

1 МОДУЛЬ. МИКРОБИОЛОГИЯ

1. Предмет и задачи МБ

Микробиология – это наука о морфологии, физиологии, генетике, экологии и эволюции микроорганизмов (живых организмов с размерами до 0,1 мм)

Предмет изучения МБ – МО – мельчайшие невидимые одноклеточные и многоклеточные существа, которые по многообразию не уступают представителям животного или растительного царств

К МО относят три типа организации живого:

- *доклеточные формы*: вирусы, бактериофаги, прионы;
- *прокариоты*: бактерии и археи;
- *некоторые эукариоты*: микроскопические животные, растения и грибы до 0,1 мм.

Задачи МБ:

- Изучение биологии патогенных (болезнетворных) и нормальных для человека микробов.
- Изучение роли микробов в возникновении, развитии инфекционных (заразных) болезней и формировании иммунного ответа макроорганизма ("хозяина").
- Разработка методов микробиологической диагностики, специфического лечения и профилактики (предупреждения) инфекционных болезней человека.

В зависимости от задач микробиологическая наука разделяется на:

- А) ОБЩУЮ МИКРОБИОЛОГИЮ – изучает наиболее общие закономерности, структуру, метаболизм, генетику, экологию микроорганизмов;
- Б) ТЕХНИЧЕСКУЮ МИКРОБИОЛОГИЮ - это разработка биотехнологий в промышленности, изучение процессов биокоррозии и биodeградации на промышленных предприятиях;
- В) СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННУЮ МИКРОБИОЛОГИЮ – это изучение процессов паразитирования между растениями и микроорганизмами и сельскохозяйственными животными;
- Г) ВЕТЕРИНАРНУЮ МИКРОБИОЛОГИЮ – изучает возбудителей различных заболеваний животных;
- Д) САНИТАРНУЮ МИКРОБИОЛОГИЮ – изучает санитарно-микробиологическое состояние объектов окружающей среды, пищевых продуктов и т.д.;
- Е) МЕДИЦИНСКУЮ МИКРОБИОЛОГИЮ – занимается изучением микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания человека.

2. Медицинская МБ и ее место в современной медицине

Медицинская микробиология – это наука о патогенных и условно-патогенных для человека микроорганизмах, их взаимодействии между собой и с окружающей средой.

Предметом изучения МЕДИЦИНСКОЙ МБ - являются болезнетворные (патогенные) и условно-патогенные для человека микроорганизмы, а также разработка методов микробиологической диагностики, специфической профилактики и этиотропного лечения вызываемых ими инфекционных заболеваний.

Месте МБ в современной медицине. Микробиология сочетает в себе основы как фундаментальной, так и прикладной науки. Для изучения микроорганизмов она использует методы других наук, прежде всего физики, биологии, биоорганической химии, молекулярной биологии, генетики, цитологии, иммунологии.

Как и всякая наука, микробиология подразделяется на общую и частную:

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

Частная микробиология изучает отдельных представителей микромира в зависимости от проявления и влияния их на окружающую среду, живую природу, в том числе человека. К частным разделам микробиологии относятся: медицинская, ветеринарная, сельскохозяйственная, техническая (раздел биотехнологии), санитарная.

Многочисленные открытия в области микробиологии, изучение взаимоотношений между макро- и микроорганизмами во второй половине XIX в. способствовали началу бурного развития иммунологии.

Иммунология является основой для разработки лабораторных методов диагностики, профилактики и лечения инфекционных и многих неинфекционных болезней, а также разработки иммунобиологических препаратов (вакцин, иммуноглобулинов, иммуномодуляторов, аллергенов, диагностических препаратов).

Современная медицинская микробиология и иммунология достигли больших успехов и играют огромную роль в диагностике, профилактике и лечении инфекционных и многих не инфекционных болезней, связанных

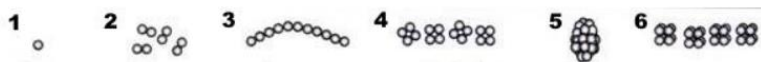
с нарушением иммунной системы (онкологические, аутоиммунные болезни, трансплантация органов и тканей и др.)

3. Основные морфологические формы бактерий и методы их изучения. Виды микроскопии

Основные морфологические формы:

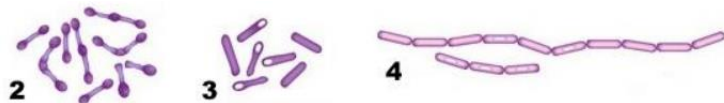
1. *Шаровидная форма*- кокки (размер = 1 мкм). По характеру расположения кокков делятся на:

- микрококки (одиночные) – *непатогенные*
- диплококки (сцепленные попарно);
- стрептококки (сцепленные в цепочку);
- тетракокки (сцепленные по 4) – *непатогенные*
- стафилококки (сцепленные беспорядочно в виде виноградной грозди).
- сарцины (сцепленные в пакеты по 8, 12) – *непатогенные*



2. *Палочковидные* (до 10 мкм) –

- ФОРМА: правильной формы (кишечная палочка) и неправильной булавовидной (коринебактерии)
- РАЗМЕР: наиболее мелкие (риккетсии);
- КОНЦЫ: обрезаны (сибиреязвенная бацилла)/закруглены (кишечная палочка)/заострены (прямые, обрубленные)/утолщенные (в виде булавы);
- РАСПОЛОЖЕНИЕ: слегка изогнутые – вибрионы (холерный вибрион)/беспорядочно/ под углом друг к другу (коринебактерии дифтерии)/цепочкой – стрептобактерии (сибиреязвенная бацилла)/попарно (диплобактерии/диплобациллы);
- Спорообразующие: бациллы (размер спор не превышает диаметр палочки)/клостридии (размер спор превышает диаметр палочки)
- Неспорообразующие (собственно бактерии) – не образуют спор



- 1) *энтеробактерии* – прямые, располагаются беспорядочно;
2) *коринебактерии* – попарно, буквой «V», на концах расширения с *волютином*;
3) *клостридии* – форма теннисной ракетки (на конце эндоспора);
4) *бациллы* – располагаются цепочками, образуют эндоспоры.

3. *Извитые формы* – спиралевидные бактерии, по характеру и количеству завитков делятся на:

- спираиллы – имеют вид штопорообразно извитых клеток с крупными завитками (хеликобактерии)
- спирохеты – тонкие длинные извитые бактерии, отличающиеся от спираилл более мелкими завитками и характером движений.



- 1) *вибрионы* – короткие, с одним изгибом (форма запятой);
2) *спирохеты* – длинные и тонкие, много изгибов;
3) *спираиллы* и *кампилобактерии* – длинные, с двумя-тремя изгибами;
4) *актиномицеты* – ветвятся по типу мицелия грибов.

4. *Ветвящиеся формы* (форма *ветвящейся нити*) – состоит из 1 клетки:

- бифидобактерии – имеют разветвление в виде буквы Y
- актиномицетов – в виде нитевидных разветвленных клеток, способные переплетаться, образуя мицелий

Методы изучения МО (лежат в основе микробиологической диагностики):

1. Микроскопический метод
2. Культуральный метод (бактериологическое/вирусологическое/микологическое исследования).
3. Биологический (выращивание в организме лабораторного животного)
4. Молекулярно-генетический (молекулярно-биологический)

5. Иммунодиагностика (серодиагностика, иммуноиндификация)
6. Кожно-аллергический (постановка аллергических проб для выявления инфекционной аллергии)

ВИДЫ МИКРОСКОПИИ:

- Световая:
 - ✓ *Иммерсионная* – изучение морфологических и тинкториальных (в окрашенном состоянии) свойств бактерий. Отличия от обычного: иммерсионный объектив (с подвижной головкой); конденсор (фокусирует лучи, линза под столиком); иммерсионное масло (кедровое, вазелиновое) – прозрачное и б/цв, в нее погружается линза для предотвращения рассеивания лучей
 - ✓ *Фазово-контрастная* – (больше контраста) изучение нефиксированных и неокрашенных препаратов в слое жидкости – исследование живых МО
 - ✓ *Темнопольная* – основана на явлении светорассеивания. Прямые лучи не попадают => МО кажутся ярко светящимися на темном фоне. Для нативных препаратов (живых МО)
 - ✓ *Люминесцентная* - изучение спонтанной флюоресценции микроорганизмов
 - ✓ *Электронная* - изучение ультраструктуры бактериальной клетки и морфологии вирусов

4. Прокариоты и их особенности

Микроорганизмы делят на клеточные (прокариоты – бактерии; эукариоты – грибы и простейшие) и неклеточные (вирусы, вироиды и прионы)

• Общие черты МО с другими организмами:

- 1) состоят из тех же химических элементов и имеют в структуре те же химические соединения (белки, липиды, углеводы, НК);
- 2) имеют те же механизмы обеспечения энергией и биохимические процессы (с некоторыми отличиями).

• Отличительные черты МО:

- 1) малые размеры: до 450 нм у вирусов, до 10 мкм у большинства бактерий, до 100 мкм у простейших и микроскопических грибов;
- 2) относительная простота строения;
- 3) повсеместное распространение;
- 4) превосходство биомассы МО над биомассой животных и растений;
- 5) высокие темпы размножения и адаптации к окружающей среде, генетическое разнообразие;
- 6) высокая активность метаболизма и его пластичность (разнообразие);
- 7) являются ключевым звеном круговорота веществ и энергии.

Признак	Прокариоты	Эукариоты
Ядро	Нуклеоид без гистонов, гаплоидный набор	Линейная ДНК, диплоидный набор;
Внехромосомные генетические элементы	Плазмиды, транспозоны	ДНК митохондрий
Деление	Бинарное (амитоз)	Митоз и мейоз
Мембранная система	Высокоорганизованных органелл <u>нет</u>	Высокоорганизованные мембранные и внемембранные органеллы
Рибосомы	70S	80S
Состав клеточной стенки	Пептидогликан	Целлюлоза, хитин, отсутствует
Эндоцитоз	Нет	Есть
Устойчивость к гамма-облучению	Очень высокая	Низкая
Анаэробизм	Факультативный и облигатный	Факультативный

* Нуклеоид с полиаминами

5. Бактерии. Определение. Принципы классификации бактерий: филогенетическая, нумерическая таксономия, геносистематика

Бактерии – это одноклеточные микроорганизмы, относящиеся к прокариотам, лишенные оформленного ядра и хлорофилла.

Систематика бактерий – это таксономическое положение бактерий, указывающее на их родство с другими бактериями

- Для филогенетической классификации микроорганизмов информативным показателем является генетическое родство. При этом учитывают размер генома, способность обмениваться генетической информацией (путем трансформации или конъюгации), состав нуклеотидных основ (соотношение пар

Г-Ц: А-Т), гомологии нуклеиновых кислот, определяемой методом молекулярной гибридизации. Предполагают, что гомология ДНК от 60 до 100% свидетельствует о принадлежности к одному и тому же виду, 40-60% – к разным родам одной семьи.

- Нумерическая таксономия признает равноценность всех признаков бактерий. Для ее применения необходимо иметь информацию о многих десятках признаков. Видовая принадлежность исследуемого микроорганизма устанавливается в случае максимального совпадения его признаков с признаками, описанными в определителях бактерий. При этом для всех бактерий учитывается частота встречаемости данного признака у данного вида бактерий. Для названия микроорганизмов используется латинская биномиальная Номенклатура, согласно которой первое слово обозначает род, второе вид.
- Геносистематика - это раздел систематики, предметом исследования которого являются генотипы, или генетические программы, созданные в процессе эволюции животного на Земле. Разница между феносистематикой и геносистематикой качественная, они принципиально отличаются объектами исследования.

6. Ультраструктура бактериальной клетки

Структурные компоненты бактериальной клетки делятся на обязательные и необязательные.

Обязательные компоненты:

- клеточная стенка
- цитоплазматическая мембрана
- цитоплазма с локализованными в ней рибосомами и ядерным аппаратом.

Необязательные структурные компоненты:

- капсула, микрокапсула
- внеклеточная слизь
- включения
- жгутики
- пили/ворсинки/фимбрии
- споры
- плазмиды

Снаружи клетка окружена **клеточной стенкой**, к ней прилегает **ЦПМ (плазмолемма)**. Она ограничивает цитоплазму, в которой располагаются: ядерный аппарат, рибосомы и различного рода включения. Помимо этих обязательных структур ряд бактерий образуют **споры**. Подвижные бактерии передвигаются с помощью **жгутиков**. Некоторые бактерии могут образовывать **капсулу**. Большинство бактерий на поверхности клеточной стенки несут **ворсинки** (по-другому их называют фимбрии или пили).

7. КС, ее функции. Строение КС Грам+ и Грам-

Клеточная стенка - это упругое ригидное образование, которое покрывает клетку снаружи.

Функции:

- придает клетке определенную форму и размеры;
- выполняет защитную функцию;
- является стабилизатором осмотического давления;
- участвует в процессах питания и размножения;
- в клеточной стенке располагается основной О-антиген (соматический);
- с клеточной стенкой связана способность к продукции эндотоксина.

Клеточная стенка покрывает бактериальную клетку снаружи ЦПМ, но располагается **под капсулой**, если капсула имеется.

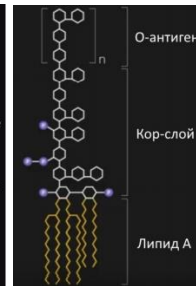
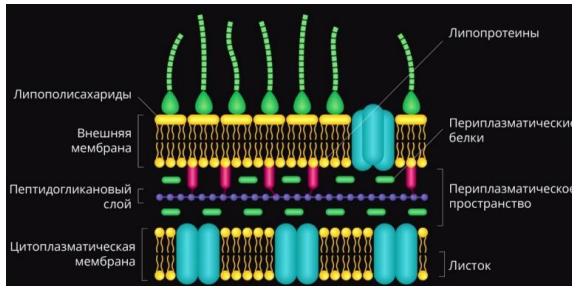
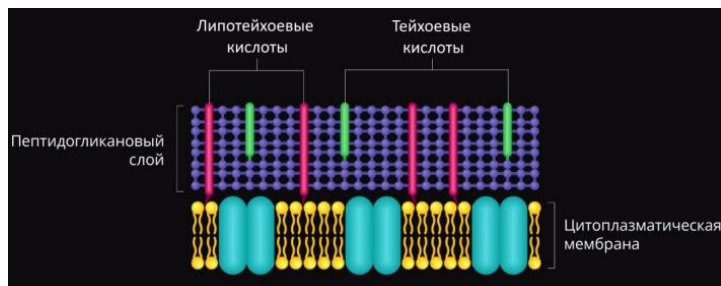
Основу клеточной стенки составляет **пептидогликан (муреин)**. Пептидогликан представлен гликановыми цепями из повторяющихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты

Строение клеточной стенки сильно отличается у бактерий грамположительных (Грамм+, окрашиваются в **фиолетовый**) и грамотрицательных (Грамм-, окрашиваются в **красный**).

1) У Грамм+ бактерий (рис. 1):

- клеточная стенка толстая, пептидогликан (муреин) (до 90% массы), состоящий из множества цепочек (вплоть до 10).
- Пептидогликан пронизывают тейхоевые/липотейхоевые кислоты, достигающие внешней поверхности клеточной стенки (определяют заряд поверхности клетки). Их особенность – липофильный якорь, погружающийся в ЦПМ и прикрепляющийся к ней клеточную стенку.

- Между ЦПМ и клеточной стенкой пространство отсутствует.
- Наружный слой содержит ЛП (липопротеины) и ГП (гликопротеины)



2) **Грам– бактерии** (рис. 2):

- КС тоньше, пептидогликан имеет всего 1-2 цепочки и составляет 5-10% от массы клеточной стенки.
- В пептидогликане отсутствуют (липо)тейхоевые кислоты.
- Вследствие этого он прилегает к клеточной стенке неплотно, и образуется периплазматическое пространство.
- В нем имеются периплазматические белки (транспортные и ферменты).
- Есть пориновые каналы.
- Наружный слой четко выражен: ЛП, ЛПС (состоит из Липида А и Полисахарида и отходящий от него О-антиген)

Грам- бактерии не способны прочно связывать комплекс красителей, и соответственно, обесцвечиваются спиртом. Поэтому их дополнительно прокрашивают фуксином в розово – красный цвет.

8. **МО с дефектной КС. Протопласты и сферопласты. L-пласты бактерий, роль в патологии человека**

- При разрушении муреинового слоя Грам+ бактерии становятся протопластами (не могут размножаться).
- При разрушении муреинового слоя Грам- бактерий образуются сферопласты – бактерии, сохраняющие КС, но не способные к размножению

Из любой бактериальной клетки можно получить форму, полностью или частично лишенную клеточной стенки – протопласты и сферопласты. Под воздействием химиопрепаратов и других факторов, нарушающих формирование клеточной стенки, они могут образовываться в организме больного, но при этом бактерии сохраняют способность взаимодействовать с организмом больного. Кроме того, существуют, так называемые **L-формы бактерий**, которые в отличие от протопластов и сферопластов **способные к размножению** - это сферические образования разных размеров.

Существуют стабильные L-формы, не способные реверсировать в исходный морфотип и нестабильные L-формы, реверсирующие в исходный тип при устранении причин, вызывающих их образование. В процессе реверсии восстанавливается способность бактерий синтезировать пептидогликан – муреин клеточной стенки. L-формы различных бактерий играют существенную роль в патогенезе многих хронических рецидивирующих заболеваний (бруцеллез, туберкулез, сифилис).

9. **Капсулы у бактерий, их функции, методы выявления**

КАПСУЛА БАКТЕРИЙ – это утолщенный наружный слой клеточной стенки. Капсулы могут быть построены из полисахаридов (пневмококк) или белков (возбудитель сибирской язвы).

Большинство бактерий, особенно патогенных, образуют капсулу только в организме человека или животных. Однако, существует **род истинно капсульных бактерий (Klebsiella)**, представители которого образуют капсулу и при культивировании на искусственно питательных средах.

Некоторые бактерии могут иметь микрокапсулу, например, эшерихии, или неявно выраженную способность к капсулообразованию – так называемую «нежную» капсулу, например, золотистые стафилококки, менингококки. **Основная функция капсулы** – защита бактерий от фагоцитоза, лизоцима.

Методы определения капсулы:

- При окраске **по Грамму** капсулы не видно. О наличии капсул у истинных капсульных бактерий можно заподозрить, если они в мазке располагаются на расстоянии друг от друга.
- Колонии истинно-капсульных бактерий имеют слизистый характер (при взятии материала тянется за петлей)
- Для выявления капсул используют метод окраски **по Бурри-Гинсу** для выявления капсул:

В каплю туши вносят материал из колонии, затем гладким краем другого стекла разносят мазок на $\frac{1}{4}$ поверхности предметного стекла, далее мазок сушат, фиксируют и докрашивают фуксином. В результате при микроскопии мазка на черном фоне видны бактерии красного цвета, окруженные неокрашенными капсулами

10. ЦПМ, ее функции

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА (ЦПМ) – это двойной слой липидов с направленными наружу гидрофильными головками и погруженными внутрь гидрофобными хвостами. У бактерий это чаще всего фосфолипиды и нейтральные жиры. **Липиды** – это основа механической стабильности мембраны.

- ☐ ЦПМ также пронизывают белки: **структурные** (также поддерживают структуру мембраны) и **функциональные** (ферменты синтеза, переноса веществ и дыхания). Они бывают **интегральными** (проходят через всю толщу), **поверхностными** и **периферическими**.
- ☐ **Функции:** структурная, барьерная, транспортная, интегрирующая, энергетическая, участвует в процессах биосинтеза, репликации ДНК, деления и спорообразования.

МЕЗОСОМЫ – это впячивания ЦПМ внутрь клетки. Наличие мезосом позволяет увеличить рабочую поверхность мембраны, разместив на ней большее количество ферментов (например, дыхательной цепи). Мезосомы также участвуют в процессах деления и спорообразования, а у немногочисленных бактерий еще в секреторных процессах.

ЦИТОПЛАЗМА – это полужидкое содержимое клетки, ограниченное ЦПМ. На 75% цитоплазма состоит из воды, остальное составляют растворенные и взвешенные в ней органические и минеральные вещества. Жидкая часть цитоплазмы с растворенными в ней веществами – **цитозоль**, а остальные элементы (нуклеоид, рибосомы, включения и др.) – структурные элементы. Важнейшая **функция** цитоплазмы – объединение всех клеточных компонентов и обеспечение их взаимодействия.

Цитоплазматическая мембрана, мезосомы и цитоплазма выявляются электронной микроскопией.

РИБОСОМЫ у прокариот, в отличие от эукариот, не объединяются в эндоплазматическую сеть и имеют меньшую массу и размер. **Коэффициент седиментации** (скорость осаждения в центрифуге) для большой и малой субъединиц – 50S и 30S соответственно, а после их объединения – 70S. **Функция рибосом** – синтез белка, и чем он интенсивнее, тем больше их в клетке. При активном синтезе рибосомы могут объединяться в полисомы. **Выявляются рибосомы электронной микроскопией.**

ВКЛЮЧЕНИЯ – необязательные компоненты бактериальной клетки: зерна, глыбки, капли или гранулы различной формы с запасаемыми химическими веществами. Включения преимущественно состоят из полисахаридов (гликоген и крахмал), липидов, полифосфатов (зерна волютина), минеральных веществ (S, Ca, Fe). Функция включений – трофическая и энергетическая. Зерна волютина могут выявляться световой микроскопией после окраски по Леффлеру или по Нейссеру.

11. Ядерный аппарат бактерий и его особенности

НУКЛЕОИД – структурный элемент прокариотической клетки, в котором находится жизненно необходимый генетический материал (ДНК).

- нуклеоид не отделен от ЦП ядерной мембраной;
- не имеет ядрышек и гистонов;
- почти всегда это одна хромосома с гаплоидным набором генов;
- почти всегда это кольцевая (замкнутая) молекула ДНК.

Функции – хранение, передача и реализация наследственного материала

Кроме нуклеоида, в цитоплазме могут находиться **ПЛАЗМИДЫ** – также кольцевые молекулы двунитевой ДНК, но меньшие по массе. В них тоже кодируется наследственная информация, но она не является жизненно важной.

Нуклеоид выявляется **электронной и фазово-контрастной микроскопией**, а также **в световой микроскоп при окраске по Романовскому-Гимзе** (окрашивается в фиолетовый цвет на фоне бледно-розовой цитоплазмы).

12. Жгутики. Определение подвижности. Ворсинки и их типы

Жгутики

На поверхности ряда бактерий располагаются жгутики. В их состав входит **белок флагеллин**, который по своей структуре относится к сократимым белкам типа миозина. Поэтому жгутики **обеспечивают подвижность**

бактерий. Определить подвижность бактерий можно с помощью фазово-контрастной микроскопии методами вискозиметрии и раздавленной капли, а также посевом на среду Пешкова.

Количество и расположение жгутиков у разных бактерий неодинаково:

- монотрихи – на одном из полюсов клетки имеют один жгутик,
- лофотрихи – пучок жгутиков;
- амфитрихи - жгутики расположены на обоих полюсах клетки;
- перитрихи – расположены по всей поверхности.

Ворсинки/пили/фимбри – это поверхностные нити из **белка пилина**. Они короче и тоньше жгутиков, не участвуют в движении. Делятся на два типа:

- **1 порядка – пили общего типа** – имеются в большом количестве (сотни-тысячи) у большинства бактерий; обеспечивают адгезию, механическую защиту и увеличивают поверхность всасывания и водно-солевого обмена
- **2 порядка – половые пили** – создают контакт между клетками, осуществляя между ними передачу генетической информации - **конъюгацию**

13. Споры: значение, методы окраски

СПОРЫ БАКТЕРИЙ – п.с. бактериальные клетки в состоянии анабиоза и образуются при неблагоприятных условиях внешней среды.

- ☐ Располагаться могут внутри клетки терминально, субтерминально или центрально.
- ☐ В процессе спорообразования клетка почти полностью теряет воду, сморщивается, клеточная стенка уплотняется, появляется новое вещество **дипиколинат кальция** которое образует комплексы с биополимерами клетки, устойчивые к действию температуры и ультрафиолетовых лучей.
- ☐ В окружающей среде споры бактерий могут сохраняться годами, но при попадании в благоприятные условия спора впитывает влагу, комплексы распадаются, дипиколинат разрушается и спора превращается в вегетативную клетку.
- ☐ Таким образом, спору следует рассматривать не как способ размножения клетки (как это часто имеет место у грибов), а только **как способ существования бактериальной клетки в неблагоприятных условиях**. При этом надо запомнить – 1 клетка- 1 спора- 1 клетка.
- ☐ Спорообразование характерно в основном для **Грам+ бактерий**. У Грам- эквивалентом спорообразования является переход в так называемое **некультивируемое состояние**. У таких бактерий метаболизм снижен, в силу чего они теряют способность к размножению и не растут на питательных средах. Однако в этой форме бактерии сохраняют свою вирулентность и, попадая в макроорганизм, они восстанавливают свою активность. Этот процесс детерминирован на генетическом уровне. Основную роль играют трансмембранные сенсорные белки, которые улавливают изменение в окружающей среде и передают на соответствующий ген.
- ☐ От активности последних будет зависеть переход в некультивируемую форму. В такой форме они могут длительно сохраняться в окружающей среде.
- ☐ Два семейства образуют споры: А) возбудитель сибирской язвы. Б) Возбудитель столбняка, ботулизма, газовой гангрены.
- ☐ Выявить споры можно специальными методами окраски. Они основаны на том, что споры и вегетативная часть клетки окрашиваются при обработке концентрированными растворами краски при высокой температуре (первый этап окраски), при последующей обработке концентрированным раствором серной кислоты вегетативная часть клетки теряет окраску, а спора нет (второй этап окраски). Для удобства микроскопии на третьем этапе окраски мазок докрашивают красителем другого цвета. В мазке вегетативные клетки и споры окрашены по-разному.
- ☐ **Методика окраски спор по Клейну:**
 1. К взвеси бактерий в пробирке добавляют карболовый фуксин и прогревают в течение 3-5 мин.
 2. Из прогретой взвеси делают мазок: наносят петлей на предметное стекло, высушивают, фиксируют.
 3. На фиксированный мазок наносят серную кислоту на 2-3 сек., промывают водой и докрашивают мазок метиленовым синим 5 мин.
 4. На микроскопе – споры окрашены в красный, а вегетативные тела – в синий цвет.
- ☐ **Схема окраски по Клейну:**
 1. Взвесь бактерий + карболовый фуксин + нагрев до 100°C. Приготовление мазка.
 2. Обработка конц. H₂SO₄, промывание водой.
 3. Окраска метиленовой синью, промывание водой.

14. Простые и сложные методы окраски бактерий. Окраска по Граму

Методы окраски делятся на два типа:

а) простые – с использованием одного красителя (чаще водный фуксин или метиленовый синий) – малоинформативные;

б) сложные – с использованием 2-3 контрастных по цвету красителей, проводятся в несколько этапов. Включают:

- Специальные (позволяют окрасить споры, капсулы, жгутики, включения)
- Дифференциально-диагностические (метод Грама, Циль-Нильсена) – выявляют особенности строения бактериальной клетки и позволяют обнаружить различия между разными бактериями

* Метод по Граму – выявляет различия в строении КС бактерий

** Все бактерии по отношению к этому методу Грам+ и Грам- - определяет тинкториальные свойства

Методика окраски мазка по Граму:

- ✓ На фиксированный мазок нанести 1-2 капли генцианвиолета, оставить на 1 мин
- ✓ Избыток краски слить в лоток, нанести 1-2 капли р-ра Люголя, оставить на 1 мин
- ✓ Слить р-р и обесцветить спиртом в течение 25-30 сек
- ✓ Мазок тщательно промыть водой
- ✓ Дополнительно докрасить водным фуксином в течение 2 мин, промыть водой
- ✓ После окрашивания высушить и приступить к иммерсионной микроскопии

15. Некультивируемые формы бактерий. Методы их выявления

У многих видов Грам- бактерий существует особое приспособительное, генетически регулируемое состояние, эквивалентное цистам, в которое они могут переходить под влиянием неблагоприятных условий и сохранять свою жизнеспособность до нескольких лет. Главная особенность такого состояния в том, что бактерии в нем не размножаются и не образуют колоний на питательной среде. Такие не размножающиеся, но жизнеспособные бактерии и называются **некультивируемыми формами бактерий (НФБ)**. Клетки этих бактерий находятся в метаболически активном состоянии, они высокоустойчивы к воздействию условиям внешней среды.

Для их обнаружения используют методы молекулярно-генетического анализа (ДНК-гибридизацию, ПЦР).

16. Понятие о метаболизме. Анаболизм и катаболизм. Особенности метаболизма у бактерий

МЕТАБОЛИЗМ – это совокупность всех химических превращений в клетке, обмен веществ и энергии. Метаболизм складывается из *анаболизма* (биосинтез макромолекул из более простых соединений) и *катаболизма* (разрушение макромолекул с получением и запасанием энергии).

* Изучают метаболизм бактерий с помощью биохимических и физико-химических методов исследования в процессе культивирования бактерий в определенных условиях на питательных средах, содержащих определенные субстраты.

** **Особенности метаболизма у бактерий:**

- 1) Процессы диссимиляции преобладают над процессами ассимиляции;
- 2) Высокая интенсивность процессов метаболизма, обусловленная тем, что соотношение поверхности к единице массы больше, чем у многоклеточных;
- 3) способность разных видов включать в метаболизм почти любые органические и неорганические соединения
- 4) Бактерии имеют очень широкий набор ферментов - это также способствует высокой интенсивности метаболических процессов.
- 5) способность быстро и широко адаптироваться к изменяющимся условиям, многообразие путей метаболизма;
- 6) примитивные и несовершенные механизмы регуляции метаболизма

17. Методы изучения метаболизма бактерий

Метаболизм бактерий изучают с помощью физико-химических и биохимических методов исследования в процессе культивирования бактерий в определенных условиях на специальных питательных средах, содержащих то или иное соединение в качестве субстрата для трансформации.

- определение продуктов метаболизма, которые накапливаются в питательной среде;

- определение продуктов метаболизма, которые накапливаются в самой бактериальной клетке.

Также с помощью изучения ферментов, участвующих в метаболизме.

Ферменты бактерий по локализации делятся на 2 группы:

- экзоферменты — ферменты бактерий, выделяемые во внешнюю среду и действующие на субстрат вне клетки (например, протеазы, полисахариды, олигосахаридазы);
- эндоферменты — ферменты бактерий, действующие на субстраты внутри клетки (например, ферменты, расщепляющие аминокислоты, моносахара, синтетазы).

Синтез ферментов генетически детерминирован, но регуляция их синтеза идет за счет прямой и обратной связи, т.е. для одних — репрессируется, а для других — индуцируется субстратом. *Ферменты, синтез которых зависит от наличия соответствующего субстрата в среде называются **индуцибельными**.*

Другая группа ферментов, синтез которых не зависит от наличия субстрата в среде, называется **конститутивными**. Их синтез имеет место всегда, и они всегда содержатся в микробных клетках в определенных концентрациях

*Регуляция синтеза ферментов у бактерий подчиняется определенным законам. Подавляются или активируются не ферменты, а гены, отвечающие за их синтез.

** Информация о синтезе белка посылает структурный ген, который находится под действием ген-оператора. Ген-оператор находится под действием ген-регулятора. В активном состоянии ген-регулятор посылает в клетку информацию и начинает вырабатываться вещество репрессор. Он блокирует ген-оператор и поэтому структурный ген не работает. По этому механизму синтез большинства веществ подавлен. Если во внешней среде появляется субстрат, то считается, что он взаимодействует с репрессором. Таким образом ген-оператор не блокируется и в клетку идет информация о синтезе фермента. **Этот механизм лежит в основе синтеза индуцибельных ферментов.** В ряде случаев может происходить мутация либо гена-оператора, либо ген-регулятора и ферменты начинают вырабатываться постоянно

18. Конститутивные и индуцибельные ферменты бактерий. Автоматическая регуляция синтеза ферментов

Ферменты бактерий — высокоспецифичные катализаторы химических реакций, проходящих в клетке.

На постоянной основе в бактериальной клетке работают **конститутивные ферменты**, однако численно преобладают **индуцибельные ферменты**, которые синтезируются при необходимости (например, переключение метаболизма на более доступный субстрат);

См. вопрос 17

19. Типы питания бактерий. Классификация по источникам углерода и азота

По типу питания, т.е. в зависимости от характера источника получения углерода и азота микроорганизмы делятся на автотрофы и гетеротрофы.

- ✓ **Автотрофы** используют в качестве получения углерода и азота неорганические вещества
- ✓ **Гетеротрофы** — используют в качестве получения углерода и азота органические вещества.

В свою очередь, гетеротрофы делятся на **паратрофы** (источник питательных веществ — объекты живой природы) и **метатрофы** (источник питательных веществ — органические вещества неживой природы).

Прототрофы — это микроорганизмы, способные самостоятельно синтезировать все необходимые органические соединения.

Ауксотрофы — это микроорганизмы, не способные самостоятельно синтезировать необходимые соединения; они получают их в готовом виде из окружающей среды или организма хозяина.

Источники азота также могут быть разнообразны.

- ✓ Азотфиксирующие — микроорганизмы, способные усваивать молекулярный азот атмосферы.
- ✓ Аммонифицирующие, нитрат- и нитрит-редуцирующие бактерии — ассимилируют неорганический азот из солей аммония, нитратов или нитритов

Однако патогенные для человека МО способны ассимилировать только азот органических соединений.

20. Механизмы питания бактерий

Питание — это процесс поступления в клетку питательных веществ и выделение продуктов метаболизма.

Особенности питания бактерий:

- бактериальные клетки лишены специальных органов для захвата и переваривания пищи. Поступление питательных веществ у них происходит путем всасывания через всю поверхность.
- бактерии выделяют во внешнюю среду экзоферменты, с помощью которых они и расщепляют сложные вещества до простых.

Существуют три основных механизма поступления питательных веществ в бактериальную клетку: пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт.

Пассивный транспорт.

Осуществляется за счет различного содержания питательных веществ в среде и в клетке и происходит в направлении от большой концентрации к меньшей, т.е. по градиенту концентрации. Таким путем в клетку проникает вода и выходит из нее вместе с растворенными в ней различными мелкими молекулами, способными проходить через мелкие поры мембраны. Для пассивной диффузии характерно отсутствие субстратной специфичности и она не требует затраты энергии.

Облегченная диффузия

Характеризуется выраженной субстратной специфичностью и протекает при обязательном участии специфических белков, локализованных в мембране – это пермиазы – «проходящие сквозь». Они распознают и связывают молекулу субстрата на внешней стороне мембраны и обеспечивают ее перенос через мембрану. Облегченная диффузия происходит только по градиенту концентрации – поэтому не требует затрат энергии.

Активный транспорт

С помощью этого механизма растворенные вещества могут поступать в клетку против градиента концентрации, поэтому активный транспорт требует от клетки затрат энергии. У бактерий этот механизм преобладает.

21. Белковый обмен бактерий. Тление, гниение. Методы изучения белкового обмена бактерий

Белковый обмен – это процесс синтеза собственных аминокислот и белков путем ассимиляции необходимых компонентов из внешней среды.

Во внешней среде содержатся сложные белки. Их расщепляют только те бактерии, которые выделяют ферменты протеазы. Расщепление белков идет до пептонов.

Тление – расщепление белков в аэробных условиях.

Гниение – расщепление белков в анаэробных условиях.

Протеолитические свойства - способность расщеплять белки до промежуточных продуктов распада – пептонов - изучается при посеве на желатин и (или) лакмусовое молоко. При наличии протеаз у бактерий желатин разжижается, а в молоке образуется сгусток кремового цвета, а над ним светлая, прозрачная жидкость).

Пептолитические свойства - способность расщеплять только промежуточные продукты распада белков – пептоны, до элементарных радикалов) изучается при посеве бактерий в мясо – пептонный бульон (МПБ). Под крышку пробирки помещают индикаторные полоски, способные изменять свой цвет в присутствии летучих продуктов распада пептонов (аммиака, сероводорода, индола).

Протео- и пептолитические свойства изучают для идентификации возбудителей.

22. Углеводный обмен бактерий. Горение, брожение. Методы изучения углеводного обмена бактерий

Углеводный обмен – это процесс синтеза и распада углеводов.

Сложные углеводы внешней среды могут расщепить только те бактерии, которые выделяют ряд экзоферментов (полисахаридазы, олигосахаридазы). Внутри клетки из углеводов может поступать только глюкоза. Ее судьба двояка. Меньшая ее часть идет на синтез собственных полисахаридов клетки. А большая подвергается дальнейшему расщеплению.

Оно может идти двумя путями:

Горение – это расщепление углеводов в аэробных условиях. Конечные продукты газ и вода.

Брожение – это расщепление углеводов в анаэробных условиях. В зависимости от промежуточных продуктов различают спиртовое, молочнокислое, пропионокислое, масляно-кислое и др. виды брожения.

Способность бактерий расщеплять углеводы обозначается как *сахаролитическая активность*.

Изучается углеводный обмен в процессе культивирования исследуемых бактерий **на средах Гисса** (полужидких средах, содержащих углевод и индикатор, реагирующий на появление кислых продуктов распада углеводов).

23. Типы О-В процессов у бактерий. ЦПЭ аэробных, факультативных аэробов/анаэробов

Дыхание – это процесс получения энергии путем окисления органических и неорганических соединений. У большинства МО энергия запасается в форме АТФ.

В зависимости от того, что является конечным акцептором электронов, выделяют три типа дыхания:

- I. **Аэробное дыхание** – конечным акцептором электронов (окислителем) выступает *атомарный кислород*. Дыхательный процесс принципиально не отличается от такового в клетках человека. Например, если исходным субстратом выступает углевод, он ферментативно расщепляется до пировиноградной кислоты (гликолиз), та в свою очередь окисляется до ацетил-КоА, после чего в ЦТК водородные атомы и электроны передаются на пиридиновые дегидрогеназы, которые вступают в дыхательную цепь. В конечном счете, ионы водорода связываются с кислородом, а в процессе окислительного фосфорилирования образуется АТФ.
- II. **Анаэробное дыхание** – конечным акцептором электронов выступает *молекулярный кислород* в составе неорганических веществ (сульфаты, нитраты). Начальные этапы дыхания у аэробов и анаэробов совпадают, но из-за отсутствия у последних некоторых ферментов дыхательной цепи (цитохромов) конечные этапы окисления у них заблокированы. В итоге субстраты при анаэробном дыхании расщепляются не полностью. Энергия запасается путем субстратного фосфорилирования. Энергетический выход при этом гораздо ниже, чем при окислительном фосфорилировании.
- III. **Брожение** – конечным акцепторами электронов, равно как и донором, выступают органические соединения. Это тоже анаэробный процесс и субстраты также окисляются не полностью. Особенность брожения – это превращение на последних этапах пирувата в различные конечные метаболиты (спирты и органические кислоты). В этих реакциях энергия не высвобождается, но они необходимы для регенерации НАД⁺. Энергия также запасается путем субстратного фосфорилирования.

Классификация бактерий по отношению к кислороду:

Аэробы:

- *облигатные аэробы** – не могут жить и размножаться без O₂; только аэробное дыхание;
- *микроаэрофилы* – растут только в условиях уменьшенной концентрации O₂.
- *капнофилы* – растут только в условиях увеличенной концентрации CO₂.

Анаэробы:

- *облигатные анаэробы** – погибают в присутствии O₂ (отсутствует супероксиддисмутаза, защищающая клетку от продуктов окисления); только анаэробное дыхание;
- *факультативные анаэробы** – могут переключаться на аэробное дыхание;
- *аэротолерантные* – могут расти в присутствии O₂ (имеется супероксиддисмутаза), но не способны его использовать; только брожение.

* их обязательно знать!!!

24. Особенности дыхательного аппарата бактерий

Для осуществления различных обменных процессов бактерии нуждаются в определенном количестве энергии, которую они получают в ходе окислительно-восстановительных процессов. Окислительно-восстановительные процессы протекают в дыхательном аппарате.

Особенности дыхательного аппарата:

- ✓ бактерии лишены митохондрий, их функцию выполняет ЦПМ и ее инвагинации - мезосомы, на которых локализуются специальные дыхательные ферменты**
- ✓ у бактерий могут отмечаться значительные колебания в качественном и количественном составе ферментов, образующих дыхательную цепь;
- ✓ у бактерий тонкие процессы регуляции дыхания затруднены, т.к. их дыхательный аппарат соприкасается как с внешней средой, так и с цитоплазмой

****Среди ферментов выделяют:**

- *пиридиновые дегидрогеназы (первичные)* – окисляют субстрат, отнимая водород;
- *флавиновые дегидрогеназы (вторичные)* – принимают водород от первичных дегидрогеназ, но для отдельных субстратов могут и сами работать как первичные;
- *цитохромы* – переносчики водорода от вторичных дегидрогеназ на кислород;
- *убихиноны* – свободные переносчики водорода по мембране (не ферменты).

25. Рост и размножение бактерий

Рост для клетки – это генетически контролируемое увеличение объема и массы микробной клетки. Рост для популяции – это увеличение ее биомассы.

Клеточная культура (популяция) на питательной среде проходит шесть фаз роста:

- 1) *фаза задержки роста* – адаптация клеток к среде обитания, деления не происходит;
- 2) *период положительного ускорения* – начало деления;
- 3) *фаза экспоненциального роста* – максимальная скорость деления, минимальный размер клеток;
- 4) *фаза замедления скорости роста* – снижение количества питательных веществ и накопление метаболитов, как следствие – снижение скорости деления;
- 5) *стационарная фаза* – почти полная остановка деления, переход на запасенные субстраты; количество клеток относительно постоянно (отмирает, как и делится, малый процент клеток);
- 6) *фаза отмирания* – массовая гибель бактерий.

Размножение микроорганизмов – это увеличение их концентрации в единице объема среды, направленное на сохранение вида. **Особенности размножения микроорганизмов:**

- разнообразие способов и возможность переключения между ними;
- возможность одновременного размножения разными способами;
- высокая скорость.

Прокариоты размножаются **исключительно бесполовыми способами:**

- *простое деление (равномерное бинарное деление)* – самый распространенный способ, образуются две дочерние особи с генетической информацией материнской клетки;
- *множественное деление (шизогония)* – равномерное бинарное деление без периодов роста с уменьшением размеров клеток; встречается у цианобактерий и простейших;
- *почкование (неравномерное бинарное деление)* – выросшая на одном из полюсов материнской клетки почка отделяется от нее; новая клетка первоначально меньше материнской, но содержит тот же набор генетической информации; характерно для грибов;
- *фрагментация* – деление на несколько фрагментов разной величины, каждый из которых затем продолжает самостоятельное развитие, характерна для актиномицет и микоплазм; (почкование – это частный случай фрагментации);
- *образование экзоспор* – характерно для стрептомицет и грибов;
- особый цикл развития хламидий.

Механизмы и фазы простого деления

I. Рост:

- происходит до достижения определенных размеров;
- в процессе деления рост останавливается.

II. Кариокинез:

- репликация ДНК по полуконсервативному механизму;
- в каждую дочернюю клетку отходит одна новая и одна старая нуклеотидная цепь.²²

III. Цитокинез (деление клетки):

- начинается параллельно с кариокинезом;
- у места контакта ДНК с ЦПМ имеется мезосома, рядом с которой синтезируется мембрана для будущей перегородки;
- после окончания репликации ДНК мембрана образует перегородку, отделяя клетки.

IV. Расхождение дочерних клеток:

- средний слой клеточной стенки лизируется и клетки отделяются друг от друга;
- если клетки полностью не расходятся, они могут принимать вид цепочек (бациллы и стрептококки), парных клеток (диплококки), гроздьев, пакетов и т.д.

Из документа в подвале**

Рост бактериальных клеток связан с синтезом и накоплением всех компонентов, входящих в его состав, и увеличение размера, характерного для данного вида. В условиях, обеспечивающих рост микробов, происходит и процесс, и деления.

Для большинства бактерий характерно поперечное бинарное деление, приводящее к образованию двух дочерних клеток. У грамположительных бактерий при этом происходит синтез перегородки между делящимися клетками. Перегородка начинает формироваться на периферии и «движется» к центру клетки. Для грамотрицательных бактерий характер перетяжки, отделяющей клетки. После ее образования окончательное разделение дочерних клеток сопровождается синтезом перегородки между ними.

При размножении микробной клетки наиболее важные процессы происходят в нуклеоиде, содержащем всю генетическую информацию в двунитевой молекуле ДНК. Репликация ДНК происходит полуконсервативным способом, обеспечивающим равномерное распределение генетического материала между дочерними клетками. Надежность процесса репликации и правильность расхождения (сегрегация) дочерних цепей обеспечивается связью ДНК с цитоплазматической мембраной.

Репликация начинается в определенной точке (локусе) ДНК и происходит одновременно в двух противоположных направлениях. Синтез дочерних нитей ДНК идет ступенчато, короткими фрагментами, которые сшиваются специальными ферментами лигазой.

Когда бактерия готова к делению, то начинается процесс репликации. При этом начинается выработка фермента инициатора под действием которого раскручивается ДНК на две равноценные нити. Вторая нить прикрепляется на противоположном участке ЦПМ – прорепликон. Затем каждая нить достраивается. И после достройки прорепликон превращается в репликатор. Фермент инициатор освобождается для нового цикла. Спираль растягивается к полюсам клетки. ЦПМ образует инвагинации – септальные мезосомы – за счет которых формируется клеточная стенка. Оставшаяся ЦПМ – лизируется соответствующим ферментом клетки – аутолизанами. Весь процесс находится под строгим генетическим контролем.

26. Фазы развития бактериальной популяции в жидкой питательной среде

1. **Lag фаза (фаза покоя).** Продолжительность 3-4 часа. Начинается она с момента помещения бактерий в свежую питательную среду. За это время бактерии приспосабливаются, привыкают к новой питательной среде и растут.
2. **log-фаза (фаза интенсивного размножения бактерий).** Она продолжается 18-20 часов. Время генерации (время между делением 1 бактериальной клетки) является величиной постоянной.
3. **Максимальная стационарная фаза.** Начинается процесс отмирания бактерий, однако количество погибших бактерий равно количеству вновь появившихся. В эту фазу отмечается максимальная концентрация бактерий.
4. **Фаза отмирания.** Отмирание бактерий связано с истощением запаса питательных веществ в среде и накоплением токсических продуктов метаболизма. Ее продолжительность различна. Этой фазы можно избежать, если создать условия проточного культивирования (из питательной среды постоянно удаляются продукты метаболизма и восполняются питательные вещества).

27. Понятие «культура», «штамм», «колония», «клон»

1) чистая культура – культура, содержащая бактерии одного вида, выращенные на **твердой/жидкой** питательной среде

2) штамм – чистая культура, полученная из определенного источника в определенное время, с известными свойствами, которые могут отличаться от свойств других штаммов (например, выделенных в другом месте или в том же месте в другое время);

* фактически **штамм** – культура микробов одного вида, выделенная из определенного источника;

3) клон – чистая культура, полученная из одной материнской клетки, а значит генетически полностью однородная.

4) колония – видимое невооруженным глазом изолированное скопление бактерий, являющееся потомством одной клетки, на поверхности **твердой** питательной среды. Т.е. колония – это чистая культура, но не наоборот

28. Питательные среды. Требования, предъявляемые к ним

Питательные среды – разнообразные субстраты для выращивания бактерий в лабораторных или производственных условиях. К ним предъявляются следующие требования:

- Питательность (содержание всех необходимых питательных веществ);
- Изотоничность (обеспечивает осмотическое равновесие между клеткой и средой, облегчает процессы осмоса и диффузии питательных веществ и продуктов метаболизма);
- Стерильность (позволяет правильно учесть результаты);
- определенное значение pH=7,2-7,4 (обеспечивает функционирование ферментов бактерий);

- определенный Eh-потенциал (обеспечивает О-В процессы в клетке бактерий)
- для жидких сред – прозрачность (позволяет увидеть рост бактерий).

Для культивирования бактерий необходимо соблюдать определенный температурный режим.

По температурному оптимуму роста выделяют три основные группы микроорганизмов:

- психрофилы – организмы, нормально существующие и размножающиеся при относительно низких температурах (обычно не выше 10 °С)
- мезофиллы – организмы, лучше всего растущие при умеренной температуре, в не слишком горячих, но и не очень холодных условиях, обычно между 20 и 45 °С
- термофилы – организмы, живущие при относительно высоких температурах свыше 45 °С

29. Классификации питательных сред

♦ По происхождению:

- **естественные** – приготовленные из естественных продуктов (яично-глицериновая, картофельно-глицериновая среда, молоко, мясная вода и пр.), состав их непостоянен;
- **искусственные** – в качестве источников азота используют высокомолекулярные органические компоненты* (пептон, мясной экстракт, казеин) растительного и животного происхождения; готовятся по рецептам, состав относительно постоянен;

*приготовленные из веществ, искусственно полученных из естественных продуктов

- **простые искусственные** – из добавок содержат только соли; примеры: мясопептонный бульон, мясопептонный агар и др.);
- **сложные искусственные** – содержат стимулирующие добавки (сахара, витамины, кровь, микроэлементы и др.);
- **синтетические** – среды известного состава, в качестве источника азота используют аминокислоты и другие низкомолекулярные органические и неорганические соединения, состав точен и химически чист, используют при получении вакцин, сывороток, антибиотиков

♦ По составу:

- **простые** – обеспечивают минимальные потребности м/о (мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), агар Хоттингера, бульон Хоттингера)
- **полные** – содержат все необходимое для полноценного роста м/о

♦ По назначению:

- **основные** – пригодные для культивирования разных бактерий;
- **элективные (селективные)** – пригодные для культивирования бактерий одного рода или вида;
- **дифференциально-диагностические** – среды, на которых рост одних видов бактерий отличается от других;
- **специальные** – для определения отдельных свойств разных бактерий.

♦ По плотности (консистенции):

- **жидкие** – мясопептонный, сахарный, кровяной бульоны, молоко и др.;
- **полужидкие** – агар (0,5%);
- **плотные** – агар, желатин, силикагель.

30. Методы выявления чистых культур

Для выделения чистых культур МО используют методы:

1. Методы механического разобщения на плотных питательных средах:
 - Метод штриха с обжигом петли
 - Метод Дригальского (последовательный посев в несколько питательных сред в чашках Петри)
 - Метод Коха (посев материала в разведении)
2. Посев на элективные питательные среды
3. Заражение лабораторных животных

31. Влияние физических, химических и биологических факторов на МО

Микроорганизмы находятся в тесной зависимости от условий окружающей среды. Выделяют физические, химические и биологические факторы внешней среды, влияющие на микроорганизмы.

1. Физические факторы. Из физических факторов наибольшее влияние на микроорганизмы оказывают температура, влажность, излучение.

- *Температура.* По отношению к температурным условиям микроорганизмы разделяют на мезофильные, психрофильные и термофильные. Для **мезофилов** оптимальные температуры роста лежат между 20 и 40°C. Область температур роста **психрофилов** лежит в пределах от 0 до 20°C. **Термофильные бактерии** растут при температурах от 40 до 98°C. Для сохранения жизнеспособности бактерий благоприятны низкие температуры (ниже 0°C). Споры бактерий и вирусы годами сохраняются в жидком азоте (температура минус 196°C).
- *Влажность.* Важнейшим фактором поддержания жизнеспособности микробной клетки является вода, поскольку именно в растворах протекают все биологические процессы. Вода находится в клетке в свободном или связанном состоянии.
- *Действие излучения.* **Солнечный свет** может обеспечивать выраженный антимикробный эффект. **Ультрафиолетовое излучение** вызывает замедление роста культур, снижает скорость деления клеток, способствует развитию мутаций. УФ-лучи широко применяются для обеззараживания воздуха в помещениях, воды, отходов производства. **Ионизирующее излучение** вызывает повреждения ДНК, которые принято подразделять на прямые и опосредованные, возникающие в связи с образованием свободных радикалов. Ионизирующее излучение используется для стерилизации биопрепаратов, перевязочного материала, инструментов. **Действие лазера** вызывает у микроорганизмов в зависимости от дозы облучения изменения морфологических и биохимических свойств, вплоть до утраты жизнеспособности. При этом происходит денатурация белка и повреждение нуклеиновых кислот.

2. Влияние химических факторов на микроорганизмы. Концентрация ионов водорода в окружающей среде действует на микроорганизм непосредственно или косвенно. От значения pH зависит состояние веществ в окружающей среде. Многие органические кислоты в кислой среде находятся в недиссоциированной форме и легко проникают в клетку, становясь токсичными для нее. Границы значений pH, оптимальных для роста различных микроорганизмов, находятся в пределах от 1,0 до 11,0. В зависимости от отношения к кислотности среды прокариоты могут быть разделены на несколько групп. Для подавляющего большинства прокариотов оптимальной является среда, близкая к нейтральной. Такие организмы называют нейтрофилами. Многие нейтрофилы способны расти или выживать при значениях pH, лежащих за пределами указанного диапазона. Такие прокариоты считаются кислото- или щелочеустойчивыми. К кислотоустойчивым относятся многие грибы, микобактерии (туберкулезная палочка). Устойчивыми к значениям pH близким к 9,0-10,0, являются многие из кишечных бактерий. У некоторых видов бактерий оптимум pH для роста находится в кислой (pH 4,0 и ниже) или щелочной (pH от 9,0 и выше) области. Такие бактерии называются ацидофильными и алкалофильными (кислотолюбивыми или щелочелюбивыми), соответственно.

3. Влияние биологических факторов. К биологическим средствам могут быть отнесены препараты, содержащие живых особей -бактериофагов и бактерий, обладающих выраженной конкурентной активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным для человека и животных видам микробов. Они вводятся в организм в жизнеспособном состоянии.

32. Понятие о стерилизации, методы стерилизации. Дезинфекция, методы дезинфекции

«Деконтаминация» - это процесс уничтожения на (в) каких-либо объектах

Для осуществления этого процесса разработаны различные методы стерилизации и дезинфекции.

1. Стерилизация – это уничтожение всех форм жизни (включая споры) в веществе и на поверхности стерилизуемого объекта.

* стерилизации подвергают медицинские инструменты, объекты медицинского назначения (питательные среды, растворы для инъекций и др.)

Методы стерилизации:

- *Сухим жаром* – в сухожаре, при $t=180^{\circ}\text{C}$, 60 мин. – только лабораторные стекла
- *Паром под давлением* – в автоклаве, 2 режима ($t=134^{\circ}\text{C}$ 1,5 атм.; $t=121^{\circ}\text{C}$ 2 атм. 15-20 мин.) – питательные среды, термостатные изделия (наконечники и др.)

- С помощью радиоактивных элементов (проводится на производстве) – получение одноразовых объектов (в готовом стерильном виде)
- Окись этилена (формальдегид) – под давлением – обработка эндоскопа, фибродастоскопа

2. Дезинфекция – комплекс мер, направленных на снижение общей микробной обсемененности материала или объекта и полное уничтожение патогенных МО.

*основная масса вегетативных форм вымирает, споры остаются. Это вынужденные меры, если нельзя провести стерилизацию

Методы дезинфекции:

- Тепловая – кипячение
- Лучевая – УФ-облучение
- Химическая – с использованием дезинфектантом

3. Пастеризация – тепловая обработка ($t=60\text{ }^{\circ}\text{C}$) – погибают патогенные МО (споры остаются)

4. Асептика – система профилактических мероприятий, направленных на предотвращение попадания МО в рану и на объекты медицинского назначения (лекарственные препараты, питательные среды, медицинские инструменты, растворы и др.)

Она включает:

- Стерилизацию инструментов, приборов, материалов
- Антисептическую обработку рук
- Соблюдение определенных правил и приемов работы (стерильные халаты, маски, перчатки и др.)
- Проведение санитарно-противоэпидемических и гигиенических мероприятий (проветривание, уборки с применением дезинфицирующих средств, использование бактерицидных ламп и др.)

5. Антисептика – это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение МО, попавших в рану или др. объект

Различают следующие виды:

- Механическая – хирургическая, обработка раны, удаление инородных тел и др.
- Физическая – наложение гигроскопических повязок, применение сухого тепла, УФО и т.д.
- Химическая – применение химических веществ, оказывающих бактерицидное или бактериостатическое действие
- Биологическая – применение антибиотиков, бактериофагов, иммуностимуляторов

33. Методы культивирования анаэробов

Для культивирования анаэробов необходимо понизить окислительно-восстановительный потенциал среды, создать условия анаэробии, т. е. пониженного содержания кислорода в среде и окружающем ее пространстве. *Это достигается применением физических, химических и биологических методов.*

1. Физические методы. Основаны на выращивании микроорганизмов в безвоздушной среде, что достигается:

- посевом в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества;
- посевом микроорганизмов в глубину плотных питательных сред;
- механическим удалением воздуха из сосудов, в которых выращиваются анаэробные микроорганизмы;
- заменой воздуха в сосудах каким-либо индифферентным газом.

2. Химические методы. Основаны на поглощении кислорода воздуха в герметически закрытом сосуде (анаэроостате, эксикаторе) такими веществами, как пирогаллол или гидросульфит натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

3. Биологические методы. Основаны на совместном выращивании анаэробов со строгими аэробами. Для этого из застывшей агаровой пластинки по диаметру чашки вырезают стерильным скальпелем полоску агара шириной около 1 см. Получается два агаровых полудиска в одной чашке. На одну сторону агаровой пластинки засевают аэроб, например, часто используют *S. aureus* или *Serratia marcescens*. На другую сторону засевают анаэроб. Края чашки заклеивают пластилином или заливают расплавленным парафином и помещают в термостат. При наличии подходящих условий в чашке начнут размножаться аэробы. После того, как весь кислород в пространстве чашки будет ими использован, начнется рост

анаэробов (через 3-4сут). В целях сокращения воздушного пространства в чашке питательную среду наливают возможно более толстым слоем

34. Цель и этапы Бак-исследования

Цель – выделение чистой культуры бактерий и ее идентификация

Этапы:

- 1) Первичная микроскопия исследуемого материала (не всегда целесообразна, поэтому иногда не проводится)
- 2) Выделение чистой культуры возбудителя
- 3) Накопление чистой культуры возбудителя
- 4) Идентификация возбудителя на основании изученных биологических свойств

Материал для Бак-исследования – взвесь бактерий