработана для диагностики сибирской язвы. РКП используют в ветеринарной диагностической практике преимущественно для выявления микробных антигенов в тканевом материале. Обязательное условие постановки РКП — прозрачность раствора антигена и иммунной сыворотки, поэтому при необходимости компоненты реакции освобождают от взвешенных частиц фильтрованием, например, через асбестовую вату.

Техника постановки РКП включает в себя три варианта.

**Метод «наслаивания» антигена.** В уленгутовские пробирки (диаметр 2...3 см) вносят пастеровской пипеткой с тонким капилляром, не смачивая стенку пробирки, 0,3...0,4 мл иммунной преципитирующей сыворотки. Затем по стенке пробирки осторожно наслаивают на поверхность сыворотки 0,1...0,2 мл растворимого исследуемого антигена (преципитиногена). Смешивания компонентов не происходит благодаря различию плотности сыворотки и экстракта.

Учет результатов проводят на фоне темной бумаги. Через 1...2 мин в зоне взаимной диффузии антигена и антител, на границе контакта компонентов, происходит помутнение среды, видимое сбоку как серо-белый диск (преципитат).

**Метод «подслаивания» антител.** В пробирку вначале вносят антиген, а затем осторожно при помощи пастеровской пипетки на дно пробирки, под антиген, «подслаивают» иммунную сыворотку.

При постановке кольцевой РП в ходе исследования тканевого материала необходимы следующие контроли: 1) иммунная сыворотка + стандартный антиген; 2) иммунная сыворотка + физиологический раствор; 3) иммунная сыворотка + экстракт из тканей здоровых животных.

Показания РП считают достоверными, если в первом контроле получают положительный, а в остальных — отрицательный результат.

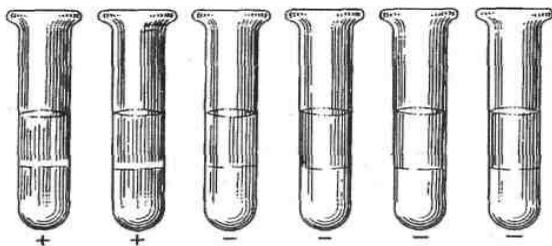


Рис. 58. Реакция кольцепреципитации в пробирках

**Микровариант РКП.** Разработан для экономии компонентов. В этом случае используют стеклянные капилляры или тонко оттянутые кончики пастеровских пипеток диаметром 0,5... 1 мм. Капилляр опускают одним концом во флакон с преципитирующей сывороткой, набирают ее на высоту 1... 1,5 см, закрывают верхнее отверстие капилляра указательным пальцем. Затем ватой удаляют излишек сыворотки с наружной стороны капилляра, погружают его в раствор антигена и набирают равное количество антигена. Капилляр переворачивают с таким расчетом, чтобы смесь сыворотки и антигена оказалась в середине капилляра, после чего закрепляют вертикально в пластилиновой пластинке. Результаты учитывают, как и при обычной РКП.

**Реакция диффузионной преципитации (РДП).** Основана на встречной диффузии антител (иммунной сыворотки) и растворимых антигенов в агаровом геле (двойная диффузия). Если антиген состоит из смеси моноантигенов, то каждый из них диффундирует с различной скоростью и точки эквивалентных соотношений каждого антигена и гомологичных антител будут находиться в различных участках агарового геля, где и формируется преципитат в виде линий. Таким образом, каждая пара антиген — антитело образует свою линию преципитации. При помощи РДП можно анализировать сложные антигенные смеси, поскольку каждый антиген дает свою линию преципитации. В ряде случаев РДП используют как метод серологической диагностики инфекционных болезней.

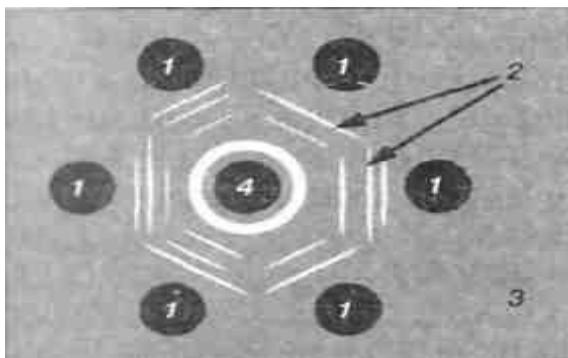
Из очищенного агара фирмы «Дифко» готовят 1,5%-й раствор агара в физиологическом растворе (рН 7,2...7,4) с добавлением мертиолата (конечное разведение 1:10 000) как консерванта.

На хорошо обезжиренное стекло, лежащее строго горизонтально, наливают расплавленный агар в количестве, достаточном для формирования слоя геля толщиной 3...4 мм. Затем штампами вырезают лунки в агаровом геле; агар из лунки удаляют с помощью трубочек. На дно лунки вносят каплю горячего агара с последующим его удалением, что создает «дно» лунки и предотвращает подтекание компонентов под гель.



*Рис. 59. Полосы преципитации между антигенами в лунках G и E и иммунной сывороткой (антителами) в лунке A*

В зависимости от конкретной задачи применяют штампы с различным количеством пробойников, обеспечивающие получение лунок разного диаметра и на разном расстоянии. При изучении неизвестных реагентов оптимальное расстояние между лунками необходимо установить в предварительных опытах. В зависимости от конкретной задачи в центральную лунку вносят иммунную сыворотку, в периферические — анализируемые антигены или наоборот. Сыворотка и антиген не должны выходить за пределы лунки на поверхность агара. Затем пластины помещают в эксикатор. На дно эксикатора наливают небольшое количество воды с антисептиком. Пластины с компонентами выдерживают при комнатной температуре 10..72 ч.



*Рис. 60. Реакция преципитации в геле по Оухтерлони  
1 – лунки со сравниваемыми антигенами (периферические);  
2- полосы преципитации; 3 – пластинка с агаровым гелем;  
4- лунка с иммунной сывороткой*

Учет результатов: полосы преципитации образуются только в зоне эквивалентности, т.е. там, где все антитела связаны с антигеном. (Если в жидкой среде соединить эквивалентные количества реагентов, то в надсадочной жидкости

после формирования преципитата не будет свободных антигена и антител).

При изучении в РДП различных антигенов возможны три варианта результата реакции (рис. 61,62,63).

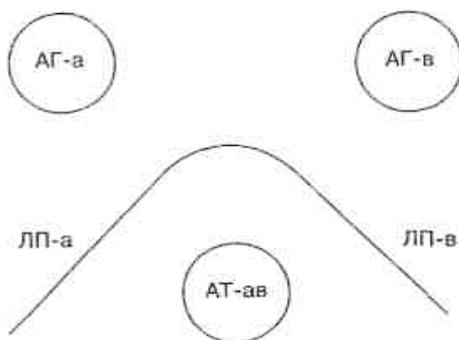


Рис. 61. 1-й вариант. Линии преципитации сливаются,

сравниваемые антигены идентичны:

Ag-1, Ag-2 — сравниваемые антигены;

At — антитела к сравниваемым антигенам; ЛП — линия преципитации

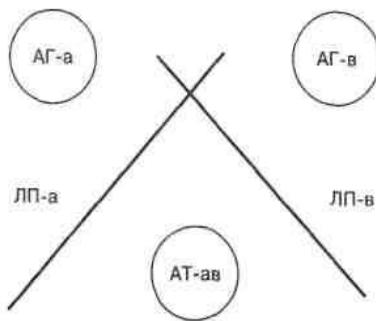
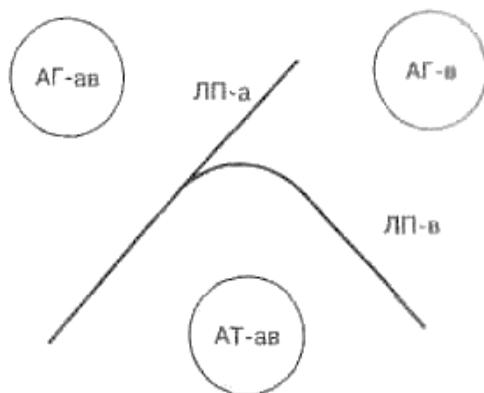


Рис. 62. 2-й вариант. Линии преципитации пересекаются — «реакция неидентичности», у сравниваемых антигенов нет гомологичных антигенных детерминант:

Ag-1, Ag-2 — сравниваемые антигены;

At — антитела к сравниваемым антигенам; ЛП — линия преципитации



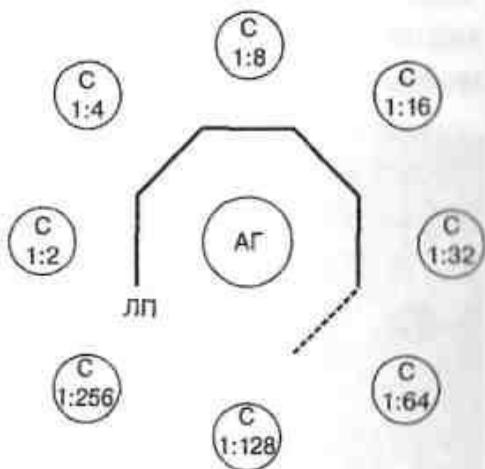
*Рис. 63. РДП. 3-й вариант. Линии преципитации частично сливаются, у сравниваемых антигенов гомологичные (общие) и гетерологичные детерминанты: Аг-ав, Аг-в — сравниваемые антигены; «в» — гомологичная (общая) антигенная детерминанта в сравниваемых антигенах; «а» — специфическая антигенная детерминанта антигена Аг-ав; Ат-ав — антитела к антигенам Аг-ав, Аг-в; ЛП-в — линия преципитации гомологичных антигенов «в»; ЛП-а — линия преципитации антигена «а» — «шпора»*

1. Реакция идентичности: слияние линий преципитации, относящихся к двум соседним антигенам (у сравниваемых антигенов гомологичные детерминанты — антигены оценивают как идентичные).

2. Реакция неидентичности: пересечение линий преципитации (у сравниваемых антигенов нет гомологичных антигенных детерминант).

3. Реакция неполной идентичности: неполное пересечение линий преципитации с формированием так называемой «шпоры». Такая картина возникает, когда у одного из антигенов помимо гомологичных есть и специфические детерминанты, которые второй антиген в составе своей молекулы не несет.

С помощью реакции диффузионной преципитации можно обнаруживать антитела в сыворотке крови и определять их титр. В этом случае в центральную лунку вносят известный растворимый антиген (бактериальный, вирусный), а в периферические — различные разведения исследуемой сыворотки крови (рис. 64).



*Рис. 64. РДП. Обнаружение антител в исследуемой сыворотке крови:  
 С 1:2...С 1:256 – разведения исследуемой сыворотки крови;  
 Ag - известный микробный антиген; ЛП-линия преципитации.  
 Титр сыворотки в данном случае составляет 1:64*

Чтобы полосы преципитации стали более выраженными, пластины обрабатывают солями кадмия: пластины с готовым гелем отмывают в физиологическом растворе и заливают 0,65%-м раствором сульфата кадмия. В результате через несколько минут полосы преципитации становятся более ярко выраженными (в несколько раз).

### **Контрольные вопросы**

1. В чем сущность феномена преципитации?
2. Какова техника постановки кольцевой РП и РДП?
3. Учет результатов РП.

## ТЕМА 17 РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

**Цель занятия:** ознакомить студентов с сущностью и принципом постановки реакции связывания комплемента и назначение титрации компонентов.

**Материалы и оборудование:** антиген бактериальный, не обладающий антикомплемментарностью (единый бруцеллезный антиген для РА и РСК), иммунная сыворотка, освобожденная от комплемента и лишенная гемотоксичности (положительная бруцеллезная сыворотка), комплемент, взятый в рабочей дозе, эритроциты барана, отмытые в физрастворе, в виде 2—3%-ной взвеси в физрастворе, гемолитическая сыворотка, физраствор pH 7,2 — 7,4, градуированные пипетки, пробирки, цилиндры, стаканы или колбы для разведений, центрифуга, водяная баня, термостат, штативы, схемы и таблицы постановки РСК.

Реакция связывания комплемента (Борде, Жанту, 1901) основана на том, что взаимодействие антигена с соответствующим специфическим антигеном происходит только при участии комплемента.

Реакция протекает в две фазы с участием двух систем: бактериальной и гемолитической. РСК относится к прямым двух-системным гетерологичным 5-компонентным реакциям (рис. 65).

Первая фаза реакции — специфическая, происходит при участии антигена (АГ) + антитело (АТ) + комплемент. Положительный результат реакции, наступающий в том случае, когда антитело соответствует антигену, характеризуется образованием специфического бактериального комплекса антиген — антитело с адсорбированием, или связыванием комплемента. Оставаясь невидимым, комплекс не вызывает каких-либо внешних изменений той среды, в которой он образовался.

Отрицательный результат РСК имеет место при отсутствии специфического средства между антигеном и антителом в сыворотке и характеризуется сохранением свободного активного комплемента.

Первая фаза реакции может происходить при различных температурных условиях: в термостате при 37 °С, при комнатной температуре 20 °С или в леднике при 0 — 8 °С. При понижении температуры процесс связывания комплемента происходит медленнее.

Вторая фаза реакции называется индикаторной, она устанавливает, произошла ли адсорбция комплемента в первой фазе реакции или последний остался свободным и протекает при участии специфической гемолитической системы: гемолитическая сыворотка + соответствующие эритроциты. Вторая фаза реакции протекает при температуре 37 °С в термостате.

Реакция считается положительной, если отсутствует гемолиз в гемолитической системе. При отсутствии свободного активного комплемента гемолиз эритроцитов под действием специфических гемолизин не происходит.

Реакция отрицательная, если имеет место гемолиз, обусловленный наличием несвязанного активного компонента, оставшегося свободным от 1-й фазы реакции.

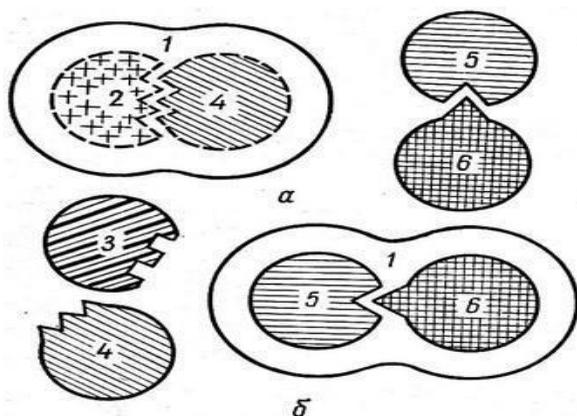


Рис. 65. Схема реакция связывания комплемента.

*а* – положительная; *б* – отрицательная.

*1* – комплемент, *2* – сыворотка больного, *3* – сыворотка здорового, *4* – антиген, *5* – гемолитическая сыворотка, *6* – эритроциты барана

РСК может быть использована в двух направлениях:

1) для обнаружения в сыворотке больного специфических антител при помощи известных антигенов (серодиагностики бактериальных, вирусных, риккетсиозных, спирохетозных и других инфекций, диагностики аутоиммунных состояний и др.);

2) для выявления и идентификации в исследуемом материале специфического антигена (коллоидного или корпускулярного) при тех же заболеваниях с помощью иммунной сыворотки, содержащей специфические антитела.

Накануне основного опыта готовят необходимые ингредиенты реакции, посуду и др.

В реакции могут быть использованы эритроциты любых лабораторных животных и человека. Однако преимущественное распространение получили эритроциты барана. Их получают путем пункции яремной вены здорового животного в возрасте от года до 5 лет. Кровопускание у баранов можно производить не чаще одного раза в 10 дней до 200 мл в течение 1 — 1,5 года, после чего животных заменяют.

В области яремной вены выстригают шерсть и место прокола дезинфицируют. Голову барана отгибают назад и в бок. На шею животного накладывают жгут, из набухшей вены толстой иглой берут кровь в стерильную колбу с бусами, которую затем встряхивают в течение 5 — 6 мин для дефи-

бринирования крови с целью предупреждения свертывания, после чего фильтруют через два слоя марли и центрифугируют при 1500 — 2000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант (плазму) отсасывают, а остаток эритроцитов отмывают 2 — 3 раза с пятью объемами физраствора. Последняя промывная жидкость должна быть бесцветной. В реакции применяется 2,5 — 3%-ная взвесь эритроцитов, которую готовят из осадка отмытых эритроцитов (1 мл эритроцитов суспендируют в 40 или 33 мл физраствора). На холоде при 4 °С эритроциты могут сохраняться в течение 6—7 дней. Для сохранения их на более длительные сроки прибегают к консервированию.

Гемолитическую сыворотку получают путем 3—4-кратной внутривенной иммунизации кролика 50%-ной взвесью эритроцитов барана в количестве 2 — 5 мл с промежутками 2 — 3 дня. На шестой-седьмой день после окончания иммунизации производят забор небольшого количества крови и проверяют активность сыворотки (титр ее должен быть не менее 1:1200). При этом титре и выше производят тотальное кровопускание. Полученную сыворотку прогревают при 56 °С в течение 30 мин, для консервации прибавляют до 0,5% сухой борной кислоты, титруют, разливают по ампулам и хранят в холодильнике при 4 °С. В настоящее время биофабрики выпускают стандартные сухие препараты гемолитической антибараньей сыворотки с титром 1:1200, 1:1500 и т.д. Сухие гемолитические сыворотки разводят стерильным физраствором согласно инструкции и используют в работе.

В качестве комплемента используют свежую сыворотку, полученную от трех — пяти морских свинок, или сухой препарат комплемента, выпускаемый биофабриками. Для сохранения комплемента в свежей сыворотке морских свинок на срок до шести месяцев его консервируют путем добавления на каждые 10 мл сыворотки 0,4 г борной кислоты и 0,5 г сернокислого натрия. Сухой (лиофилизированный) комплемент сохраняет активность в течение нескольких лет.

Для постановки реакции комплемент разводят 1:10 (1 мл сыворотки морских свинок + 9 мл физраствора). Перед каждой постановкой РСК следует проводить титрование комплемента. Титрование проводят в том объеме, в котором в последующем проводится главный опыт.

Антигеном в РСК служат убитые бактериальные, вирусные и другие биологические корпускулярные агенты, а также полученные из них коллоидные антигены. Антигены для РСК не должны обладать антикомплемментарными свойствами. Поэтому их титруют в присутствии комплемента. Допускается употребление антигена, подавляющего активность комплемента не более чем на 30%. Антиген не должен обладать гемотоксичными свойствами. Двойная доза антигена не должна давать даже следов гемолиза рабочего объема 3%-ной взвеси бараньих эритроцитов.

Полученную сыворотку инактивируют прогреванием в зависимости от вида животных при 56 — 61 °С в течение 30 мин. В результате этого разрушают комплемент и добиваются необходимой для реакции стабилизации

коллоидов сыворотки. Инактивированную сыворотку можно хранить в течение 5 — 6 дней при 4 °С. При необходимости более длительного хранения сыворотки (2 — 3 недели) после инактивации к ней добавляют 2% сухой борной кислоты. Длительно хранившиеся сыворотки перед постановкой РСК вновь инактивируют.

Схема проведения РСК предусматривает постановку ряда опытов в последующей очердности:

1. Титрование и определение рабочей дозы гемолитической сыворотки (гемолизина).
2. Титрование и определение рабочей дозы комплемента.
3. Титрование иммунной сыворотки на антикомплемментарность.
4. Основной опыт РСК.

Для РСК вначале используют реагенты, каждый в объеме 1 мл, а так как в реакции участвуют 5 компонентов, то общий объем равняется 5 мл. В дальнейшем снижают объем реагентов, вводимых в реакцию. Вместо полного объема (5 мл) реакцию ставят в объеме 2,5, 1,25, 1,0, 0,5 мл, а реагенты берут соответственно — 0,5, 0,25, 0,2, 0,1 мл.

Титрование проводят при получении новой серии сыворотки, а также с целью определения пригодности ее при длительном хранении — 1 раз в 3 — 4 мес.

Для определения титра гемолизина ставят реакцию гемолиза с падающими разведениями сыворотки и комплементом, взятым в разведении 1:10 (табл. 4).

Т а б л и ц а 4 - Схема разведения гемолитической сыворотки

Компонент	Пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Гемолизин в разведении 1:10	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физраствор рН 7,3	1,8	3,9	7,9	9,9	11,9	14,9	17,9	20,9
Разведение гемолизина	1:100	1:400	1:800	1:1000	1:1200	1:1500	1:1800	1:2100

Титр гемолизина — максимальное его разведение, которое способно растворить в течение 1 ч при 37 °С 3%-ную взвесь эритроцитов в присутствии комплемента, взятых в равных объемах (табл. 5).

Т а б л и ц а 5 - Определение титра гемолизина

	Разведение гемолизина и дозы реагентов, мл						Контроль		
	1:100	1:400	1:800	1:1000	1:1200	1:1400	ГС	к	э
Гемолизин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
Эритроциты барана, 3% взвесь	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Комплемент в разведении 1:10	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-
Физраствор	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
Инкубация при 37 °С в течение 45- 60 минут (через 30 мин встряхнуть пробирки)									
Результат	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-

О б о з н а ч е н и е : ++++ — полный гемолиз;  
 ++ — неполный гемолиз;  
 - — отсутствие гемолиза.

К о н т р о л ь : ГС — контроль гемолитической сыворотки на гемотоксичность; К — контроль комплемента на гемотоксичность; Э — контроль эритроцитов на стабильность в физрастворе.

В указанном опыте титром гемолизина будет разведение сыворотки 1:1200 (полный гемолиз). Для РСК гемолизин применяют в рабочей дозе, равной удвоенному или утроенному титру сыворотки (при титре сыворотки 1:1200 разведение рабочей дозы будет 1:1400 - 1:600).

Гемолитическая система, или гемосистема, представляет смесь эритроцитов барана и гемолитической сыворотки. Готовят ее в день постановки опыта. Для этого к объему 3%-ной взвеси эритроцитов в колбе быстро добавляют равный объем гемолизина, взятого в рабочем разведении. Смесь выдерживают при 37 °С в термостате 30 мин для сенсбилизации эритроцитов и после этого используют в работе.

Гемосистема является цветным индикатором на комплемент.

Для определения дозы комплемента, в которой его следует применять в реакции, проводят титрование.

В дополнительном ряду пробирок приготавливают разведения комплемента. Затем их разливают по 0,1 мл в опытные пробирки, в которые до-

бавляют физраствор и гемосистему по 0,2 мл. Штатив с пробирками встряхивают и выдерживают в термостате при 37 °С 1 ч (табл. 6).

Т а б л и ц а 6 - Титрование комплемента (в объеме 0,3 мл)

Компонент	Разведения комплемента и дозы реагентов, мл							
	1:10	1:15	1:20	1:25	1:30	1:40	1:60	1:80
Комплемент	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физраствор	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Гемосистема (сенсibilизированная)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Инкубация при 37 °С в течение 1 ч								
Результат	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-

Результаты оценивают по плюсовой системе. Титр комплемента устанавливают по пробирке с минимальным содержанием комплемента, в которой наблюдается полный гемолиз. В табл. 6 это пробирка с разведением 1:40. В качестве рабочей дозы берут предыдущую пробирку с более высоким содержанием, примерно на 25-30%. В данном опыте это будет пробирка с разведением 1:30.

Для определения рабочей дозы антигена, т.е. максимального количества, в котором он сам по себе не проявляет антикомплементарного действия, проводят его титрование. С этой целью в дополнительный ряд пробирок переносят по 0,1 мл каждого разведения антигена. Затем в каждую пробирку добавляют по 0,1 мл комплемента, взятого в рабочей дозе, и по 0,1 мл физраствора. Пробирки встряхивают и инкубируют в термостате при 37 °С 1 ч, после чего во все пробирки добавляют по 0,2 мл сенсibilизированной гемосистемы. Пробирки вновь встряхивают и термостатируют при 37 °С еще 1 ч. Затем учитывают результаты и определяют, при каком максимальном количестве антигена отмечается гемолиз. Это количество представляет собой «растворяющую» дозу антигена, которую и принимают за его титр (табл. 4).

Для титрования сыворотки используют рабочую дозу антигена, которая в два раза меньше титра АГ.

Исследуемые сыворотки животных и человека в больших концентрациях могут обладать антикомплементарным действием. Поэтому возникает необходимость определять, какие разведения сыворотки лишены антикомплементарных свойств.

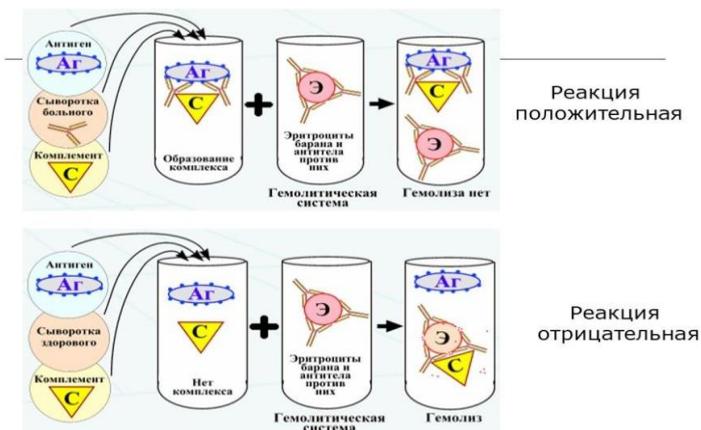


Рис. 66. Реакция связывания комплемента

### Основной опыт РСК

Оттитрованные ингредиенты (антиген, комплемент, гемолитическая сыворотка) разводят физраствором таким образом, чтобы рабочая доза их содержалась в объеме 0,1—0,5 мл. Одновременно готовят 2,5 — 3%-ную взвесь эритроцитов.

РСК можно ставить и в других объемах ингредиентов, например, в объемах по 0,5 мл соответствующих компонентов. Каждую исследуемую пробу сыворотки крови 1:10 инактивируют и разливают в две пробирки по 0,1–0,5 мл, в штативы ставят два ряда пробирок на каждую сыворотку. Дополнительно ставят еще по две пробирки с нормальной и позитивной сыворотками для контроля. Во все пробирки первых рядов сывороток добавляют по 0,1—0,5 мл антигена, во вторые ряды (безантигенный ряд) по 0,1 — 0,5 мл физраствора, затем во все пробирки обоих рядов вносят комплемент по 0,1 — 0,5 мл. Встряхивают и помещают в водяную баню на 20–40 мин (37–38 °С) для хода реакции в бактериолитической системе. После этого во все пробирки добавляют гемосистему (гемолизин и взвесь эритроцитов барана по 0,1 — 0,5 мл каждого), встряхивают и снова ставят в водяную баню на 15 — 20 мин.

Учет результатов проводят дважды: первый предварительный — сразу после водяной бани, второй - через 18 — 20 ч. При первом учете обращают внимание на пробирки второго ряда и пробирки с нормальной сывороткой и антигеном (первый ряд), где должен быть гемолиз. В пробирках с позитивной сывороткой и антигеном гемолиз отсутствует (эритроциты во взвешенном состоянии, жидкость мутная). Окончательный учет проводят на следующий день.

Показания реакции с исследуемыми сыворотками считаются достоверными, если в пробирках с позитивной сывороткой и антигеном нет гемолита при полном гемолитизе в пробирках с этой сывороткой без антигена и во всех пробирках с отрицательной сывороткой.

### Основной опыт РСК

Фаза реакции	Ингредиенты, участвующие в реакции	Номера пробирок				
		1, опыт	2, КС	3, КА	4, КГ	5, КК
1.	1. Исследуемая сыворотка, мл	0,5	0,5	-	-	-
	2. Антиген в раб. дозе, мл	0,5	-	0,5	-	-
	3. Комплемент в раб. дозе, мл	0,5	0,5	0,5	-	0,5
	4. Изотонический раствор, мл	-	0,5	0,5	1,5	1,0
Инкубация при 37 С в течение 30 мин						
2.	5. Гемолитическая система, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Инкубация при 37 С в течение 30 мин						
Результат:						
Условные обозначения:		(+) задержка гемолиза;		(-) гемолиз.		

*Рис. 67. Основной опыт РСК*

Результат РСК принято выражать в плюсах в зависимости от его интенсивности:

++++ - полная задержка гемолиза, полное осаждение эритроцитов, результат положительный;

+++ — задержка гемолиза хорошо выражена, имеется значительный осадок эритроцитов, жидкость над осадком слабо-розового цвета, результат положительный;

++ — частичная задержка гемолиза, имеется незначительный осадок эритроцитов, результат сомнительный;

+ — слабая задержка гемолиза, незначительный осадок, жидкость интенсивно окрашена в красный цвет, результат отрицательный;

- (минус) - полный гемолиз (лаковая кровь), отсутствие осадка, результат отрицательный.

### *Контрольные вопросы*

1. Сущность РСК, принцип постановки.
2. Принцип титрования комплемента и назначения гемолитической системы.
3. Что собой представляют гемолизин, комплемент, как их получают?
4. Что означает рабочий титр гемолизина?
5. Объяснить необходимость инактивации исследуемых в РСК сывороток.
6. Суть методики постановки РДСК и других модификаций РСК.

## ТЕМА 18 ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ. РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

**Цель занятия:** ознакомить студентов с различными вариантами ИФА, с сущностью и методикой постановки реакции нейтрализации (РН) применяемыми в микробиологической практике.

**Материалы и оборудование:** предметные стекла, полистироловые микропанели с плоским дном, автоматические пипетки объемом от 50 до 200 мкл, промывочное устройство, считывающее устройство, световой микроскоп, исследуемый патматериал, исследуемые сыворотки крови, диагностические иммунные сыворотки, бактериальные диагностикумы, иммунопероксидазные конъюгаты, субстрат диаминобензидинтетрахлорид (3,3 ДАБ•4НС1), культуральная жидкость, физиологический раствор, стерильные пробирки и градуированные пипетки на 1, 2, 5 мл, шприцы с иглами на 1 или 2 мл, воронки, фильтровальная бумага, штативы, термостат, резиновые груши, дезинфицирующий раствор, таблицы по схеме.

### Иммуноферментный метод (ИФА)

Широко используется как серологический метод выявления антигенов и антител и является перспективным аналитическим методом, обладающим высокой чувствительностью, достаточной специфичностью, хорошо коррелирующим с результатами, полученными при использовании других серологических методов.

Основными направлениями ИФА являются:

ранняя диагностика инфекционных болезней;

проведение массовых эпизоотологических обследований в целях своевременной профилактики животных от ряда инфекционных заболеваний, наносящих значительный ущерб животноводству (бруцеллез, лейкозы, микоплазмозы, ящур и др.);

определение иммунологического статуса у животных и изучение эффективности применения вакцин;

контроль качества биопрепаратов и соблюдение норм на предприятиях биологической промышленности;

контроль качества продуктов животноводства и сырья животного происхождения на предприятиях мясной и мясоперерабатывающей промышленности (трихинеллез, сальмонеллез, пестициды, антибиотики и другие вещества).

В микробиологической практике наибольшее распространение ИФА получил при определении антител против бактериальных антигенов, таких, как О-антиген сальмонелл, О-антиген и экзотоксин холерного вибриона, О-антигенов бруцелл, М-антиген белка стрептококков, антигенов микоплазм, риккетсий, столбнячного и дифтерийного экзотоксинов и т.д.

Иммуноферментный анализ аналогичен МФА (методу флуоресци-

рующих антител), но в качестве метки антител используют фермент пероксидазу хрена, кислую и щелочную фосфатазу, глюкозооксидазу, галактозидазу, дегидрогеназу, люциферазу и др., которые при добавлении к реагирующим компонентам соответствующего субстрата образуют окрашенные продукты реакции. Чаще всего для метки применяют пероксидазу хрена, так как ее молекулярная масса (40000) меньше молекулярной массы щелочной фосфатазы (100000), галактозидазы (150000) и др., что способствует лучшему проникновению. Пероксидаза устойчива при гистологической обработке. Учет результатов реакции проводят под обычным световым, люминесцентным и электронным микроскопом или с помощью спектрофотометра.

Для идентификации бактериальных антигенов ИФА применяют в двух вариантах: гистохимическом и твердофазном.

### **Гистохимический вариант ИФА, или иммунопероксидазная реакция**

Данный метод проводят в прямом и непрямом вариантах. При прямом иммунопероксидажном тесте используют антибактериальные конъюгаты, т.е. антитела против определенных бактериальных антигенов, меченные ферментом. Такие конъюгаты обычно готовят на предприятиях биологической промышленности.

Материалом для выявления могут служить, мазки-отпечатки из различных органов, мазки из культур, гистосрезы, мазки крови. Препараты в течение 10 мин фиксируют охлажденным ацетоном (-10 — -20 °С), подсушивают на воздухе и наносят на них антибактериальный конъюгат в рабочем разведении. Инкубируют 1—2 ч во влажной камере (чашки Петри с фильтровальной бумагой, смоченной водой) при 37 — 38 °С, затем препарат тщательно промывают (в течение 15 мин) физиологическим раствором, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. В дальнейшем на препарат наносят проявляющий раствор — диаминобензидинтетрахлорид (3,3 ДАБ•4НС1). Для приготовления субстрата 25 мг 3,3 ДАБ•4НС1 растворяют в 100 мл 0,05 М трис-буфера pH 7,5 или в лимоннокислом буфере pH 5,0 (0,05 М лимонная кислота, нейтрализованная 0,05 М уксуснокислым аммонием). Далее 25 мл раствора 3,3 ДАБ•4НС1 смешивают с 3 мл 0,5%-ной НО (готовят *ex tempore!*). Субстрат выдерживают на препарате 5 — 10 мин, промывают 10—15 мин физиологическим раствором и споласкивают дистиллированной водой.

В положительных случаях, т.е. при наличии антигена в исследуемом препарате, после нанесения иммунопероксидажного конъюгата образуется комплекс антиген — антитело, меченный ферментом. После нанесения на препарат раствора субстрата последний под действием фермента разлагается, образуя цветной продукт ферментативной реакции, хорошо видный в световом микроскопе.

Результаты учитывают с помощью светового микроскопа. Диаминобензидин тетрахлорид под действием пероксидазы разлагается, образуя продукт реакции голубого цвета, который быстро переходит в коричневый. В

препарате видны или диффузное желто-коричневое окрашивание, или гранулы коричнево-черного цвета. В контрольных препаратах окрашивание не обнаруживают.

Сущность непрямого варианта заключается в том, что он проводится в два этапа: соединение антигена с соответствующей немеченной специфической сывороткой и затем присоединение к этой смеси антивидового иммунопероксидазного конъюгата (антитела против глобулинов определенного вида животных, меченные ферментом). Учет результатов проводят, как и в первом случае, в световом микроскопе.

### Твердофазный вариант ИФА

Впервые был предложен в 1972 г. Энгваллом и Перлманном. Он успешно используется как для обнаружения бактериальных антигенов, так и специфических антител.

Метод твердофазного ИФА основан на применении антител или антигенов, фиксированных на нерастворимых носителях. В качестве носителей применяют стеклянные или нейлоновые шарики, полистироловые пробирки и микропанели. В последнее время широкое распространение получили полистироловые микропанели. Применение их и автоматизация процесса постановки и учета реакции позволяют за короткое время исследовать большое число образцов сывороток на наличие антител и другого материала на наличие бактериального антигена (рис. 68).

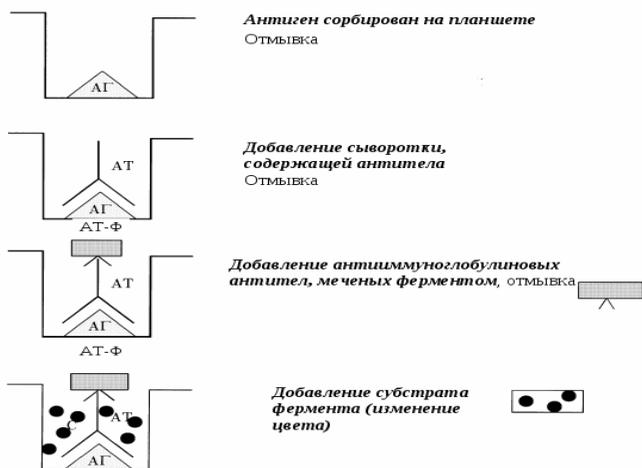


Рис. 68. Принцип выявления антител в твердофазном ИФА

Для выявления антигенов с помощью данного метода наиболее часто используют метод двойных антител (сэндвич-метод). Для этого лунки полистироловых микропанелей сенсibiliзируют гамма-глобулином, выделенным из специфической к исследуемому антигену сыворотки. Оптимальной концентрацией считается такая, при которой уровень оптической плотности положительных образцов в 5—10 раз превышает уровень отрицательных образцов. Чаще всего используют концентрацию 10 — 30 мкг/мл.

В лунки микропанелей вносят по 0,2 мл гамма-глобулина в нужной концентрации в натрия карбонатном буфере с рН 9,6. Микропанели инкубируют в течение 1 ч при 37 °С и оставляют на ночь при 4 °С. На следующий день из лунок удаляют раствор иммуноглобулинов, микропанели промывают 3 раза по 5 мин калийфосфатным буфером с рН 7,4, содержащим 0,05% твина-20. В лунки вносят по 0,2 мл раствора, содержащего исследуемый антиген, и инкубируют при 37 °С 1 ч. В контрольные лунки вносят заведомо известные положительный и отрицательный антигены. Микропанели промывают 3 раза по 5 мин калийфосфатным буфером с рН 7,4, содержащим 0,06% твина-20. Затем в лунки вносят по 0,2 мл раствора субстрата: ортофенилендиамина (ОФД) или 5-аминосалициловой кислоты (для пероксидазы). Инкубируют в темноте при комнатной температуре 5 — 30 мин. Реакцию останавливают добавлением 0,05 мл 2 н. серной кислоты (для пероксидазы) и 3 М NaOH (для щелочной фосфатазы).

Реакцию учитывают визуально по разности в окраске опытных и контрольных образцов или колориметрически при длине волны 490 нм (для пероксидазы) или 405 нм (для щелочной фосфатазы).

При использовании субстрата ортофенилендиамина положительные образцы имеют оранжево-коричневую окраску, а при применении 5-аминосалициловой кислоты — интенсивно-коричневую, контроль либо совсем не окрашен, либо окрашен в слабо-желтый цвет. При использовании щелочной фосфатазы опытные образцы окрашены в желтый цвет.

За положительный результат принимают превышение оптической плотности опытных образцов над контрольными в 5—10 раз.

Для выявления антител в ячейках полистироловых панелей фиксируют антиген аналогично описанному выше (как и для антител). Затем добавляют сыворотку, в которой предполагается наличие антител, оставляют на контакт, промывают и добавляют фермент — меченный антиглобулин, содержащий антитела к глобулинам первой сыворотки. Он фиксируется на комплексе антиген — антитело. Количество прикрепленного конъюгата измеряют после добавления субстрата (проявляющего раствора). Субстрат разлагается под действием фермента и образует цветной продукт.

### **Реакция нейтрализации (РН)**

Предложена П. Районом в 1922 г. как реакция флокуляции. В ее основе лежит взаимодействие микробного токсина (антигена) и антител — антитоксинов, в результате чего смесь в пробирке мутнеет с последующим

просветлением и выпадением осадка. В настоящее время эта реакция используется в ветеринарной практике как реакция нейтрализации по Эрлиху (с биопробой) в двух вариантах:

1. С целью выявления, идентификации и определения титра антител. В этом случае в качестве известного компонента используют стандартный микробный токсин.

2. Для установления наличия, идентификации и определения серотипа возбудителя заболевания и изучения его антигенов. В этом варианте применяют известную специфическую сыворотку (антитоксин).

Сущность реакции нейтрализации заключается в способности гомологичных антител иммунной сыворотки подавлять (нейтрализовать) инфекционные свойства возбудителя болезни или продуктов его жизнедеятельности.

РН характеризуется специфичностью, чувствительностью, способностью установить количественные соотношения реагентов реакции, она играет ведущую роль в диагностике бактериальных токсикоинфекций. В микробиологической практике РН в основном применяется для определения вида или типа токсигенных микроорганизмов, таких, как возбудители анаэробной энтеротоксемии, ботулизма, злокачественного отека и др.

Способность микроба продуцировать токсин называется токсигенностью, а это один из важнейших показателей вирулентности. В организме в ответ на образование и воздействие токсина вырабатываются специфические антитела — антитоксины. Они способны нейтрализовать ядовитое действие возбудителя при токсических инфекциях.

Техника постановки РН для выявления токсина *Cl. perfringens* при диагностике анаэробной энтеротоксемии не сложна, идентична в случае ее использования при других заболеваниях и заключается в следующем.

Патологический материал или микробную культуру вначале проверяют на наличие токсина. Для этого исследуемый материал (содержимое тонкого отдела кишечника или фекалии) разводят равным (1:1) или двойным (1:2) количеством физиологического раствора (в зависимости от густоты), экстрагируют при комнатной температуре в течение 1 ч, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и центрифугируют 20 — 30 мин при 5000 об/мин и опять фильтруют через обычный бумажный фильтр. Культуральную и перитонеальную жидкость фильтруют без указанной предварительной обработки. Полученные фильтраты следует немедленно (в виду быстрого разрушения токсинов) использовать для обнаружения в них токсина *Cl. perfringens*. Оставшийся материал помешают в специальную посуду, закрывают резиновыми пробками и хранят при температуре не выше +4 °С до окончания экспертизы. Наличие токсина и его типовую принадлежность выявляют при помощи биологической пробы на белых мышах, морских свинках и кроликах.

Для определения в материале токсина полученный фильтрат вводят внутривенно или внутрибрюшинно по 0,5 мл белым мышам (массой 16—18 г) или внутривенно кроликам (массой 1,5 — 2,0 кг) в дозе 1,0 — 1,5 мл. Кон-

трольным животным вводят такое же количество материала, но прокипяченного на водяной бане в течение 20 — 30 мин. При наличии в исследуемом материале токсина *Cl. perfringens* гибель животных наступает уже через 4 — 6 ч, в зависимости от его количества. Контрольные животные остаются живыми. Наблюдение за животными ведут в течение суток.

После обнаружения токсина приступают к постановке РН, компонентами которой являются: культура (центрифугат) или фильтрат фекалий в качестве антигена, типоспецифические сыворотки, содержащие антитела — антитоксины, чувствительные биологические объекты (белые мыши, кролики, морские свинки).

Диагностические антитоксические сыворотки *Cl. perfringens* типов А, В, С, Д, Е представляют собой нативные сыворотки крови овец, гипериммунизированных антигенами соответствующего типа *Cl. perfringens*. Диагностические сыворотки перед использованием разводят физиологическим раствором до содержания 10 антитоксических единиц (АЕ) в 1 мл и в разведенном виде применяют для постановки реакции нейтрализации токсинов. За 1 АЕ принимается то минимальное количество сыворотки, которое нейтрализует 100 ДЛМ (минимальная доза — количество культуры (центрифугата), которое вызывает гибель мышей (соответствующего токсина).

Для определения типа основного летального токсина в пять пробирок разливают исследуемый материал в объеме 1,5 мл и добавляют по 1,5 мл типоспецифической сыворотки, предварительно разведенной до 10 АЕ. В первую пробирку — сыворотку типа А, во вторую — типа В, в третью — типа С, в четвертую — сыворотку типа Д, в пятую, типа Е, в шестую — 1,5 мл физраствора. Смесь выдерживают в течение 30 — 45 мин при 37 °С в термостате. Содержимое каждой пробирки вводят внутривенно или внутрибрюшинно белым мышам или внутрикожно по 0,2 мл морским свинкам и кроликам. Для каждой сыворотки используют отдельный шприц. Наблюдение за животными ведут в течение 48 ч.

Результаты реакции учитывают по гибели белых мышей или образованию некроза у опытных и контрольных морских свинок (кроликов).

Животные, получившие смесь токсина с гомологичной антитоксической сывороткой, остаются живыми. У морских свинок и кроликов некроз не развивается. Учет результатов РН проводят в соответствии с табл. 7.

При постановке РН по второму варианту, когда исследованию подлежит иммунная сыворотка, вначале готовят последовательные разведения сыворотки на изотоническом растворе натрия хлорида, а затем в каждую пробирку с соответствующим разведением сыворотки вносят постоянную дозу токсина в равном объеме. Смесь инкубируют при 37 °С в течение 30 — 45 мин, а затем инъецируют лабораторным животным.

Т а б л и ц а 7 - Схема определения типа возбудителя *Cl. Perfringens*

Тип <i>Cl. perfringem</i>	Токсин в исследуемом материале	Антитоксическая сыворотка				Контроль
		А	С	Д	Е	
А	Альфа	-	+-	+-	+-	+
В,С,Е	Бета	+	-	+	+	+
Д	Эпсилон	+	+	-	+	+
Е	Йота	+	+	+	-	+

П р и м е ч а н и е . (+) — белые мыши пали, у морских свинок и кроликов некроз на месте введения;

(-) — белые мыши живы, у морских свинок и кроликов некроз отсутствует;

(+-) — результат не учитывается.

### ***Контрольные вопросы***

1. Сущность и диагностическое значение ИФА.
2. Техника постановки прямого иммунопероксидазного теста.
3. Техника постановки непрямого иммунопероксидажного теста.
4. Техника постановки «сэндвич-метода» при определении антигена.
5. Техника постановки «сэндвич-метода» при определении антител.
6. Сущность, назначение и практическое применение РН.
7. Техника постановки РН для определения типа токсина в исследуемом материале.
8. Техника постановки РН для определения антитоксинов в сыворотке крови.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микробиология: учеб. пособие для вузов / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков, А.И. Ибрагимова. 4-е изд., стер. СПб.: Лань, 2021. 496 с. Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – Режим пользования: URL: <https://e.lanbook.com/book/171851>
2. Гусев М.В Микробиология. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 464 с.
3. Колычев Н.М., Госманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология. М.: КолосС, 2003. 432 с.
4. Костенко Т.С. Практикум по ветеринарная микробиология и иммунология. М.: Колос, 2001. 344 с.
5. Кисленко В.Н. Практикум по ветеринарная микробиология и иммунология. М.: КолосС, 2005. 232 с.
6. Кисленко В.Н., Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология. Ч. 1. Общая микробиология. М.: КолосС, 2006. 183 с.
7. Кисленко В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Практикум. СПб.: Изд-во «Лань», 2012. 368 с.
8. Петрищева Т.Ю. Практикум по общей микробиологии: учеб. пособие. Елец: ЕГУ им. И.А. Бунина, 2022. 89 с. Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – Режим пользования: URL: <https://e.lanbook.com/book/331916>
9. Ромейко Л.В. Общая микробиология и микробиология: лабораторный практикум: учеб. пособие. Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2022. 173 с. Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – Режим пользования: URL: <https://e.lanbook.com/book/314003>
10. Сахарова О.В., Сахарова Т.Г. Общая микробиология и общая санитарная микробиология. 3-е изд., стер. СПб.: Лань, 2023. 224 с. Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – Режим пользования: URL: <https://e.lanbook.com/book/346448>

Учебное издание

Рябичева Ангелина Евгеньевна  
Андрюшина Надежда Сигизмундовна

## **ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ**

учебно-методическое пособие  
для проведения практических занятий и самостоятельной работы  
по дисциплине «Общая микробиология и общая санитарная микробиология»  
студентами, обучающимися по направлению  
19.03.03 «Продукты питания животного происхождения»  
профиль «Технология мяса и мясных продуктов»

Редактор Лебедева Е.М.

---

Подписано к печати 30.11. 2023 г. Формат 60x84. 1/16.

Бумага печатная Усл.п.л. 7,84. Тираж 25 экз. Изд. №7606

---

Издательство Брянского государственного аграрного университета  
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ