

ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Т.Г. ШЕВЧЕНКО

Кафедра ботаники и экологии

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

ЧАСТЬ 3: Экология и значение микроорганизмов

Методические рекомендации

Тирасполь, 2021

УДК 579(07)(075)
ББК 28.4 р3я 73
М 54

Составители:

Е.Б. Бушева, ст. преп.
Т.И. Богатая, преп.

Рецензенты:

В.В. Власов, канд. биол. наук, доцент
М.В. Капитальчук, канд. биол. наук, доцент

Лабораторные работы по микробиологии. Ч. 3: Экология и значение микроорганизмов: методические рекомендации / сост. Е.Б. Бушева, Т.И. Богатая. – Тирасполь, 2021. – 78 с.

Представлен материал для проведения лабораторных занятий по дисциплине: «Микробиология и вирусология». Лабораторные занятия подобраны и методически распределены в соответствии с программой подготовки биологов. Рекомендации включают 4 лабораторных занятия, связанных с изучением экологии и значения микроорганизмов в природе и для человека, в которых рассматриваются соответствующие методы исследований. Дано описание способов количественного и качественного учета микроорганизмов в объектах внешней среды, методы изучения нормальной микрофлоры человека, оценки факторов неспецифической и специфической защиты. Основу составляет описательная часть, в которой кратко изложены особенности применяемых методов, и рекомендации к выполнению практических заданий по указанной теме.

Методические рекомендации рассчитаны на студентов биологических специальностей учебных заведений, а также могут быть полезными для преподавателей дисциплины «Микробиология».

УДК 579(07)(075)
ББК 28.4 р3я 73

Рекомендовано Научно-методическим советом ПГУ им. Т.Г. Шевченко

ВВЕДЕНИЕ

Рекомендации составлены в соответствии с учебным планом по микробиологии и позволяют осуществить выполнение всех видов лабораторных работ, предусмотренных учебной программой по разделу «Экология и значение микроорганизмов» данного курса.

Рекомендации включают описание 4 (четырёх) лабораторных занятий по темам: «Количественный учет микробов в объектах среды», «Качественный учет микробов в объектах среды», «Изучение нормальной микрофлоры человека и инфекционного процесса», «Изучение факторов неспецифической и специфической защиты».

Рекомендации структурированы следующим образом: изучение каждой темы начинается с теоретической части, в которую включены тезисы лекций, а также вспомогательные материалы в виде пояснительных таблиц и схем для записи в рабочую тетрадь. Далее следуют тесты для самоподготовки. Затем идет практическая часть, содержащая информацию о проведении соответствующей лабораторной работы. Каждая лабораторная работа начинается с цели лабораторного занятия, за которой следуют описательная часть, оснащение и сам ход выполняемой работы. Затем дается программа лабораторного занятия, включающая домашнее задание для подготовки, а именно, задание для самостоятельной работы по заполнению рабочей тетради и перечень вопросов для теоретической подготовки. Следом идет рабочее задание, содержащее описание того, что необходимо выполнить непосредственно на лабораторном занятии, и пояснения к тому, что должно содержаться в альбоме. Также прилагаются рисунки и образцы таблиц как пример заполнения альбома. После этого представлены вопросы для подготовки к следующему занятию.

Теоретический материал дает возможность закрепить и конкретизировать знания студентов о специфике взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой, значении их в биосфере, использовании в хозяйственной деятельности, а также о влиянии микробов на организм человека и факторах защиты организма от

возбудителей болезней человека. Практическая часть работы обеспечивает получение определенных навыков выполнения микробиологических исследований, в частности, выделения микроорганизмов из объектов окружающей среды и организма человека на общих и специальных питательных средах, определения микробных чисел, анализа и оценки факторов неспецифической и специфической защиты от патогенных микробов.

Методические рекомендации предназначены для студентов биологических специальностей учебных заведений, а также может использоваться преподавателями дисциплины «Микробиология».

Данная информация также может быть полезна для учителей средних школ, как методический материал для более углубленного изучения предмета биологии или проведения факультативных занятий.

Раздел

ЭКОЛОГИЯ И ЗНАЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

ТЕМА 1. ЭКОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Вопросы для самоподготовки к занятию 1.

«Количественный учет микробов в объектах среды».

1. Распространение бактерий в окружающей среде.
2. Действие физических факторов на микроорганизмы.
3. Действие химических факторов на микроорганизмы.
4. Типы биотических взаимоотношений у микробов.
5. Особенности взаимодействия микроорганизмов с растени-

ями

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Микрофлора окружающей среды.

Микрофлора почвы. Почва – главный резервуар и естественная среда обитания микроорганизмов, принимающих участие в процессах ее формирования и самоочищения, а также в круговороте веществ в природе. Нижняя граница распространения микробов в литосфере проходит на уровне 3-4 км. Микробное число почвы – это количество микробов в 1г почвы. В песчаных почвах оно 10^5 , в глинистых – 10^8 , в черноземах – 10^9 .

В почве большинство представителей нормальной и патогенной микрофлоры человека и животных длительно не выживают. Однако некоторые бактерии, входящие в состав нормальной микрофлоры человека, включаются в биоценоз почвы. В почву они попадают с фекально-бытовыми и сточными водами различных предприятий и служат санитарными показателями. Фекальное загрязнение – наличие в почве *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus faecalis*.

Микрофлора воды. Вода – тоже естественная среда обитания разнообразных микроорганизмов. Границ распространения микробов в водной среде нет. Микробное число в среднем $10\text{--}10^6$ в 1 мл. В грунтовых водах – несколько единиц, в полисапробной зоне – 10^6 , в мезосапробной – 10^5 , в олигосапробной – $10^2\text{--}10^3$. В прибрежной зоне открытых водоемов, особенно вблизи крупных населенных пунктов, вода содержит большое количество заносных микробов, в том числе патогенных и условно-патогенных для человека, обитающих в кишечнике животных и самого человека и возбудители кишечных инфекций (брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций и др.). Поэтому есть санитарные показатели воды: коли-титр – наименьший объем, где находится 1 бактерия группы кишечной палочки БГКП (он равен 300 мл) и коли-индекс – количество БГКП в 1 л воды (равен 1-3). Хорошая вода для питья содержит не > 100 бактерий в 1 мл, сомнительная – 101-500, грязная – > 500 .

Микрофлора воздуха. Воздух не пригоден для размножения микроорганизмов, так как в нем недостаточно влаги и питательных веществ, а солнечная радиация и высушивание действуют на микроорганизмы губительно. Но микробы постоянно присутствуют в воздухе, попадая в него из других сред. Микробное число – от нескольких штук до 10^4 в 1 м³. При этом в лесу до 350 в 1 м³, в помещении – до 10^4 . Воздух закрытых помещений содержит в основном микрофлору дыхательных путей и кожи человека, многие представители которой способны переживать в воздухе в течение времени, достаточного для инфицирования находящихся в нем людей. Воздух в помещении считается чистым, если зимой микробное число – до 4500 в 1 м³, летом – до 1500 в 1 см³. Граница распространения микробов в атмосфере проходит на высоте 10–20 км и связана с озоновым слоем.

2. Действие физических и химических факторов на микроорганизмы.

Микроорганизмы подвержены постоянному воздействию факторов внешней среды. Неблагоприятные воздействия могут приводить к гибели микроорганизмов, то есть оказывать микробицидный эффект, либо подавлять размножение микробов, оказывая

статическое действие. Некоторые воздействия оказывают избирательный эффект на отдельные виды, другие – проявляют широкий спектр активности. На основе этого созданы методы подавления жизнедеятельности микробов, которые используются в медицине, быту, сельском хозяйстве и др.

Влияние физических факторов на микроорганизмы:

1) Температура. По отношению к температурным условиям микроорганизмы разделяют на экологические группы: термофильные, психрофильные и мезофильные.

- *Термофильные виды*. Зона оптимального роста равна 50-60°C, верхняя зона задержки роста – 75°C. Термофилы обитают в горячих источниках, участвуют в процессах самонагревания навоза, зерна, сена.

- *Психрофильные виды* (холодолюбивые) растут в диапазоне температур 0-10°C, максимальная зона задержки роста 20-30°C. К ним относят большинство сапрофитов, обитающих в почве, пресной и морской воде. Но есть некоторые виды, вызывающие заболевания у человека.

- *Мезофильные виды* лучше растут в пределах 20-40°C; максимальная 43-45°C, минимальная 15-20°C. В окружающей среде могут переживать, но обычно не размножаются. К ним относится большинство патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Высокая температура вызывает коагуляцию структурных белков и ферментов микроорганизмов. Большинство вегетативных форм гибнет при температуре 60 °C в течение 30 мин, а при 80–100 °C – через 1 мин. Споры бактерий устойчивы к температуре 100 °C, гибнут при 130 °C и более длительной экспозиции (до 2 ч.). Для сохранения жизнеспособности относительно благоприятны низкие температуры (например, ниже 0 °C), безвредные для большинства микробов.

2) Влажность. При относительной влажности окружающей среды ниже 20% жизнедеятельность большинства бактерий прекращается. Время их отмирания при высушивании различно (например, холерный вибрион – за 2 суток, а микобактерии – за 90 суток). Поэтому высушивание не используют как метод элиминации микробов с субстратов. Особой устойчивостью обладают споры бактерий. Широко распространено искусственное высушивание

микроорганизмов, или лиофилизация. Метод включает быстрое замораживание с последующим высушиванием под низким (вакуумом) давлением (сухая возгонка). Лيوфильную сушку применяют для сохранения иммунобиологических препаратов (вакцин, сывороток), а также для консервирования и длительного сохранения культур микроорганизмов.

3) Излучения. Солнечный свет губительно действует на микроорганизмы, исключением являются фототрофные виды. Наибольший микробицидный эффект оказывает коротковолновые УФ-лучи. Энергию излучения используют для дезинфекции, а также для стерилизации термолабильных материалов. УФ-лучи (в первую очередь коротковолновые, т. е. с длиной волны 250–270 нм) действуют на нуклеиновые кислоты. Микробицидное действие основано на разрыве водородных связей и образовании в молекуле ДНК димеров тимина, приводящем к появлению нежизнеспособных мутантов. Применение УФ-излучения для стерилизации ограничено его низкой проникаемостью и высокой поглотительной активностью воды и стекла. Рентгеновское и γ -излучение в больших дозах также вызывает гибель микробов. Облучение вызывает образование свободных радикалов, разрушающих нуклеиновые кислоты и белки с последующей гибелью микробных клеток. Применяют для стерилизации бактериологических препаратов, изделий из пластмасс.

Микроволновое излучение применяют для быстрой повторной стерилизации длительно хранящихся сред. Стерилизующий эффект достигается быстрым подъемом температуры. Определенные частоты ультразвука при искусственном воздействии способны вызывать деполимеризацию органелл микробных клеток, под действием ультразвука газы, находящиеся в жидкой среде цитоплазмы, активируются и внутри клетки возникает высокое давление (до 10 000 атм), появляются кавитационные полости. Это приводит к разрыву клеточной оболочки и гибели клетки. Ультразвук используют для стерилизации пищевых продуктов (молока, фруктовых соков), питьевой воды.

5) Давление. Бактерии мало чувствительны к изменению давления. Некоторые виды бактерий выдерживают давление до 3000 – 5000 атм, а бактериальные споры – даже 20 000 атм. Но в условиях глубокого вакуума субстрат высыхает и жизнь невозможна.

6) Фильтрация. Для удаления микроорганизмов применяют различные материалы (мелкопористое стекло, целлюлоза, коалин); они обеспечивают эффективную элиминацию микроорганизмов из жидкостей и газов. Фильтрацию применяют для стерилизации жидкостей, чувствительных к температурным воздействиям, разделения микробов и их метаболитов (экзотоксинов, ферментов), а также для выделения вирусов.

7. Действие химических факторов на микроорганизмы.

Существенно влияет на жизнь бактерий кислотность среды. По отношению к pH также можно выделить экологические группы бактерий. Бактерии, предпочитающие pH 4,5–5,0 называются ацидофилы, pH ок. 7,0 – нейтрофилы, pH 7,8–8,5 – алкалофилы.

Способность ряда химических веществ подавлять жизнедеятельность микроорганизмов зависит от концентрации химических веществ и времени контакта с микробом. Дезинфектанты и антисептики дают неспецифический микробицидный эффект; химиотерапевтические средства проявляют избирательное противомикробное действие. Спирты, фенолы, тяжелые металлы и альдегиды вызывают денатурацию белков; детергенты (например, моющие средства) приводят к нарушению целостности ЦПМ, анилиновые красители (например, бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, фуксин и др.) и окислители (раствор йода, марганцовокислый калий и др.) инактивируют белки. Антибиотики могут вызывать гибель бактерий (бактерицидный эффект) или задерживать размножение (бактериостатический эффект).

3. Межвидовые биотические отношения прокариот.

У микробов большое разнообразие внутривидовых и межвидовых биотических отношений. Есть негативные отношения. К ним относятся:

Конкуренция (антагонизм) – взаимное угнетение (например, у молочнокислых и гнилостных бактерий).

Аменсализм (антибиоз) – одностороннее полное угнетение. Такой эффект оказывают бактерии, выделяющие антибиотики или растения, выделяющие фитонциды в отношении чувствительных к ним бактерий.

Отношения ресурс-потребитель, т.е. использование одним видом другого в качестве ресурса также бывают двух вариантов: а)

хищничество (бактерии и поедающие их простейшие); б) паразитизм (болезнетворные патогенные, зоопатогенные или фитопатогенные бактерии, вирусы, фаги и чувствительные к ним организмы).

К позитивным отношениям можно отнести следующие:

Комменсализм: а) нахлебничество – использование одним остатков пищи другого; б) квартиранство – использование одним жилища другого. Например, человек и некоторые представители его микрофлоры ротовой полости (а и б), бактерии эпифиты (б).

Метабиоз – подготовка условий жизни одних (например, удаление продуктов метаболизма) благодаря особенностям жизни других. Это бактерии-аммонификаторы и бактерии-нитрификаторы, бактерии-аэробы и бактерии-анаэробы.

Мутуализм (симбиоз) – облигатные взаимовыгодные отношения как у человека и его нормальная кишечная микрофлора, клубеньковых бактерий-азотфиксаторов и бобовых растений, бактерий ризосферы и корней растений.

Синергизм – усиление физиологических функций в присутствии друг друга. Это делают дрожжи и молочнокислые бактерии.

Весь комплекс биотических отношений микробов определяет их важную роль в системе живой природы.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 1. Распространение микроорганизмов в окружающей среде

Среда	Количество (микробное число)	Санитарные показатели	Граница распространения
Воздух	От нескольких до 10^4 в 1 м^3 (в лесу до 350 в 1 м^3 , в помещении – до 10^4)	Чистый воздух в помещении: зимой – до 4500 в 1 м^3 летом – до 1500 в 1 м^3	10-20 км (озоновый слой)
Вода	$10-10^6$ в 1 мл в грунтовых водах – несколько единиц, в полисапробной зоне – 10^6 в мезосапробной – 10^5 в олигосапробной – 10^2-10^3	Коли-титр (наименьший объем, где находится 1 бактерия группы кишечной палочки БГКП) = 300 мл Коли-индекс (количество БГКП в 1 л воды) = 1-3 Хорошая вода для питья – не > 100 в 1 мл сомнительная – 101-500 грязная – > 500	Нет границ.

Среда	Количество (микробное число)	Санитарные показатели	Граница распространения
Почва	Песчаные почвы – 10^5 в 1 г Глинистые почвы – 10^8 в 1 г Черноземы – 10^9 в 1 г	Фекальное загрязнение – наличие <i>E. coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>	3-4 км, наибольшее количество на глубине 10-20 см

Таблица 2. Действие факторов окружающей среды на микроорганизмы

Фактор		Реакция на действие фактора
Физические	t°	Психрофилы – от -5 до 20 °C Мезофилы – от 10 до 45 °C (пределы роста) Термофилы – от 40 до 90 °C
	Влажность	Менее 20 % – гибель из-за высыхания
	УФ-лучи 250–260 нм	Гибель, но есть устойчивый вид, живущий в ядерных реакторах (<i>Micrococcus radiodurans</i>)
	pH	Ацидофилы 4,0–4,5 Алкалофилы 8–9 (требование к pH среды) Нейтрофилы 7,0–7,5
	Ультразвук	Гибель из-за образования кавитационных полостей, повреждающих клетку изнутри
	Давление	Не чувствительны из-за малых размеров
Химические	Спирты	Денатурация белков
	Фенолы	
	Тяжелые металлы	
	Альдегиды	
	Детергенты (например, моющие средства)	Нарушение целостности ЦПМ
	Анилиновые красители	Инактивация белков
	Окислители	Инактивация белков
	Антибиотики	а) гибель (бактерицидный эффект) б) задержка размножения (бактериостатический эффект)

Таблица 3. Межвидовые биотические отношения у прокариот

Название отношений	Характеристика	Пример
Конкуренция (антагонизм)	Взаимное угнетение	Молочнокислые и гнилостные бактерии.
Аменсализм (антибиоз)	Одностороннее полное угнетение	Бактерии, выделяющие антибиотики или растения, выделяющие фитонциды и чувствительные к ним бактерии.

Название отношений	Характеристика	Пример
Ресурс-потребитель: а) хищничество; б) паразитизм	Использование одним другого в качестве ресурса	а) бактерии и поедающие их простейшие; б) болезнетворные бактерии, вирусы, фаги и чувствительные к ним организмы;
Комменсализм: а) нахлебничество; б) квартиранство.	Использование одним (а) остатков пищи или (б) жилища другого	а) человек и некоторые представители его микрофлоры ротовой полости; б) микробы – эпифиты;
Сателлизм (спутничество)	Стимуляция одним развития другого	Дрожжи, выделяющие ростовые вещества для сарцин.
Метабиоз	Подготовка условий жизни одних благодаря особенностям жизни других	Бактерии-аммонификаторы и бактерии-нитрификаторы, бактерии-аэробы и бактерии-анаэробы.
Мутуализм (симбиоз)	Облигатные взаимовыгодные отношения	Человек и его нормальная кишечная микрофлора, клубеньковые бактерии-азотфиксаторы и бобовые растения.
Синергизм	Усиление физиологических функций в присутствии друг друга	Дрожжи и молочнокислые бактерии.

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Экология микроорганизмов

- Наименьшее влияние на микроорганизмы оказывает:
 - влажность
 - температура
 - свет
 - давление
- В 1 г плодородной почвы содержится бактерий:
 - 10^2
 - 10^9
 - 10
 - 10^5
- Антибиотики, разрушающие бактерии, называются:
 - широкого спектра действия
 - бактерицидные
 - бактериостатические
 - узкого спектра действия
- Наибольшее количество БГПК, которое можно обнаружить в 1 л воды по санитарным нормам:
 - микробное число
 - коли – индекс
 - инфицирующая доза
 - коли – титр
- Примером комменсализма являются отношения:
 - человека и его нормальной микрофлоры ротовой полости

- б) клубеньковых бактерий и бобовых растений
 - в) фагов и бактерий
 - г) аммонифицирующих и нитрифицирующих бактерий
6. Позитивные взаимоотношения с растениями устанавливают все группы бактерий, кроме:
- а) эпифитов
 - б) симбионтов
 - в) фитопатогенов
 - г) бактерий ризосферы
7. Граница распространения микроорганизмов в литосфере находится на уровне:
- а) 10–20 см
 - б) 1,0–1,5 м
 - в) нет границы
 - г) 3–4 км
8. Кавитационные полости, разрушающие бактериальную клетку, образуются при воздействии на нее:
- а) УФ – лучами
 - б) ультразвуком
 - в) антибиотиками
 - г) спиртами
9. Наименьшее количество микробов содержится:
- а) в воде открытых водоемов
 - б) грунтовой воде
 - в) в лесном воздухе
 - г) в воздухе помещений
10. Бактерии, предпочитающие pH 4,5–5,0:
- а) мезофилы
 - б) нейтрофилы
 - в) алкалофилы
 - г) ацидофилы
11. Антибиотики, прекращающие рост бактерий:
- а) бактерицидные
 - б) широкого спектра действия
 - в) узкого спектра действия
 - г) бактериостатические
12. Освобождение одним видом территории от продуктов метаболизма другого вида называется:
- а) антагонизм
 - б) паразитизм
 - в) симбиоз
 - г) метабиоз
13. По санитарным нормам коли-титр:
- а) 3 БГКП / л
 - б) 300 мл
 - в) 350 бактерий / 1 м³
 - г) 10² бактерий / мл
14. У психрофилов предпочитаемая температура:
- а) +10 °С
 - б) –20 °С
 - в) +30 °С
 - г) +95 °С
15. Верхняя граница распространения микроорганизмов в биосфере определяется:
- а) низкой температурой
 - б) озоновым слоем
 - в) обилием света
 - г) низким давлением

16. Выделение антибиотиков приводит к типу отношений:
а) антибиоз г) метабиоз
б) комменсализм в) антагонизм
17. Количество микроорганизмов в 1 м³ чистого воздуха помещений зимой в норме:
а) до 4500 г) до 1500
б) до 350 в) 10⁴
18. Нарушают целостность мембран бактерий:
а) фенолы г) соли тяжелых металлов
б) спирты в) детергенты
19. Граница распространения микроорганизмов в воде проходит на уровне:
а) 100–200 м г) границ нет
б) 3–4 км в) 10–20 см
20. К классификации микроорганизмов по отношению к температуре не относится группа:
а) ацидофилов г) мезофилов
б) термофилов в) психрофилов

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа №1.

Количественный учет микробов в объектах среды

Цель лабораторного занятия:

1. Изучить способы количественного учета микроорганизмов в объектах окружающей среды (почве, воде и воздухе).
2. Ознакомиться с методами санитарно-бактериологического исследования почвы и воды.

Описательная часть лабораторного занятия.

Для изучения вопроса распространения микроорганизмов в окружающей среде важно выяснить их количество.

Наибольшее количество микроорганизмов обитает в почве.

Для проведения микробиологического анализа проводят растирание 1 г почвенного образца в фарфоровой ступке, смочив стерильной дистиллированной водой до пастообразного состояния, в

течение 5 минут с целью дезинтеграции почвенных частиц. Далее готовят почвенную суспензию в 100 мл стерильной воды, затем ряд последовательных разведений почвенной суспензии в пробирках в зависимости от предполагаемой численности микроорганизмов, учитывая характеристики почвы. Для выделения и количественного учета бактерий из 3 последних разведений делают посев почвенной суспензии в чашки Петри на одну из питательных сред: МПА, КАА, почвенный агар, среду Эшби, среду Чапека и др. Посев проводят по методу Дригальского. Засеянные чашки Петри переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 28–30°. Колонии бактерий на чашках Петри подсчитывают через 3–5 суток, грибов и дрожжей через 5–7, актиномицетов – через 7–15. Наиболее точный результат получается при развитии на чашке Петри 50–200 колоний бактерий и актиномицетов и 30–50 колоний грибов.

Для исследования воды открытых водоемов также готовят серию последовательных разведений до 10^{-3} . Воду из водопровода и артезианских колодцев можно исследовать без разведений.

Применяют следующий метод посева. Из пробирки последнего разведения берут 1 мл воды и вносят в пробирку со стерильной расплавленной средой (температура ее не должна быть выше 45 °С). Закрыв пробку, быстро перемешивают содержимое, вращая пробирку между ладонями, и выливают в стерильную чашку Петри. Чашку закрывают и, осторожно наклоняя ее, разравнивают питательную среду по всей поверхности дна, дают пластинке застыть.

Имеется несколько методов микробиологического исследования воздуха, но наиболее простой из них седиментационный – оседание микробов по Коху. При использовании этого метода чашки Петри с питательной средой открывают на 5 минут. Чашки закрывают и ставят в термостат при температуре 30–35 °С на 2–3 суток. Подсчет колоний проводят на всей поверхности чашки. Считают, что из каждой живой клетки вырастает колония, и на площадь примерно в 100 см² в течение 5 минут оседает столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха, а в 1 м³ их содержится в 100 раз больше.

Для учета просматривают выросшие на средах колонии бактерий и подсчитывают их количество.

Чтобы подсчитать число бактерий в 1 г почвы (микробное число почвы), число выросших колоний на чашке умножают на сте-

пень разведения (число, показывающее, во сколько раз в каждом конкретном случае разбавили 1 г почвы). Для правильного учета подсчитывают только такие чашки, в которых колоний свыше десяти, но не более 200 (в последнем случае при условии, если колонии мелкие).

При большом количестве колоний (больше 200) в последнем разведении можно пользоваться приспособлением, которое называется счетная камера Вальфюгеля. Она представляет собой стеклянную пластинку, разделенную на квадратные сантиметры и более мелкие единицы. Чашки Петри с выросшими колониями помещают на подставку камеры вверх дном и покрывают этой стеклянной пластинкой, подсчитывают число колоний в 10–20 квадратах с помощью лупы при ярком боковом освещении в разных местах чашки, выводят среднее арифметическое на 1 см² и делают пересчет на общую площадь чашки, которую вычисляют по формуле площади круга $S = \pi \cdot r^2$.

Также подсчитывают колонии на посевах из воды. Если посев был сделан из разведений, то количество колоний умножают на степень разведения 1 мл воды из обследуемого источника, так как микробное число воды – это количество бактерий в объеме 1 мл. Если был сделан посев 1 мл воды без разведений, то количество подсчитанных на чашке колоний и представляет собой микробное число воды.

Микробное число воздуха определяется как количество бактерий в 1 м³ воздуха. Подсчитав количество, выросших колоний на чашках Петри и зная объем воздуха, который был пропущен через питательные среды, можно сделать пересчет численности бактерий на 1 м³ воздуха.

Санитарно-микробиологическое обследование объектов среды.

Кроме сапрофитных микроорганизмов, живущих в окружающей среде, в почве, воде и воздухе могут находиться патогенные для человека микробы, попадающие в эти среды из организма человека и животных. Возможное загрязнение внешней среды патогенными микробами определяют на основании косвенного показателя – обнаружение так называемых санитарно – показательных микробов, указывающих на зараженность их выделениями чело-

веческого организма. Выявляют наличие БГКП (бактерий группы кишечной палочки). Интенсивность фекального заражения объектов внешней среды характеризуется двумя показателями: 1) коли-титр – наименьшее количество исследуемого материала (выраженное в миллилитрах или граммах), в котором обнаруживается 1 кишечная палочка; 2) коли – индекс – количество особей кишечной палочки, обнаруженное в 1 л жидкости или 1 г плотного вещества.

Оснащение лабораторного занятия.

Чашки Петри с универсальной питательной средой и пустые стерильные чашки Петри, пробирки с универсальной питательной средой, пробирки с разведениями почвы до 10^{-9} , колбы с водопроводной водой.

Водяная баня, стерильные пипетки на 1 и 5 мл, шпатели Дригальского, спиртовки, флаконы со спиртом.

Таблицы: определение коли-индекса воды и почвы титрационным методом.

Ход выполняемой работы.

1. Взять стерильными пипетками по 0,1 мл почвенной суспензии из 3 последних разведений и сделать посевы на агаровые пластины в чашках Петри методом Дригальского.

2. Растопить на водяной бане МПА в пробирке, остудить на воздухе до 45–50 °С, контролируя температуру прикладывая пробирки к щеке.

3. Набрать стерильной пипеткой 1 мл водопроводной воды, взятой для исследования, влить в пробирку с расплавленным и остуженным МПА и перемешать воду со средой, вращая пробирку между ладонями.

4. Вылить содержимое пробирки в стерильную чашку Петри, и слегка покачивая ее распределить равномерно по дну, оставить до застывания среды. Примечание. Манипуляции 3 и 4 пунктов выполнять быстро, чтобы не допустить образования сгустков среды при остывании.

5. Снять крышку с чашки Петри со стерильной агаровой пластиной, положить, не переворачивая, рядом, выдержать 5 минут для оседания микроорганизмов из воздуха.

6. Закрыть все чашки крышками, перевернуть, подписать и поставить в термостат на инкубацию.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Таблица 1. Распространение микроорганизмов в окружающей среде.

2. Таблица 2. Действие факторов окружающей среды на микроорганизмы.

3. Таблица 3. Межвидовые биотические отношения у прокариот.

б) Выучить:

6. Распространение бактерий в окружающей среде.

7. Действие физических факторов на микроорганизмы.

8. Действие химических факторов на микроорганизмы.

9. Типы биотических взаимоотношений у микробов.

10. Особенности взаимодействия микроорганизмов с растениями

Рабочее задание:

1. Изучить методы определения микробных чисел в почве, воде и воздухе.

2. Из 3 последних разведений почвы сделать посев на 3 чашки Петри с помощью шпателя Дригальского.

3. Сделать посев 1 мл водопроводной воды в стерильную чашку Петри, предварительно смешав ее с расплавленным питательным агаром.

4. Сделать посев микроорганизмов из воздуха на стерильную питательную среду в открытой чашке Петри методом седиментации.

5. Зарисовать все схемы посева в альбом.

Содержание альбома:

1. Рис. 1. Схема посева почвы на определение микробного числа.

2. Рис.2. Схема посева воды на определение микробного числа.

3. Рис 3. Схема посева воздуха на определение микробного числа.

Пример заполнения альбома:

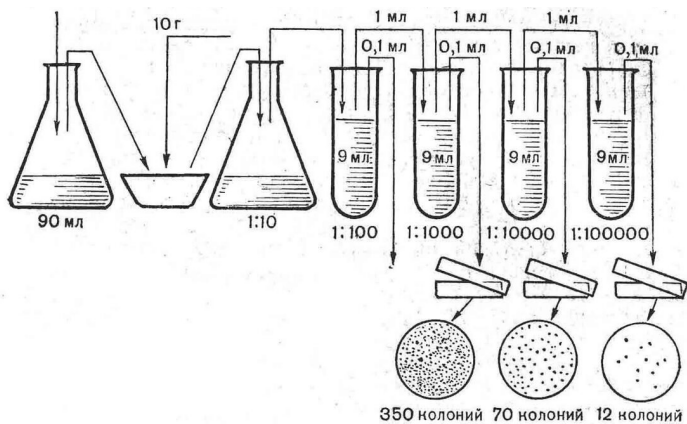


Рис. 1. Схема посева почвы на определение микробного числа

Рис. 2. Схема посева воды на определение микробного числа – сделать самостоятельно по аналогии со схемой посева почвы с использованием описания опыта.

Рис 3. Схема посева воздуха на определение микробного числа – сделать самостоятельно по аналогии со схемой посева почвы с использованием описания опыта.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
2. Бушева Е.Б. Микробиология в таблицах, схемах и рисунках (учебное пособие). – Тирасполь, 2010.
3. Гусев М.В. Микробиология [Текст]: учебник для студ. учрежд. высш. проф. образования / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 464 с.
4. Овчарова Е.Н. Биология (растения, грибы, бактерии, вирусы) [Электронный ресурс]: учебное пособие для поступающих в вузы / Е.Н. Овчарова, В.В. Елина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 704 с.

5. Микробиология, физиология питания, санитария [Электронный ресурс]: Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 240 с.

6. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М., 2004. – 256 с.

7. Шапиро Я. С. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы [Текст]: учеб. пособие / Я. С. Шапиро. – М., 2003. – 323 с.

8. ibooks.ru[Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://ibooks.ru>

9. Znanium.com[Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://znanium.com>

Вопросы для самоподготовки к занятию 2.

«Качественный учет микробов в объектах среды»

1. Роль микроорганизмов в биосфере.
2. Роль микроорганизмов в круговороте углерода, азота, фосфора, серы.
3. Превращение железа микроорганизмами.
4. Использование микроорганизмов в пищевой промышленности.
5. Использование микроорганизмов в сельском хозяйстве.
6. Использование микроорганизмов в технике и для биочистки.
7. Биотехнология и генная инженерия.

ТЕМА 2. ЗНАЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРИРОДЕ И ХОЗЯЙСТВЕННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Роль микроорганизмов в круговороте вещества в природе.

Микробы играют важнейшую роль в круговороте веществ в биосфере, так как входят во все три функциональные группы: продуцентов, консументов и редуцентов. Микроорганизмы участвуют во всех основных биогеохимических циклах: С, N, P, S и др. В основе любого цикла лежат противоположно направленные процессы

создания органических веществ из неорганических и разложения органических веществ до неорганических.

Роль микроорганизмов в круговороте углерода в природе.

Круговорот углерода складывается из двух взаимосвязанных процессов: 1) потребление углекислоты атмосферного воздуха автотрофными микробами в процессах фотосинтеза и хемосинтеза; 2) возвращения углекислоты в атмосферу путем гидролитического расщепления в аэробных и анаэробных условиях в ходе биологического окисления и почвенного дыхания. При фотосинтезе и хемосинтезе образуются различные органические соединения. Возвращение углекислоты происходит микроорганизмами почвы и воды. Большое количество углекислоты поступает обратно в атмосферу при минерализации органических остатков растений и животных почвенными бактериями и грибами. Это и есть почвенное дыхание. Использование глюкозы в качестве основного энергетического материала при процессах биологического окисления (брожение, дыхание) также приводит к высвобождению углекислоты. Дополнительный цикл круговорота углерода обусловлен анаэробными почвенными микроорганизмами. Одни из них (метанобактерии) в условиях влажных почв восстанавливают CO_2 в метан (CH_4). Другие (метилотрофы), наоборот, окисляют метан в углекислоту. Карбоксидобактерии окисляют окись углерода до двуокиси: $\text{CO} \rightarrow \text{CO}_2$.

Роль микроорганизмов в круговороте азота в природе.

Круговорот азота в природе складывается из пяти основных процессов: 1) фиксация азота атмосферы с образованием связанной формы азота, которая затем поступает в биомассу; 2) нитрификация-окисление неорганического азота; 3) включение азота в биомассу растениями, которые используют продукты первых двух процессов; 4) денитрификация – восстановление азота до молекулярного состояния; 5) аммонификация (гниение или тление при широком доступе кислорода) с выделением аммиака, также используемого растениями. Азот атмосферы фиксируют свободноживущие азотфиксаторы (азотобактер) и микробы-симбионты – клубеньковые бактерии: $\text{N}_2 = \text{H}_2\text{N} = \text{H}_3\text{N}$. Они имеют ферменты, обладающие способностью связывать свободный азот с другими химическими элементами. Эти микроорганизмы обогащают почву связанным азотом и способствуют ее плодородию. Аммонификация, или гниение, – процесс разложения белков на менее слож-

ные соединения: пептоны, пептиды, аминокислоты, до аммиака. Процессы нитрификации, или окисления, аммиака в нитриты, а затем в нитраты осуществляют почвенные бактерии, в результате растения получают питательные вещества. Сначала бактерии (нитрозомонас) окисляют аммиак в азотистую кислоту, получая при этом энергию, необходимую для своей жизни. На втором этапе нитратные бактерии (нитробактер) окисляют азотистую кислоту в азотную. Процессы денитрификации идут при наличии в почве денитрифицирующих бактерий, которые восстанавливают нитраты до молекулярного азота, возвращающегося в атмосферу. Бактерии, осуществляющие круговорот азота в природе могут быть либо симбионтами, либо свободноживущими.

Роль микроорганизмов в круговороте серы в природе.

Круговорот серы осуществляется в результате жизнедеятельности бактерий, окисляющих или восстанавливающих ее. Процессы восстановления серы (десульфификация) ведет к образованию сероводорода. В дальнейшем он окисляется (процесс сульфификации) при участии серобактерий и тиобацилл. Сульфаты могут использовать растения.

Роль микроорганизмов в круговороте фосфора.

Круговорот фосфора несколько отличается от круговорота остальных элементов. Освобождение фосфора из органических соединений происходит в результате процессов гниения. Неполное разложение фосфорсодержащей органики называется гумификация, а полное – минерализация. От этих процессов зависит плодородие почв. Фосфорные бактерии, находящиеся в почве и воде, используют для своей жизнедеятельности нерастворимые соединения фосфора, переводя их в растворимые. Эти соединения потом могут быть использованы растениями. Переходу нерастворимых соединений фосфора в растворимые способствуют также нитрифицирующие и серные бактерии, образующие кислоты при процессах брожения.

2. Микробное превращение железа.

Участие микроорганизмов в превращениях железа в почве, может быть прямым и косвенным. *Окисление железа в кислой среде* происходит с участием специфических железобактерий за счет кислорода воздуха и с образованием энергии по типу хемосинтеза.

Окисление железа в нейтральной среде (в почвах гумидной зоны) – процесс побочный для осуществляющих его микроорганизмов и идет без использования ими энергии этого окисления. Проводится микробами-гетеротрофами.

Восстановление железа при сопряженном окислении органического вещества или водорода происходит в анаэробных условиях. Восстановленное железо образует нерастворимый минерал – вивианит (синяя болотная руда – фосфат закиси железа).

Таким образом, в превращениях железа в почве участвуют в основном микроорганизмы с неспецифическими функциями. Истинные железобактерии – группа облигатно-ацидофильных автотрофных бактерий, участвующие также и в превращениях серы.

3. Использование микробов в хозяйственной деятельности человека.

Микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности с древних времен и по сегодняшний день широко используются человеком в его хозяйственной деятельности: в пищевой и технической промышленности, в сельском хозяйстве, для биоочистки воды и почв, в биотехнологии и генной инженерии.

Разработка наиболее рациональных приемов использования микробов в хозяйственной деятельности человека и сознательная селекция микробов стали возможны только после разработки новых методов их изучения и конструирования новых форм с помощью генной инженерии.

В настоящее время в селекции микробов существуют три основных направления:

1. Селекция на повышение устойчивости к ядам, антибиотикам и на понижение требований к составу питательной среды;
2. Селекция на повышение накопления полезных веществ;
3. Селекция на повышение требований к ростовым веществам.

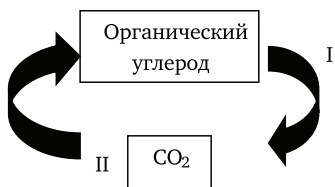
При помощи ступенчатой селекции получают новые штаммы продуцентов полезных веществ (антибиотики, аминокислоты, витамины и т. д.), способные расти и давать высокую продуктивность на более дешевых питательных средах, при менее интенсивном перемешивании и т. д. Это значительно уменьшает стоимость промышленного получения таких полезных веществ.

Методы селекции микробов постоянно совершенствуются. Благодаря им ученые смогли разработать способы для получения новых веществ и препаратов, в которых так нуждается человечество.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Схема 1. Геохимическая деятельность микроорганизмов

Круговорот углерода



I – разложение органических веществ

1 – аэробный гидролиз

2 – анаэробный гидролиз

II – синтез органических веществ

3 – фотосинтез

4 – хемосинтез

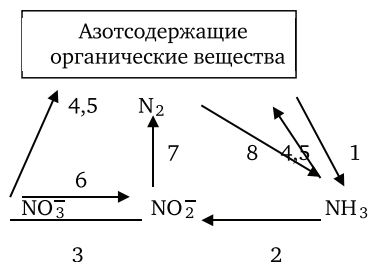
Другие превращения углерода:

$\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$ (метанобактерии)

$\text{CH}_4 \rightarrow \text{CO}_2$ (метилотрофы)

$\text{CO} \rightarrow \text{CO}_2$ (карбоксибактерии)

Круговорот азота



1 – аммонификация (гниение, разложение азотсодержащих органических веществ) – микроорганизмы аммонификаторы

2 – нитризация (окисление до нитратов) – нитробактерии

3 – денитрификация (восстановление нитратов до нитритов и далее до молекулярного азота) – микроорганизмы денитрификаторы

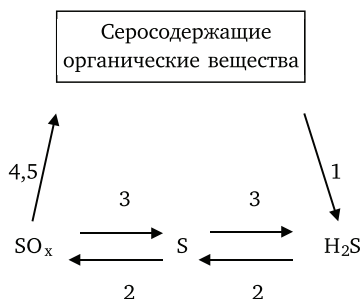
4 – ассимиляция (образование органических веществ растениями)

5 – иммобилизация (образование органики микроорганизмами)

6, 7 – денитрификация (восстановление нитратов до нитритов и далее до молекулярного азота) – микроорганизмы денитрификаторы

8 – азотфиксация (связывание молекулярного азота) – микроорганизмы азотфиксаторы

Круговорот серы



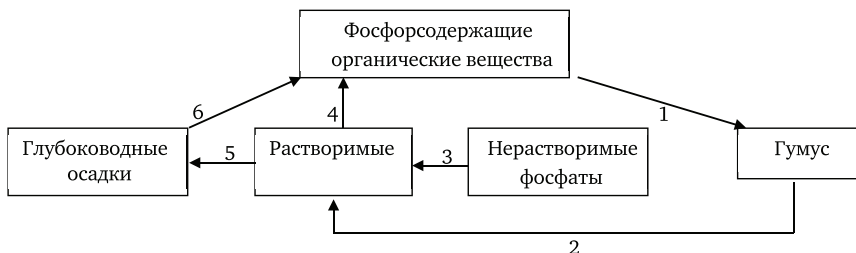
1 – гниение (разложение серосодержащих органических веществ) – гнилостные бактерии

2 – сульфификация (окисление сероводорода и серы) – микроорганизмы сульфификаторы

3 – десульфификация (восстановление окислов серы и серы) – микроорганизмы десульфификаторы

4,5 – ассимиляция растениями и иммобилизация бактериями

Круговорот фосфора



1 – гумификация (неполное разложение органики)

2 – минерализация (полное разложение органики)

3 – перевод нерастворимых природных фосфатов в растворимую форму метаболитами бактерий (мобилизация фосфатов)

4 – ассимиляция растениями и иммобилизация микробными клетками

5 – вымывание в водоемы и выведение из круговорота

6 – частичный возврат на сушу в форме морепродуктов

Таблица 4. Значение микробов в практической деятельности человека

Отрасль	Направление применения	Используемые бактерии или их процессы
Пищевая промышленность	1. Молочная (кисломолочные продукты) 2. Хлебопечение 3. Виноделие 4. Пивоварение 5. Квашение овощ. и фруктов	1. Молочнокислое брожение (+ спиртовое) 2. Спиртовое дрожжевое и бактериальное молочнокислое брожение 3. Спиртовое дрожжевое брожение 4. Спиртовое дрожжевое брожение 5. Молочнокислое брожение
Сельское хозяйство	Удобрения, содержащие почвенных бактерий АМБ (аутохтонная микрофлора бактериальная)	Нитрагин (с клубеньковыми бактериями) Азотобактерин (со свободноживущими азотфиксаторами) АМБ (с представителями аутохтонной почвенной микрофлоры) Фосфобактерин (с бактериями, транспортирующими фосфорные соединения)
	Силосование кормов	Молочнокислое брожение
Биоочистка	1. Очистка сточных вод: поля орошения, поля фильтрации азотенки, метантенки. 2. Очистка угольных шахт 3. Биорегенерация воздуха 4. Очистка воздуха от CO	1. Разложение бактериями органических примесей (например, в активном иле) 2. Метилотрофы, окисляют CH_4 3. Воронные бактерии, удаляют избыток CO_2 4. Карбоксибактерии, окисляют CO до CO_2
Биотехнология (с сер. 70-х г.)	Получение: 1. Антибиотики, ферменты и другие БАВ и технические вещества 2. Кормовой белок 3. Вакцины 4. Защита растений	1. Особенности метаболизма 2. Выращивание дрожжей 3,4. Бактериальные клетки или их компоненты
Генная инженерия	Получение штаммов микробов с заданным признаком	Введение ДНК со встроенным «целевым геном» в клетку-реципиента

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Значение в природе и хозяйственной деятельности

1. Разложение азотосодержащих органических веществ при широком доступе кислорода:

- | | |
|-----------------|-------------------|
| а) гниение | г) денитрификация |
| б) нитрификация | в) тление |

2. Штаммы микроорганизмов с заданными свойствами получают методом:

- а) биоконверсии г) генной инженерии
- б) брожения в) культивирования

3. Выделение CO_2 в результате разложения органических веществ в почве:

- а) аммонификация г) десульфофикация
- б) почвенное дыхание в) гниение

4. Вивианит образуется в результате:

- а) автотрофного окисления железа
- б) гетеротрофного окисления железа
- в) восстановления железа

5. Молочнокислое брожение используется во всех процессах, кроме:

- а) виноделия г) силосования
- б) хлебопечения в) квашения

6. Окисление неорганических соединений серы осуществляют бактерии:

- а) сульфокислотокисляющие г) аммонификаторы
- б) десульфокислотокисляющие в) гнилостные бактерии

7. Разложение органических веществ происходит на основе реакций:

- а) азотификсации г) сульфокислотокисления
- б) гидролиза в) десульфокислотокисления

8. Клубеньковые бактерии содержатся в удобрениях:

- а) азотобактерин г) нитрагин
- б) фосфобактерин в) АМБ

9. Основной процесс, необходимый для поступления азота в биомассу:

- а) азотификация г) сульфокислотокисление
- б) аммонификация в) денитрификация

10. Для биорегенерации воздуха используют:

- а) метилотрофных бактерий г) молочнокислых бактерий
- б) водородных бактерий в) карбоксидобактерий

11. Неполное разложение органики в круговороте фосфора:

- а) минерализация г) денитрификация
- б) гумификация в) десульфокислотокисление

12. Дрожжевое брожение (спиртовое) используют во всех процессах, кроме:

- а) квашения
- б) виноделия
- г) образования молочнокислых продуктов
- в) хлебопечения

13. Образование азотистых веществ, которые могут использовать растения, происходит во всех процессах, кроме:

- а) азотификации
- б) аммонификации
- г) нитрификации
- в) полной денитрификации

14. Антибиотики получают, используя:

- а) бактериальные клетки
- б) особенности метаболизма микроорганизмов
- в) выращивание дрожжей
- г) культивирование вирусов

15. Восстановление CO_2 осуществляют все группы бактерий, кроме:

- а) фотосинтетиков
- б) хемосинтетиков
- г) метилотрофов
- в) метанобактерий

16. В очистке воздуха угольных шахт используются:

- а) водородные бактерии
- б) карбоксидобактерии
- г) метилотрофные бактерии
- в) дрожжи

17. Разложение органических веществ не происходит в процессе:

- а) аэробного гидролиза
- б) анаэробного гидролиза
- г) денитрификации
- в) гниения

18. Свободноживущие азотификсаторы содержатся в удобрениях:

- а) азотобактерин
- б) нитрагин
- г) фосфобактерин
- в) АМБ

19. Восстановление неорганических соединений серы осуществляют бактерии:

- а) сульфификаторы
- б) десульфификаторы
- г) аммонификаторы
- в) гнилостные

20. Основной процесс, необходимый для возврата неорганического азота в атмосферу:

- а) азотификация
- б) денитрификация
- г) нитрификация
- в) аммонификация

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа № 2.

Качественный учет микробов в объектах среды

Цель лабораторного занятия:

1. Изучить методы выделения микробов, участвующих в превращении азотсодержащих и безазотистых веществ.
2. Ознакомиться с ролью микробов в основных биохимических циклах.

Описательная часть лабораторного занятия.

Микробы входят во все три функциональные группы в экосистемах: продуцентов, консументов и редуцентов. Особенно большое значение имеют микроорганизмы – редуценты, которые разрушают органические остатки и возвращают в круговорот минеральные вещества. К ним относятся почвенные бактерии и плесневые грибы разных видов, проявляющих свою активность в аэробных или анаэробных условиях. Они осуществляют превращение безазотистых органических веществ, таких как полисахариды (целлюлоза, пектиновые вещества, крахмал), жиры, углеводороды. Крахмал может разлагаться до декстринов либо до моносахаридов. Разрушение пектиновых веществ происходит медленно, в течение 2–8 недель.

Также есть в почвах микроорганизмы, осуществляющие превращение азотсодержащих органических веществ.

Азот – основной элемент, необходимый для образования важнейших органических веществ, таких как белки, нуклеиновые кислоты, АТФ и др. Круговорот азота на земле и перевод его в доступные для растений соединения осуществляется именно благодаря жизнедеятельности микроорганизмов. Сюда относятся процессы азотфиксации, нитризации, нитрификации.

Азотфиксация – процесс связывания молекулярного атмосферного азота и перевод его в форму неорганического соединения (NH_3), доступного растениям. В почве живет большое количество азотфиксаторов. Они могут быть свободноживущими (например, аэробные бактерии р. *Azotobacter* или анаэробные бактерии р. *Clostridium*) или симбиотрофными (такие, как клубеньковые бактерии р. *Rhizobium*).

Под нитрификацией понимают процессы окисления аммиака до нитрита и нитрата. Окисление аммиака под воздействием кислорода воздуха происходит в 2 этапа: 1) нитризация – окисление аммиака до азотистой кислоты, вызывается нитрозобактериями, например *Nitrosomonas*; 2) нитрификация – окисление азотистой кислоты до азотной, вызывается нитробактериями, например *Nitrobacter*.

Процесс восстановления нитратов и нитритов с образованием молекулярного азота N_2 или закисного азота N_2O называется денитрификацией. Большинство денитрификаторов относится к родам *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, но есть и представители бацилл (*Bac. licheniformis*).

В результате разложения азотосодержащих органических веществ происходит выделение аммиака в первую очередь белков. Аммонификацию ведут различные микроорганизмы: бактерии, грибы, актиномицеты, в аэробных и анаэробных условиях. Основные аэробы-аммонификаторы – бактерии рода *Bacillus*.

Кроме того почвенные микроорганизмы участвуют в превращении соединений серы, фосфора и железа.

Оснащение лабораторного занятия.

Чашки Петри с крахмальным агаром, со средой Эшби; пробирки с жидкой средой Виноградского, с пептонной водой и с МПБ и источником железа (гвозди), флакон с илом, бюксы с садовой почвой, трафареты для посева методом почвенных комочков.

Бактериологические петли и иглы, водяная баня, предметные и покровные стекла, банки с холодной водой, кристаллизаторы, препаратодержатели.

Флаконы с фуксином, генцианвиолетом, раствором Люголя, лакмусовая бумага, полоски фильтровальной бумаги, пропитанные уксуснокислым свинцом, спиртовки, спички, пипетки на 1-2 мл, флаконы с тушью, флаконы с иммерсионным маслом, тряпочки.

Микроскопы, флаконы с иммерсионным маслом, тряпочки для протирания оптики.

Таблицы: круговороты углерода, азота, серы, фосфора.

Ход выполняемой работы.

1. Сделать посев почвы методом почвенных комочков на крахмальный агар для выявления почвенных микроорганизмов,

способных гидролизовать крахмал. Для этого выполняются следующие действия:

- смочить почву водопроводной кипяченной водой до пастообразного состояния;

- подложить под чашку Петри с крахмальным агаром трафарет с черными точками (40–50 точек на расстоянии 1 см друг от друга);

- стерильной иглой положить комочки почвы величиной около 1–2 мм в диаметре над каждой точкой трафарета на поверхность среды;

- инкубировать несколько дней в термостате при температуре 25–30 °C до обрастания почвенных комочков колониями микроорганизмов;

- после инкубации наблюдать образование прозрачных зон вокруг почвенных комочков, которые после заливки агара раствором Люголя остаются бесцветными, если произошло разложение крахмала до глюкозы или становятся красно-бурыми при разложении крахмала до декстринов, в то время как на свободной от комочков поверхности развивается синее окрашивание в результате реакции крахмала с йодом;

- зарисовать чашки.

2. Таким же образом сделать посев на среду Эшби методом почвенных комочков для выявления бактерий рода *Asotobacter*. Инкубировать во влажной камере при температуре 25–30 °C 4–6 суток. После инкубации оценить обрастание комочков слизистыми колониями. Из такой колонии приготовить мазок, окрасить по Бурри-Гинсу, промикроскопировать. Зарисовать.

3. Сделать посев почвы в элективную жидкую среду Виноградского без источника азота для выделения анаэробных азотфиксаторов рода *Clostridium*. Для этого выполнить следующие действия:

- опустить в пробирку со средой Виноградского небольшой комочек почвы;

- пастеризовать на водяной бане при температуре 80 °C 10 минут для уничтожения вегетативных клеток и удаления воздуха;

- после пастеризации быстро остудить пробирку в холодной воде;

- закрыть пробку пробирки полиэтиленовым колпачком;

- инкубировать при температуре 25 °C 3–7 суток;

- зафиксировать помутнение среды, обильное газообразование и запах масла и уксуса;

- из придонного осадка стерильной пипеткой взять материал и приготовить препарат «раздавленная капля» в растворе Люголя, промикроскопировать с иммерсией;

- под микроскопом наблюдать подвижные веретеновидные клетки с синими включениями гранулезы и бесцветной спорой; зарисовать.

4. Сделать посев в пептонную воду на выявление аммонифицирующих бактерий рода *Bacillus*. Для этого выполнить следующие действия:

- опустить в пробирку с пептонной водой небольшой комочек почвы;

- положить под пробку пробирки лакмусовую бумажку и бумажку, пропитанную уксуснокислым свинцом;

- закрыть пробку пробирки полиэтиленовым колпачком;

- инкубировать 2–3 дня при температуре 25–30 °С;

- наблюдать посинение лакмуса и появление черного осадка сульфида свинца; помутнение среды;

- взять петлей часть среды с бактериями, приготовить мазок, окрасить простым методом, промикроскопировать с иммерсией;

- наблюдать крупные палочковидные клетки бацилл с бесцветными спорами; зарисовать.

5. Сделать посев ила в МПБ с источником железа (гвозди) для выделения железобактерий. Для этого выполнить следующие действия:

- опустить в пробирку с МПБ и железным гвоздем небольшой комочек ила;

- инкубировать при температуре 7–10 °С несколько дней;

- наблюдать разрушение гвоздя и помутнение среды;

- из среды с бактериями сделать мазок, окрасить генцианвиолетом, микроскопировать с иммерсией;

- наблюдать нитевидных бактерий, окруженных чехлом; зарисовать.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Схема 3. Геохимическая деятельность микроорганизмов.
2. Таблица 4. Значение микробов в практической деятельности человека.

б) *Выучить:*

1. Роль микроорганизмов в биосфере.
2. Роль микроорганизмов в круговороте углерода, азота, фосфора, серы.
3. Превращение железа микроорганизмами.
4. Использование микроорганизмов в пищевой промышленности.
5. Использование микроорганизмов в сельском хозяйстве.
6. Использование микроорганизмов в технике и для биочистки.
7. Биотехнология и генная инженерия.

Рабочее задание:

1. Изучить методы выделения специфических почвенных микробов.
2. Сделать посевы почвы методом почвенных комочков для выявления крахмалразрушающих и азотфиксирующих бактерий.
3. Сделать посев почвы в элективные жидкие среды для выделения анаэробных азотфиксирующих и гнилостных почвенных бактерий, водных железобактерий.
4. Инкубировать в течение недели.
5. Учесть результаты посевов методом почвенных комочков, сделать выводы.
6. Сделать микроскопические препараты из посевов и просмотреть с иммерсией.
7. Зарисовать схемы посева и микроскопические препараты в альбом.

Содержание альбома:

1. Рис. 1. Схема посева почвы методом почвенных комочков
2. Рис.2. Результаты посева для выявления крахмалразрушающих бактерий (сделать рисунок самостоятельно, используя рис.1 и описание данного опыта в ходе работы).
3. Рис 3. Нативный препарат «раздавленная капля» в растворе Люголя почвенных азотфиксирующих анаэробных клостридий

(уточнить образец рисунка, используя описание опыта в ходе работы), X100.

4. Рис.4. Мазок почвенных гнилостных бацилл, окраска фуксином, X100.

5. Рис. 5. Мазок водных железобактерий, окраска генцианвиолетом, X100.

Все рисунки подписать соответствующим образом.

Пример заполнения альбома:



Рис. 1. Схема посева почвы методом почвенных комочков

Рис.2. Результаты посева для выявления крахмалразрушающих бактерий –
сделать рисунок самостоятельно, используя рис. 1
и описание данного опыта в ходе работы

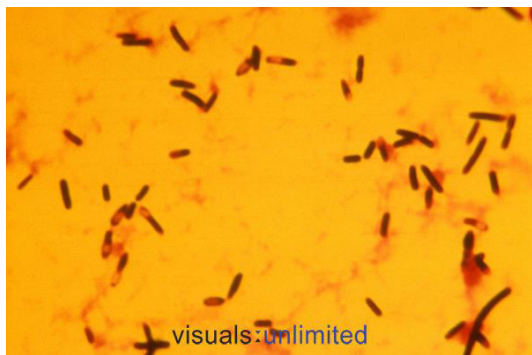


Рис 3. Нативный препарат «раздавленная капля» в растворе Люголя почвенных азотфиксирующих анаэробных клостридий (уточнить образец рисунка, используя описание опыта в ходе работы), X100



Рис. 4. Мазок почвенных гнилостных бацилл, окраска фуксином, X100

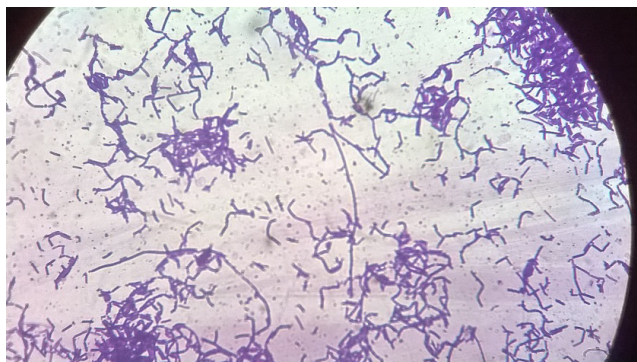


Рис. 5. Мазок водных железобактерий, окраска генцианвиолетом, X100

Все рисунки микроскопических препаратов сделать в стандартной форме (в кругу).

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
2. Бушева Е.Б. Микробиология в таблицах, схемах и рисунках (учебное пособие). – Тирасполь, 2010.
3. Гусев М.В. Микробиология [Текст]: учебник для студ. учрежд. высш. проф. образования / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 464 с.

4. Микробиология, физиология питания, санитария [Электронный ресурс]: Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 240 с.

5. Практикум по микробиологии [Текст]: практикум / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук; под ред.: А. И. Нетрусова, 2005. – 608 с.

6. Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Тюменцева Е.Ю.– Электрон. текстовые данные. – Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015.– 123 с. – Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788> (ЭБС «IPRbooks»)

7. Шапиро Я. С. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы [Текст]: учеб. пособие / Я. С. Шапиро, 2003. – 323 с. (БИ СГУ).

8. ibooks.ru[Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://ibooks.ru>

9. Znaniium.com[Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://znaniium.com>

Вопросы для самоподготовки к занятию 3.

«Значение микробов для здоровья человека. Изучение нормальной микрофлоры человека»

1. Нормальная микрофлора человека, ее значение для здоровья.
2. Инфекционный процесс, его условия и формы.
3. Патогенность и вирулентность микробов.
4. Эпидемический процесс.

ТЕМА 3. ЗНАЧЕНИЕ МИКРОБОВ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Микрофлора тела здорового человека.

Организм человека в норме содержит сотни видов микроорганизмов; среди них доминируют *бактерии*. Вирусы и простейшие представлены значительно меньшим числом видов. Кровь и внутренние органы здорового человека и животных

практически стерильны. Не содержат микробов и некоторые полости, соприкасающиеся с внешней средой – матка, мочевого пузыря. В течение внутриутробного периода организм развивается в стерильных условиях полости матки, и его первичное обсеменение происходит при прохождении через родовые пути и в первые сутки при контакте с окружающей средой. Затем в течение ряда лет после рождения формируется характерный для определенных биотопов его организма микробный «пейзаж» (Табл.)

Значение микрофлоры тела для человека:

- Барьер. Пристеночная микрофлора кишечника колонизирует слизистую оболочку в виде микроколоний, образуя своеобразную биологическую пленку. При этом бактерии препятствуют проникновению внутрь организма и вредных микробов, и продуктов их жизнедеятельности.

- Защита. Нормальная микрофлора является одним из важнейших факторов естественной резистентности (устойчивости) организма, так как проявляет высоко антагонистическое действие по отношению к другим, в том числе патогенным бактериям, препятствуя их размножению в организме.

- Метаболизм. Микрофлора, особенно толстого кишечника, участвует в процессах пищеварения, в том числе в обмене холестерина и желчных кислот. Важная роль микрофлоры заключается также в том, что она обеспечивает организм человека различными витаминами, которые синтезируются ее представителями (витамины B1, B2, B6, B12, K, никотиновая, пантотеновая, фолиевая кислоты и др.) Эти витамины обеспечивают большую часть потребностей в них организма. Микрофлора регулирует водно-солевой обмен и газовый состав кишечника.

- Детоксикация. Микроорганизмы ингибируют выделение токсина некоторыми микроорганизмами, принимают участие в детоксикации попадающих из внешней среды в организм ксенобиотиков (чужеродные вещества) и образующихся токсичных продуктов метаболизма путем их преобразования в нетоксичные продукты, разрушают канцерогенные вещества.

- Стимуляция иммунной системы. Микрофлора своими антигенными факторами стимулирует развитие лимфоидной ткани ор-

ганизма, образование антител и таким образом способствует поддержанию гомеостаза слизистых оболочек.

2. Инфекция (инфекционный процесс).

Инфе́кция (инфекционный процесс) – процесс заражения (проникновения) и взаимодействия патогенных микроорганизмов с другими живыми организмами, сопровождающийся нарушением в той или иной степени гомеостаза зараженного организма. Термин означает различные виды взаимодействия бактерий, вирусов микроскопических грибов, прионов, способных вызвать заболевание, с организмом человека (в медицине), животных (в зоотехнике, ветеринарии), растений (в агрономии). Это комплекс взаимных приспособительных реакций на внедрение и размножение патогенного микроорганизма в макроорганизме.

Условия возникновения инфекционного процесса:

1. Наличие патогенного микроорганизма.
2. Наличие чувствительного к нему организма.
3. Инфицирующая доза – минимальное количество микробов, способных вызывать инфекционный процесс.
4. Входные ворота инфекции – место проникновения возбудителя в организм человека через определенные ткани, лишенные физиологической защиты против конкретного вида возбудителя.

5. Наличие предрасполагающих факторов (например, переохлаждение, недостаточное питание, стрессы, избыточные нагрузки и т. п.)

Виды инфекции по распространению в организме

Очаговая инфекции – размножение возбудителя в месте внедрения.

Генерализованная форма инфекции – инфекция, при которой возбудитель распространяется по организму лимфогенным или гематогенным путем.

Периоды инфекции:

1. Инкубационный период между проникновением инфекционного агента в организм и проявлением клинических признаков (существует определённый для каждой болезни промежуток времени, характерный только для экзогенных инфекций, в который возбудитель адаптируется к организму, его размножение или накопление в организме еще не происходит, симптомов заболевания никаких нет).

2. Продромальный период – период предвестников (первоначальные клинические проявления не несут каких-либо патогномичных для конкретной инфекции признаков. Обычны слабость, головная боль, чувство разбитости).

3. Период развития (разгара) болезни. В этот период и проявляются индивидуальные черты болезни.

4. Период разрешения болезни. Это может быть реконвалесценция – выздоровление, либо летальный исход, либо инвалидность.

3. Патогенность микроорганизмов

Патогенность – это потенциальная способность микроорганизмов вызывать заболевания, которая является видовым генетически детерминированным признаком.

Вирулентность – это степень патогенности, является мерой патогенности микроба.

Патогенность как биологический признак реализуется через три свойства: инфекционность, инвазивность и токсигенность.

Под инфекционностью (или инфективностью) понимают способность возбудителей проникать в организм. Она обусловлена наличием у возбудителей факторов, способствующих его прикреплению к клеткам организма и их колонизации.

Под инвазивностью понимают способность возбудителей преодолевать защитные механизмы организма, размножаться, проникать в его клетки и распространяться в нем.

Факторы патогенности бактерий:

Важным фактором патогенности следует считать экзоферменты (например, лецитиназа, гиалуронидаза, коллагеназа и др.), нарушающие гомеостаз клеток и тканей, что приводит к их повреждению. Способность к образованию экзоферментов во многом определяет инвазивность бактерий – возможность проникать через слизистые оболочки, соединительнотканые и другие барьеры. К этой же группе следует отнести и бактериальные ферменты, разлагающие антибиотики.

Токсигенность бактерий обусловлена выработкой ими экзотоксинов. Токсичность обусловлена наличием эндотоксинов. Экзотоксины и эндотоксины обладают своеобразным действием и вызывают глубокие нарушения жизнедеятельности организма.

Экзотоксины – это вещества белковой природы, выделяемые во внешнюю среду живыми патогенными бактериями. Оказывают избирательное повреждающее действие на клетки хозяина. Экзотоксины высокотоксичны, обладают выраженной специфичностью действия и иммуногенностью (в ответ на их введение образуются специфические нейтрализующие антитела).

Анатоксины – белковые токсины, утратившие свою ядовитость под действием формалина, но сохранившие при этом иммуногенные свойства. Их используют для активной иммунопрофилактики токсинемических инфекций.

Эндотоксины – токсические субстанции, входящие в структуру бактерий (обычно в клеточную стенку) и высвобождающиеся из них после лизиса бактерий. Эндотоксины в отличие от экзотоксинов более устойчивы к повышенной температуре, менее ядовиты и малоспецифичны.

Факторы вирулентности вирусов:

Факторы патогенности вирусов связаны с механизмами их взаимодействия с клетками-хозяевами.

Это, например, способность к внутриклеточному паразитированию – цитопатическое действие (ЦПД) от полного лизиса до полного сохранения жизнедеятельности.

Некоторые вирусные белки способны оказывать повреждающее действие на клетку.

Некоторые вирусы (например, ВИЧ) способны паразитировать в иммунных клетках, вызывая развитие иммунодефицита, который способствует развитию сопутствующих инфекций.

Некоторые вирусы способны вызывать деление клетки без ее разрушения, давая начало злокачественным опухолям.

Некоторые вирусы способны вызывать интегративную инфекцию, встраиваясь в геном клетки, что также может приводить к злокачественной трансформации.

Также для организма могут быть токсичными компоненты вирионов и продукты клеточного распада.

4. Эпидемический процесс.

Эпидемический процесс – процесс распространения инфекционных заболеваний в популяции человека. Эпидемический процесс включает три взаимосвязанных компонента:

1. источник инфекции;
2. механизм, пути и факторы передачи возбудителя;
3. восприимчивый организм или коллектив.

1. Источник инфекции – различные одушевленные и неодушевленные объекты внешней среды, содержащие и сохраняющие патогенные микроорганизмы, где они могут размножаться и накапливаться в инфицирующих дозах.

По источнику инфекции классифицируются:

Антропонозы – инфекции, при которых источником инфекции является только человек.

Зоонозы – инфекции, при которых источниками инфекций являются животные, но ими могут болеть и люди.

Сапронозы – инфекции, развивающиеся после проникновения свободноживущих бактерий или грибов в организм человека с объектов окружающей среды и поверхности тела (например, при попадании в рану).

Могут быть антропозоонозы, зооантропонозы, сапрозоонозы и т. п.

2. Механизмы передачи – это способы выделения микроба из зараженного организма, его пребывания во внешней среде и проникновения в новый чувствительный организм. Каждый механизм реализуется конкретными путями с помощью конкретных факторов передачи:

фекально-оральный – возбудитель локализуется в кишечнике. Пути, передачи: а) алиментарный (с пищей), б) водный (с водой), в) контактно-бытовой (через предметы обихода);

аэрогенный – возбудитель локализуется в дыхательных путях. Пути передачи: а) воздушно-пылевой, б) воздушно-капельный, в) контактно-бытовой);

кровяной (трансмиссивный) – возбудитель локализуется в кровеносной системе. Путь – при кровососании кровососущими членистоногими;

контактный: – возбудитель локализуется на наружных покровах (кожа и слизистые) Пути: а) прямой контакт – передача возбудителя происходит при непосредственном соприкосновении, б) непрямой контакт – через зараженные предметы окружающей обстановки, в) половой контакт;

вертикальный – передача возбудителя плоду от инфицированной матери (внутриутробное заражение. Пути: а) трансплацентарный, б) во время родов.

3. Восприимчивый организм или коллектив. Состояние невосприимчивости человека определяется его реактивностью на внедрение возбудителя и зависит от внутренних и внешних факторов.

К числу внутренних факторов самого организма относятся следующие:

Генетические особенности, Состояние центральной нервной системы гормональная регуляция. Иммунная система имеет отчетливую возрастную зависимость, от характера питания и витаминного баланса. Перенесенные заболевания, травмы, а также вредные привычки (алкоголь, курение и т.д.) ослабляют защитные возможности организма.

Внешние факторы, воздействующие на организм:

Условия труда и быта людей. Климатические условия и сезонные факторы. Физические и химические факторы окружающей среды.

При любом варианте проявлений эпидемического процесса и при различных болезнях формируется эпидемический очаг. Эпидемический очаг – место пребывания источников инфекции с окружающей территорией, в пределах которой в конкретной обстановке возможна передача возбудителей и распространение инфекционной болезни.

По интенсивности эпидемических процессов выделяют *спорадическую заболеваемость, эпидемии и пандемии*. *Спорадическая заболеваемость* – единичные, внешне не связанные между собой случаи болезни. *Эпидемическая заболеваемость* (эпидемия) – групповая заболеваемость в пределах одной страны. *Пандемия* – массовое распространение инфекционной болезни на большие территории в разных странах. В соответствии с распространенностью инфекционные заболевания также выделяют *повсеместные* (убиквитарные) и *эндемичные инфекции*, выявляемые на определенных, нередко небольших территориях. Также *экзотические болезни* – не свойственные данной территории.

Конвенционные (карантинные) *болезни* – наиболее опасные болезни, склонные к быстрому распространению, характеризующиеся большой высокой восприимчивостью населения и высокой летальностью, например, чума, холера, оспа, желтая лихорадка.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 5. Нормальная микрофлора человека

Система	Орган	Количество бактерий	Типичные представители
Дыхательные пути	Рот, нос	Много	Стрептококки, спирохеты
	Трахея, бронхи, легкие	Стерильны	
ЖКТ	Желудок	Мало	Кампилобактерии, лактобактерии
	Тонкий кишечник	Мало	Лактобактерии, бифидобактерии
	Толстый кишечник	Очень много: 10^9 – 10^{11} клеток на 1 г фекалий	Бифидобактерии, лактобактерии, бактероиды, кишечная палочка
МПС	Наружные отделы	Умеренное количество	Пептококки, стрептококки, стафилококки, микоплазмы
	Мочевой пузырь, мочеточники, почки, матка	Стерильны	
Покровы	Кожа	8×10^5 на 1 см^2	Стафилококки, коринебактерии
	Конъюнктив глаза	Мало	Стафилококки, стрептококки

Таблица 6. Формы инфекций

Признак	Название формы	Сущность
Природа возбудителя	Бактериальная, вирусная, грибковая, протозойная	
Происхождение и распространение	Экзогенная	Возбудитель поступает извне
	Эндогенная	Вызывают представители собственной условно-патогенной флоры
	Аутоинфекция	Самоперенос возбудителя из одной части организма в другую
Локализация в организме	Местная (очаговая)	Возбудитель находится в области входных ворот
	Общая (генерализированная)	Возбудитель лимфо- или гематогенно распространяется по организму
	Бактериемия Вирусемия Токсинемия	Сохранение возбудителя или токсинов при попадании в кровь

Локализация в организме	Септицемия (сепсис)	Размножение возбудителя в крови	
	Септиопиемия	Возникновение вторичных гнойных очагов при перенесении возбудителя кровью	
Число возбудителя	Моноинфекция	Один	
	Смешанная	Несколько	
Повторные заболевания	Вторичная инфекция	Дополнительное заражение другим возбудителем в период болезни.	
	Реинфекция	Повторное заражение тем же возбудителем	
	Суперинфекция	Повторное заражение тем же возбудителем в течение болезни.	
	Рецидив	Возврат того же заболевания за счет возбудителя, сохранившегося в организме	
Течение болезни	Типичная	С обычным набором симптомов	
	Атипичная	С необычным набором симптомов	
Продолжительность	Острая	До 3-х месяцев, симптомы четкие	
	Хроническая (персистенция)	Свыше 3 месяцев, симптомы нечеткие	
	Носительство	Сохранение возбудителя, в организме после клинического выздоровления	
Проявление	Манифестная форма	Со всем набором симптомов	
	Абортивная	С неполным набором симптомов	
	Бессимптомная		
Источник инфекции	Антропоноз	Человек	есть смешанные формы антропонозов, зооантропоноз
	Зооноз	Животное	
	Сапроноз	Внешняя среда	

Таблица 7. Классификация и свойства бактериальных токсинов

Экзотоксины (секретируются)	Эндотоксины (не секретируются)
Белки-ферменты, диффундируют из клетки в среду в процессе жизнедеятельности Высокотоксичны, характеризуются избирательным поражением органов и тканей (например, гемотоксины, нейротоксины) Термолабильны Могут обезвреживаться при специальной обработке, превращаясь в анатоксины Высоко иммуногенны	Липополисахариды ЛПС, прочно связаны с телом клетки, освобождаются после гибели. Менее токсичны, неспецифичны, вызывают общетоксические реакции (например, повышение температуры) Термостабильны В анатоксины не переходят Слабо иммуногенны

Таблица 8. Формы эпидемического процесса

Название формы	Характеристика
Спорадическая	Единичные случаи инфекционной болезни
Эпидемическая: – вспышка – эпидемия	– Незначительное превышение спорадического уровня – Значительное превышение спорадического уровня
Пандемия	Вовлечение в эпидемический процесс нескольких стран или континентов
Эндемическая	Распространение болезни, свойственной именно данной местности
Экзотическая	Распространение болезни, несвойственной данной местности

Таблица 9. Движущие силы эпидемического процесса

№.п/п	Название	Характеристика
1	Источник инфекции	Зараженный организм, из которого выделяется возбудитель
2	Механизм передачи	Эволюционно сложившийся процесс, имеющий 3 фазы: 1. Выделение возбудителя из источника 2. Пребывание во внешней среде 3. Внедрение в новый чувствительный организм
3	Восприимчивое население	Способное отвечать на встречу с возбудителем инфекционным процессом

Таблица 10. Механизмы и пути передачи инфекции

Название механизма	Название пути
Фекально-оральный	– Алиментарный (пищевой) – Водный – Контактно-бытовой (грязные предметы, руки)
Аэрозольный	– Воздушно-капельный (для нестойких во внешней среде микробов) – Воздушно-пылевой (для стойких во внешней среде микроорганизмов) – Контактно-бытовой (игрушки и т. п.)
Контактный	– Прямой контакт – Непрямой контакт – Половой контакт
Трансмиссивный	Через кровососущего переносчика
Парентеральный	Через манипуляции, связанные с повреждением кровеносных сосудов
Вертикальный (от матери ребенку)	– Трансплацентарный – Во время родов

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Значение микробов для здоровья человека

1. Распространение инфекционных болезней среди людей называется:

- а) инфекционный процесс г) эпидемический очаг
- б) эпидемический процесс в) механизм передачи инфекции

2. Источник инфекции – это:

- а) живой зараженный организм г) насекомые переносчики
- б) предметы обихода в) восприимчивое население

3. Фекально-оральный механизм передачи возбудителя не может быть реализован путем:

- а) трансплацентарным г) контактно-бытовым
- б) водным в) алиментарным

4. Единичные случаи какой-либо инфекционной болезни в данной местности называются:

- а) вспышка г) экзотические
- б) эпидемия в) спорадические

5. Период первых предвестников инфекционной болезни:

- а) инкубационный г) разгар болезни
- б) продромальный в) реконвалесценция

6. В норме стерильны все перечисленные органы, кроме:

- а) бронхи г) ротовая полость
- б) матка в) почки

7. Механизм передачи возбудителя не включает в себя:

- а) пребывание возбудителя во внешней среде
- б) размножение и накопление возбудителя в зараженном организме

в) внедрение возбудителя в новый организм

г) выделение возбудителя из источника

8. Механизм передачи возбудителя от матери своему плоду:

- а) вертикальный г) трансмиссивный
- б) половой в) контактный

9. Инфекционные болезни, постоянно встречающиеся среди населения определенной местности:

- а) энзоотические г) эпидемические
- б) экзотические в) эндемические

19. Болезни, не характерные для данной местности:

- | | |
|-------------------|------------------|
| а) экзотические | г) эпидемические |
| б) эпизоотические | в) эндемические |

20. Процесс попадания бактерий в кровь и размножение в ней:

- | | |
|------------------------|------------------|
| а) бактериемия | г) токсинемия |
| б) септицемия (сепсис) | в) септикопиемия |

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа №3.

*Изучение нормальной микрофлоры человека
и инфекционного процесса*

Цель лабораторного занятия:

1. Изучить методы исследования микрофлоры ротовой полости и кожи человека.

2. Ознакомиться с методами заражения лабораторных животных для изучения инфекционного процесса.

Описательная часть лабораторного занятия.

Все поверхности и полости тела человека, соприкасающиеся с внешней средой, заселены микроорганизмами. Количество их зависит от условий, в которых оказываются микробы в той или иной области человеческого организма. Интенсивность размножения микробов зависит от наличия питательных веществ.

Человеческий организм характеризуется определенным количественным и качественным составом микроорганизмов, которые называются нормальной микрофлорой.

В разных участках человеческого тела в соответствии с условиями обитания формируются ассоциации микроорганизмов, состоящие из разнообразных видовых сочетаний. Таким образом, кожные покровы и слизистая оболочка организма заселены различными видами микроорганизмов, которые образуют с макроорганизмом целостную единую экологическую систему, в которой преобладают позитивные отношения. Наибольшее количество микробов находится в толстом кишечнике, ротовой полости и на поверхности кожи.

Можно изучать количественный и качественный состав нормальной микрофлоры, выделяя микроорганизмов из организма человека с помощью методов культивирования или путем микроскопирования препаратов, приготовленных из материала различных участков организма.

Однако представители нормальной микрофлоры не всегда приносят только пользу. При определенных условиях в частности при воздействии факторов, снижающих естественную резистентность, многие представители нормальной микрофлоры могут стать виновниками различных эндогенных инфекций.

Кроме того, из внешней среды в организм постоянно попадают условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, способные вызвать инфекционный процесс.

В течение инфекционного заболевания микроб-возбудитель находится в организме больного и в большинстве случаев может быть выделен в чистой культуре или обнаружен микроскопическим путём.

Локализация возбудителя в организме зависит как от свойств возбудителя, так и от состояния макроорганизма. Микробы могут распространяться в организме гематогенным, лимфогенным и нейрогенным путями. Многие микробы обладают органотропностью, то есть поражают определённые органы и ткани.

Инфекционный процесс может быть искусственно воспроизведён путём заражения лабораторных животных: белых мышей, морских свинок, кроликов, белых крыс; реже ставят опыты на других животных. Заражают животных накожно, внутрикожно, подкожно, внутримышечно, внутривенно, перорально, интраназально, интритрахеально, интрацеребрально и внутрибрюшино. Перед началом опыта животных отбирают, взвешивают и маркируют.

Погибших животных следует вскрывать как можно быстрее, чтобы избежать проникновения микробов из кишечника в кровь и органы, и, кроме того, в условиях асептики, чтобы избежать заражения посторонними микробами.

Извлеченный материал до момента посева не должен соприкасаться с дезинфицирующими средствами. Все трупные материалы после исследования должны обеззараживаться. Трупы сжигаются.

Животное кладут брюшком вверх на деревянную доску, покрытую марлей, смоченной дезинфицирующим раствором. Поме-

щают в оцинкованную или эмалированную кювету и прикрепляют за четыре лапки к доске, широко раздвинув их. Производят осмотр трупа и отмечают патологические изменения, если такие имеются. Обработывают кожу антисептиком.

Вскрытие и исследование трупа животного делятся на три этапа:

- 1) вскрытие и исследование наружных покровов;
- 2) вскрытие и исследование грудной полости;
- 3) вскрытие и исследование брюшной полости.

Инструменты перед вскрытием переносят из стерилизатора в стакан со спиртом и ватой на дне. Перед употреблением инструменты обжигают на пламени.

Осматривают и отмечают в протоколе состояние кожи, подкожной клетчатки, внутренних органов, отмечают их величину, цвет, консистенцию. Вырезав кусочек органа, делают посев и мазки.

Материал для посевов из органов берут, прижигая поверхность органа и на этом месте сделав разрез. С поверхности разреза соскабливают петлей ткань и засевают ее на бульон и агар. Мазки из органов готовят размазыванием по стеклу поверхностью разреза или отпечатками (вырезают из органа небольшой кусочек и, взяв его пинцетом, несколько раз прикасаются поверхностью разреза, как печатью, к предметному стеклу). Фиксируют мазки на пламени или, если хотят сохранить структуру клеточных элементов органа, в жидком фиксаторе: смесь Никифорова (спирт + эфир поровну 10–15 мин, метиловый спирт 3–5 мин.). Окрашивают мазки фуксином (или метиленовой синей) и по Грамму, и микроскопируют.

Оснащение лабораторного занятия.

Чашки Петри с МПА, предметные стекла, бумажки Синева, флаконы с раствором Люголя, фуксином, спиртом, водой, спиртовки, спички.

Микроскопы, иммерсионное масло, тряпочки для протирания оптики.

Таблица: «Этапы вскрытия мыши».

Ход выполняемой работы.

1. Приготовить мазок из микробов полости рта, для чего кончиком спички осторожно снять часть зубного налета возле шейки зуба и поместить в каплю воды на предметном стекле.

2. Окрасить мазок по Граму и промикроскопировать с иммерсией.
3. Рассмотреть в препарате разнообразные формы бактерий ротовой полости, по-разному окрашенные по Граму.
4. Зарисовать изображение препарата в альбоме.
5. Сделать посев «отпечатков» пальцев на МПА путем прикосновения их к агару в чашке Петри № 1.
6. Повторить посев на чистый МПА в чашке №2, предварительно вымыв руки с мылом.
7. Повторить посев на чистый МПА в чашке № 3, прикоснувшись к агару губами.
8. Инкубировать в термостате при температуре 30-35°C 24 часа, затем выдержать в течение 2-3 суток при комнатной температуре.
9. Наблюдать на чашках рост микробов (главным образом, стафилококков, сарцин, разнообразных хромогенных палочек, плесневых и дрожжевых грибов).
10. Сравнить интенсивность роста на чашках Петри №1-3.
11. Изучить метод заражения и вскрытия лабораторного животного.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Таблица 5. Нормальная микрофлора человека.
2. Таблица 6. Формы инфекций.
3. Таблица 7. Классификация и свойства бактериальных токсинов.
4. Таблица 8. Формы эпидемического процесса.
5. Таблица 9. Движущие силы эпидемического процесса.
6. Таблица 10. Механизмы и пути передачи инфекции.

б) Выучить:

1. Нормальная микрофлора человека, ее значение для здоровья.
2. Инфекционный процесс, его условия.
3. Формы инфекционного процесса.
4. Патогенность и вирулентность микробов.
5. Факторы патогенности бактерий.

6. Факторы патогенности вирусов.
7. Особенности вирусных инфекций.
8. Эпидемический процесс.

Рабочее задание:

1. Приготовить мазок из микробов полости рта, окрасить по Граму.
2. Промикроскопировать мазок с иммерсией и зарисовать.
3. Сделать посев на МПА отпечатков рук и губ студента.
4. Изучить метод заражения и вскрытия лабораторного животного.
5. Зарисовать изображение метода в альбоме.

Содержание альбома:

1. Рис. 1. Мазок зубного налета, окраска по Граму, X100.
2. Рис.2. Этапы вскрытия мыши.

Пример заполнения альбома

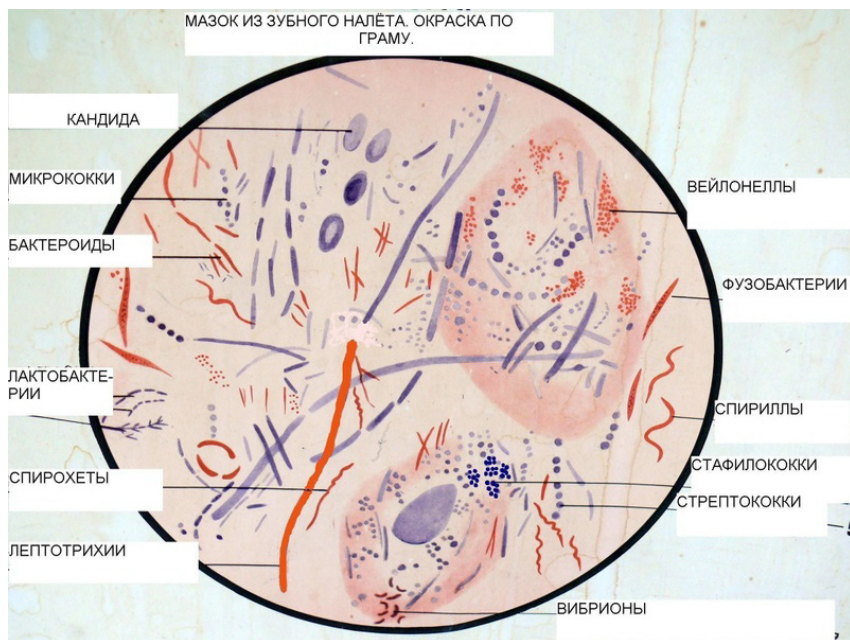


Рис. 1. Мазок зубного налета, окраска по Граму, X100

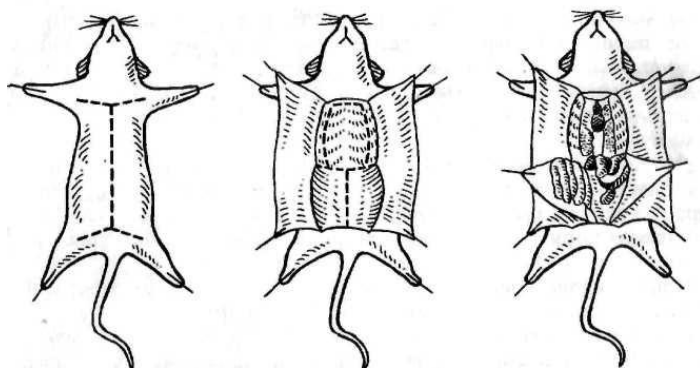


Рис. 2. Этапы вскрытия мыши

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
2. Бушева Е.Б. Микробиология в таблицах, схемах и рисунках (учебное пособие). – Тирасполь, 2010.
3. Госманов, Р. Г. Микробиология и иммунология / Р. Г. Госманов, А. И. Ибрагимова, А.К. Галлиулин. – Лань, 2013. – 240 с. ЭБС Лань
Белясова Н.А. Микробиология [Электронный ресурс]: учебник / Белясова Н.А. – Электрон. текстовые данные. – Минск: Вышэйшая школа, 2012. – 443 с. – Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/20229>
4. Гусев М.В. Микробиология [Текст]: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 464 с.
5. Павлович, С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособие / С. А. Павлович. – 3-е изд., испр. – Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с. (<http://www.bibliorossica.com>)
6. Микробиология, физиология питания, санитария [Электронный ресурс]: Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 240 с.
7. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М., 2004. – 256 с.

Вопросы для самоподготовки к занятию 4.
«Изучение факторов защиты организма человека
от патогенных микробов»

1. Неспецифическая защита организма.
2. Специфическая защита организма.
3. Антигенная структура микроорганизмов.
4. Факторы специфического иммунитета.
5. Механизмы специфической иммунной защиты.
6. Практическое использование механизмов специфического иммунитета.

ТЕМА 4. ЗАЩИТА ОТ ПАТОГЕННЫХ МИКРОБОВ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Иммунитет (лат. *immunitas* – освобождение, избавление от чего-либо) – невосприимчивость, сопротивляемость организма к инфекциям и инвазиям генетически чужеродных организмов (в том числе – болезнетворных микробов), а также воздействию генетически чужеродных веществ, обладающих антигенными свойствами. Иммунные реакции возникают и на собственные клетки организма, измененные в антигенном отношении.

Иммунитет обеспечивает гомеостаз организма на клеточном и молекулярном уровне организации. Реализуется иммунной системой.

Биологический смысл иммунитета – обеспечение генетической целостности организма на протяжении его индивидуальной жизни, сохранения постоянства внутренней среды (гомеостаза). Иммунная система служит для распознавания и разрушения чужеродных агентов, а также устранения источника их образования – бактерий, инфицированных вирусом клеток и т.п. Когда антиген элиминирован, иммунный ответ прекращается, хотя во многих случаях в организме сохраняется иммунная память об антигене.

Основы теории иммунитета разработали И. И. Мечников (теория клеточного иммунитета) и П. Эрлих (теория гуморального иммунитета), за что они в 1908 г. получили Нобелевскую премию.

Есть 2 группы факторов и механизмов защиты: специфические и неспецифические. Поэтому и иммунитет делится на неспецифический и специфический.

1. Неспецифический иммунитет

Неспецифический иммунитет – это биологические факторы и механизмы, которые формируются в организме в ходе естественной жизнедеятельности, независимо от его взаимодействия с чужеродными агентами. Но при встрече с любыми агентами они сразу оказывают защитное действие, хотя в некоторых случаях антигены могут их активизировать или усиливать.

Механизмы неспецифической защиты делятся на две группы.

1. Ограничение проникновения чужеродных факторов (микробов) в организм:

а) кератиновый слой неповрежденной кожи, создающий механический барьер;

б) органические кислоты, выделяемые эпителием кожи, снижающие ее pH;

в) белок лизоцим слюны, обладающий бактерицидным действием;

г) реснитчатый эпителий слизистой дыхательных путей, который выводит слизь с микробами наружу;

д) нормальная микрофлора верхних дыхательных путей, выступающая антагонистами патогенных микробов;

е) кислая реакция желудочного сока, обладающая микробоцидными свойствами;

ж) воспалительная реакция – формирование воспалительного вала, препятствующего распространению микробов из места проникновения.

2. Ограничение развития микробов в организме:

а) бактерицидные вещества крови – разнообразные белки, разрушающие бактерий, попавших в кровь;

б) интерферон – белок, препятствующий репродукции вирусов в инфицированных клетках;

в) температурная реакция организма, вызывающая температурный шок у микробов в организме;

г) клетки – натуральные киллеры, которые разрушают инфицированные вирусами и опухолевые клетки;

д) фагоцитоз – процесс поглощения и разрушения чужеродных клеток, попавших в организм, специфическими клетками крови, кровеносных сосудов, лимфоидной ткани, объединенных в систему мононуклеарных фагоцитов;

е) система комплемента крови – сложный белковый комплекс крови, состоящий из 9 фракций белков (C1–C9), способных каскадно активизироваться при взаимодействии с чужеродным агентом, формируя мембранатакующий комплекс (МАК), разрушающий мембраны несущих антигены клеток. Есть 2 пути активизации комплемента: 1) альтернативный, когда система комплемента непосредственно активизируется антигеном; 2) классический, когда активизация комплемента происходит после предварительного образования комплекса антиген-антитело.

2. Специфический иммунитет.

Специфический иммунитет – это механизмы и факторы, которые активизируются в ответ на попадание в организм определенного антигена. Они характеризуются высокой специфичностью.

Этот иммунитет делится на врождённый и приобретенный.

Врождённый бывает:

– видовой (конституционный) иммунитет обусловлен анатомическими, физиологическими, клеточными или молекулярными особенностями, закрепленными наследственно. Характеризуется невосприимчивостью организма к тем или иным антигенам. Например, все люди невосприимчивы к чуме собак, некоторые люди невосприимчивы к туберкулёзу, некоторые люди невосприимчивы к ВИЧ.

– трансплацентарный, когда ребенок рождается с готовыми защитными антителами, полученными из организма матери через плаценту (пассивно).

Приобретенный иммунитет делится на активный, когда происходит перестройка организма под влиянием антигена, и пассивный, когда в организм поступают готовые специфические факторы защиты.

Приобретенный активный иммунитет возникает после перенесенного заболевания или после введения вакцины.

Приобретенный пассивный иммунитет развивается при введении в организм готовых антител в виде сыворотки или передаче их новорожденному с молоком матери или внутриутробным способом.

Также иммунитет делится на естественный и искусственный.

Естественный иммунитет включает врожденный иммунитет и приобретенный активный (после перенесенного заболевания). А также пассивный при передаче антител ребёнку от матери.

Искусственный иммунитет включает приобретенный активный после прививки (введение вакцины) и приобретенный пассивный (введение сыворотки).

Иммунитет может быть местный (ареактивность органов и тканей в месте входных ворот инфекции) и общий (вовлечение всех звеньев иммунитета); стерильный (сохраняется после освобождения организма от возбудителя) и нестерильный (сохраняется только во время присутствия возбудителя в организме), коллективный (возникает при формировании иммунной прослойки среди населения) и социальный (когда в обществе нет условий для распространения инфекции). Также иммунитет может быть антибактериальный, антитоксический, антивирусный и т. п.

1. Антигены и их свойства.

Термин антиген (от англ. *Antibodi generator*) обозначает любую молекулу, которую могут специфически распознавать элементы системы приобретенного иммунитета, т. е. В-клетки или Т-клетки, либо и те, и другие.

Антиген – это инициатор и движущая сила всех реакций приобретенного иммунитета.

Антигены – вещества различного происхождения, несущие признаки генетической чужеродности и вызывающие развитие иммунных реакций (гуморальных, клеточных, состояние иммунной толерантности, индуцирование иммунной памяти).

Свойства антигена определяются комплексом признаков: чужеродность, иммуногенность и антигенность, специфичность, макромолекулярность, коллоидность.

Чужеродность – принадлежность вещества к генетически другой специфичности, чем иммунная система организма в целом или те или иные звенья иммунной системы.

Иммуногенность – способность антигена индуцировать в организме иммунный ответ.

Антигенность – способность антигена взаимодействовать только с гомологичными антителами и лимфоцитами определенного клона.

Специфичность – структурные особенности, отличающие один антиген от другого. Способность вызывать развитие иммунного ответа и определять его специфичность обладает фрагмент молекулы антигена – *антигенная детерминанта (эпитоп)*, избирательно реагирующая с антигенраспознающими рецепторами и антителами. Молекула антигена может иметь несколько эпитопов, то есть быть поливалентной. Чем сложнее молекула антигена и чем больше у нее эпитопов, тем больше вероятность развития иммунной ответа. *Иммуногены* или *полные антигены* – это вещества, вызывающие полноценный иммунный ответ и обладающие свойствами: иммуногенностью, антигенностью и специфичностью.

Макромолекулярность – иммуногенами являются биополимеры – белки, их комплексы с углеводами (гликопротеиды), а также сложные полисахариды, липополисахариды с высокой молекулярной массой. Чем дальше от человека в эволюционном отношении отстоят организмы, тем большую иммуногенность проявляют их белки.

Коллоидность – это растворимость в жидкостях организма с образованием коллоидного раствора, нерастворимые вещества не могут быть антигенами.

Антигены микроорганизмов

Большинство возбудителей инфекционных заболеваний человека, их структуры и токсины – полноценные антигены, вызывающие развитие иммунных реакций.

Антигены бактерий. По расположению в бактериальной клетке выделяют антигены: **Капсульный антиген – К-Аг; Жгутиковый антиген – Н-Аг; Соматический антиген – О-Аг.**

О-Аг большинства бактерий представлены термостабильным липополисахаридно-полипептидным комплексом; у грамотрицательных бактерий О-Аг представляет эндотоксин.

Н-Аг представлен термолабильным белком флагеллином.

К-Аг большинства бактерий имеют полисахаридную природу.

Для идентификации выделенных микроорганизмов в лаборатории применяют внутривидовую или внутриродовую дифферен-

циацию микроорганизмов, основанную на различиях в антигенной структуре.

Антигены вирусов. В каждом вирионе любого вируса содержатся различные антигены. Одни из них являются вирусспецифическими. В состав других антигенов входят компоненты клетки хозяина (липиды, углеводы), которые включаются в его внешнюю оболочку. Антигены простых вирионов связаны с их нуклеокапсидами. По своему химическому составу они принадлежат к рибонуклеопротеидам или дезоксирибонуклеопротеидам, которые являются растворимыми соединениями и поэтому обозначаются как *S-антигены* (solutio – раствор). У сложноорганизованных вирионов одни антигенные компоненты связаны с нуклеокапсидами, другие – с гликопротеидами внешней оболочки. Многие простые и сложные вирионы содержат особые поверхностные *V-антигены* – гемагглютинин и фермент нейраминидазу.

Антигены организма человека

Все ткани и клетки организма человека обладают антигенными свойствами. Одни антигены специфичны для всех млекопитающих, другие видоспецифичны для человека, третьи – для отдельных групп, их называют *изоантигенами* (например, антигены групп крови). К антигенам, свойственным только данному организму относятся антигены тканевой совместимости. Изоантигены (групповые антигены – это антигены, по которым отдельные индивидуумы или группы особей одного вида различаются между собой. Поскольку в окружающей среде имеются микроорганизмы, обладающие такими же антигенами (их называют *перекрестно-реагирующими*), у человека имеются антитела к этим антигенам, но только к тем, которые у него отсутствуют. К собственным антигенам организм толерантен.

Антигены главного комплекса тканевой (гисто) совместимости.

Помимо антигенов, свойственных всем людям и групповых антигенов, каждый организм обладает уникальным набором антигенов, свойственных только ему самому. Эти антигены кодируются группой генов, находящихся у человека на 6 хромосоме, и называются *антигенами главного комплекса тканевой совместимости*

и обозначаются *МНС-антигены* (англ. *Major histocompatibility complex*). МНС-антигены человека впервые были обнаружены на лейкоцитах и поэтому имеют другое название – HLA (Human leucocyte antigens).

2. Иммунная система и выработка антител.

Выработку специфического иммунитета обеспечивает иммунная система организма. У человека она состоит из центральных и периферических органов. К центральным относится красный костный мозг и тимус. К периферическим – селезенка, лимфатические узлы, миндалины и другие лимфоидные образования: бронхассоциированная (БАЛТ), кожноассоциированная (КАЛТ), кишечноассоциированная (КиЛТ, пейеровы бляшки).

Красный костный мозг – центральный орган кроветворения и иммуногенеза. Здесь происходит дифференцировка В-лимфоцитов из предшественников. Содержит также Т-лимфоциты.

Тимус – центральный орган иммунной системы. В нём происходит дифференцировка Т-лимфоцитов из предшественников, поступающих из красного костного мозга.

Лимфатические узлы – периферические органы иммунной системы. Они располагаются по ходу лимфатических сосудов.

Селезёнка – паренхиматозный зональный орган. Является самым крупным органом иммунной системы, кроме того, выполняет депонирующую функцию по отношению к крови.

Защитные клетки – это клетки, входящие в состав иммунной системы. Все эти клетки происходят из единой родоначальной стволовой клетки красного костного мозга. Все клетки делятся на 2 типа: гранулоциты и агранулоциты. К гранулоцитам относят нейтрофилы, эозинофилы и базофилы, обладающие способностью к фагоцитозу. К агранулоцитам: макрофаги и лимфоциты (В, Т), которые называются иммунокомпетентные клетки (иммуноциты).

Натуральные киллеры – (НК-клетки) – незрелые Т-лимфоциты, обладающие цитотоксичной активностью, то есть они способны: прикрепляться к клеткам-мишеням, секретировать токсичные для них белки, убивать их или отправлять в апоптоз. Натуральные киллеры распознают клетки, поражённые вирусами и опухолевые клетки.

Нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и натуральные киллеры обеспечивают прохождение врождённого иммунного ответа, который по сути является неспецифичным.

Непосредственно реакции иммунитета осуществляют иммунокомпетентные клетки – ИКК (иммуноциты). В центральных органах происходит образование, созревание и дифференцировка иммуноцитов, в периферических – осуществляется формирование специфических иммунных реакций.

В организме происходит постоянная рециркуляция иммуноцитов через лимфатические узлы, лимфатические сосуды и кровоток. Таким образом, они осуществляют «иммунологический надзор» за попаданием в организм патогенных бактерий и вирусов, имеющих определенную антигенную специфичность.

Макрофаги – поглощают антигеннесущие клетки, разрушают их и представляют антигены на своей поверхности для других ИКК.

Т-лимфоциты включают в себя:

Т-хелперы – активируют другие ИКК,

Т-эффекторы (киллеры) – разрушают клетки с антигенами,

Т-супрессоры – подавляют выработку иммунного ответа,

В-лимфоциты выполняют 2 функции: 1) способны при антигенной стимуляции превращаться в плазматические клетки (плазматциты), продуцирующие антитела, и пролиферировать; 2) способны распознавать антигены и представлять их на своей поверхности для других ИКК.

Основной механизм выработки иммунного ответа называется «трёхклеточная кооперация».

Как правило, цикл начинает макрофаг, который фагоцитирует микроорганизм, «переваривает» его, кроме антигенных детерминант, которые с помощью белков системы HLA выводит (представляет) на свою поверхность. Здесь детерминанты в комплексе с белками взаимодействуют с антигенраспознающими рецепторами Т-хелпера. При этом Т-хелпер начинает продукцию медиаторов, которые вызывают его пролиферацию, а также медиаторов, которые активизируют другие иммунокомпетентные клетки. Если медиатор связывается с рецептором на поверхности Т-киллера, то последний начинает в свою очередь пролиферировать и проявлять цитолитическую активность. Данный эффект заключается в разрушении клетки, на поверхности которой находятся антигены той

же специфичности, которая была представлена макрофагом. Такая форма иммунного ответа называется клеточной.

Антитела (иммуноглобулины, ИГ, Ig) – это особый класс гликопротеидов, присутствующих на поверхности В-клеток и в сыворотке крови и тканевой жидкости в виде растворимых молекул. Относятся к белкам γ -глобулиновой фракции белков плазмы крови.

Они являются важнейшим фактором специфического гуморального иммунитета. Антитела используются иммунной системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов – например, бактерий и вирусов. Обладают способностью специфически связываться с антигенами.

Антитела выполняют две функции: антиген-связывающую и эффекторную (вызывают тот или иной иммунный ответ, например, запускают классическую схему активации комплемента).

Антитела синтезируются плазматическими клетками, которыми становятся В-лимфоциты в ответ на присутствие антигенов. Для каждого антигена формируются соответствующие ему специализировавшиеся плазматические клетки, вырабатывающие специфичные для этого антигена антитела. Антитела распознают антигены, связываясь с определённым эпитопом – характерным фрагментом поверхности или линейной аминокислотной цепи антигена.

Структура всех иммуноглобулинов в основе однотипна. Антитела являются относительно крупными гликопротеидами, имеющими сложное строение. Простейшая молекула состоит из четырех полипептидных цепей: двух легких L-цепей и двух тяжелых H-цепей. L- и H-цепи связаны дисульфидными мостиками, посередине тяжелых цепей имеется подвижная шарнирная часть. К тяжелым цепям ковалентно присоединены олигосахариды. По шарнирной части молекулу при помощи протеазы папаина можно расщепить на два идентичных фрагмента, называемых Fab, которые несут антигенсвязывающие области, и один Fc-фрагмент. Fab (*fragment antigen binding*) – антиген-связывающий фрагмент, Fc (*fragment crystallizable*) – фрагмент, способный к кристаллизации, который служит местом фиксации комплемента или прикрепления к разным иммунцитам, здесь же прикрепляются углеводные компоненты молекулы.

Также L- и H-цепи подразделяются на переменные и константные части. H-цепи состоят из V_H , C_{H1} , шарнира, C_{H2} и C_{H3} до-

менов, L-цепи, состоят из V_L и C_L доменов. Именно переменные части отвечают за связь с антигеном, поэтому специфичность антител реализуется именно за их счет. Данные участки L- и H-цепей формируют активные центры антитела называемые паратопами, взаимодействующими с эпитопами антигенов. В зависимости от количества паратопов, определяется валентность антитела. Антитела могут быть в мономерной форме (описанной выше), а также в ди- и пентамерной, где мономеры связаны дополнительными пептидными цепями.

У млекопитающих выделяют пять классов антител (иммуноглобулинов) – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, различающихся между собой по строению и аминокислотному составу тяжелых цепей и по выполняемым эффекторным функциям.

В зависимости от класса и выполняемых функций антитела могут существовать как в мономерной форме (IgG, IgD, IgE, сывороточный IgA), так и в олигомерной форме (димер-секреторный IgA, пентамер – IgM). Всего различают пять типов тяжелых цепей (α -, γ -, δ -, ϵ - и μ - цепи) и два типа легких цепей (κ -цепь и λ -цепь).

Есть динамика антителообразования.

Первичный ответ. Появлению АТ предшествует *латентный период* продолжительностью 3–5 суток. В это время происходят переработка и представление антигена иммунокомпетентным клеткам, размножение клона плазматических клеток, специализированного на выработку антител к данному антигену, начинается синтез антител. В этот период антитела в крови не обнаруживаются. Затем наступает *логарифмическая фаза* – синтезированные антитела высвобождаются из плазмочитов и поступают в лимфу и кровь; ее продолжительность – 7–15 суток. Постепенно титры АТ достигают пика и наступает *стационарная фаза*, продолжительностью 15–30 суток, количество антител достигает максимума и стабилизируется. Ее сменяет *фаза снижения* уровня антител (титров АТ), длящаяся 1–6 месяцев и более.

Вторичный ответ. После антигенной стимуляции часть В- и Т-лимфоцитов циркулирует в виде клеток памяти. Латентный период укорочен, логарифмическая фаза характеризуется быстрым нарастанием и значительно более высоким уровнем антител, который в последующих фазах длительно удерживается и медленно, иногда в течение нескольких лет, снижается.

Основные характеристики вторичного ответа: образование АТ индуцируется значительно меньшими дозами Аг; индуктивная фаза сокращается до 5-6 ч или 1–2 сут; среди АТ доминируют IgG с большой аффинностью («жадностью», активностью), пик их наступает раньше (3-5 сут); АТ образуются в более высоких титрах и циркулируют в организме длительное время.

Такое различие динамики антителообразования при первичном и вторичном иммунном ответе объясняется тем, что после первичного введения антигена в иммунной системе формируется клон лимфоцитов, несущих иммунологическую память о данном антигене. После повторной встречи с этим же антигеном клон лимфоцитов с иммунологической памятью быстро размножается и интенсивно включает процесс антителогенеза.

Очень быстрое и энергичное антителообразование при повторной встрече с антигеном используется в практических целях при необходимости получения высоких титров антител при производстве диагностических и лечебных сывороток от иммунизированных животных, а также для экстренного создания иммунитета при вакцинации.

Способность к образованию антител появляется во внутриутробном периоде у 20-недельного эмбриона; после рождения начинается собственная продукция иммуноглобулинов, которая увеличивается до наступления зрелого возраста и несколько снижается к старости. Динамика образования антител имеет различный характер в зависимости от силы антигенного воздействия (дозы антигена), частоты воздействия антигена, состояния организма и его иммунной системы.

Основное действие антител характеризуется двумя особенностями: специфичностью и немедленностью. Нейтрализация антигенов антителами обеспечивает невосприимчивость к ним организма.

Механизм реакции антиген-антитело заключается в образовании связи между паратопом антитела с эпитопом антигена. С учетом как минимум двух валентностей антитела и обычной многовалентности антигена создается возможность образования прочной решетки, состоящей из многих антигенов и антител. Прочность этой решетки находится в зависимости от соотношения количеств антигенов и антител.

Антитела специфически связываются с антигенами на поверхности бактерий, образуя иммунные комплексы. Эти комплексы с высокой активностью поглощаются макрофагами, а также активизируют комплемент по классическому пути, с формированием мембраноатакующего комплекса, разрушающего ЦПМ бактерии. Антитела, выработанные против бактериальных токсинов, связываются с ними, нейтрализуя их токсические свойства.

Особенность противовирусного иммунитета заключается в том, что клетки организма, инфицированные вирусом, приобретают вирусную антигенную специфичность. Поэтому они либо связываются с противовирусными антителами и разрушаются макрофагами или системой комплемента, либо разрушаются Т-киллерами. В любом случае при этом вирусы теряют возможность репродуцироваться и гибнут в организме. Кроме того, противовирусные антитела обладают способностью нейтрализовать внеклеточные формы вирусов.

3. Практическое применение серологических реакций.

Реакции между антигеном и антителом называют гуморальными или серологическими от латинского *serum*-сыворотка. Эти реакции можно проводить в лабораторных условиях для решения ряда практических задач.

В основе лабораторных серологических реакций лежит явление формирования видимых иммунных комплексов при взаимодействии эквивалентных количеств комплементарных антигенов и антител в присутствии электролита. В этом случае образуются наиболее прочные иммунные комплексы, образующие регистрируемый визуально нерастворимый осадок.

Эти реакции используют либо для *сероидентификации*, когда с помощью стандартных антител выявляются антигены возбудителей болезней, что позволяет их идентифицировать. Либо для *серодиагностики*, когда с помощью стандартных антигенов определяют антитела в сыворотке больного человека, что позволяет поставить диагноз заболевания.

Также эти реакции лежат в основе *серопрофилактики и серотерапии* инфекционных болезней, основанных на применении вакцин, содержащих в той или иной форме антигены возбудите-

лей или сывороток с готовыми антителами против тех или иных возбудителей.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 11. **Факторы неспецифической защиты**

Специфика действие факторов	Фактор	Механизм действия
Ограничение проникновения возбудителей в организм	кожа, слизистые	механический и химический барьер
	нормальная микрофлора	антагонизм
	лизоцим (белок в жидкостях организма)	разрушение бактериальных клеток
	pH желудочного сока	гибель нейтрофильный и базофильных бактерий
Ограничение распространения микробов по организму	местная воспалительная реакция	механический, химический, температурный и цитологический барьер
	повышение температуры тела	тепловая гибель микробов
	бактерицидные вещества крови	химическая гибель бактерий
	интерферон	препятствие репродукции вирусов в клетках организма
	НК – клетки (натуральные киллеры)	цитотиз чужеродных клеток
	фагоцитоз	поглощение и разрушение чужеродных клеток; этапы: хемотаксис – адгезия – эндоцитоз – лизосомальная реакция – экзоцитоз
	система комплемента	каскадная активизация определенных белков крови чужеродными клетками с образованием МАК (мембраноатакующего комплекса с цитолитическим эффектом)

Таблица 12. **Основные иммунокомпетентные клетки (ИКК)**

Название	Свойства
Т- лимфоциты (Тл) а) Т- хелперы (Тх) б) Т- киллеры (Тк)	созревают в тимусе а) помогают другим ИКК выработке иммунного ответа б) разрушают клетки организма с измененной антигенной структурой механизмом цитолита (клетки, зараженные вирусами, опухолевые клетки, трансплантированные клетки)

Название	Свойства
В-лимфоциты	созревают не в тимусе, распознают антигены, преобразуются в плазматические клетки, специализирующиеся на выработке антител
Макрофаги (тканевые макрофаги и моноциты крови)	распознают антигены, фагоцитируют их и представляют на своей поверхности другим ИКК

Таблица 13. **Антителогенез (образование антител)**

Период	Процесс	первичный ответ		вторичный ответ	
		продолжительность	основной класс антител	продолжительность	основной класс антител
Индуктивный	активизация ИКК	5-10 дней		неск. часов – 3-5 дней	
Продуктивный	синтез антител	1-2 недели, сохраняются в организме 2-6 месяцев	Ig M	неск. дней, сохраняются в организме несколько лет	Ig G

Таблица 14. **Использование иммунных механизмов на практике**

Метод	Характеристика
Сeroидентификация	определение вида и, или серовара возбудителя по реакции его антигенов с антительным стандартным диагностикумом
Серодиагностика	установление диагноза инфекционного заболевания на основе выявления в сыворотке больного специфических антител по реакции с антигенами стандартного диагностикума
Сeroпрофилактика	предупреждение развития инфекционной болезни путем введения специфической сыворотки или прививки
Серотерапия	лечение инфекционной болезни путем введения специфической сыворотки или прививки

Таблица 15. **Классификация специфического иммунитета**

Название		Характеристика
Врожденный		Видовой (невосприимчивость к определенным антигенам) Трансплацентарный (пассивный) – получение готовых антител от матери во время внутриутробного периода развития
Приобретенный	Активный (перестройка в организме)	Естественный – постинфекционный (после болезни)
		Искусственный – поствакцинальный (после вакцинации)
	Пассивный (получение антител в готовом виде)	Коллективный – после массового заболевания или вакцинации
		Естественный – с молоком матери
		Искусственный – постсывороточный (введение сыворотки)
Социальный		Отсутствие в обществе возможности распространения болезни

Таблица 16. Свойства антигенов

Свойство	Сущность свойства
Генетическая чужеродность	Наличие признаков генетически чужеродной информации (продукт организма другого вида)
Макромолекулярность	Антигенами могут быть только крупные молекулы за редким исключением
Коллоидность	Антигеном может быть только растворимое вещество
Специфичность	В структуре молекулы антигена всегда есть несколько одинаковых поверхностно расположенных участков – эпитопов, по которым он отличается от любого другого антигена

Таблица 17. Антигены бактерий и вирусов

Группа м/о	Название антигена	Химическая природа
бактерии	О-антиген (соматический)	ЛПС, компоненты клеточной стенки, тейхоевые кислоты
	К-антиген (капсульный)	Полисахаридные или полипептидные компоненты капсулы
	Н-антиген (жгутиковый)	Белок флагеллин
вирусы	Капсидный	Белок капсида
	Гемагглютинин (ГА)	Специфические гликопротеиды суперкапсида
	Нейраминидаза	Специфический белок суперкапсида

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Защита от патогенных микробов

- К вирусным антигенам относится:
 - а) К-антиген
 - б) геммагглютинин
 - г) Н-антиген
 - в) О-антиген
- Ограничивает проникновение микроорганизмов в организм человека:
 - а) фагоцитоз
 - б) интерферон
 - г) комплемент
 - в) лизоцим
- Поствакцинальный иммунитет является:
 - а) активным искусственным
 - б) пассивным искусственным
 - г) пассивным естественным
 - в) активным естественным
- С эпитопом антигена связывается:

- а) весь Fab-фрагмент
 - б) переменная часть Fab-фрагмента
 - в) константная часть Fc-фрагмента
 - г) константная часть Fab-фрагмента
5. К специфическим факторам иммунитета относится:
- а) лизоцим
 - б) антитела
 - г) интерферон
 - в) комплемент
6. В результате массовой вакцинации формируется иммунитет:
- а) коллективный
 - б) социальный
 - г) видовой
 - в) врожденный
7. Альтернативный путь активации комплемента отличается от классического:
- а) образованием МАК
 - б) предварительным связыванием антигена с антителом
 - в) отсутствием предварительного связывания антигена с антителом
 - г) отсутствием образования МАК
8. Способны проходить через плаценту антитела класса:
- а) G
 - б) A
 - г) M
 - в) E
9. Выработку антител осуществляют:
- а) Т-лимфоциты
 - б) В-лимфоциты
 - г) макрофаги
 - в) плазмocyты
10. Тейхоевые кислоты являются:
- а) О-антигенами
 - б) Н-антигенами
 - г) К-антигенами
 - в) гемагглютинидами
11. При первичном гуморальном ответе синтезируются в основном:
- а) IgM
 - б) IgG
 - г) IgE
 - в) IgA
12. Ограничивает развитие микроорганизмов (вирусов) внутри организма:
- а) лизоцим
 - б) интерферон
 - г) кислотность желудочного сока
 - в) реснитчатый эпителий
13. Н-антиген бактерий – это:
- а) ЛПС
 - б) тейхоевая кислота
 - г) гемагглютинин
 - в) флагеллин

14. Антигенпредставляющими клетками являются:
а) макрофаги г) Т-киллеры
б) Т-хелперы в) плазмоциты
15. Постсыворочный иммунитет является:
а) активным естественным г) пассивным искусственным
б) активным искусственным в) пассивным естественным
16. Классический путь активации комплемента отличается от альтернативного:
а) предварительным связыванием антигена с антителом
б) вовлечением факторов В и Д
в) образованием МАК
г) связывание антигена сразу с белком C_3 – фракции:
17. ЛПС является:
а) гемагглютинином г) Н-антигеном
б) О-антигеном в) К-антигеном
18. В форме пентамеров существуют:
а) IgG г) IgA
б) IgE в) IgM
19. Когда в обществе нет условий для передачи возбудителей инфекционных болезней- это:
а) социальный иммунитет г) видовой иммунитет
б) коллективный иммунитет в) местный иммунитет
20. Гуморальный иммунный ответ:
а) антителообразование
б) цитолиз
в) фагоцитоз
г) активация комплемента по альтернативному пути

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа № 4.

Изучение факторов неспецифической и специфической защиты

Цель лабораторного занятия:

1. Изучить методы оценки основных факторов неспецифической защиты организма.
2. Изучить методы оценки основных факторов специфической защиты организма.

Описательная часть лабораторного занятия.

Для защиты от воздействий патогенных микроорганизмов человеческий организм обладает анатомо-физиологическими приспособлениями, которые являются препятствием для проникновения в него микробов и распространению по нему. К ним относятся механизмы естественного иммунитета, представляющие собой совокупность анатомо-физиологических приспособлений организма. Такие компоненты организма относятся к факторам неспецифической защиты. Их оценка является важным моментом в выявлении способности макроорганизма противодействовать негативному воздействию микробов.

Методы оценки функциональной активности фагоцитирующих клеток.

Одной из основных функций гранулоцитов и моноцитов крови является эндоцитоз захват различных объектов: инертных частиц (латекс, уголь), живых или убитых микроорганизмов (бактерий, дрожжевых грибов). Количественную оценку фагоцитарной активности гранулоцитов и моноцитов проводят в цельной крови, в лейкоцитарной взвеси или в обогащенных фракциях фагоцитирующих клеток. В качестве стандартных объектов фагоцитоза используют монодисперсные частицы латекса диаметром от 1 до 2 мкм, суспензию убитых нагреванием клеток бактерий или дрожжеподобных грибов.

Фагоцитирующие клетки смешивают с объектами фагоцитоза в соотношениях 1:100 или 1:10 и инкубируют при температуре 37°С в течение 30 минут при постоянном помешивании. Затем пробирки центрифугируют и осадок ресуспендируют в капле сыворотки крови для приготовления мазка. Мазки фиксируют и окрашивают по Романовскому-Гимзе. Просматривают мазки под микроскопом и оценивают фагоцитарную активность 25 нейтрофилов. Составляется таблица из 25 клеток (по числу учтенных нейтрофилов), в каждой клетке записывается число кокков, поглощенных одним нейтрофилом. Если нейтрофил не участвовал в фагоцитозе, то становится «0».

Затем подсчитывают процент фагоцитирующих клеток (фагоцитарный показатель) и среднее количество поглощенных частиц на 1 клетку (фагоцитарное число). Для лейкоцитов здоровых людей фагоцитарный показатель колеблется от 40 до 80%, а фагоцитарное число от 1 до 5.

Титрование лизоцима слюны

Готовят ряд последовательных разведений слюны в пробирках, в каждую из которых вносят по 1 мл суспензии суточной бактериальной культуры, содержащей 1 млрд/мл микробных тел. После инкубации в термостате в течение 3 час. определяют титр лизоцима по последнему разведению, в котором наблюдается полный лизис бактерий (просветление среды).

Реакции специфического иммунитета основаны на взаимодействии комплементарных антигенов и антител. Эти реакции используют при диагностических и иммунологических исследованиях у больных и здоровых людей. С этой целью применяются серологические исследования (лат. serum – сыворотка): методы изучения антител и антигенов с помощью реакций антиген-антитело в сыворотке крови и других жидкостях организма, а также в тканях.

При выделении микроорганизма от больного проводится идентификация возбудителя путём изучения его антигенных свойств с помощью иммунной диагностической сыворотки (так называемая серологическая идентификация микроорганизмов). Для выявления иммунных комплексов, образовавшихся при специфическом взаимодействии антиген-антитело, также используют серологические реакции.

Реакция агглютинации (РА).

В лабораторной диагностике инфекционных заболеваний реакцию агглютинации применяют как для идентификации видов и сероваров бактерий с помощью диагностических агглютинирующих сывороток, так и для определения присутствия антител в сыворотке больного по известным антигенам (диагностикумам), т.е. для серодиагностики. Диагностикумы – взвесь убитых микроорганизмов, имеющих определенную антигенную структуру.

Ориентировочная агглютинация на стекле (пластинчатая РА) ставится с одним разведением диагностических агглютинирующих сывороток, которые в зависимости от их титра составляют 1:10, 1:25, 1:50 или 1:100. Предметное стекло делят восковым карандашом пополам. На одну половину наносят каплю физ. раствора (контроль), на другую каплю сыворотки. Затем петлей в каждую каплю вносят небольшое количество бактериальной культуры (1 или 2 петли) и тщательно перемешивают. Для ускорения реакции

стекло слегка покачивают или нагревают над пламенем горелки в течение 3-5 мин. Учет проводят, наблюдая появление хлопьев или зерен в капле сыворотки. Контрольная капля остается равномерно мутной. Если реакция плохо видна невооруженным глазом, ее можно наблюдать под микроскопом. Контрольная капля необходима, чтобы исключить возможность учета спонтанной агглютинации, которую дают R-формы бактерий или которая происходит в кислой среде из-за снятия одноименного заряда с поверхности бактериальных клеток.

Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА).

Эту реакцию применяют при работе с растворимыми мелко-дисперсными антигенами. Антиген предварительно адсорбируют на инертных монодисперсных частицах или клетках, например на эритроцитах, готовят эритроцитарный диагностикум. Эритроциты для адсорбции антигена обрабатываются танином. Такие эритроциты склеиваются под действием иммунной сыворотки, содержащей комплементарные антитела. Реакция более чувствительна и специфична, чем РА.

Её используют для выявления даже небольших концентраций антител в исследуемой сыворотке, для идентификации возбудителя по его антигенной структуре или для индикации и идентификации бактериальных токсинов в исследуемом патологическом материале. Соответственно используют стандартные эритроцитарные антительные диагностикумы, полученные путем адсорбции специфических антител на поверхности танизированных эритроцитов.

В лунках полистироловых пластин готовят последовательные разведения исследуемого материала или сыворотки больного, ориентируясь на диагностический титр. Затем в каждую лунку вносят одинаковый объём (0,25 мл, 0,5 мл) соответствующего 3% эритроцитарного диагностикума. Через 2 часа инкубации при 37°C учитывают результаты, оценивая внешний вид осадка эритроцитов (без встряхивания). При отрицательной реакции появляется осадок эритроцитов в виде «пуговки» или колечка, при положительной реакции – характерный кружевной осадок склеившихся эритроцитов, тонкая пленка по стенкам лунки с неровными краями – «зонтик».

Оснащение лабораторного занятия.

Исследуемая бактериальная культура *E. coli*, набор стандартных диагностических агглютинирующих сывороток.

Предметные стекла, флаконы с физ. раствором, спиртовки, спички, бактериологические петли, стеклоглафы, полистироловые пластины с лунками для постановки серологических реакций

Таблицы: «Учет фагоцитарной активности нейтрофилов», «Титрование лизоцима слюны», «Реакция пассивной гемагглютинации для определения антител в сыворотке больного».

Ход выполняемой работы.

1. Провести оценку фагоцитарной активности нейтрофилов по таблице.

2. Определить титр лизоцима слюны по таблице. Сделать заключение: титр лизоцима в слюне... (норма 1:300).

3. Поставить реакцию агглютинации на стекле по описанной методике.

4. Провести учет РА, наблюдая появление в одной из капель хлопьев иммунных комплексов.

5. Сделать заключение о принадлежности исследуемой культуры *E. coli* к определенному серовару.

6. Проанализировать данные РНГА по таблице.

7. Сделать заключение о титре антител в исследуемой сыворотке крови.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Таблица 11. Факторы неспецифической защиты
2. Таблица 12. Основные иммунокомпетентные клетки (ИКК)
3. Таблица 13. Антителогенез (образование антител)
4. Таблица 14. Использование иммунных механизмов на практике

5. Таблица 15. Классификация специфического иммунитета.

6. Таблица 16. Свойства антигенов.

7. Таблица 17. Антигены бактерий и вирусов.

б) Выучить:

1. Неспецифическая защита организма.

2. Специфическая защита организма.
3. Антигенная структура микроорганизмов.
4. Факторы специфического иммунитета.
5. Механизмы специфической иммунной защиты.
6. Практическое использование механизмов специфического иммунитета.

Рабочее задание:

1. Изучить методы оценки факторов неспецифической защиты организма человека (функциональной активности фагоцитирующих клеток, лизоцима слюны). Рассчитать фагоцитарное число и фагоцитарный индекс по таблице и оценить соответствие полученных данных норме.
2. Определить по таблице титр лизоцима слюны и оценить соответствие полученных данных норме.
3. Изучить методы сероидентификации на примере реакции агглютинации на стекле. Идентифицировать по таблице принадлежность исследуемой культуры *E. coli* к определенному серовару.
4. Изучить методы серодиагностики на примере реакций пассивной гемагглютинации. Проанализировать данные РНГА по таблице и сделать заключение о титре антител в исследуемой сыворотке крови.

Содержание альбома:

1. Таблица. Учет фагоцитарной активности нейтрофилов.
2. Таблица. Титрование лизоцима слюны.
3. Таблица. Реакция агглютинации на стекле с диагностической сывороткой.
4. Таблица. Реакция пассивной гемагглютинации для определения антител в сыворотке больного.

Пример заполнения альбома

1. Таблица. Учет фагоцитарной активности нейтрофилов.

3	5	0	2	0
0	0	1	3	3
0	0	2	0	1
0	0	0	3	1
2	2	3	2	0

Расчет фагоцитарного числа. Число кокков, поглощенных всеми подсчитанными нейтрофилами /число всех подсчитанных нейтрофилов (норма 1–5)). **СДЕЛАТЬ и ЗАПИСАТЬ РАСЧЕТ и вывод о соответствии норме.**

Расчет фагоцитарного индекса (показателя). Число нейтрофилов, поглотивших хотя бы один кокк (общее число подсчитанных нейтрофилов x 100 % (норма 40-60 %)). **СДЕЛАТЬ и ЗАПИСАТЬ РАСЧЕТ и вывод о соответствии норме.**

2. Таблица. Титрование лизоцима слюны

ингредиенты № пробирки	К	2	3	4	5	6	7	8
Физ. р-р, мл	1	1,8	1	1	1	1	1	1
Слюна, мл	–	0,2	1	1	1	1	1	1
Тест культура, мл	1	1	1	1	1	1	1	1
Разведение 1:	к	10	20	40	80	160	320	640
Учет после инкубации 2 ч при 37 °С (просветление)	–	+	+	+	+	+	+	-

Титр лизоцима 1:

ОПРЕДЕЛИТЬ ПО ТАБЛИЦЕ И ЗАПИСАТЬ ТИТР ЛИЗОЦИМА,
сделать вывод о соответствии норме.

3. Таблица. Реакция агглютинации на стекле с диагностической сывороткой.

Агглютинирующая сыворотка	Культура	Физ. р-р	Учет
Против серовара О-111, 1 капля	1 капля	–	+
Против серовара О-55, 1 капля	1 капля	–	–
Против серовара О-26, 1 капля	1 капля	–	–
Контроль культуры	1 капля	1 капля	–

Выделена культура E coli серовара

4. Таблица. Реакция пассивной гемагглютинации для определения антител в сыворотке больного (инкубация в течение 2-х часов при температуре 37 °С).

Ингредиенты	Разведение сыворотки					Контроль антигена
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	
Сыворотка больного, мл	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	–
Эритроцитарный диагностикум, мл	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Ингредиенты	Разведение сыворотки					Контроль антигена
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	
Учет по агглютинации эритроцитов	++++	+++	++	+	-	-

«++++» – полная агглютинация; «+++» – неполная агглютинация; «++» – слабая агглютинация; «+» – следы агглютинации. («++++, ++++, +++» – положительная реакция; «+» – сомнительная реакция, «-» – отрицательная реакция)

Титр антител в сыворотке больного _____

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.

2. Бушева Е.Б. Микробиология в таблицах, схемах и рисунках (учебное пособие). – Тирасполь, 2010.

3. Госманов, Р. Г. Микробиология и иммунология / Р. Г. Госманов, А. И. Ибрагимова, А.К. Галлиулин. – Лань, 2013. – 240 с. ЭБС Лань Беясова Н.А. Микробиология [Электронный ресурс]: учебник/ Беясова Н.А.– Электрон. текстовые данные. – Минск: Вышэйшая школа, 2012. – 443 с.– Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/20229>

4. Гусев М.В. Микробиология [Текст]: учебник для студ. уч-режд. высш. проф. образования / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 464 с.

5. Микробиология, физиология питания, санитария [Электронный ресурс]: Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 240 с.

6. Павлович, С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособие / С. А. Павлович. – 3-е изд., испр. – Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с. (<http://www.bibliorossica.com>)

7. Практикум по микробиологии [Текст]: практикум / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук; под ред.: А. И. Нетрусова. – М., 2005. – 608 с.

8. Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Тюменцева Е.Ю.– Электрон. текстовые данные.– Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015.– 123 с.– Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788>

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
----------------	---

Раздел. ЭКОЛОГИЯ И ЗНАЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Тема 1. ЭКОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ	5
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	5
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ	12
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	14
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	19
ТЕМА 2. ЗНАЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРИРОДЕ И ХОЗЯЙСТВЕННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ	20
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	20
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ	26
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	29
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	35
ТЕМА 3. ЗНАЧЕНИЕ МИКРОБОВ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА	36
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	36
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ	46
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	48
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	53
ТЕМА 4. ЗАЩИТА ОТ ПАТОГЕННЫХ МИКРОБОВ	54
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	54
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ	68
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	70
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	77