

**Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
“Уральский государственный медицинский университет”  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии**

**Литусов Н.В.**

## **ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ**

**Иллюстрированное учебное пособие**

**Екатеринбург  
2015**

УДК 579

Рецензент: профессор кафедры эпидемиологии ГБОУ ВПО УГМУ доктор медицинских наук профессор Слободенюк А.В.

Литусов Н.В. Общая микробиология. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2015. – 516 с.

Иллюстрированное учебное пособие “Общая микробиология” подготовлено в качестве информационного сопровождения самостоятельной работы студентов, осваивающих основные образовательные программы высшего профессионального образования укрупненной группы специальностей 060000 – Здравоохранение, разработанные на основе ФГОС и предусматривающие формирование знаний по микробиологии и вирусологии.

В иллюстрированном учебном пособии приводятся сведения по морфологии, физиологии, генетике, экологии микроорганизмов, основам инфектологии и эпидемиологии инфекционных болезней. Каждый раздел сопровождается контрольными вопросами и тренировочными тестами. Пособие содержит также методические указания по проведению практических занятий по общей микробиологии.

Иллюстрированное учебное пособие предназначено для внеаудиторной подготовки студентов, обучающихся по специальностям 060101 (лечебное дело), 060103 (педиатрия), 060105 (медико-профилактическое дело), 060201 (стоматология) и 060301 (фармация).

© ГБОУ ВПО УГМУ, 2015

© Литусов Н.В.

## Содержание

1.1. Мир микробов и их роль в жизни человека.....	7
1.2. Положение микробов в системе живых существ.....	8
1.3. Предмет и задачи медицинской микробиологии.....	11
1.4. Виды и разделы микробиологии.....	12
1.5. Связь микробиологии с другими науками.....	14
1.6. Вопросы для контроля усвоения материала.....	15
1.7. Тренировочные тесты.....	15
2. История микробиологии.....	17
2.1. Эвристический период.....	17
2.2. Морфологический период.....	21
2.3. Физиологический период.....	27
2.4. Иммунологический период.....	35
2.5. Молекулярно-генетический период.....	39
2.6. Вклад отечественных ученых в развитие микробиологии, вирусологии и иммунологии.....	40
2.7. Научно-исследовательские учреждения микробиологического профиля России.....	45
2.8. Вопросы для контроля усвоения материала.....	56
2.9. Тренировочные тесты.....	56
3. Систематика и номенклатура микробов.....	62
3.1. Основные принципы систематики микробов.....	62
3.2. Таксономические категории.....	66
3.3. Номенклатура микробов.....	67
3.4. Понятие о культуре, клоне, штамме микроорганизмов.....	68
3.5. Особенности систематики вирусов, грибов и простейших.....	69
3.5.1. Особенности систематики вирусов.....	69
3.5.2. Особенности систематики грибов.....	69
3.5.3. Особенности систематики простейших.....	70
3.6. Вопросы для контроля усвоения материала.....	71
3.7. Тренировочные тесты.....	71
4. Морфология и структура микробов.....	74
4.1. Основные формы бактерий.....	74
4.2. Структура бактериальной клетки.....	86
4.3. Вопросы для контроля усвоения материала.....	104
4.4. Тренировочные тесты.....	105
5. Бактериоскопические методы исследования.....	117
5.1. Введение.....	117
5.2. История открытия микроскопа.....	118
5.3. Устройство светового микроскопа.....	121
5.4. Разновидности световой микроскопии.....	128
5.5. Правила обращения со световым микроскопом.....	136
5.6. Электронная микроскопия.....	136
5.7. Оборудование рабочего места для микроскопирования.....	140
5.8. Подготовка предметных стекол для микроскопического исследования.....	141

5.9. Приготовление препаратов для микроскопирования микробов в живом состоянии.....	142
5.10. Приготовление препаратов для микроскопирования микробов в окрашенном состоянии.....	143
Приложение 5.1. Рецепты приготовления растворов красителей.....	154
Приложение 5.2. Методы окрашивания микробов.....	157
5.11. Вопросы для контроля усвоения материала.....	158
5.12. Тренировочные тесты.....	159
6. Строение и репродукция вирусов.....	162
6.1. Форма и размеры вирусов.....	162
6.2. Структура вирусов.....	165
6.3. Типы симметрии вирусов.....	168
6.4. Вирусный геном.....	171
6.5. Вирусные белки.....	174
6.6. Липиды и полисахариды вирусов.....	176
6.7. Классификация вирусов.....	177
6.8. Жизненный цикл вирусов.....	178
6.9. Культивирование вирусов.....	183
6.10. Вопросы для контроля усвоения материала.....	191
6.11. Тренировочные тесты.....	191
7. Строение и свойства бактериофагов.....	197
7.1. Введение.....	197
7.2. Классификация бактериофагов.....	200
7.3. Строение и химический состав бактериофагов.....	202
7.4. Резистентность фагов.....	210
7.5. Взаимодействие фага с бактериальной клеткой.....	210
7.6. Участие бактериофагов в генетическом обмене у бактерий.....	216
7.7. Практическое применение бактериофагов.....	217
7.8. Выделение и производство бактериофагов.....	221
7.9. Вопросы для контроля усвоения материала.....	224
7.10. Тренировочные тесты.....	224
8. Физиология бактерий.....	230
8.1. Химический состав микробов.....	230
8.2. Ферменты бактерий и их выявление.....	232
8.3. Механизмы транспорта веществ внутрь бактериальной клетки.....	239
8.4. Метаболизм бактерий.....	242
8.4.1. Энергетический метаболизм бактерий.....	245
8.4.2. Конструктивный метаболизм бактерий.....	249
8.5. Транспорт веществ из бактериальной клетки.....	250
8.6. Рост и размножение бактерий.....	255
8.7. Питательные среды.....	258
8.8. Вопросы для контроля усвоения материала.....	263
8.9. Тренировочные тесты.....	263
9. Бактериологическое исследование.....	268
9.1. Отбор, хранение и транспортировка материала.....	268
9.2. Посев материала на питательные среды и выделение чистой культуры аэробных	

бактерий.....	270
9.3. Посев материала на питательные среды и выделение чистой культуры анаэробных бактерий .....	275
9.4. Вопросы для контроля усвоения материала .....	278
9.5. Тренировочные тесты .....	279
10. Генетика бактерий .....	281
10.1. Наследственный аппарат бактерий .....	281
10.2. Изменчивость бактерий .....	292
10.3. Понятие о генной инженерии.....	306
10.4. Вопросы для контроля усвоения материала .....	312
10.5. Тренировочные тесты .....	312
11. Экология микробов .....	318
11.1. Распространение и роль микробов в природе .....	318
11.2. Микрофлора почвы .....	320
11.3. Микрофлора воды .....	327
11.4. Микрофлора воздуха.....	332
11.5. Микрофлора организма человека .....	338
11.6. Вопросы для контроля усвоения материала.....	351
11.7. Тренировочные тесты .....	351
12. Уничтожение микробов в окружающей среде .....	354
12.1. Асептика.....	354
12.2. Антисептика.....	358
12.3. Дезинфекция .....	362
12.5. Стерилизация .....	369
12.5. Вопросы для контроля усвоения материала.....	378
12.6. Тренировочные тесты .....	378
13. Антимикробные химиотерапевтические препараты .....	381
13.1. История антибиотикотерапии .....	381
13.2. Классификация антимикробных препаратов.....	386
13.3. Продуценты антибиотиков .....	391
13.4. Принципы получения антибиотиков.....	393
13.5. Требования, предъявляемые к антимикробным препаратам.....	395
13.6. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам .....	397
13.7. Антибиотикорезистентность микроорганизмов .....	404
13.8. Характеристика антимикробных препаратов.....	407
13.9. Осложнения и побочные действия антимикробной терапии .....	418
13.10. Вопросы для контроля усвоения материала.....	420
13.11. Тренировочные тесты .....	421
14. Основы инфектологии и эпидемиологии.....	424
14.1. Инфекция, инфекционный процесс, инфекционная болезнь .....	424
14.2. Эпидемический процесс .....	429
14.3. Роль микроорганизмов в развитии инфекционного процесса.....	435
14.3.1. Патогенность и вирулентность микробов .....	435
14.3.2. Факторы патогенности микробов .....	436
14.4. Роль макроорганизма в развитии инфекционного процесса .....	445
14.4.1. Врожденные факторы защиты организма от инфекции.....	445

14.4.2. Патоген-ассоциированные молекулярные образы и образраспознающие рецепторы.....	459
14.5. Вопросы для контроля усвоения материала.....	462
14.6. Тренировочные тесты .....	462
15. Методические указания к практическим занятиям.....	474
Список учебной литературы .....	515

## 1. Введение в микробиологию

### 1.1. Мир микробов и их роль в жизни человека

Наша планета состоит из неживой и живой природы. Живая природа составляет биосферу и включает представителей растительного, животного мира и человека, а также продукты их жизнедеятельности. Живые существа, обитающие на Земле, можно условно разделить на две большие группы: макромир и микромир. К макромиру относятся живые существа, видимые невооруженным глазом (растения, животные, насекомые, человек и т. д.), а к микромиру - представители живого мира, видимые только с помощью специальных увеличительных приборов. Размеры представителей микромира колеблются от 10 нм (вирусы) до 10 мкм и более (бактерии, грибы, простейшие). Сравнительные размеры организмов приведены на рисунке 1.1.



Рисунок 1.1 – Сравнительные размеры организмов.

К микромиру относятся представители растительного и животного происхождения: вирусы, бактерии, грибы, простейшие. Всех их можно объединить единым термином - **микробы**. Среди микробов имеются одноклеточные и многоклеточные организмы, имеющие ядро (**эукариоты**); организмы, не имеющие оформленного ядра (**прокариоты**); сложноустроенные неклеточные формы, представляющие собой комплекс нуклеиновых кислот и белков (**вирусы**); инфекционные белковые макромолекулы (**прионы**). Все микробы различаются структурой генома. Так, геном простейших включает примерно 5000-10000 генов, бактерий и грибов - до 5000 генов, вирусов - менее 100 генов.

Микробы чрезвычайно широко распространены в природе. Они обитают в почве, воде, атмосфере, а также в организме человека, животных, растений. Видовой состав их очень разнообразен. Например, только бактерий насчитывается более 100000 видов, грибов - до 250000 видов. В организме человека обитает до  $10^{13-14}$  бактериальных клеток. Среди всех микробов примерно 3500 видов являются патогенными для человека, способными вызывать те или иные инфекционные заболевания.

Роль микробов в природных процессах и в деятельности человека заключается

в следующем:

- микробы участвуют в круговороте веществ в природе, осуществляя процессы азотфиксации, нитрификации, денитрификации и минерализации органических соединений;

- микроорганизмы используются в микробиологических производствах: хлебопечении, пивоварении, виноделии, генной инженерии, производстве молочно-кислых продуктов и лекарственных и профилактических препаратов (антибиотиков, ферментов, гормонов, вакцин, сывороток, иммуноглобулинов);

- микробы участвуют в процессах очистки окружающей среды от природных и антропогенных загрязнений, в том числе от ксенобиотиков (чужеродных для живых организмов химических веществ, не входящих в биотический круговорот);

- патогенные микроорганизмы являются возбудителями заболеваний человека, животных, растений, вызывают порчу продуктов питания и технических материалов (биоповреждения).

## 1.2. Положение микробов в системе живых существ

Во времена **Аристотеля** (рисунок 1.2) живой мир делился на два царства - царство растений и царство животных.



Рисунок 1.2 - Аристотель (384-322 гг. до н. э.).

Обнаруженные в XVII веке микроскопические живые существа были отнесены к царству животных. Однако во второй половине XIX века немецкий естествоиспытатель **Э. Геккель** (рисунок 1.3) пришел к заключению о том, что микроорганизмы по своей структуре существенно отличаются от представителей как царства растений, так и царства животных.

Он предложил выделить все микроорганизмы в отдельное царство - *Protista* (протисты, первосущества). В дальнейшем эта группа организмов была разделена на высшие и низшие протисты. **К высшим протистам** относятся микроскопические животные (простейшие), микроскопические водоросли (кроме сине-зеленых) и микроскопические грибы (плесени, дрожжи). **К низшим протистам** относятся все бактерии и сине-зеленые водоросли.



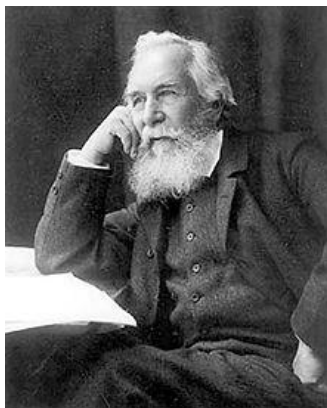


Рисунок 1.3 - Эрнст Геккель (Ernst Heinrich Philipp August Haeckel, 1834-1919 гг.).

Деление микробов на высшие и низшие протисты было обусловлено типом строения клеток. Выделяют два типа строения клеток живых существ – эукариотический тип (эукариоты) и прокариотический тип (прокариоты). Высшие протисты относятся к эукариотам, а низшие протисты – к прокариотам.

Особенности строения прокариотических и эукариотических клеток представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 - Строение прокариотической и эукариотической клеток

Структурные компоненты и функции	Прокариоты	Эукариоты
Эндоплазматический ретикулум	Отсутствуют	Имеются
Размер рибосом	70S	80S
Лизосомы	Отсутствуют	Имеются
Митохондрии	Отсутствуют	Имеются
Аппарат Гольджи	Отсутствует	Имеется
Оформленное ядро	Отсутствует	Имеется
Ядерная мембрана	Отсутствует	Имеется
Ядрышко	Отсутствует	Имеется
Митоз	Отсутствует	Имеется
Мейоз	Отсутствует	Имеется
Дыхательная система	Является частью мембран или мезосом	Осуществляется в митохондриях
Фагоцитоз	Отсутствует	Имеется
Внутриклеточное пищеварение	Отсутствует	Имеется
Устойчивость к облучению	Очень высокая	Низкая
Пептидогликаны в составе клеточной стенки	Имеются	Отсутствуют
Тейхоевые кислоты в составе клеточной стенки	Имеются	Отсутствуют
Стерины в составе мембран	Отсутствуют (имеются у некоторых микоплазм)	Имеются

На рисунке 1.4. представлено сравнительное изображение строения эукариотической и прокариотической клеток.

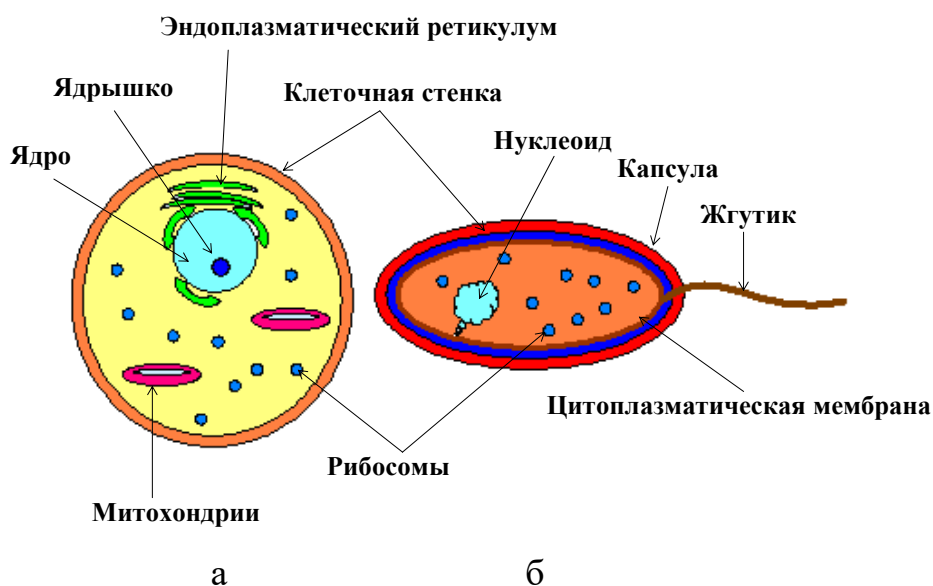


Рисунок 1.4 – Схематическое изображение строения эукариотической (а) и прокариотической (б) клеток.

В настоящее время высшие протисты относятся к надцарству эукариотов, а низшие протисты – к надцарству прокариотов. В свою очередь, надцарства подразделяются на царства, а царства – на подцарства. Таким образом, к миру микробов относятся следующие категории:

1. Представители надцарства эукариотов:

1.1. Подцарство простейших царства животных.

1.2. Представители царства растений (в частности, микроскопические водоросли).

1.3. Представители царства грибов (в частности, микроскопические грибы).

2. Надцарство прокариотов:

2.1. Царство бактерий:

Отдел I - *Gracilicutes* (грациликуты, бактерии с тонкой клеточной стенкой, тонкокожие) объединяет грамотрицательные бактерии.

Отдел II - *Firmicutes* (фирмикуты, бактерии с толстой клеточной стенкой, толстокожие) объединяет грамположительные бактерии.

Отдел III - *Tenericutes* (тенерикуты, бактерии без клеточной стенки, нежнокожие) включает микоплазмы.

Отдел IV - *Mendosicutes* (мендосикуты, бактерии с дефектной клеточной стенкой без пептидогликана) включает архебактерии (бактерии, обитающие в экстремальных условиях – экстремальные термофилы, экстремальные галофилы и др.).

3. Царство вирусов.

Термин “бактерии” ввел в употребление в 1828 г. немецкий естествоиспытатель основатель микрорепалеонтологии **Х.Г. Эренберг** (рисунок 1.5).



Рисунок 1.5 – Христиан Готфрид Эренберг (Christian Gottfried Ehrenberg, 1795 – 1876 гг.).

### 1.3. Предмет и задачи медицинской микробиологии

Наука, изучающая микроорганизмы, называется микробиологией (греч. *micros* - малый, *bios* - жизнь, *logos* - учение). В свое время Л. Пастер науку о микробах предлагал назвать “микробией”, однако прижился существующий до сих пор термин - “микробиология”. Это название было предложено французским ученым **П.Э. Дюкло** (рисунок 1.6).



Рисунок 1.6 - Пьер Эмиль Дюкло (Pierre Emile Duclaux, 1840-1904 гг.).

Многие авторы микробиологию определяли как науку о мельчайших живых существах – организмах, доступных исследованию только при помощи микроскопа. Однако вирусы являются неклеточными формами жизни и не могут быть обнаружены с помощью светового микроскопа. В связи с этим, в настоящее время используется следующее определение: **микробиология** – это наука, которая изучает систематику, морфологию, физиологию, генетику, экологию микробов, их взаимоотношение с другими формами жизни, патогенез инфекционных заболеваний, а также разрабатывает методы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней.

Размеры большинства микробов не превышают 0,1 мм, поэтому они не видны

невооруженным глазом. Для их изучения используют световую и электронную микроскопию (таблица 1.2).

Таблица 1.2 - Сравнительная характеристика размеров микробов

Объекты	Средние размеры	Метод исследования
Диатомовые водоросли, растительные клетки	100 мкм (0,1 мм)	Световая микроскопия
Клетки крови	10 мкм	
Бактерии	1 мкм	
Вирусы человека и животных	До 200 нм (0,2 мкм)	Электронная микроскопия
Молекулы	1 нм	

Микроорганизмы распространены в природе повсеместно: в почве, воде, воздухе, на предметах окружающей среды, на наружных покровах и во внутренних органах человека, животных и птиц. Микробы встречаются во всех почвах и водных объектах, в глубинах материков и морей, в высоких слоях атмосферы. Они составляют значительную часть живого вещества планеты.

**Главными задачами** современной медицинской микробиологии являются:

- изучение роли микробов в жизни человека;
- изучение микробов - возбудителей инфекционных заболеваний человека, а также болезней, общих для человека и животных;
- изучение структуры и метаболизма возбудителей заболеваний человека;
- изучение влияния факторов окружающей среды на жизнедеятельность микробов и их сохраняемость;
- изучение микрофлоры тела человека, почвы, воды, воздуха, продуктов питания, лекарственного сырья, производственных, бытовых, медицинских и других объектов и их влияния на организм человека;
- разработка и совершенствование средств и методов лабораторной диагностики инфекционных болезней;
- разработка и изыскание эффективных средств специфической профилактики и лечения инфекционных болезней человека (вакцин, сывороток, иммуноглобулинов, антибиотиков и иных препаратов);
- использование продуктов микробиологического синтеза в производстве профилактических и лечебных препаратов.

#### 1.4. Виды и разделы микробиологии

Микробиология дифференцируется на специальные дисциплины (виды):

- **медицинская микробиология** изучает микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни человека, а также заболевания, общие для человека и животных, разрабатывает средства и методы диагностики, профилактики и лечения этих болезней специальными препаратами (сыворотками, вакцинами и др.), исследует роль нормальной микрофлоры в жизнедеятельности человека, условия

сохранения патогенных микробов в окружающей среде, пути и механизмы их распространения, их обезвреживание;

- **ветеринарная микробиология** изучает микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни сельскохозяйственных, промысловых и диких животных, птиц, рыб, пчел, в том числе возбудителей заболеваний, общих для человека и животных, исследует микрофлору кормов и организма животных, разрабатывает препараты для диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний животных и птиц;

- **сельскохозяйственная микробиология** изучает микроорганизмы, участвующие в формировании почвенных структур, повышении плодородия почв, создании удобрений на основе микроорганизмов, а также микроорганизмы, вызывающие болезни сельскохозяйственных культур (фитопатогенные микроорганизмы) и меры борьбы с ними, разрабатывает методы консервирования кормов с помощью препаратов, приготовленных с использованием микроорганизмов;

- **промышленная (техническая) микробиология** изучает микроорганизмы, используемые в различных отраслях промышленности с целью получения пищевых продуктов, спиртов, ферментов, аминокислот, витаминов, антибиотиков, кормового белка и других биологически активных веществ, а также разрабатывает способы предохранения продуктов и сырья от порчи микроорганизмами;

- **пищевая микробиология** изучает микроорганизмы, используемые в производстве пищевых продуктов, разрабатывает средства и способы защиты пищевого сырья и продуктов питания от порчи микроорганизмами;

- **санитарная микробиология** занимается вопросами выживания патогенных и условно-патогенных микробов в окружающей среде, разрабатывает методы санитарно-микробиологического контроля объектов окружающей среды и методы их оздоровления;

- **фармацевтическая микробиология** изучает микроорганизмы, используемые в производстве лечебно-профилактических препаратов, а также возбудителей порчи лекарственного сырья;

- **космическая микробиология** изучает влияние космических условий на жизнедеятельность микроорганизмов;

- **геологическая микробиология** изучает роль микроорганизмов в образовании и разложении руд, извлечении и получении из этих руд металлов, образовании полезных ископаемых, круговороте наиболее важных биогенных элементов.

**В самостоятельные разделы микробиологии выделены:**

- **бактериология** (изучает морфологию, физиологию, генетику бактерий, патогенез, клинику, диагностику, профилактику и лечение бактериальных инфекций);

- **иммунология** (изучает закономерности проявления иммунных реакций, механизмы и способы управления иммунитетом, строение и функции антигенов и антител, иммунологическую толерантность, вопросы аллергии, разрабатывает методы диагностики, специфической профилактики и иммунотерапии инфекционных заболеваний);

- **вирусология** (изучает вирусы – неклеточные формы жизни, их структуру,

природу, химический состав, взаимоотношения с клеткой хозяина, механизмы внутриклеточного паразитизма, разрабатывает средства и методы диагностики, профилактики и лечения вирусных инфекций);

- **молекулярная биология** с молекулярной генетикой и геной инженерией (изучает вопросы молекулярной организации живых существ и возможность конструирования рекомбинантных молекул);

- **микробная биотехнология** (изучает возможность использования микробов для производства практически полезных для человека продуктов);

- **микология** - наука о грибах (изучает грибы – возбудители микозов, разрабатывает средства и методы диагностики, профилактики и лечения грибковых поражений).

Микробиология по решаемым задачам подразделяется на общую и частную микробиологию. **Общая микробиология** изучает общие закономерности строения, развития и жизнедеятельности микробов, их роль в природе, генетику, вопросы систематики и классификации. **Частная микробиология** изучает конкретных возбудителей инфекционных заболеваний, их морфологию, культуральные и биохимические свойства, антигенную структуру, факторы патогенности, особенности патогенеза вызываемого заболевания, клиническую картину болезни, методы диагностики, профилактики и лечения инфекционного заболевания.

В качестве самостоятельных дисциплин выделились **экологическая микробиология**, изучающая роль микробов в природе и в жизни человека, взаимодействие микробов с человеком, и **клиническая микробиология**, изучающая возникновение и течение внутрибольничных инфекций, разрабатывающая и внедряющая методы и способы микробиологической диагностики, профилактики и специфического лечения инфекционных и неинфекционных болезней.

## 1.5. Связь микробиологии с другими науками

Медицинская микробиология имеет тесную связь с другими науками:

- **физикой** (реактивное движение у живых организмов, центрифуги и их применение в биологических исследованиях, клеточные мембраны, разрешающая способность оптических приборов, люминесцентный анализ, фотобиологические реакции, рентгеновское излучение, электронный микроскоп);

- **органической химией** (структура и функции спиртов, фенолов, углеводов, аминокислот, белков, липидов);

- **неорганической и аналитической химией** (дисперсные системы и растворы, приготовление разведений различной концентрации и с разными коэффициентами);

- **биологией** (сущность жизни, структурные компоненты клетки, взаимодействие организма и внешней среды);

- **анатомией** (органы кровообращения, лимфоидные структуры, органы иммунной системы и другие ткани);

- **гистологией** (клеточная организация тканей, функционирование клеток

организма);

- **биохимией** (ферменты, белки, биологическое значение витаминов, белковый, углеводный, липидный и водно-солевой обмен);

- **физиологией** (транспорт питательных веществ, механизмы секреции, воспаления, аллергии, действия лизоцима, комплемента и других защитных факторов);

- **генетикой** (строение нуклеиновых кислот, наследственность и изменчивость организмов).

Микробиология имеет широкие связи со многими **клиническими дисциплинами** (инфекционные болезни, паразитология, хирургия, внутренние болезни, акушерство и гинекология, педиатрия, урология, дерматовенерология, фтизиопульмонология, офтальмология, стоматология и др.), **медико-профилактическими дисциплинами** (эпидемиология, гигиена, экология), **биотехнологией**.

### 1.6. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Назовите особенности строения прокариотических клеток.
2. Назовите особенности строения эукариотических клеток.
3. Какие признаки отличают прокариотические клетки от эукариотических клеток?
4. Какие организмы и формы жизни включает в себя мир микробов?
5. Дайте определение микробиологии.
6. Назовите виды и разделы микробиологии.
7. Назовите главные задачи современной медицинской микробиологии.
8. С какими науками имеет связь медицинская микробиология?

### 1.7. Тренировочные тесты

1. Какие царства живых существ выделяли во времена Аристотеля?
  - + растения
  - микробы
  - + животные
  - вирусы
  - простейшие
2. Первооткрывателем микробов является:
  - П. Эрлих
  - + А. Левенгук
  - Р. Кох
  - И.И. Мечников
  - Л. Пастер
3. Выделять микроорганизмы в отдельное царство (протисты) предложил:

- Л. Пастер
- + Э. Геккель
- Р. Кох
- Гиппократ
- Д. Фракасторо

4. Кто предложил называть науку о микробах микробиологией?

- Р. Кох
- Л. Пастер
- И.И. Мечников
- + П. Дюкло
- А. Левенгук

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.



## 2. История микробиологии

Микробы появились на нашей планете в древние времена, когда о существовании микроорганизмов люди не знали и только догадывались. Со временем сформировалась целая наука – микробиология, изучающая строение, функции и роль микробов в жизни людей. В настоящее время историю микробиологии условно разделяют на пять периодов:

- эвристический период;
- морфологический период;
- физиологический период;
- иммунологический период;
- молекулярно-генетический период.

### 2.1. Эвристический период

Эвристический период развития микробиологии (эвристика – догадка, домысел) характеризовался предположениями ученых о причинах заразных болезней. В этот период человек не подозревал о присутствии микробов, хотя повседневно встречался с продуктами их жизнедеятельности. Например, человек издавна использовал спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое брожение в выпечке хлеба, виноделии, пивоварении, сыроделии. Предположения о том, что брожение, гниение и заразные болезни человека и животных являются результатом воздействия невидимых существ выдвигались многими учеными того времени.

Так, древнегреческий врач **Гиппократ** (рисунок 2.1) высказал предположение о том, что причиной заразных болезней человека и животных являются невидимые неживые вещества, образующиеся в гнилых болотистых местах. Эти вещества Гиппократ назвал “миазмами”.



Рисунок 2.1 - Гиппократ (Hippocrates, III-IV в. до н. э.) обследует ребенка.

За свой вклад в развитие медицинской науки Гиппократ назван отцом медицины. Клятва Гиппократа до сих пор является одним из атрибутов вступления выпускника медицинского высшего учебного заведения во врачебную деятельность.

Древнеримский поэт и философ **Тит Лукреций** (рисунок 2.2) причиной

заразных болезней считал наличие особых “невидимых семян”, специфичных для каждой инфекции.

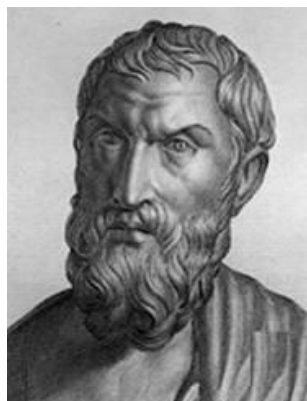


Рисунок 2.2 - Тит Лукреций (Titus Lucretius, примерно 99-55 гг. до н. э.).

Спартанский военачальник и философ **Фукидид** (рисунок 2.3) предполагал о наличии уже “живого контагия” – *contagium animatum* (от лат. *contagio* – дотрагиваюсь), являющегося причиной инфекционных болезней. Им было сформулировано даже положение о невосприимчивости к повторному заболеванию: “... кто сам переболел и выздоровел, ... никогда не заболел второй раз, а если и заболел, то никогда смертельно”.



Рисунок 2.3 - Фукидид (Thukydudys, ок. 460-455 гг. до н. э. – ок. 399-396 гг. до н. э.).

Сторонником теории о “живом возбудителе” был также древнеримский поэт и философ **Марк Теренций Варрон** (рисунок 2.4). Он предполагал о наличии “мельчайших живых существ” (*animalcula quaedam minuta*), вызывающих эпидемии инфекционных болезней.



Рисунок 2.4 – Марк Теренций Варрон (Marcus Terentius Varro, 116-27 гг. до н. э.).

Иранский ученый-энциклопедист **Разес** (Абу-Бекр Мухаммед бен-Закария, рисунок 2.5) одним из первых высказал предположение об инфекционной (заразной) природе некоторых заболеваний.



Рисунок 2.5 - Разес (Razes, 865-925 гг.).

В своем труде “Об оспе и кори” он дал классическое описание этих болезней и указал на невосприимчивость к повторному заболеванию.

Таджикский философ и врач **Авиценна** (Абу Али аль-Хусейн Алта-ибн Сина, рисунок 2.6) в своем сочинении “Канон врачебной науки” предположил, что заболевания вызываются мельчайшими существами.



Рисунок 2.6 - Авиценна (Avicenna, 980-1037 гг.).

Авиценна первым обратил внимание на заразность оспы, установил различия между холерой и чумой, описал проказу.

Философ и врач **Маймонид** (Абу Амрам Муса ибн Маймун, рисунок 2.7) выделил в отдельное направление профилактическую медицину и рекомендовал особое внимание уделять уходу за выздоравливающими от инфекционных болезней.



Рисунок 2.7 - Маймонид (Maimonides, 1135-1204 гг.).

В XV-XVI вв. немецкий ученый Т. Парацельс и итальянский врач и поэт Д. Фракасторо также выдвигали предположение о том, что заразные болезни вызываются живыми существами - контагиями (*Contagium vivum*). Они разработали методы и средства лечения заразных болезней. Например, **Т. Парацельс** (рисунок 2.8) считал, что организм человека состоит из ртути, серы, железа и других веществ, а причиной болезней является нарушение равновесия между этими веществами. Поэтому он ввел в медицинскую практику препараты ртути, серы и железа.



Рисунок 2.8 - Теофраст Парацельс (Theophrastus Paracelsus, 1493-1541 гг.).

**Д. Фракасторо** (рисунок 2.9) первым обосновал теорию о том, что заразные болезни вызываются “живыми контагиями”, которые передаются от больных людей здоровым через воздух или окружающие предметы. Поэтому Д. Фракасторо предлагал для борьбы с заразными болезнями изолировать больных и окуривать помещения можжевельником. За эти работы Д. Фракасторо считают основоположником эпидемиологии.



Рисунок 2.9 - Джироламо Фракасторо (Girolamo Fracastoro, 1476-1553 гг.).

Со времен Д. Фракасторо заразные болезни стали называться инфекционными. Таким образом, примерно за два тысячелетия ученые прошли путь от догадок и предположений о причинах возникновения болезней к убеждению о том, что заразные болезни человека и животных вызываются какими-то невидимыми живыми существами.

## 2.2. Морфологический период

Развитие микробиологии как науки стало возможным после изобретения микроскопа - прибора, позволяющего многократно увеличивать изображение рассматриваемого объекта. С использованием микроскопа начался новый этап развития микробиологии - **морфологический период** - период открытия мира микробов.

Первое увеличивающее оптическое устройство изобрел в 1612 г. **Галилео Галилей** (рисунок 2.10).

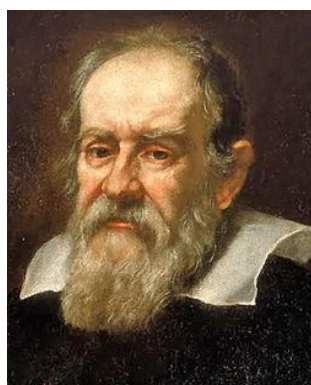


Рисунок 2.10 - Галилео Галилей (Galileo Galilei, 1564-1642 гг.) и его микроскоп.

Микроскоп Галилея представлял собой всего лишь зрительную трубу с небольшим увеличением, недостаточным для обнаружения микроорганизмов, Поэтому Галилео Галилей с помощью своего микроскопа изучал насекомых.

Первое увеличивающее устройство, пригодное для обнаружения крупных микробов, сконструировали в Голландии шлифовальщики стекол (мастера очков) **Х. Янсен и его сын З. Янсен** (рисунок 2.11).



Рисунок 2.11 - Захариас Янсен (Sacharias Jansen, примерно 1585-1632 гг.) и “микроскоп” Янсенов.

Изготовленное ими устройство давало увеличение в 32 раза и представляло собой две выпуклые линзы внутри одной трубки, то есть являлось прообразом современного телескопа, нежели микроскопа. Однако с помощью “микроскопа” Янсенов католический прелат, алхимик, римский преподаватель медицины **А. Кирхер** (рисунок 2.12) обнаружил в гниющих продуктах (мясе, молоке) и в крови больных людей живые существа, названные им “червячками”. Он полагал, что наблюдаемые им живые существа произошли в организме из неживых органических соединений.



Рисунок 2.12 - Атанасиус Кирхер (Athanasius Kircher, 1602-1680 гг.).

Наибольшую известность в этот период развития микробиологии получили исследования голландского продавца сукна и естествоиспытателя **А. Левенгука** (рисунок 2.13). Он в свободное от работы время увлекался шлифовкой стекол и конструированием увеличительных приборов. В 1673 г. он изобрел прибор, дающий увеличение в 150-300 раз.



Рисунок 2.13 - Антони ван Левенгук (Antoni van Leeuwenhoek, 1632-1723 гг.) и его микроскоп.

“Микроскоп” Левенгука представлял собой двояковыпуклую линзу с очень коротким фокусным расстоянием, поэтому при работе этот прибор необходимо было подносить близко к глазам (рисунок 2.14).

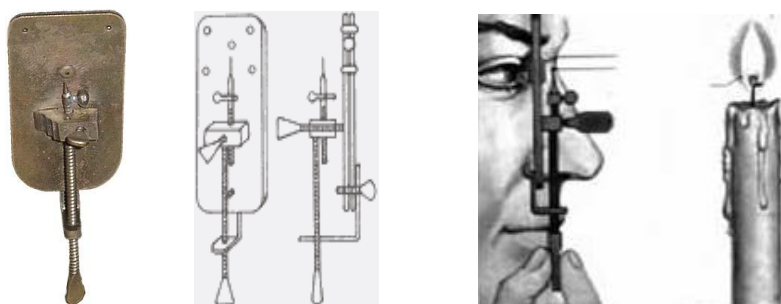


Рисунок 2.14 – “Микроскоп” А. Левенгука и обращение с ним.

Рассматривая с помощью изобретенного им “микроскопа” каплю воды, налет с зубов, испражнения, кровь, А. Левенгук описал инфузории, лямблии, эритроциты, а также неизвестные образования шарообразной, палочковидной и извитой формы. Обнаруженных живых “зверушек” Левенгук назвал “анималькулюсами”. Свои зарисовки и описания “анималькулюсов” он направлял в Лондонское королевское научное общество. Эти описания сначала печатались в научных журналах, а в 1695 г. были изданы на латинском языке отдельной книгой под названием “Тайны природы, открытые Антони ван Левенгуком при помощи микроскопов”. Зарисовки Левенгука отражали увиденное им многообразие живых существ (рисунок 2.15).

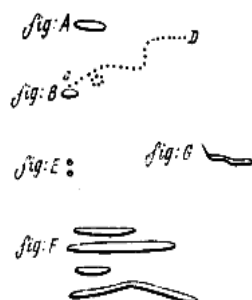


Рисунок 2.15 - Зарисовки микробов, сделанные А. Левенгуком.

Первым из россиян, кто увидел микробов, был Петр I. Он посетил в Голландии А. Левенгука и привез в Россию его микроскоп.

В последующем микроскоп многократно совершенствовался, что позволило описать множество различных форм микробов. Наибольший вклад в совершенствование микроскопа внес английский естествоиспытатель **Р. Гук** (рисунок 2.16). Микроскоп Гука представлял собой уже сложную систему линз, объектива и окуляра.

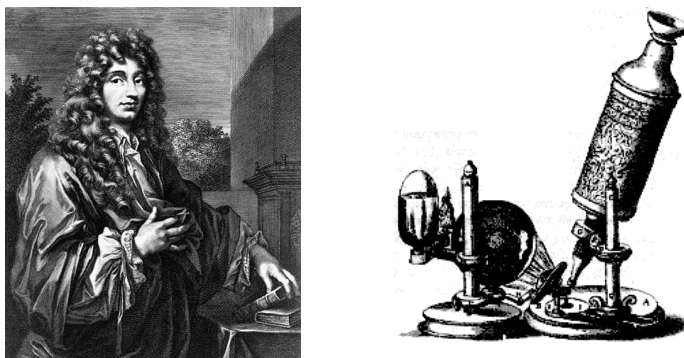


Рисунок 2.16 - Роберт Гук (Robert Hooke, 1635-1703 гг.) и его микроскоп.

После открытия А. Левенгука за короткое время было обнаружено большое количество бактерий, грибов, простейших. Для доказательства роли микробов в патологии человека проводились эксперименты на животных, а также опыты по самозаражению. Например, русский ученый **Д.С. Самойлович** (Даниил Самойлович Сушковский, рисунок 2.17) ввел себе содержимое бубона больного чумой человека и переболел чумой в тяжелой форме.



Рисунок 2.17 - Даниил Самойлович Самойлович (1744-1805 гг.).

К этому времени было установлено, что микроскоп должен иметь две оптические системы: объектив и окуляр, а важнейшими характеристиками микроскопа являются увеличение и разрешающая способность. **Увеличение микроскопа** – это отношение линейных размеров изображения к линейным размерам рассматриваемого предмета. **Разрешающая способность микроскопа** – это линейное расстояние между двумя точками, которые можно наблюдать отдельно. Микроскоп Янсенов имел увеличение в 30 раз, а его разрешающая способность неизвестна. Микроскоп А. Левенгука имел увеличение в 150-300 раз,



его разрешающая способность составляла 0,5 микрона. Современные световые микроскопы имеют увеличение в 1000 раз, а разрешающую способность - 0,25 микрона.

В течение XVIII-XX веков были открыты возбудители многих инфекционных заболеваний. Однако долго не удавалось обнаружить возбудителей таких заболеваний как корь, полиомиелит, грипп. В 1892 г. русский ботаник **Д.И. Ивановский** (рисунок 2.18) открыл возбудителя мозаичной болезни табака.



Рисунок 2.18 – Дмитрий Иосифович Ивановский (1864-1920 гг.) листья табака, пораженные мозаичной болезнью.

При фильтровании сока больных растений табака Д.И. Ивановский обнаружил, что через бактериальные фильтры проходят какие-то мельчайшие частицы (фильтрующийся вирус или фильтрующийся яд), способные вызывать специфические поражения у здоровых растений.

В 1898 г. голландский микробиолог **М. Бейеринк** (рисунок 2.19) повторил опыты Д.И. Ивановского с возбудителем болезни табака и назвал его жидким ядом или вирусом (лат. *virus* - яд).



Рисунок 2.19 - Мартин Бейеринк (Martinus Willem Beijerinck, 1851-1931 гг.).

В отличие от бактерий, вирусы не имеют клеточного строения и способны размножаться только внутри живой клетки. На питательных средах они не культивируются. Вслед за возбудителем болезни табака были открыты многие вирусы, поражающие человека, животных, растения и даже бактерий – так

называемые бактериофаги. Например, в 1915 г. английский бактериолог **Ф. Туорт** (рисунок 2.20) описал агент, который вызывал лизис стафилококков и был способен проходить через бактериальный фильтр.



Рисунок 2.20 – Фредерик Туорт (Frederic Twort, 1877-1950 гг.).

Независимо от него в 1917 г. французско-канадский микробиолог **Ф.Х. Д'Эрель** (рисунок 2.21) подробно описал свойства агента, вызывающего лизис возбудителя дизентерии. Он установил, что бактерии, зараженные этим агентом, погибали, а количество самого агента увеличивалось. Ф. Д'Эрель предложил название для этого агента – бактериофаг, то есть пожиратель бактерий. Он предложил использовать бактериофаги для лечения бактериальных заболеваний и в 1919 г. успешно вылечил бактериофагом первого пациента. Ф. Д'Эреля по праву считают первооткрывателем бактериофагов.



Рисунок 2.21 - Феликс Хьюберт Д'Эрель (Felix d'Herelle, 1873-1949 гг.).

После открытия вирусов в первой половине XX в. сформировалась самостоятельная дисциплина - **вирусология** (наука о вирусах).

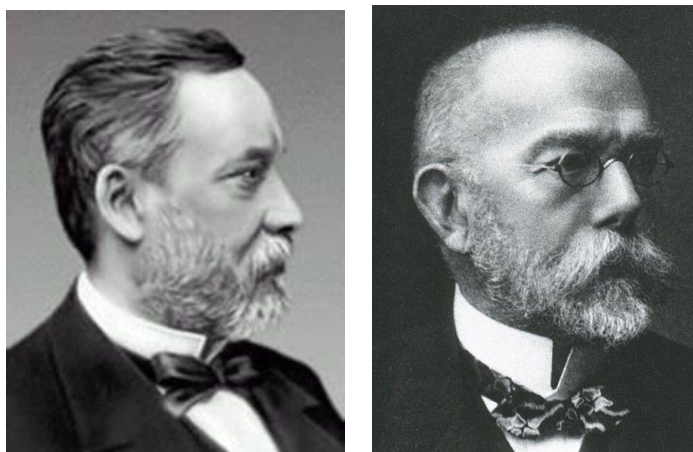
Открытие новых видов бактерий, вирусов, грибов и простейших продолжается и в настоящее время. В последние десятилетия открыты возбудители иммунодефицита человека (ВИЧ), геморрагических лихорадок (Марбург, Ласса, Эбола и др.), болезни легионеров и др. Многие бактерии и вирусы в результате генетических рекомбинаций приобрели новые свойства и стали патогенными для человека (вирус оспы обезьян, хеликобактер). Получили эпидемическое

распространение парентеральные гепатиты, туберкулез, хламидиоз. Благодаря глобальной массовой вакцинации полностью исчезла натуральная оспа. Особое значение приобретают прионные заболевания.

### 2.3. Физиологический период

После обнаружения микробов пристальное внимание ученых привлекли вопросы строения и жизнедеятельности возбудителей. Поэтому с середины XIX в. начался физиологический период развития микробиологии - интенсивное изучение химического состава, питания, дыхания, роста и размножения бактерий.

Основоположниками физиологического периода микробиологии по праву считают выдающегося французского ученого-химика **Л. Пастера** и немецкого ученого-медика **Р. Коха** (рисунок 2.22).



А

Б

Рисунок 2.22 – А - Луи Пастер (Louis Pasteur, 1822-1895 гг.), Б - Роберт Кох (Heinrich Hermann Robert Koch, 1843-1910 гг.).

Л. Пастер был химиком по образованию, но обладал широкой эрудицией, талантом экспериментатора, целеустремленностью. Он сделал ряд принципиальных открытий во многих областях науки, что позволило ему стать основоположником не только микробиологии, но и иммунологии, биотехнологии, дезинфектологии. Л. Пастер открыл природу брожения, установил явление анаэробноз, опроверг теорию самозарождения жизни, обосновал принципы стерилизации, разработал способы получения вакцин и принципы вакцинации.

В 1857 г. Л. Пастер установил, что спиртовое, молочнокислое и уксуснокислое брожение вызывают соответствующие бактерии. В 1860 г. он экспериментально доказал, что в стерильном прокипяченном бульоне в открытой колбе размножаются микробы, попавшие из воздуха. Но если стерильный бульон будет находиться в колбе, которая сообщается с воздухом через спиральную изогнутую стеклянную трубку, то бульон останется стерильным в течение длительного времени, так как бактерии из воздуха будут оседать в капельках воды в изогнутой части трубки и не попадут в бульон (рисунок 2.23).

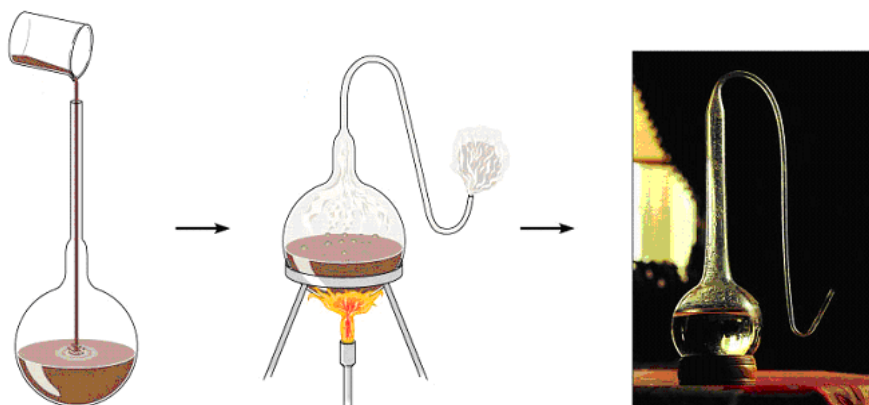


Рисунок 2.23 - Опыты Л. Пастера по зарождению жизни.

Этими опытами Л. Пастер опроверг существовавшую в то время теорию самопроизвольного зарождения живых организмов. За опровержение теории самозарождения жизни Л. Пастер получил премию французской академии наук.

Изучая маслянокислое брожение, Л. Пастер установил, что некоторые бактерии живут и размножаются только в бескислородной среде. Этими исследованиями он открыл явление **анаэробноз**, а группа таких микробов получила название **анаэробных**.

В 1865 г. Л. Пастер установил, что микроорганизмы, попадающие в вино или пиво из внешней среды, вызывают порчу этих продуктов. Он предложил прогревать такие продукты при температуре  $60-80^{\circ}\text{C}$ , что было достаточным для уничтожения вредных бактерий, но не влияло на качество продуктов. Разработанный метод в честь Л. Пастера стал называться **“пастеризацией”**. Этот способ широко используется в настоящее время в пищевой промышленности. Для стерилизации некоторых изделий Л. Пастер предложил нагревать их до  $120^{\circ}\text{C}$  в паровом котле, который получил название **“автоклав”**.

**30 апреля 1878 г.** в своем докладе на заседании Французской Академии наук Л. Пастер указал, что причиной инфекционных болезней человека и животных являются микроорганизмы. Этот день считается **днем рождения медицинской микробиологии** как науки.

Считается, что Л. Пастер первым разработал **принципы вакцинации**. Однако задолго до этого в Китае, Индии, Ираке для профилактики натуральной оспы детям на кожу наносили насечки и втирали в них гной из пустул больных людей. Такой метод назывался **скарификацией**. После такой скарификации развивалось заболевание, которое протекало относительно легко и оставляло после себя невосприимчивость к последующему заражению этим же возбудителем. Использовали при натуральной оспе и другой способ защиты - так называемую **вариоляцию** – введение высушенных оспенных корочек в ноздри, прикладывание их к сделанным на коже надрезам. В России “профилактическое самозаражение” проводилось под названием **“покупка оспы”**. Для этого здоровым детям в подмышечные впадины помещали монеты, смазанные оспенным отделяемым больного человека. В последующем содержимое пузырьков больных оспой стали вводить под кожу здоровым людям. Этот метод защиты назвали **инокуляцией**. Во время эпидемии оспы в Австрии, когда заболела императрица Терезия и члены ее

двора, Екатерина II пожелала сделать себе и своему сыну прививку. 12 октября 1768 г. врач Т. Димсдейл произвел оспопрививание методом **инокуляции** (введения) оспенного материала императрице и ее сыну Павлу. В результате этого ни Екатерина II, ни Павел I не заболели оспой.

Сам термин “вакцина” введен в честь английского врача **Э. Дженнера**, который вводил в организм человека содержимое пузырьков людей или животных, больных коровьей оспой. С помощью этого приема он защищал людей от натуральной оспы. Так как Э. Дженнер вначале использовал материал от коров, препарат стали называть вакциной (лат. *vacca* - корова). В 1796 г. Э. Дженнер ввел 8-летнему мальчику “вакцинный яд”, взятый из пузырька с кисти женщины, заразившейся коровьей оспой при доении коровы. Через два месяца после этого Э. Дженнер взял содержимое из пустул больного натуральной оспой человека и ввел его привитому мальчику. Мальчик не заболел натуральной оспой. Через 5 месяцев мальчику повторно ввели материал, взятый от больного натуральной оспой человека. Заболевания не возникло. Таким способом была установлена возможность искусственного создания невосприимчивости к натуральной оспе (рисунок 2.24).



Рисунок 2.24 – Эдвард Дженнер проводит оспопрививание.

В России первая прививка коровьей оспы была сделана в 1801 г. профессором Е.О. Мухиным мальчику из сиротского дома Антону Петрову, получившего после этого фамилию Вакцинов.

Л. Пастер впервые предложил метод **аттенуации** (ослабления) патогенных свойств микроорганизмов путем длительного культивирования на питательных средах или путем длительного пассирования через организм лабораторных животных. Аттенуированные (ослабленные) культуры утрачивали патогенность (способность вызывать заболевание), но сохраняли иммуногенность (способность вызывать защитную реакцию), что позволяло использовать их в качестве вакцинных препаратов.

Разработке метода аттенуации предшествовало то, что однажды Л. Пастер оставил культуру возбудителя куриной холеры на длительный срок в пробирке без пересева. После введения такой “старой” культуры куры не заболевали холерой. Но удивительным было то, что введение этим курам свежей культуры также не приводило к развитию заболевания. Результаты этих опытов позволили Л. Пастеру предложить метод аттенуации (ослабления патогенности культур) для получения вакцин против инфекционных заболеваний.

Используя метод аттенуации, Л. Пастер в 1881 г. создал **вакцины против сибирской язвы**. Аттенуированные культуры сибиреязвенного микроба Л. Пастер получил путем длительных последовательных пассажей возбудителя на питательных средах при повышенной температуре. Пастеровские вакцины против сибирской язвы длительное время использовались для иммунизации животных (рисунок 2.25).



Рисунок 2.25 - Вакцинация овец против сибирской язвы.

Следующей вакциной, разработанной Л. Пастером, стала **вакцина против бешенства**. Многократно заражая кроликов материалом, взятым из мозга погибшей от бешенства собаки, Л. Пастер получил вакцину против этого опасного заболевания людей. 6 июля 1885 года Л. Пастер ввел приготовленную вакцину 9-летнему мальчику Йозефу Майстеру, искусанному бешеной собакой (рисунок 2.26).



Рисунок 2.26 – Прививка от бешенства.

Мальчик не заболел бешенством. В благодарность за свое спасение Й. Майстер до конца своей жизни служил швейцаром в Институте Пастера.

17 февраля 1886 г. Л. Пастер доложил о своих результатах по вакцинации против бешенства во Французской Академии наук. В то время в Смоленской губернии бешеным волком было покусано одновременно 19 человек. Все они после предварительного согласования отправились в Париж к Л. Пастеру для прививок. Из 19 пострадавших 16 человек после полного курса прививок не заболели бешенством

и вернулись домой (рисунок 2.27).



Рисунок 2.27 – Жители Смоленской губернии, спасенные Л. Пастером от бешенства.

После этого во всех странах начали организовывать пастеровские станции для прививок против бешенства. Первой была создана станция в Париже, затем по инициативе И.И. Мечникова была создана станция в Одессе. В 1888 г. в Париже был создан институт имени Л. Пастера, где заслуги Пастера отражены на мемориальной доске у входа в его лабораторию:

- 1857 г. - брожение;
- 1860 г. - самопроизвольное зарождение;
- 1865 г. - болезни вина и пива;
- 1868 г. - болезни шелковичных червей;
- 1881 г. - зараза и вакцина;
- 1885 г. - предохранение от бешенства.

Выдающейся заслугой Л. Пастера является подготовка учеников, внесших весомый вклад в развитие микробиологии. Например, французский химик и бактериолог **Ш.Э. Шамберлан** (рисунок 2.28) занимался вопросами вакцинации против сибирской язвы, изучал микробные токсины, разработал первый керамический бактериальный фильтр (свечу Шамберлана), изготовленный из каолина.



Рисунок 2.28 - Шарль Эдуард Шамберлан (Charles Edouard Chamberland, 1851-1908 гг.).

Французский микробиолог **Э. Ру** (рисунок 2.29) изучал возбудителей сибирской язвы, столбняка, бешенства и продуцируемые ими токсины.



Рисунок 2.29 - Эмиль Ру (Pierre Paul Emile Roux, 1853-1933 гг.).

Румынский микробиолог **В. Бабеш** (рисунок 2.30) занимался изучением возбудителей бешенства, лепры, дифтерии, туберкулеза и других инфекционных заболеваний. Его именем названы включения в нервных клетках при бешенстве (тельца Бабеша-Негри).



Рисунок 2.30 - Виктор Бабеш (Victor Babes, 1854-1926 гг.).

Значительный вклад в развитие микробиологии внес немецкий бактериолог **Р. Кох**. Он предложил использовать для микроскопирования бактерий иммерсионную систему, для выращивания микробов - плотные питательные среды на основе желатина и агара, разработал методы выделения чистых культур микроорганизмов и методы окраски микробов анилиновыми красителями (метилвиолетом и фуксином), обосновал использование дезинфектантов при инфекционных заболеваниях. В 1881 г. он опубликовал работу “К вопросу об исследовании патогенных микроорганизмов”, в которой излагал методику приготовления плотных питательных сред и методы выделения чистых культур микроорганизмов. Роль конкретного микроорганизма в возникновении и развитии инфекционной болезни Р. Кох выразил в виде утверждений, известных в настоящее время как **постулаты Коха** (постулаты Коха-Пастера):

- для определения этиологии заболевания микроб должен быть выделен из организма больного человека в чистой культуре;



- чистая культура микроба должна вызывать аналогичное заболевание при заражении животных;
- микроб должен быть повторно изолирован из организма экспериментально зараженного животного.

Первые три постулата известны также под названием **триады Коха** или **триады Генле-Коха**. Немецкий патологоанатом **Я. Генле** (рисунок 2.32) впервые обратил внимание на связь конкретного инфекционного заболевания с конкретным возбудителем.



Рисунок 2.32 - Якоб Генле (Friedrich Gustav Jakob Henle, 1809-1885 гг.).

В наше время постулаты Генле-Коха имеют относительное значение, так как установление этиологической роли микробов в инфекции не всегда укладывается в приведенные рамки: иногда трудно воспроизвести болезнь у животных, так как отсутствует соответствующая модели (например, при ВИЧ-инфекции). Кроме того, некоторые возбудители нередко обнаруживаются у лиц, не имеющих симптомов заболевания (носительство).

Заслугой Р. Коха является выделение возбудителей туберкулеза (1882 г.) и холеры (1883 г.). Эти бактерии были названы соответственно палочкой Коха и запятой Коха (рисунок 2.33).



Рисунок 2.33 - Возбудители туберкулеза (а) и холеры (б), открытые Р. Кохом.

Р. Кох первым сделал фотоснимки бациллы сибирской язвы и стал основателем микробиологической фотографии. В благодарность за заслуги перед

микробиологией институт в Берлине носит имя Роберта Коха.

К работам Л. Пастера Р. Кох относился ревностно, так как Л. Пастер был химиком, а Р. Кох - медиком. После получения Л. Пастером вакцинного сибиреязвенного штамма Р. Кох решил получить вакцинный туберкулезный штамм. В 1890 г. на международном съезде врачей он сообщил, что получил экстракт из туберкулезных бактерий (туберкулин), который способен излечивать туберкулез. Однако на практике оказалось, что туберкулин не только не излечивает, но в отдельных случаях даже обостряет процесс. Тем не менее, туберкулин (АТК – альт-туберкулин Коха) до сих пор используется для диагностики туберкулеза. Поэтому имя Р. Коха заслужено стоит рядом с именем Л. Пастера.

Один из сотрудников Р. Коха **Ю.Р. Петри** предложил особую стеклянную посуду, которую знают и используют микробиологи всего мира, - чашку Петри (рисунок 2.34).



Рисунок 2.34 – Юлиус Рихард Петри (Julius Richard Petri, 1852-1921 гг.) и его чашка.

Другой сотрудник Р. Коха – **Д. Тиндаль** (рисунок 2.35) предложил использовать для стерилизации некоторых питательных сред метод многократного нагревания. Такой прием получил название “тиндализация” (дробная стерилизация - 3-5-кратное воздействие температурой ниже  $60^{\circ}\text{C}$  с последующим инкубированием после каждого прогревания в течение суток при  $36^{\circ}\text{C}$  для прорастания спор). Этот метод до сих пор используется для стерилизации растворов, не выдерживающих высокой температуры (например, растворов сахаров).

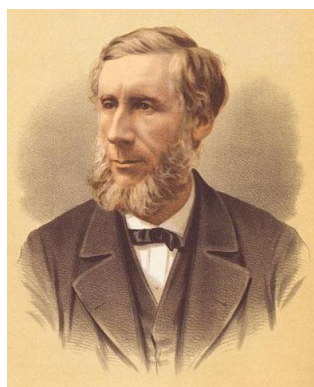


Рисунок 2.35 - Джон Тиндаль (John Tyndall, 1820-1893 гг.).

Английский хирург и ученый **Д. Листер** (рисунок 2.36) в этот период

заложил основы асептики и антисептики. Для профилактики послеоперационных инфекций Д. Листер ввёл жёсткие меры поддержания чистоты в клинике. В качестве дезинфицирующего и антисептического средства он предложил концентрированный раствор карболовой кислоты для обработки инструментов и рук хирурга.



Рисунок 2.36 - Джозеф Листер (Joseph Lister, 1827-1912 гг.).

Таким образом, вторая половина XIX века ознаменовалась подробным изучением микроорганизмов, выявлением особенностей их строения, разработкой средств и методов защиты организма от инфекций, открытием новых возбудителей инфекционных заболеваний.

#### 2.4. Иммунологический период

Иммунологический период развития микробиологии связан в первую очередь с именами французского ученого Луи Пастера, российского биолога Ильи Ильича Мечникова и немецкого врача Пауля Эрлиха. Этих ученых с полным правом можно назвать основоположниками иммунологии, так как Л. Пастер открыл и разработал принципы вакцинации, И.И. Мечников предложил клеточную (фагоцитарную) теорию иммунитета, а П. Эрлих разработал гуморальную теорию иммунитета.

Во второй половине XIX в. ученые начали разрабатывать способы защиты от патогенных микробов, вызывающих инфекционные болезни человека и животных. В частности, английский врач **Э. Дженнер** (рисунок 2.37) разработал способ создания невосприимчивости человека к натуральной оспе путем введения в организм возбудителя коровьей оспы. Он обратил внимание на то, что женщины, ухаживающие за больными коровьей оспой животными, переболели этой инфекцией в легкой форме и в последующем не заболели натуральной оспой. Для защиты людей от натуральной оспы он стал использовать материал, полученный из пораженных тканей сначала коров, а потом и человека.



Рисунок 2.37 - Эдвард Дженнер (Edward Anthony Jenner, 1749-1823 гг.).

Французский ученый **Луи Пастер** первым пришел к заключению, что с помощью прививок можно предупредить многие инфекционные болезни. В память об открытии Дженнера Пастер назвал этот метод вакцинацией (от латинского слова *vassa* – корова), а прививочные препараты - вакцинами.

Большой вклад в развитие иммунологии внес **И.И. Мечников** (рисунок 2.38).



Рисунок 2.38 - Илья Ильич Мечников (1843-1916 гг.).

И.И. Мечников разработал учение о фагоцитах и фагоцитозе. В 1883 г. он установил, что основную функцию защиты организма от инфекций выполняют фагоциты - амебовидные подвижные клетки - “пожиратели” возбудителей заболеваний. Он отметил, что фагоцитоз наблюдается у всех животных и проявляется по отношению ко всем чужеродным веществам (бактериям, органическим и неорганическим частицам и т. д.). Теория фагоцитоза явилась основой разработанной И.И. Мечниковым клеточной теории иммунитета. Л. Пастер на своем портрете, подаренном И.И. Мечникову, написал: “На память знаменитому Мечникову - творцу фагоцитарной теории”. И.И. Мечников изучал также процессы старения и роль нормальной микрофлоры организма в жизни человека. Поэтому его по праву считают родоначальником геронтологии и учения об эубиозе организма.

Оппонентом И.И. Мечникова был немецкий ученый **П. Эрлих**, предложивший гуморальную теорию иммунитета (рисунок 2.39).



Рисунок 2.39 - Пауль Эрлих (Paul Ehrlich, 1854-1915 гг.).

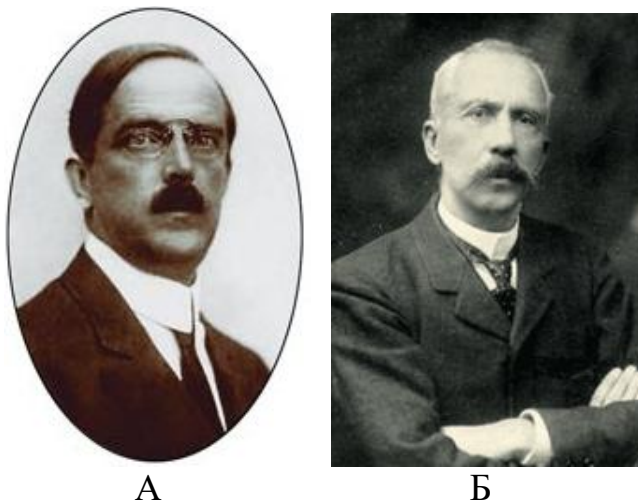
П. Эрлих считал, что в ответ на внедрение в организм микробов или их токсинов вырабатываются специфические защитные вещества – антитела. В связи с этим он придавал антителам (гуморальным факторам) первостепенное значение в развитии иммунитета. Однако дальнейшее развитие иммунологии показало единство клеточных и гуморальных факторов иммунитета. За разработку теории иммунитета П. Эрлих и И.И. Мечников в 1908 г. были удостоены Нобелевской премии.

В 1898 г. бельгийский иммунолог и бактериолог **Ж. Борде** (рисунок 2.40) показал, что антитела образуются не только к бактериям или их токсинам, но и к любому чужеродному белку, попавшему в организм. Так появилось понятие “**антиген**” - чужеродное вещество, в ответ на введение которого в организме вырабатываются антитела.



Рисунок 2.40 - Жюль Борде (Jules Jean-Baptiste Vincent Bordet, 1870-1961 гг.).

В 1904 г. австрийский педиатр **К. Пирке** и французский физиолог **Ш.Р. Рише** (рисунок 2.41) открыли феномен анафилаксии – иммунопатологическую реакцию (иногда с летальным исходом) в ответ на введение в организм чужеродного белка (гиперчувствительность немедленного типа). Ш. Рише за открытие феномена анафилаксии в 1913 г. был удостоен Нобелевской премии.



А

Б

Рисунок 2.41 – А - Клеменс фон Пирке (Clemens Peter Freiherr von Pirquet, 1874-1929 гг.), Б - Шарль Роббер Рише (Charles Robert Richet, 1850-1935 гг.).

Таким образом, в начале XX в. возникла новая наука - иммунология, которая разделилась на два направления:

- инфекционная иммунология;
- неинфекционная иммунология.

До середины XX века в основном развивалась инфекционная иммунология. В этот период были созданы вакцины и лечебные сыворотки против наиболее распространенных инфекций (чумы, туберкулеза, брюшного тифа, дифтерии и т. д.). Однако теоретическая иммунология оставались в зачаточном состоянии. Новый этап развития иммунологии начался с конца 40-х годов XX в., когда австралийский ученый **Ф.М. Бёрнет** (рисунок 2.42) объединил инфекционную и неинфекционную иммунологию в так называемую “**новую иммунологию**”.



Рисунок 2.42 - Фрэнк Макфарлейн Бёрнет (Frank Macfarlane Burnet, 1899-1985 гг.).

В 1949 г. Ф.М. Бёрнет предложил **клонально-селекционную теорию иммунитета**, согласно которой в эмбриональном периоде лимфоциты проходят отбор (селекцию). Те из них, которые проявляют агрессию по отношению к “своим” антигенам, уничтожаются. Оставшиеся лимфоциты реагируют только с чужеродными антигенами. В 1950 г. Ф.М. Бёрнет открыл феномен

иммунологической памяти. За работы в области иммунологии в 1960 г. он получил звание лауреата Нобелевской премии.

В 1953 г. английский биолог **П. Медавар** (рисунок 2.43) и чешский биолог **М. Гашек** экспериментально подтвердили теорию Ф.М. Бёрнета о формировании феномена толерантности в эмбриональном периоде. Они установили, что животные, которым в эмбриональном периоде вводили чужеродные антигены, после рождения воспринимали их как “свои”.

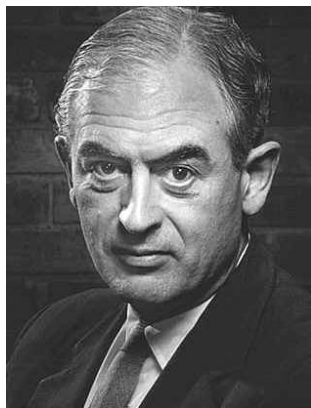


Рисунок 2.43 - Питер Медавар (Peter Brian Medawar, 1915-1987 гг.).

Во второй половине XX века было установлено, что клетки иммунной системы способны “общаться” между собой с помощью специализированных медиаторов - цитокинов. Сигналы цитокинов воспринимают только те клетки, на поверхности которых имеются специфические рецепторы. В настоящее время развитие иммунологии продолжается.

## 2.5. Молекулярно-генетический период

Со второй половины XX века начался молекулярно-генетический период развития микробиологии. В это время американский биохимик **Д. Уотсон** и британский биофизик **Ф. Крик** установили структуру и разработали трехмерную модель молекулы ДНК (рисунок 2.44).

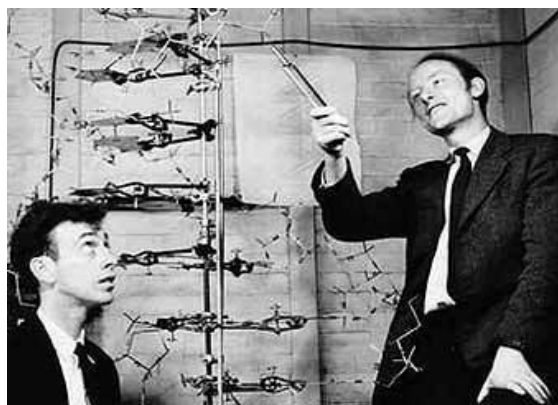


Рисунок 2.44 - Джеймс Уотсон (James Dewey Watson, 1928 г.) и Фрэнсис Крик (Francis Crick, 1916-2004 гг.).

В 1962 г. за разработку структуры ДНК они получили Нобелевскую премию. С этого времени стали широко развиваться такие дисциплины как молекулярная биология и биотехнология. Благодаря использованию новых методов было изучено строение генома многих бактерий и вирусов, структура антигенов и антител, факторов патогенности микроорганизмов. Расшифровка генов бактерий и вирусов позволила искусственно синтезировать рекомбинантные молекулы ДНК и получать штаммы бактерий, обладающие новыми свойствами.

Американский биохимик **П. Берг** (рисунок 2.45) в 1972 г. получил *in vitro* рекомбинантную ДНК, состоящую из фрагментов нуклеиновых кислот вирусов и бактерий.



Рисунок 2.45 - Пол Наим Берг (Paul Naim Berg, 1926 г.)

Последовавшая вслед за этим расшифровка генома кишечной палочки позволила искусственно конструировать гены и осуществлять их перенос из одних клеток в другие. За фундаментальные исследования нуклеиновых кислот Полу Бергу, Уолтеру Гилберту и Фредерику Сенгеру в 1980 г. была присуждена Нобелевская премия. К настоящему времени методы генной инженерии используют в производстве широкого спектра биологически активных веществ (БАВ), применяемых в качестве диагностических, лечебных и профилактических средств.

## **2.6. Вклад отечественных ученых в развитие микробиологии, вирусологии и иммунологии**

Отечественные ученые внесли существенный вклад в развитие микробиологии, вирусологии и иммунологии. И.И. Мечников, Н.Ф. Гамалея, А.М. Безредка, Г.Н. Габричевский, Л.А. Тарасевич и многие другие отечественные ученые прошли школу Л. Пастера. В XIX и начале XX вв. они много сделали для выяснения этиологической роли микробов в возникновении инфекционных болезней, изучения проблем невосприимчивости к инфекциям, создания иммунобиологических препаратов, снижения заболеваемости и ликвидации инфекционных болезней.

Русский врач и эпидемиолог **Д.С. Самойлович** много внимания уделял организации борьбы с эпидемиями чумы. Для доказательства опасности



окружающих предметов он неоднократно надевал и носил одежду больных чумой людей. Умер во время эпидемии чумы в Таганроге.

Известный ботаник **Л.С. Ценковский** (рисунок 2.46) в 1883 г. разработал отечественные вакцины против сибирской язвы, которые длительное время использовались для вакцинации животных. В середине 50-х годов XIX века он начал читать лекции о бактериях в Петербургском университете. В 1856 г. опубликовал классический труд “О низших водорослях и инфузориях”.

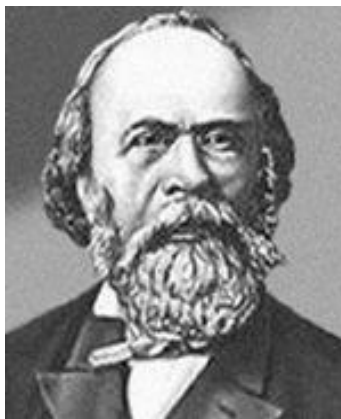


Рисунок 2.46 - Лев Семенович Ценковский (1822-1887 гг.).

Профессор ботаники Казанского университета **Николай Васильевич Сорокин** (1846-1909 гг.) является основателем медицинской микологии. В 1882-1886 гг. он опубликовал четырёхтомное издание “Растительные паразиты человека и животных как причина заразных болезней”, включавшее описание всех известных в то время бактерий. Он описал многие виды грибов – возбудителей инфекционных заболеваний (*Candida*, *Achorion*, *Trichophyton*, *Microsporium*, *Aspergillus* и др.).

Врач-терапевт **Дмитрий Леонидович Романовский** (1861-1921 гг.) описал строение малярийного плазмодия, разработал основы химиотерапии и принципы выбора антимикробных препаратов при лечении малярии, разработал метод окраски мазков крови с использованием водных растворов эозина и метиленового синего.

Вклад **Ильи Ильича Мечникова** в развитие микробиологии поистине огромен. Он является одним из основоположников иммунологии. Его заслуга отмечена высшей наградой - Нобелевской премией за 1906 г. за работы в области иммунологии.

Ученик И.И. Мечникова патологоанатом, эпидемиолог и бактериолог **В.К. Высокович** (рисунок 2.47) доказал, что попавшие в кровь бактерии депонируются в селезёнке, печени и костном мозге. Его основные работы посвящены изучению патологической анатомии сифилиса и туберкулёза, патогенеза, иммунитета и эпидемиологии ряда инфекционных болезней. Совместно с другими учеными он заложил основы учения о ретикуло-эндотелиальной системе, экспериментально доказал пригодность убитых бактерий для вакцинации против сибирской язвы и чумы, тождество туберкулёза и золотухи. В.К. Высокович являлся руководителем экспедиций по борьбе с эпидемиями холеры и чумы. Впервые в России он произвел вакцину против брюшного тифа.



Рисунок 2.47 - Владимир Константинович Высокович (1854-1912 гг.).

**С.Н. Виноградский** (рисунок 2.48) является основателем почвенной микробиологии. Он выделил и изучил азотфиксирующие бактерии, установил роль микроорганизмов в круговороте азота, углерода, фосфора, серы и железа.



Рисунок 2.48 – Сергей Николаевич Виноградский (1856-1953 гг.).

**Н.Ф. Гамалея** (рисунок 2.49) изучал вопросы эпидемиологии и профилактики бешенства, холеры, чумы, сыпного тифа. Им было обосновано значение дезинсекции для ликвидации сыпного и возвратного тифов. Н.Ф. Гамалея в 1886 г. организовал в Одессе первую в России бактериологическую станцию.



Рисунок 2.49 - Николай Федорович Гамалея (1859-1949 гг.).

**В.Л. Омелянский** (рисунок 2.50) получил широкую известность своими трудами по почвенной микробиологии. Он написал первый учебник по микробиологии на русском языке “Основы микробиологии” и “Практическое руководство по микробиологии”.



Рисунок 2.50 - Василий Леонидович Омелянский (1867-1928 гг.).

Большой вклад в развитие медицинской микробиологии внес **Д.К. Заболотный** (рисунок 2.51). Он изучал вопросы микробиологии чумы и холеры, иммунизации против холеры, распространение чумы в Индии и Китае, работал в Институте Пастера в Париже. Д.К. Заболотный организовал первую в России кафедру микробиологии при Петербургском женском медицинском институте (1898 г.) и первую в мире кафедру эпидемиологии в Одессе (1920 г.). В 1928 г. он создал в Киеве Украинский институт эпидемиологии и микробиологии, носящий в настоящее время его имя.



Рисунок 2.51 - Даниил Кириллович Заболотный (1866-1929 гг.).

**Л.А. Тарасевич** (рисунок 2.52) выдающийся микробиолог, эпидемиолог и иммунолог, ученик И.И. Мечникова. Занимался вопросами эпидемиологии и профилактики туберкулеза, холеры, брюшного тифа, малярии и других инфекций. Он является основателем первой отечественной станции по контролю бактериальных препаратов (в настоящее время – ГИСК им. Л.А. Тарасевича).



Рисунок 2.52 - Лев Александрович Тарасевич (1868-1927 гг.).

Отечественный паразитолог **Е.И. Марциновский** (рисунок 2.53) ввел в преподавание микробиологии курс протозоологии. Он изучал лейшманиозы, спирохетозы, малярию. По инициативе Е.И. Марциновского был организован Тропический институт (в настоящее время - Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского).



Рисунок 2.53 - Евгений Иванович Марциновский (1874-1934 гг.).

Значительный вклад в изучение физиологии микроорганизмов внес русский биохимик и микробиолог **Сергей Павлович Костычев** (1877-1931 гг.). Он занимался вопросами спиртового брожения, фиксацией атмосферного азота азотобактером, характером изменений фотосинтеза в течение суток. С.П. Костычев организовывал первое микробиологическое производство лимонной кислоты из сахара с помощью гриба *Aspergillus niger*.

Микробиолог и эпидемиолог **Г.Н. Габричевский** (рисунок 2.54) известен работами в области микробиологии дифтерии, возвратного тифа, скарлатины. Для лечения скарлатины и дифтерии он ввел в клиническую практику серотерапию. Он является основателем Московского бактериологического института (в настоящее время - МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского).



Рисунок 2.54 - Георгий Норбертович Габричевский (1860-1907 гг.).

**Владимир Николаевич Шапошников** (1884-1968 гг.) является основателем технической микробиологии. В 1930 г. он принимал непосредственное участие в создании в нашей стране завода по микробиологическому производству ацетона и бутилового спирта. В.Н. Шапошников написал первый в Советском Союзе учебник “Техническая микробиология”.

**Яков Яковлевич Никитинский** (1878-1941 гг.) – специалист в области санитарной гидробиологии, пищевой и технической микробиологии. Он занимался изучением микрофлоры источников водоснабжения, вопросами хранения и консервирования пищевых продуктов. Его работы послужили основой для создания консервного производства и холодильного хранения пищевых скоропортящихся продуктов.

Основоположниками микробиологии молока и молочных продуктов являются **С.А. Королев** (1876-1932) и **А.Ф. Войткевич** (1875-1950).

Во второй половине XX в. отечественные учёные добились значительных успехов в изучении возбудителей вирусных инфекций. М.А. Морозов и Е.И. Туревич разработали оригинальные методы окраски вирусных телец включений. Исследования Е.Н. Павловского, Л.А. Зильбера, А.К. Шубладзе, В.Д. Соловьёва, М.П. Чумакова явились основополагающими в учении о природно-очаговых вирусных инфекциях. Весомый вклад в развитие микробиологии внесли П.В. Циклинская, Г.Н. Минх, А.А. Смородинцев, В.Д. Тимаков, Н.А. Красильников, Е.Н. Мишустин, П.Н. Кашкин, З.В. Ермольева, В.М. Жданов, С.В. Прозоровский и многие другие ученые. Отечественными учеными созданы уникальные иммунобиологические препараты, которые широко применяются во многих странах: живые вакцины против сибирской язвы (А.Л. Тамарин, Н.Н. Гинзбург), туляремии (Б.Я. Эльберт, Н.А. Гайский), полиомиелита (М.П. Чумаков, А.А. Смородинцев), бруцеллеза (П. А. Вершилова); анатоксины против столбняка, раневых инфекций и ботулизма (А.А. Воробьев, Г. В. Выгодчиков).

## 2.7. Научно-исследовательские учреждения микробиологического профиля России

В Российской Федерации имеется широкая сеть научно-исследовательских

учреждений микробиологического профиля, входящих в состав Российской академии наук, Российской академии медицинских наук, Министерства здравоохранения и социального развития, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и других министерств и ведомств.

**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина** Пущинского научного центра РАН (ИБФМ РАН) создан в 1965 г. как один из Институтов Центра биологических исследований АН СССР в Пущино (рисунок 2.55).



Рисунок 2.55 - Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина.

В ИБФМ РАН проводятся исследования по изучению микробного разнообразия, молекулярных механизмов функционирования генетических систем микроорганизмов, взаимодействия микробов с окружающей средой. Значительное место в исследованиях ИБФМ РАН занимают вопросы использования микроорганизмов в биотехнологии. При Институте функционируют учебно-образовательный центр об окружающей среде и биотехнологии, Центр биосферных исследований, научно-образовательный центр прикладной экологии, Экобиотехнопарк.

**Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского** РАН является ведущим научным учреждением страны в области общей микробиологии и вирусологии. Основные решаемые вопросы – систематика, экология, генетика и биотехнология микроорганизмов и вирусов. Среди направлений исследований – микробиологические методы извлечения металлов из бедных руд, повышение нефтеотдачи пластов, очистка твердых бытовых и промышленных отходов, снижение содержания метана в угольных шахтах, наработка грибных лекарственных препаратов.

**Федеральное государственной бюджетное учреждение “Государственный научный центр “Институт иммунологии”** Федерального медико-биологического агентства России является ведущим научно-медицинским учреждением в области иммунологии и аллергологии. В Институте осуществляется диагностика и лечение всех видов заболеваний, связанных с нарушениями в системе иммунитета: аллергического ринита, бронхиальной астмы, крапивницы, атопического и контактного дерматита, пищевой и лекарственной аллергии, первичных и вторичных иммунодефицитов, наследственного ангионевротического отека, герпесвирусных, папилломавирусных инфекций, диагностически сложных иммуноопосредованных заболеваний и их вакцинопрофилактика.

**Государственный научный центр Российской Федерации ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов** (“ГосНИИГенетика”) основан в 1968 г. на базе сектора генетики и селекции микроорганизмов Радиобиологического отдела Института атомной энергии, созданного в 1958 г. Организатором и первым директором института был профессор С.И. Алиханян. Этот институт является ведущим исследовательским центром России в области биотехнологии, генетики и геной инженерии промышленных микроорганизмов (рисунок 2.56).



Рисунок 2.56 - Государственный научно-исследовательский институт промышленных микроорганизмов.

В этом учреждении разрабатываются биотехнологические процессы получения биологически активных веществ (аминокислот, ферментов, витаминов, антибиотиков, рекомбинантных белков, биокатализаторов и др.).

**Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН** занимается проблемами вирусных инфекций. Основан в 1955 г. М. П. Чумаковым. На базе института действует предприятие по производству вакцин.

**Государственное учреждение Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН** является одним из крупнейших в мире научно-исследовательских учреждений в области изучения экологии, эпидемиологии и молекулярной биологии вирусов человека и животных. На базе Института функционирует ряд Центров ВОЗ, Всероссийский Центр экологии вирусов, Государственная коллекция вирусов РФ, несколько диагностических Центров, клиническое отделение и отдел экспериментального производства по выпуску и контролю качества тест-систем и противовирусных вакцин.

**Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН** основан в 1919 г. (рисунок 2.57).



Рисунок 2.57 - Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Институт проводит исследования, направленные на изучение клеточных и молекулярных механизмов иммунитета, генетики и молекулярной биологии вирусов, исследование молекулярно-биологических основ патогенности и изменчивости вирусов и бактерий, механизмов персистенции и аттенуации возбудителей, разработку средств и методов профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний, создание нанотехнологий и использование наноматериалов при разработке новых иммунобиологических препаратов.

**Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе** РАМН создан в 1953 г. на базе Лаборатории антибиотиков АМН СССР (рисунок 2.58). Институт назван в честь профессора Георгия Францевича Гаузе, создателя лаборатории антибиотиков, а в 1960-1986 гг. - директора института. В 1942 году Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражникова открыли первый в СССР оригинальный антибиотик грамицидин С (советский), который применялся для лечения и профилактики раневых инфекций в период Великой Отечественной войны и по настоящее время производится российской медицинской промышленностью. В институте были получены и внедрены в медицинскую практику такие антибиотики как колимицин (неомицин), мономицин, ристомицин, канамицин, линкомицин, гелиомицин, а также противоопухолевые антибиотики оливомицин, брунеомицин (стрептонигрин), рубомицин (даунорубицин), карминомицин, блеомицетин (блеомицин А-5), и полусинтетический антибиотик доксорубицин.



Рисунок 2.58 - НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе.

Основной задачей Института является поиск и изучение новых антибактериальных, противоопухолевых и противовирусных препаратов, включая ВИЧ-ингибиторы, иммуномодуляторы, ингибиторы синтеза холестерина и другие биологически активные соединения. В Институте проводятся генетические и селекционные исследования по созданию высокопродуктивных штаммов микроорганизмов – продуцентов антибиотиков, изучаются механизмы действия новых антибиотиков, осуществляются доклинические и клинические исследования антибиотиков и других лекарственных средств.

**Государственное учреждение “Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения**



**Российской Федерации” им. Г.Н. Габричевского (МНИИЭМ)** организован на базе Бактериологического Императорского Московского Университета, созданного в 1895 г. Г.Н. Габричевским. В 1979 г. институту было присвоено имя Г.Н. Габричевского (рисунок 2.59).



Рисунок 2.59 - Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского.

В институте проводятся исследования по разработке методов профилактики, диагностики и лечения острых детских капельных и кишечных инфекций, осуществляются научно-исследовательские работы, направленные на совершенствование дизентерийных, менингококковых, коревых, дифтерийных и других вакцин. МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского является пионером по экспериментально-теоретическому обоснованию и разработке биопрепаратов для коррекции микрофлоры человека при дисбактериозах различного генеза. На базе института функционируют Федеральный консультационно-методический центр по дифтерии и коклюшу, Республиканский центр по бифидумбактериям, Государственная коллекция бактерий – представителей нормальной микрофлоры человека.

**Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи РАМН** проводит фундаментальные исследования по эпидемиологии инфекционных заболеваний и внутрибольничных инфекций, природноочаговым болезням человека, медицинской микробиологии, генетике и молекулярной биологии бактерий, теоретической и прикладной инфекционной иммунологии. Особое место занимают исследования закономерностей распространения и эпидемического проявления инфекционных заболеваний, структуры и динамики инфекционной патологии населения, возникновения, функционирования и проявления природных очагов болезни, генетики, молекулярной биологии, экологии патогенных микроорганизмов. На базе института функционируют Центры Минздрава РФ по риккетсиозам, лептоспирозам, бруцеллезу, туляремии, легионеллезу, микоплазмозам, хламидиозам, клостридиозам, боррелиозам. На базе института создана и функционирует кафедра инфектологии Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова.

**Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт гриппа РАМН** (г. Санкт-Петербург) образовано в 1967 г. (рисунок 2.60).



Рисунок 2.60 - ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России.

Научно-исследовательская деятельность Института включает решение фундаментальных и прикладных задач в области вирусологии, эпидемиологии и инфекционной патологии. Основные направления научно-исследовательской деятельности Института: эпидемиологический и этиологический мониторинг гриппа и других ОРЗ на территории России, молекулярно-генетический анализ вирусов гриппа, циркулирующих на территории России, выявление детерминант патогенности вирусов, изучение молекулярных механизмов патогенеза вирусных инфекций, создание препаратов для диагностики вирусных инфекций, разработка эффективных средств защиты населения от вирусных инфекций.

**Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Л. Пастера (НИИЭМ им. Пастера, г. Санкт-Петербург)** образован в апреле 1923 г. Он занимается исследованиями по этиологии, эпидемиологии, диагностике и профилактике актуальных бактериальных и вирусных инфекций (вирусных гепатитов, ВИЧ, туберкулеза, хеликобактерной инфекции, краснухи, дифтерии, эпидемического паротита, иерсиниозов и других инфекций).

В Институте проводятся работы по созданию вакцин против краснухи, вирусного гепатита В, кори, паротита, тест-систем для диагностики и мониторинга инфекционных болезней. Активно ведутся работы по клиническим испытаниям новых средств профилактики и лечения инфекционных болезней. Проводится большая работа по Программе ликвидации полиомиелита в России в рамках Глобальной программы ВОЗ.

**Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (г. Пермь)** проводит фундаментальные исследования по оценке роли микроорганизмов в биосферных процессах, выявлению молекулярно-генетических механизмов адаптации микроорганизмов к стрессовым факторам, изучению природных и модифицированных микроорганизмов, перспективных для получения биологически активных веществ и защиты окружающей среды от загрязнений. В Институте изучаются также механизмы функционирования иммунной системы при различных воздействиях и состояниях макроорганизма, разрабатываются новые методы иммунодиагностики и иммунокоррекции.

**ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАН (г. Владивосток).** Основные научные направления Института:

- экология возбудителей сапрозоонозов и механизмы их изменчивости в различных условиях обитания;
- молекулярные основы патогенности бактерий;

- молекулярная эпидемиология бактериальных инфекций;
- молекулярно-генетическая характеристика возбудителей вирусных природно-очаговых инфекций;
- механизмы антиинфекционной резистентности организма и ее иммунокоррекция стимуляторами различной природы.

**Федеральное государственное бюджетное учреждение (ФГБУ) “Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича”** Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ГИСК им. Л.А. Тарасевича) создан по инициативе Л.А. Тарасевича в 1918 г. на базе станции контроля вакцин, существовавшей с 1915 г. при кафедре микробиологии Московских высших женских курсов. В настоящее время ГИСК им. Л.А. Тарасевича выполняет функции Национального органа контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). В институте проводятся исследования по изучению механизмов развития иммунного ответа при вакцинации и по оценке качества биологических препаратов. Институт не только осуществляет контроль готовой продукции, но и следит за соблюдением надлежащих условий производства, гарантирующих выпуск качественных медицинских иммунобиологических препаратов. ГИСК им. Л.А. Тарасевича проводит сертификацию и экспертизу качества, эффективности и безопасности МИБП (вакцин, иммуноглобулинов, бактериофагов, препаратов нормофлоры, аллергенов, цитокинов и др.). ГИСК им. Л.А. Тарасевича взаимодействует с Всемирной организацией здравоохранения и национальными органами контроля других стран по вопросам стандартизации, экспертизы качества и сертификации МИБП. Институт участвует в работе Комитета ВОЗ по стандартизации МИБП.

**ГУ Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии** Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации проводит исследования по вопросам эпидемиологии и микробиологии актуальных бактериальных, вирусных и протозойных инфекций.

**Федеральное государственное учреждение науки “Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии” Роспотребнадзора (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)** создан в 1963 г. и является головным научным учреждением России в области разработки научных проблем эпидемиологии и инфекционной патологии. Институт является основным разработчиком в стране теоретических основ и концепций в области эпидемиологии, социально-экономической значимости инфекционных болезней, патогенеза, диагностики, терапии и профилактики инфекционных болезней. На базе института функционируют Федеральный научно-методический центр Минздравсоцразвития РФ по профилактике и борьбе со СПИД, Российские центры по внутрибольничным инфекциям, менингококковой инфекции и гнойным менингитам, шигеллезам, сальмонеллезам, Центр ВОЗ по зоонозам.

**Федеральное государственное учреждение науки “Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии” Роспотребнадзора** создано в 1974 г. (Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии) и размещается в п. Оболенск Московской области. Предназначение учреждения – проведение фундаментальных и прикладных исследований в области

эпидемиологии, бактериологии и биотехнологии, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

**Федеральное государственное учреждение науки “Научно-исследовательский институт дезинфектологии”** Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Институт занимается разработкой медицинских основ дезинфекции, стерилизации, дезинсекции, дератизации; изысканием новых гигиенически и экологически безопасных антимикробных, инсектицидных, акарицидных и репеллентных агентов; разработкой рецептур новых дезинфекционных средств и методических указаний по их применению; изучением эффективности и безопасности дезсредств, их регистрацией и сертификацией.

**Федеральное государственное учреждение науки “Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”** Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ГНЦ ВБ “Вектор”) основано в 1974 г. и расположено в п. Кольцово Новосибирской области. В состав Центра входит Институт медицинской биотехнологии, расположенный в г. Бердске. Фундаментальные исследования Центра направлены на разработку эффективных средств и методов профилактики, лечения и диагностики особо опасных и социально значимых инфекционных заболеваний, создание и совершенствование биотехнологий производства защитных препаратов, прогнозирование и анализ сценариев развития эпидемий, вызываемых особо опасными и социально значимыми инфекционными агентами.

**ФГУН Омский Научно-исследовательский институт природноочаговых инфекций** Роспотребнадзора осуществляет фундаментальные и прикладные научные исследования по проблеме природноочаговых инфекций и инвазий, изучение особенностей структуры природных и антропоургических очагов вирусных, бактериальных и риккетсиозных зоонозных инфекций, инвазий, выявление тенденций изменений паразитарных систем. В Институте проводится мониторинг и эпидемиологическое районирование природных очагов болезней, изучаются молекулярно-генетические особенности возбудителей природноочаговых заболеваний, разрабатываются и совершенствуются методы диагностики и профилактики природноочаговых болезней. На базе Института функционирует Сибирский Федеральный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД.

**Федеральное государственное учреждение здравоохранения (ФГУЗ) “Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт”** Роспотребнадзора основан в 1970 г. (рисунок 2.61). С момента создания Институт занимается решением проблем противэпидемической защиты населения от возбудителей особо опасных инфекций (чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, сапа, мелиоидоза, глубоких микозов). Особое значение в работе Института занимает научное обеспечение санитарно-эпидемиологического надзора за особо опасными и другими природно-очаговыми инфекционными болезнями в районах Нижнего Поволжья. Институт осуществляет фундаментальные и прикладные научные исследования в области эпидемиологии, биотехнологии и микробиологии опасных инфекций, разрабатывает, совершенствует и реализует научно обоснованные средства и методы профилактики и борьбы с этими заболеваниями. ВролгоградНИПЧИ является одним из базовых учреждений РФ по

проблеме “Биологическая безопасность и противодействие биотерроризму”. В состав Института входит Испытательная лаборатория по оценке эффективности дезинфицирующих средств.



Рисунок 2.61 - Волгоградский НИПЧИ.

**ФГУЗ “Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока”** Роспотребнадзора основан в 1934 г. как научно-оперативный орган по борьбе с чумой. В настоящее время Институт является многопрофильным учреждением, входящим в систему обеспечения эпидемического благополучия по особо опасным бактериальным и вирусным инфекциям (чуме, холере, бруцеллезу, туляремии, сибирской язве, арбовирусным инфекциям) в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах. Институт разрабатывает приоритетные направления по проблемам санитарной охраны территории, природной очаговости, эпидемиологии, микробиологии, диагностики, генетики, иммунологии, профилактики и лечения конвенционных, особо опасных инфекций и других природноочаговых болезней. В Институте производятся бактериальные препараты, антисыворотки, питательные среды.

**ФГУЗ “Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”** Роспотребнадзора (г. Саратов) создан в 1918 г. на базе кафедры микробиологии Саратовского университета. В Институте проводятся исследования по эпидемиологии, эпизоотологии, микробиологии, иммунологии, генетике и биотехнологии особо опасных инфекций. Особое значение в Институте отводится исследованиям фенотипической и генотипической изменчивости возбудителей особо опасных инфекций, разработке единой системы эпидемиологического надзора за чумой, холерой и другими особо опасными инфекциями, изучению механизмов природной очаговости, особенностей экологии возбудителей опасных инфекционных заболеваний. Институт участвует в работе Единой государственной системы предупреждения и ликвидации чрезвычайных ситуаций, связанных с проявлением особо опасных инфекционных болезней и биотерроризма. На производственной базе Института производится выпуск медицинских иммунобиологических препаратов и питательных сред.

**ФГУЗ “Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт”** Роспотребнадзора основан в 1934 г. для ликвидации очагов чумы на территории Северо-Западного Прикаспия. В настоящее время в Институте проводятся широкие исследования по микробиологии, диагностике, специфической и неспецифической профилактике опасных инфекционных заболеваний (чумы,

туляремии, бруцеллеза, легионеллеза, иерсиниоза, лептоспироза и др.). Большое значение в Институте отводится разработке новых питательных сред для диагностики особо опасных инфекций. На базе Института функционирует Центр молекулярной диагностики бактериальных и вирусных опасных инфекций, в котором разрабатываются препараты для генной диагностики инфекционных болезней. Научные исследования Института направлены на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации по особо опасным и другим природно-очаговым инфекциям.

**ФГУЗ “Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт”** Роспотребнадзора основан в 1952 г. на базе Ставропольской противочумной станции. Институт осуществляет научное обеспечение эпидемиологического надзора за опасными бактериальными и вирусными инфекциями, проводит разработку, совершенствование и внедрение в практику научно-обоснованных средств и методов профилактики, диагностики и борьбы с этими болезнями. Институт является составной частью единой федеральной централизованной системы противочумных учреждений, осуществляющих санитарно-эпидемиологический надзор за чумой, холерой, сибирской язвой, туляремией, бруцеллезом. На базе Института функционирует Центр индикации возбудителей и диагностики опасных инфекционных заболеваний для субъектов Южного федерального округа. Научно-производственный потенциал Института позволяет выпускать медицинские иммунобиологические препараты, в том числе магнитоиммуносорбенты и липосомальные формы антибиотиков.

**ФГУН Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций** Роспотребнадзора (рисунок 2.62) занимается проблемами гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций, неполиомиелитных энтеровирусных нейроинфекций у детей, клещевого энцефалита, ВИЧ/СПИДа и СПИД-ассоциированных герпесвирусных заболеваний, госпитальных инфекций.

Научно-техническая деятельность Института включает решение задач, направленных на снижение инфекционной заболеваемости и обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в отношении вирусных инфекций на территории Российской Федерации; разработку и совершенствование вирусных диагностических и лечебно-профилактических препаратов, организацию их выпуска; разработку и внедрение современных методов диагностики, лечения и профилактики вирусных заболеваний.



Рисунок 2.62 – Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций.

**Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии (УНИИФ)** - ведущий научно-практический и организационно-методический центр по направлениям противотуберкулёзной работы в Уральском регионе (рисунок 2.63).



Рисунок 2.63 - Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии.

УНИИФ создан на базе Городского показательного противотуберкулёзного диспансера в марте 1931 г. В 1957 г. Институт был передан в Федеральное подчинение. Направлениями научной деятельности УНИИФ являются разработка и совершенствование ускоренных методов и систем диагностики туберкулёза, разработка программ по повышению резистентности к заболеванию туберкулёзом детского населения, разработка и апробация новых методов лечения туберкулёза, разработка и апробация комплексных программ по медицинской и социальной реабилитации больных туберкулезом.

**Федеральное государственное учреждение “Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии”** Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи образовано в 1931 г. (рисунок 2.64).

НИИ дерматовенерологии и иммунопатологии осуществляет разработку и совершенствование технологий диагностики, профилактики и лечения аллергических, пролиферативных дерматозов, злокачественных новообразований кожи, распространенных микозов, а также инфекционных заболеваний, передаваемых половым путем. Институт осуществляет комплексную диагностику и лечение инфекций половой сферы, иммунных и гормональных нарушений, грибковых заболеваний, алергодерматозов детей и взрослых, герпесвирусных инфекций, псориаза и других хронических дерматозов.



Рисунок 2.64 - ФГУ Уральский НИИ дерматовенерологии и иммунопатологии.

**ФГУН Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии** Роспотребнадзора проводит фундаментальные и прикладные научные исследования и работы в области эпидемиологии, микробиологии и иммунологии инфекционных и паразитарных болезней; осуществляет научное обоснование, разработку и совершенствование системы санитарно-эпидемиологического надзора при паразитарных и инфекционных заболеваниях; разрабатывает методы диагностики, лечения и профилактики паразитарных и инфекционных заболеваний.

**Федеральное государственное учреждение науки “Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии”** Роспотребнадзора – старейшее научное учреждение, основанное в 1925 г. Направления деятельности Института: разработка средств, методов и системы противоэпидемических мероприятий, направленных на профилактику и борьбу с природно-очаговыми инфекциями и инвазиями, вирусными гепатитами, СПИД-инфекцией, кишечными инфекциями бактериальной природы, актуальными для дальневосточного региона. В Институте проводятся исследования по клещевому энцефалиту, гельминтозам, малярии, сибирской язве, геморрагической лихорадке с почечным синдромом.

## 2.8. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Какие периоды выделяют в истории микробиологии?
2. Дайте характеристику эвристическому периоду микробиологии.
3. Расскажите о развитии микробиологии в морфологический период.
4. Какими достижениями характеризуется физиологический период развития микробиологии?
5. Что представляют собой постулаты Коха?
6. Охарактеризуйте иммунологический период развития микробиологии.
7. Чем ознаменован молекулярно-генетический период развития микробиологии?
8. Кто из отечественных ученых внес вклад в развитие микробиологии?
9. Приведите примеры научно-исследовательских учреждений микробиологического профиля России.

## 2.9. Тренировочные тесты

1. В развитии микробиологии выделяют периоды:
  - + эвристический
  - + морфологический
  - биологических
  - физико-химический
  - + молекулярно-генетический
2. В развитии микробиологии выделяют периоды:



- биологический
- химический
- + физиологический
- + иммунологический
- + молекулярно-генетический

3. Самостоятельными разделами микробиологии являются:

- + бактериология
- + микология
- + вирусология
- зоология
- ботаника

4. Эвристический период становления микробиологии связан с именами:

- + Гиппократ
- А. Левенгука
- А. Флеминга
- + Д. Фракасторо
- И.И. Мечникова

5. Первое увеличивающее оптическое устройство изобрел:

- Гиппократ
- + Г. Галилей
- А. Левенгук
- Д. Фракасторо
- Л. Пастер

6. Первый микроскоп, пригодный для обнаружения крупных микробов, изобрел:

- Д. Фракасторо
- + Х. Янсен
- Гиппократ
- Аристотель
- Л. Пастер

7. Кто впервые опубликовал изображения микробов, наблюдаемые с помощью микроскопа?

- Л. Пастер
- Р. Кох
- + А. Левенгук
- Гиппократ
- Г. Галилей

8. Физиологический период развития микробиологии связан с именами:

- П. Эрлиха
- А. Левенгука
- + Р. Коха

- И.И. Мечникова
- + Л. Пастера

9. Явление анаэробнозот открыл:

- Р. Кох
- + Л. Пастер
- А. Левенгук
- П. Эрлих
- А. Флеминг

10. Первые прививки против натуральной оспы осуществил:

- Л. Пастер
- Р. Кох
- + Э. Дженнер
- П. Эрлих
- Д.И. Ивановский

11. Метод аттенуации патогенных микробов предложил:

- И.И. Мечников
- А. Левенгук
- + Л. Пастер
- Э. Дженнер
- Р. Кох

12. Иммунологический период становления микробиологии связан с именами:

- + П. Эрлиха
- А. Левенгука
- Р. Коха
- + И.И. Мечникова
- Л. Пастера

13. Основателем вирусологии является:

- И.И. Мечников
- П. Эрлих
- Л. Пастер
- Р. Кох
- + Д.И. Ивановский

14. Начало морфологического периода развития микробиологии связано:

- с выдвижением гипотезы о миазмах
- + с открытием микроорганизмов
- с внедрением плотных питательных сред
- с получением пенициллина
- с расшифровкой структуры ДНК

15. К физиологическому периоду развития микробиологии относятся:

- + открытие возбудителя холеры человека
- + создание основ вакцинного дела
- открытие микроорганизмов
- + внедрение в практику микробиологии плотных питательных сред
- расшифровка структуры ДНК

#### 16. Роберт Кох:

- + сформулировал триаду критериев, по которым можно установить связь инфекционного заболевания с определенным микроорганизмом
- разработал и получил вакцину против бешенства
- сформулировал понятия об активном и пассивном иммунитете
- получил пенициллин
- выделил вирусы

#### 17. Биологическую природу процесса брожения доказал:

- Д. Фракасторо
- П. Эрлих
- + Л. Пастер
- Ю. Петри
- И. И. Мечников

#### 18. К иммунологическому периоду развития микробиологии относятся:

- + описание явления фагоцитоза
- доказательство роли ДНК в передаче наследственной информации
- открытие возбудителя холеры человека
- + объяснение происхождения антител
- обнаружение вирусов

#### 19. *Mycobacterium tuberculosis* - возбудителя туберкулеза открыл:

- Л. Пастер
- М. Бейеринк
- И.И. Мечников
- + Р. Кох
- П. Эрлих

#### 20. Д.И. Ивановский:

- получил пенициллин
- открыл возбудителя туберкулеза
- + открыл вирусы
- выделил пенициллин
- обнаружил возбудителя холеры

#### 21. Клеточную теорию иммунитета сформулировал:

- Р. Кох
- + И.И. Мечников
- П. Эрлих

- Л. Пастер
- С. Ваксман

22. Изучением процесса фиксации азота бактериями занимался:

- Г. Флори
- Д. Уотсон
- Ф. Крик
- + С.Н. Виноградский
- И.И. Мечников

23. Д. Уотсон и Ф. Крик:

- + расшифровали структуру ДНК
- получили пенициллин
- выделили стрептомицин
- обнаружили вирусы
- предложили метод пастеризации

24. Первооткрывателем бактериофагов считается:

- Л. Пастер
- Р. Кох
- + Ф. Д'Эрель
- Д.И. Ивановский
- И.И. Мечников

25. Р. Кох и Л. Пастер занимались изучением:

- + возбудителей заболеваний человека и животных
- грибов, вызывающих заболевания растений
- бактерий, вызывающих заболевания растений
- бактериофагов
- простейших

26. Достижениями Л. Пастера являются:

- + открытие брожения как результата жизнедеятельности микроорганизмов
- + открытие возбудителя холеры человека
- выявление причин болезни шелковичных червей
- внедрение в практику микробиологии анилиновых красителей
- + разработка метода специфической профилактики сибирской язвы

27. Труд “О контагиях, контагиозных болезнях и их лечении” был написан:

- Гиппократом
- Р. Кохом
- Л. Пастером
- + Д. Фракасторо
- И.И. Мечниковым

28. Основоположником учения о природно-очаговых вирусных инфекциях является:

- Л. Пастер
- Р. Кох
- + Е.Н. Павловский
- И.И. Мечников
- П. Эрлих

29. Основателем технической микробиологии является:

- Р. Кох
- Л. Пастер
- Л.А. Зильбер
- + В.Н. Шапошников
- И.И. Мечников

30. Клонально-селекционную теорию иммунитета предложил:

- И.И. Мечников
- + Ф.М. Бёрнет
- П. Эрлих
- Л.А. Зильбер
- М.П. Чумаков

31. Основы асептики и антисептики заложил:

- Р. Кох
- Л. Пастер
- + Д. Листер
- Д. Тиндаль
- Ю. Петри

32. Первую рекомбинантную ДНК *in vitro* получил:

- Л.А. Зильбер
- П. Эрлих
- + П. Берг
- Ф.М. Бёрнет
- Л. Монтанье

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

### 3. Систематика и номенклатура микробов

#### 3.1. Основные принципы систематики микробов

В настоящее время описано более 3,5 тысяч видов бактерий и их число постоянно растет. Разобраться во всем многообразии микробов помогает систематика, позволяющая устанавливать их эволюционное родство друг с другом. Микробиологическая систематика изучает место микробов в природе, разрабатывает принципы, методы и правила их классификации (правила объединения микробов по степени родства в классификационные единицы) и номенклатуры (правила названия микробов).

Систематика микробов объединяет номенклатуру, классификацию и идентификацию (рисунок 3.1.).

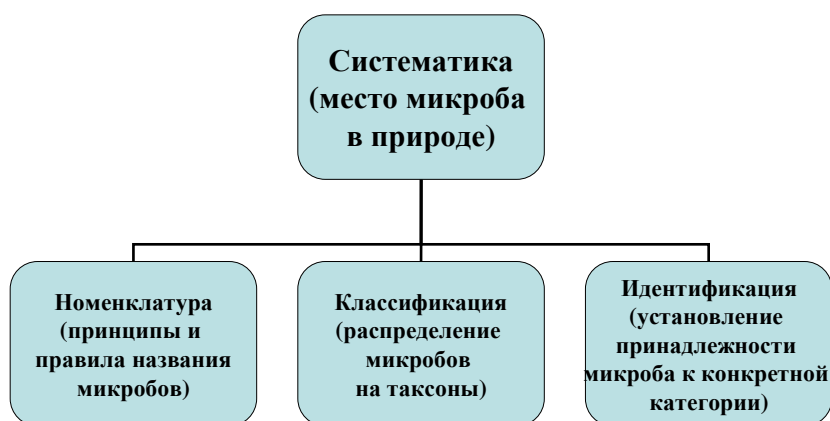


Рисунок 3.1 – Разделы систематики микробов.

**Номенклатура** - это совокупность принципов, правил и рекомендаций, применяемых для установления индивидуальных названий микробов, а также список этих названий.

**Классификация** (лат. *classis* - разряд, группа) - это правила распределения микробов на отдельные группы (классы, таксоны) на основании общих признаков. **Таксоны** – это классы, группы, категории микробов. **Таксономия** (греч. *taxis* – расположение, порядок, *nomos* - закон) - это раздел систематики о принципах, процедурах, правилах и методах классификации. Для включения микроба в ту или иную таксономическую категорию требуется их идентификация и полное описание.

**Идентификация** (лат. *identifico* - отождествление) - это установление принадлежности изучаемого микроба к той или иной таксономической категории на основе изучения морфологических, тинкториальных, биохимических, молекулярно-биологических свойств, антигенной структуры и других признаков.

Первая попытка систематизировать накопленные к тому времени сведения о живых организмах принадлежит Аристотелю, создавшему классификацию свойств (категорий). В то время естествоиспытатели подразделяли все живые существа на два царства - **царство растений** и **царство животных**. Для их систематизации

использовались отличительные признаки в морфологии и физиологии представителей этих царств. В первую очередь, различия между представителями царства растений и царства животных заключаются в способах питания. **Животные** поглощают органические вещества, которые в пищеварительном тракте перевариваются, а продукты разложения всасываются с помощью специализированных внутренних органов и тканей (**голозойный тип питания**). **Растения** имеют принципиально другой тип питания (**голофитный тип питания**). Они поглощают минеральные питательные вещества из водных растворов, всасывают их из почвы с помощью корневой системы, а органические соединения образуют в процессе фотосинтеза.

Первые попытки классификации бактерий были предприняты в XIX веке. Вначале основное внимание уделяли морфологическим признакам бактерий. В 1872 г. немецкий ботаник и бактериолог **Ф. Кohn** (Ferdinand Julius Cohn, 1828-1898 гг.) разделил все бактерии на группы: кокки, короткие палочки, удлиненные палочки, спирали.

В 1886 г. немецкий естествоиспытатель **Э. Геккель** предложил выделить все одноклеточные простейшие, грибы и бактерии в отдельное царство - *Protista* - **протисты или первосущества** (греч. *protistos* – первейший, *protos* – самый простой). Протисты подразделяются на 2 группы - высшие протисты и низшие протисты. Клетки **высших протистов** по своему строению сходны с растительными и животными клетками. Эти протисты называются **эукариотами** (греч. *eu* - хороший, добротный, *karyon* – ядро), то есть **ядерными** живыми организмами, так как они имеют истинное ядро, которое отделено от цитоплазмы двухслойной ядерной мембраной. К высшим протистам относятся микроскопические животные (простейшие), микроскопические водоросли (кроме сине-зеленых) и микроскопические грибы (плесени и дрожжи). Клетки **низших протистов** не имеют ядерной мембраны, поэтому вместо истинного ядра у них имеется нуклеоид. Эти протисты называются **прокариотами** или **доядерными** организмами (греч. *pro* - предшествующий, *karyon* – ядро). К низшим протистам относятся все бактерии и сине-зеленые водоросли.

В 1896 г. немецкие ученые **К. Леман** (Karl Bernhard Lehmann, 1858-1940 гг.) и **Р. Нейман** (Rudolf Neumann) подразделили бактерии на 3 семейства - кокки, палочки и спирали.

Для определения родства микробов в систематике используются внешние признаки (фенотипические показатели) и наследственную структуру (генотипические показатели). Фенотипические показатели объединяют морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и антигенные свойства, антибиотикочувствительность, отношение к бактериоцинам, бактериофагам и другие характеристики. К генотипическим показателям относятся соотношение пуриновых и пиримидиновых оснований, плазмидный профиль, состав рестрикционных фрагментов нуклеиновых кислот и другие. Для описания новых бактерий необходимы данные о следующих признаках:

- морфологические свойства (форма и размер клеток, наличие или отсутствие жгутиков, капсулы, способность к спорообразованию, подвижность);
- тинкториальные свойства (отношение к красителям, в первую очередь - окраска по Грамму);
- культуральные признаки (характер роста на плотных и в жидких

питательных средах);

- биохимические свойства (потребности в питательных веществах, способность ферментировать углеводы, разлагать белки, образовывать различные продукты, способы получения энергии, отношение к температуре, pH, молекулярному кислороду, химический состав бактерий);

- антигенные свойства;

- генетические характеристики (состав оснований ДНК и их соотношение, сходство нуклеиновых кислот, способность обмениваться генетической информацией, нуклеотидный состав рибосомальной РНК и др.);

- экологические особенности (условия обитания, круг хозяев и т. д.).

В современной биологии выделяют 5 царств живых существ: растения, животные, грибы, бактерии и вирусы (рисунок 3.2).

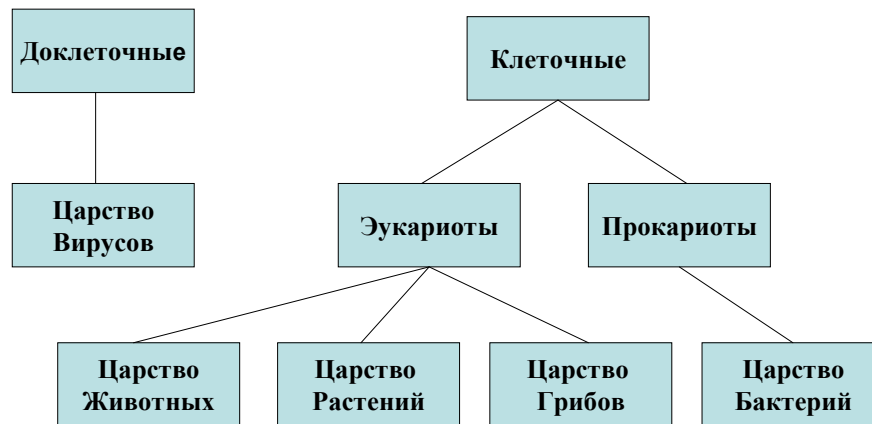


Рисунок 3.2 – Распределение живых существ между царствами.

Они систематизируются следующим образом:

1. Надцарство эукариоты (*Eucaryotae*):

1.1. Царство животных (*Animalia*) с подцарством простейшие (*Protozoa*).

1.2. Царство растений (*Plantae*), включающее водоросли.

1.3. Царство грибов (*Fungi*).

2. Надцарство прокариоты (*Procaryotae*):

2.1. Царство бактерии:

Отдел I – *Gracilicutes* (бактерии с тонкой клеточной стенкой).

Отдел II – *Firmicutes* (бактерии с толстой клеточной стенкой).

Отдел III – *Tenericutes* (бактерии без клеточной стенки).

Отдел IV – *Mendosicutes* (бактерии с дефектной клеточной стенкой).

3. Царство вирусы (*Vira*).

Свойства микроорганизмов по мере их изучения описываются в научных журналах и включаются в специальные издания – определители микробов. Наибольшее распространение получили “Определитель бактерий” Д.Х. Берджи (1923 г.), “Определитель микробов” Р.А. Циона (1948 г.) и “Определитель бактерий и актиномицетов” Н.А. Красильникова (1949 г.).

Первый международный определитель бактерий Д. Берджи (рисунок 3.3) был издан в 1923 г. Американским бактериологическим обществом. Последующие



выпуски определителя бактерий Берджи готовились международным комитетом по таксономии бактерий.



Рисунок 3.3 - Дэвид Берджи (David Henricks Bergey, 1860-1937 гг.).

После первой публикации в 1923 г. определителя бактерий Берджи сведения о свойствах микробов значительно расширились. При характеристике микробов наряду с фенотипическими признаками стали широко использоваться генетические особенности. Увеличение объема сведений потребовало переработки справочника. Последнее издание справочника состоит из 5 томов:

- том I - "The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria" (2001 г.);
- том II - "The Proteobacteria" (2005 г.);
- том III - "The Firmicutes" (2009 г.);
- том IV - "The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes" (2010 г.);
- том V - "The Actinobacteria" (2011 г.).

Российский микробиолог, бактериолог и почвовед **Н.А. Красильников** (рисунок 3.4) внес существенный вклад в изучение актиномицетов. В 1941 г. он создал определитель актиномицетов, а в 1949 г. - определитель бактерий. В 1951 г. ему была присуждена Сталинская премия третьей степени за научный труд "Определитель бактерий и актиномицетов".



Рисунок 3.4 - Красильников Николай Александрович (1896-1973 гг.).

В нашей стране в практических и научно-исследовательских бактериологических лабораториях в основном используют определитель бактерий Берджи.

### 3.2. Таксономические категории

В классификации микроорганизмов используются следующие таксономические категории: домен (*Domain*), царство (*Regnum*), отдел (*Divisio*), класс (*Classis*), порядок (или отряд) (*Ordo*), семейство (*Familia*), род (*Genus*), вид (*Species*). Эти **категории** являются **обязательными**. Предусмотрены также **необязательные категории**: подкласс (*Subclassis*), подотдел (*Subdivisio*), подсемейство (*Subfamilia*), подрод, подвид. Необязательные категории используются редко. Общеизвестная классификация бактерий опубликована в виде специального определителя бактерий Берджи, который постоянно дополняется новыми данными.

Основной таксономической единицей является вид. **Вид** – это группа близких между собой микробов, имеющих общее происхождение, сходные морфологические, биохимические и физиологические признаки, приспособленные к определенной среде обитания. Каждый вид микробов имеет типовой штамм, который является своеобразным эталоном данного вида. К типовому штамму относится тот штамм, который выделен и охарактеризован первым. Все другие изоляты, выделенные в лабораториях из разных источников и относящиеся к этому виду, должны иметь схожие характеристики. Типовые штаммы имеют наиболее полную характеристику и хранятся в специальных коллекциях. Коллекции бактерий имеются во многих странах.

**Подвид** – это совокупность бактерий определенного вида, отличающихся некоторыми признаками, не препятствующими их объединению в вид.

**Род** – это группа микроорганизмов близкородственных видов с общими свойствами. Каждый род имеет типовой вид, на основе которого он формируется. Например, вид *Escherichia coli* является типовым для рода *Escherichia*.

**Триба** (колена) – это группа близкородственных родов микроорганизмов. Например, роды *Escherichia* и *Schigella* являются родственными.

**Семейство** – это совокупность родов, имеющих общие основные свойства. Сходные семейства объединяются в порядок, а порядки – в классы, царство и домен.

**Вариант** или тип – это бактерии одного вида, отличающиеся по тем или иным свойствам. Разнообразные механизмы изменчивости бактерий приводят к определённой нестабильности признаков, совокупность которых определяет тот или иной вид. Поэтому в систематике бактерий широко применяют понятие “вариант”. В медицинской бактериологии обычно выделяют серологические варианты (**серовары**), варианты с разной чувствительностью к бактериофагам (**фаговары**), варианты, различающиеся по биохимическим свойствам (**хемовары**), биологическим или культуральным признакам (**биовары**), патогенности (**патовары**), морфологическим характеристикам (**морфовар, морфотип**), по условиям культивирования (**культивар**), по строению части генома (**геновары**). Например, *Vibrio cholerae* биовар *Eltor* (холерный вибрион Эль-Тор) или *Escherichia coli* серовар 0157:H7 (представитель группы энтерогеморрагических кишечных палочек). При генетическом типировании бактерий с помощью рестриктаз внутри

вида выделяют **риботипы** – то есть совокупность бактерий, имеющих одинаковый или близкий профиль фрагментов ДНК, образующихся при воздействии этих ферментов и выявляемых методом электрофореза.

### 3.3. Номенклатура микробов

Номенклатура – это раздел систематики, в котором рассматриваются принципы и правила названия микробов. Под названием понимают условное обозначение, символ, шифр микроорганизма. К названиям предъявляются требования универсальности и однозначности. Названия микробов должны быть стабильными и научно обоснованными. Название микроорганизмов присваивается в соответствии с международными правилами. Правила научной номенклатуры микробов регламентируют “Международный кодекс номенклатуры бактерий”, “Международный кодекс ботанической номенклатуры” (для грибов), “Международный кодекс зоологической номенклатуры” (для простейших) и решения Международного комитета по таксономии вирусов. Все изменения научных названий микроорганизмов производятся только решениями соответствующих международных конгрессов и постоянных комитетов по номенклатуре. Так, вопросами номенклатуры бактерий занимается Комитет по номенклатуре Международной ассоциации микробиологических обществ (МАМО) и его подкомитеты по отдельным группам бактерий. Списки узаконенных наименований бактерий публикуются в Международном журнале по систематике и эволюционной микробиологии (IJSEM).

Для обозначения видов бактерий принята **двойная (бинарная) номенклатура**, предложенная еще в XVIII веке шведским естествоиспытателем К. Линнеем. **К. Линней** (рисунок 3.5) создал единую систему обозначения представителей растительного и животного мира, обобщив и упорядочив биологические знания всего предыдущего периода.



Рисунок 3.5 - Карл Линней (Carl Linnaeus, 1707-1778 гг.).

Согласно кодексам номенклатуры, все названия организмов пишутся буквами латинского алфавита по правилам латинской грамматики. **Названия таксонов**, имеющих ранг рода и выше, обозначаются одним словом, например

*Herpesviridae* (семейство герпесвирусов). Вид бактерий обозначается двумя латинскими именами, то есть названия видов биномиальны (бинарны). Первое имя характеризует род (genus), а второе слово - вид (species). В названии бактерий сначала латинскими буквами пишется **название рода** (родовое название или родовой эпитет) с заглавной буквы, а затем - **название вида** (видовое название или видовой эпитет) со строчной буквы. В тексте оба слова выделяются курсивом. В тексте при первом упоминании оба слова названия микроба пишутся полностью, а при повторном упоминании допускается написание одной заглавной буквы родового названия с точкой после нее (например, *Escherichia coli*, *E. coli*). Если микроорганизм идентифицирован только до рода, то вместо видового эпитета пишется слово sp. (species - вид). Родовую принадлежность микроба обозначает какой-либо морфологический признак (форма, размер, особенность строения клеток) или фамилия ученого, открывшего микроб, а видовую принадлежность обозначает либо признак колоний (цвет, размер, форма колоний), либо среда обитания микроорганизма. Например, название *Escherichia coli* (кишечная палочка) указывает на то, что микроб открыл Т. Эшерих, а обитает микроб в кишечнике человека или животных. Название *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) обозначает, что клетки этого микроба имеют шаровидную форму и располагаются в виде виноградной грозди, а колонии этого микроба имеют золотисто-желтую окраску.

Названия подвидов тринминальны (триннарны); для их обозначения после видового названия применяют слово подвид (*subspecies*): например, *Klebsiella pneumoniae subsp. ozenae* (палочка озены, где *ozenae* - название подвида).

В названиях таксонов выше рода применяют общепринятые окончания. Так, для обозначения порядка применяют окончание -ales (например, *Pseudomonadales*), для подпорядка -ineae (например, *Pseudomonadineae*), для семейства -aceae (например, *Pseudomonadaceae*), для подсемейства -oideae (например, *Pseudomonadoideae*).

Для каждого штамма указывают также аббревиатуру названия коллекции культур микроорганизмов, в которой он хранится, и номер, под которым он значится в коллекции. Например, *Clostridium butyricum* ATCC 13398 означает, что штамм хранится в Американской коллекции типовых культур под номером 13398. Название *B. subtilis* ВКПМ 3815 означает, что данный штамм хранится под номером 3815 во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

### 3.4. Понятие о культуре, клоне, штамме микроорганизмов.

В микробиологии используются специализированные термины: чистая или смешанная культура, клон, штамм, популяция.

**Культура** - это микроорганизмы, выращенные на плотной или в жидкой питательной среде в лабораторных условиях.

**Чистая культура** представляет собой культуру микробов из особей одного вида.

**Смешанная культура** представляет собой совокупность бактерий

нескольких видов, выросших в питательной среде при посеве исследуемого материала или при попадании в питательную среду, засеянную одним видом микроба, еще и других видов микроорганизмов из внешней среды.

**Клон** (греч. *klon* - отводок) - это культура микробов, полученная в результате размножения на питательной среде одной бактериальной материнской клетки определенного вида (потомство одной клетки).

**Штамм** (нем. *stammen* - происходить) - это чистая культура определенного вида микроба, выделенная из того или иного конкретного объекта (какого-либо организма или объекта окружающей среды) и отличающаяся от эталонного штамма незначительными изменениями свойств. Разные штаммы одного вида микроорганизмов могут различаться по некоторым признакам (например, по чувствительности к антибиотикам, способности синтезировать некоторые ферменты и т. д.).

**Популяция** - это совокупность бактерий одного вида, полученная при выращивании на питательной среде одной или нескольких клеток.

### 3.5. Особенности систематики вирусов, грибов и простейших

#### 3.5.1. Особенности систематики вирусов

Вирусы отнесены к царству *Vira*. В основу их классификации положен тип нуклеиновой кислоты, образующей геном. Поэтому выделяют РНК-содержащие вирусы и ДНК-содержащие вирусы. Кроме этого при систематизации вирусов используют размеры вирусных частиц, наличие или отсутствие суперкапсида, тип симметрии нуклеокапсида, полярность нуклеиновых кислот, количество нитей в молекуле нуклеиновых кислот и наличие сегментов, присутствие ферментов, тропизм к тканям и другие свойства.

Для вирусов используют следующие таксономические категории: Вид (*Species*) → Род (*Genus*) → Подсемейство (*Subfamilia*) → Семейство (*Familia*). Но категории подсемейств и родов определены не для всех вирусов. Видовые названия вирусов обычно связывают с вызываемыми ими заболеваниями (например, вирус бешенства) либо по названию места, где они были впервые выделены (например, вирусы Коксаки, вирус Эбола). Если семейство включает большое количество видов, то видовые названия дают в соответствии с антигенной структурой и разделяют их на типы (например, аденовирус 32 типа или вирус герпеса 1 типа). Реже используют фамилии учёных, впервые их выделивших (например, вирус саркомы Рауса). Иногда используют устаревшие названия групп вирусов, отражающих их уникальные эпидемиологические характеристики (например, арбовирусы).

#### 3.5.2. Особенности систематики грибов

Грибы отнесены к царству *Fungi* (*Mycota*), которое подразделяется на отделы

*Mucormycota* (грибы-слизевики) и *Eumycota* (истинные грибы). Истинные грибы, гифы которых не имеют перегородок, известны как низшие грибы. К ним относят классы *Chytridiomycetes*, *Hyphochytridiomycetes*, *Oomycetes*, *Zygomycetes*. Представители классов *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* и *Deuteromycetes* - высшие грибы, так как их гифы имеют перегородки-септы. К ним относят подавляющее большинство видов, вызывающих заболевания у человека.

**Зигомицеты** (греч. *zygon* - сочленение, *mykes* – гриб) представлены быстрорастущими видами, обычно обитающими в почве. При культивировании *in vitro* образуют обильный сероватый или белый воздушный мицелий. Их гифы не имеют перегородок либо септированы частично. Размножаются половым и бесполом путём. Бесполое размножение реализуется через образование спорангиофоров со спорангиями. Половое размножение приводит к образованию зигот - зигоспор. Поражения человека носят выраженный оппортунистический характер. Их возбудителями могут быть представители родов *Absidia*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Entomophthora*, *Conidiobolus* и *Basidiobolus*.

**Аскомицеты** (греч. *ascos* - сумка, *mykes* – гриб) получили своё название из-за наличия основного органа плодоношения - сумки, содержащей 4 или 8 гаплоидных половых аскоспор. Гифы имеют выраженные перегородки. Размножаются половым (через образование аскоспор) и бесполом (через формирование конидий) путём. К аскомицетам относят и дрожжи - одноклеточные грибы, утратившие способность образовывать мицелий. Возбудителями микозов человека выступают *Pseudoallescheria boydii* и представители родов *Geotrichum*, *Microsporium* и *Trichophyton*.

**Базидиомицеты** (греч. *basidon* - маленькая основа, *mykes* – гриб) имеют характерный орган спороношения - базидий. Последний состоит из вздутой терминальной клетки, расположенной на тонком стебле. На базидий путём мейотического деления развиваются, отшнуровываясь от него, базидиоспоры. Единственным патогенным для человека видом выступает *Filobasidiella neoformans* (половая форма *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*).

**Дейтеромицеты** (греч. *deuteros* - вторичный, *mykes* – гриб) не образуют настоящую филогенетическую группу, а выступают в качестве таксономической “свалки”, куда помещают виды, у которых половая (совершенная) стадия размножения отсутствует либо не выявлена. Их классификация основана на формах спороношения или других внешних признаках и служит только практическим целям. Для них установленным считают лишь бесполое размножение, поэтому дейтеромицеты также известны как несовершенные грибы (*Fungi imperfecti*). По морфологическим признакам большинство дейтеромицетов сходно с аскомицетами. Большая часть возбудителей микозов человека входит в группу несовершенных грибов.

### 3.5.3. Особенности систематики простейших

Простейшие включены в царство *Animalia*, подцарство *Protozoa*, разделённое на 7 типов. Виды, патогенные для человека, входят в состав трёх типов - *Sarcomastigophora*, *Apicomplexa* и *Ciliophora*.

**Тип *Sarcomastigophora*** (греч. *sarx* - плоть, *mastix* - бич, *phoros* – носить) включает подтипы *Sarcodina* и *Mastigophora*.

**Подтип *Sarcodina*** (греч. *sarcodes* – мясистый) включает живущих свободно простейших - амёб. Включает патогенные виды, поражающие кишечник (*Entamoeba histolytica*) и органы центральной нервной системы (*Naegleria fowleri* и виды *Acanthamoeba*).

**Подтип *Mastigophora*** (греч. *mastix* – бич, *phoros* – носить). Характерная особенность - наличие одного или нескольких жгутиков. Патогенные для человека виды входят в состав четырёх родов - *Trichomonas*, *Giardia*, *Leishmania* и *Trypanosoma*.

**Тип *Ciliophora*** (лат. *cilium* – ресница) включает так называемые ресничные инфузории. Для человека патогенным представителем является *Balantidium coli*.

**Тип *Apicomplexa*** (лат. *apex*, *apicis* - конец, вершина, *complexus* - сотканный вместе). Своим названием эти простейшие обязаны способности образовывать скопления клеток, имеющие общую плотную оболочку. Нередко эти клетки условно называют спорами (отсюда название класса споровики - *Sporozoea*). Помимо споровиков, тип включает подклассы *Coccidia* и *Piroplasma*.

### 3.6. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Что такое систематика микробов?
2. Что такое классификация микробов?
3. Что такое таксономия микробов?
4. Что такое идентификация микробов?
5. Назовите таксономические категории, используемые в бактериологии.
6. Что такое бинарная номенклатура бактерий?
7. Что такое чистая культура?
8. Что такое смешанная культура?
9. Что такое штамм?

### 3.7. Тренировочные тесты

1. Основной таксономической единицей микроорганизмов является:

- класс
- род
- + вид
- порядок
- отдел

2. Чистая культура – это:

- микроорганизмы, населяющие почву
- + культура из особей одного вида
- культура из особей разных видов
- смесь клеток бактерий

- культура из клеток одной формы

3. Бинарную номенклатуру предложил:

- Л. Пастер
- + К. Линней
- Р. Кох
- И.И. Мечников
- П. Эрлих

4. Родовую принадлежность микроба обозначает:

- форма колоний
- + форма клеток
- + фамилия ученого, открывшего микроб
- способ дыхания
- размер колоний

5. Видовую принадлежность бактерий обозначает:

- форма клеток
- + признак колоний (цвет, размер, форма)
- + среда обитания микроба
- генетические особенности микроба
- фамилия ученого, открывшего микроб

6. В какой последовательности располагаются классификационные группы микроорганизмов:

- класс-порядок-отдел-семейство-род-вид
- семейство-класс-порядок-отдел-род-вид
- отдел-порядок-семейство-класс-род-вид
- + отдел-класс-порядок-семейство-род-вид
- порядок-отдел-класс-семейство-род-вид

7. Бактерии с тонкой клеточной стенкой относятся к отделу:

- фирмикуты
- + грациликуты
- мендозикуты
- тенерикуты
- археи

8. Бактерии с толстой клеточной стенкой относятся к отделу:

- + фирмикуты
- грациликуты
- мендозикуты
- тенерикуты
- археи

9. Бактерии с дефектной клеточной стенкой относятся к отделу:



- фирмикуты
- грациликуты
- + мендозикуты
- тенерикуты
- археи

10. Бактерии без клеточной стенки относятся к отделу:

- фирмикуты
- грациликуты
- мендозикуты
- + тенерикуты
- археи

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 4. Морфология и структура микробов

### 4.1. Основные формы бактерий

Микробы - это живые существа, которые можно наблюдать только с использованием оптических приборов, так как их размеры чрезвычайно малы. По принципу клеточной организации все микробы подразделяются на два типа – прокариоты и эукариоты. Основными отличительными признаками прокариотов от эукариотов являются следующие. Прокариоты не имеют оформленного ядра, то есть их ядерный аппарат (нуклеоид) не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной. Клетки прокариотов не имеют автономных мембранных структур (митохондрий, хлоропластов, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи). В составе клеточной стенки прокариотов присутствует пептидогликан. Для прокариотов характерно бинарное деление клеток.

Среди прокариотов различают **бактерии** (грамположительные бактерии или *Firmicutes*, грамотрицательные бактерии или *Gracilicutes* и микоплазмы или *Tenericutes*) и **археи** (*Mendosicutes*). Выделение этих групп микроорганизмов основано в первую очередь на строении их клеточных стенок.

Разные виды бактерий имеют определенную форму и размер клеток. Размеры микробов выражаются в микрометрах (мкм) и нанометрах (нм). Средние размеры бактерий в длину составляют 2-3 мкм, в ширину - 0,3-0,8 мкм. В 1990 г. были открыты нанобактерии, размер которых не превышает 0,2-0,5 микрон. Среди бактерий могут быть и гиганты, достигающие в длину 125 мкм и более. Способность бактерий изменять свою форму и величину называется **полиморфизмом**.

Выделяют три **основные формы бактерий**:

- шаровидные или сферические бактерии (кокки);
- палочковидные бактерии;
- извитые и S-образные бактерии.

**Сферические формы бактерий (кокки)** представляют собой шаровидные, овальные (эллипсоидные), бобовидные бактерии размером 0,5-1,0 мкм (рисунок 4.1).

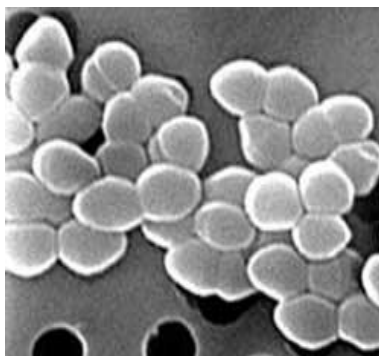


Рисунок 4.1 - Шаровидные бактерии. Электронная микрофотография.

К шаровидным бактериям относятся микрококки, диплококки, стрептококки,

тетракокки, сарцины и стафилококки.

**Микрококки** (греч. *micros* - малый) – это шаровидные клетки, располагающиеся отдельно друг от друга (рисунок 4.2). В большинстве случаев микрококки являются представителями сапрофитной микрофлоры.

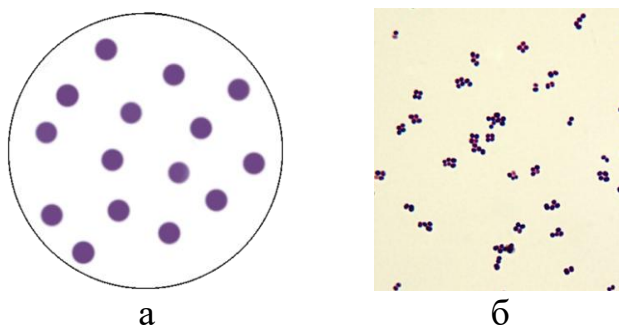


Рисунок 4.2 - Схематическое изображение микрококков (а) и их расположение в мазке (б), окраска по Граму.

**Диплококки** (греч. *diploos* - двойной, парный) - это кокки, состоящие из двух особей, которые после деления клетки не расходятся. К диплококкам относятся пневмококки, гонококки, менингококки. Пневмококк (возбудитель пневмонии, *Streptococcus pneumoniae*) имеет с противоположных сторон ланцетовидную форму (рисунок 4.3).

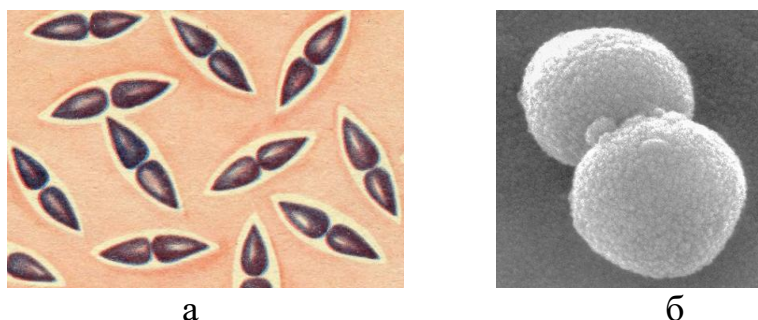


Рисунок 4.3 - Схема строения (а) и электронная микрофотография (б) *Streptococcus pneumoniae*.

Гонококк (возбудитель гонореи, *Neisseria gonorrhoeae*) и менингококк (возбудитель менингита, *Neisseria meningitidis*) имеют форму кофейных зерен, обращенных вогнутой поверхностью друг к другу (рисунки 4.4 и 4.5).

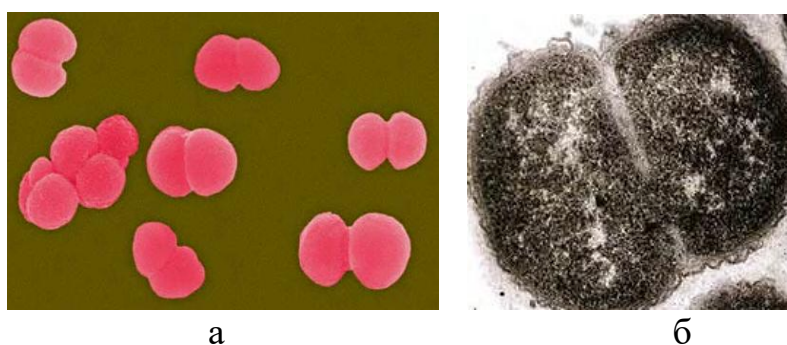


Рисунок 4.4 - Компьютерное изображение (а) и электронная микрофотография (б) ультратонкого среза гонококка.

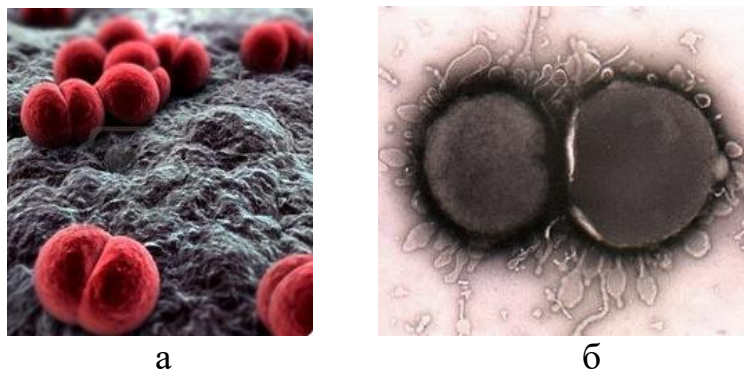


Рисунок 4.5 – Компьютерное изображение (а) и электронная микрофотография (б) ультратонкого среза менингококка.

**Стрептококки** (греч. *streptos* - цепочка) - это клетки округлой формы, располагающиеся в виде цепочки. Такая цепочка образуется при делении клеток в одной плоскости при сохранении связи между дочерними клетками. Цепочки могут иметь разную длину, то есть состоять из разного количества клеток (рисунок 4.6). Среди стрептококков имеются представители нормальной микрофлоры организма человека, условно-патогенные и патогенные бактерии - возбудители инфекционных заболеваний человека (скарлатины, рожи, ангины и др.).

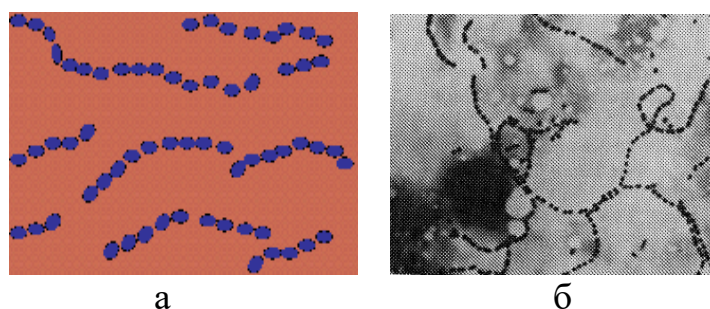


Рисунок 4.6 - Схематическое изображение стрептококка (а) и световая микроскопия препарата (б).

**Тетракокки** (греч. *tetra* – четыре) - это скопления из четырех клеток, образованные в результате деления в двух перпендикулярных плоскостях (рисунок 4.7). Тетракокки обычно не вызывают заболеваний у человека.

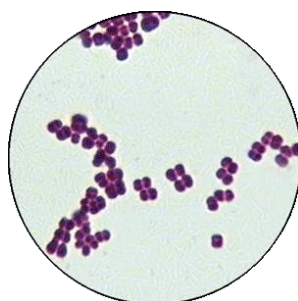


Рисунок 4.7 - Тетракокки, окраска по Граму.

**Сарцины** (лат. *sarcina* - связка, тюк) представляют собой скопления клеток в виде пакетов из 8-16 особей. Такие скопления образуются в результате деления клеток в трех взаимно перпендикулярных плоскостях (рисунок 4.8). Сарцины

являются в основном представителями микрофлоры воздуха.

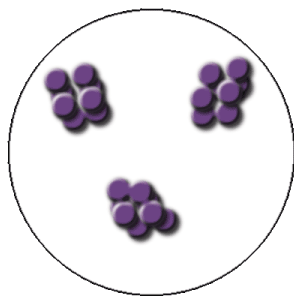


Рисунок 4.8 - Схематическое изображение сарцин.

**Стафилококки** (греч. *staphyle* - виноградная гроздь) - это сферические клетки, расположенные в виде скопления, напоминающего грозди винограда. Такая форма образуется в результате деления клеток в разных плоскостях (рисунок 4.9). Одни стафилококки являются сапрофитными, другие - условно-патогенными, а третьи – патогенными бактериями, вызывающими у человека гнойно-воспалительные заболевания (абсцессы, фурункулы, карбункулы и др.).

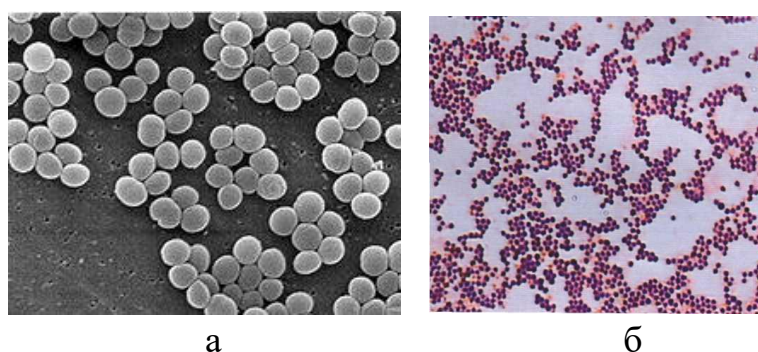


Рисунок 4.9 - Стафилококки. Электронная микрофотография (а) и световая микроскопия (б), окраска по Граму.

Взаимное расположение сферических форм зависит от особенностей деления клеток. В случае делении клеток в одной плоскости кокки располагаются в виде диплококков или стрептококков, при делении в двух плоскостях – в виде тетракокков, а при делении в трех плоскостях – в виде стафилококков или тетракокков (рисунок 4.10).

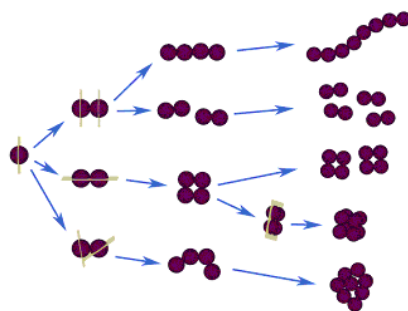


Рисунок 4.10 – Расположение клеток в зависимости от характера деления.

Палочковидные бактерии представляют собой клетки цилиндрической формы, которые различаются по размерам (длине и толщине), взаимному расположению (в цепочке, под углом друг к другу), форме концов клетки (обрубленные, заостренные, закругленные), способности к спорообразованию (рисунок 4.11).



Рисунок 4.11 - Компьютерное изображение клеток *Escherichia coli* (а) и *Corynebacterium diphtheriae* (б).

Длина клеток варьирует от 1,0 до 10 мкм, толщина - от 0,5 до 2,0 мкм. Палочки могут быть правильной (кишечная палочка и др.) и неправильной (коринебактерии и др.) формы, в том числе ветвящиеся (актиномицеты). Обрубленные концы клеток наблюдаются у возбудителя сибирской язвы, закругленные концы - у кишечной палочки, заостренные - у фузобактерий, утолщенные - у возбудителя дифтерии.

Палочковидные бактерии родов *Corynebacterium* и *Mycobacterium* имеют особое расположение клеток: под углом друг к другу или в виде жгутов (рисунки 4.12).

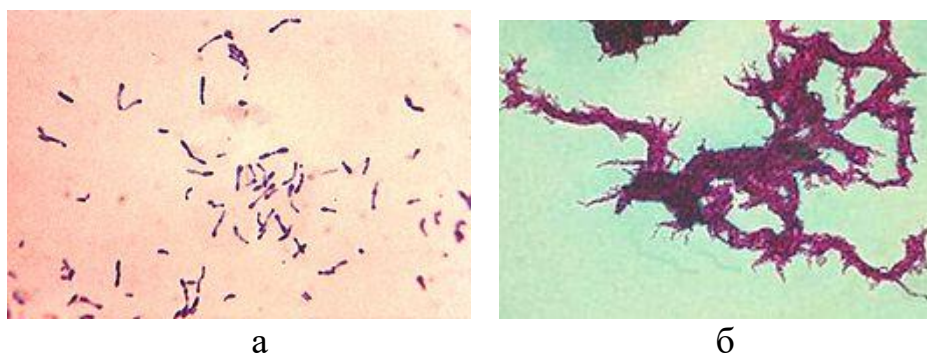


Рисунок 4.11 - *Corynebacterium diphtheriae*, окраска по Граму (а) и микобактерии туберкулеза, окраска по Цилю-Нильсену (б).

Такое расположение клеток обусловлено высоким содержанием липидов в клеточной стенке. Патогенные микобактерии вызывают у человека туберкулез и лепру, а коринебактерии - дифтерию.

Палочковидные формы, не способные образовывать споры, называются **бактериями**. Палочковидные формы могут располагаться в виде одиночных клеток (**монобактерии**), парами (**диплобактерии**), цепочками (**стрептобактерии**). Спорообразующие бактерии подразделяются на **бациллы** и **кlostридии**. У бацилл поперечник образующейся споры не превышает диаметра вегетативной клетки.

Поперечник спор у клостридий превышает диаметр вегетативной клетки, что придает палочке форму веретена (лат. *closter* – веретено), барабанной палочки, теннисной ракетки. К бациллам относится возбудитель сибирской язвы, к клостридиям - возбудители газовой гангрены, ботулизма, столбняка. Изображение бацилл и клостридий представлено на рисунке 4.13.

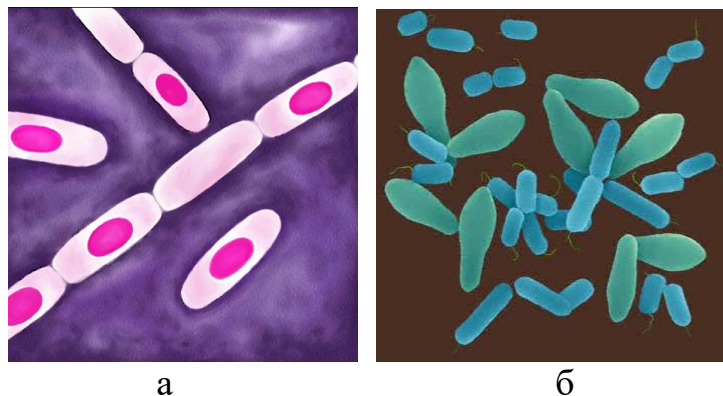


Рисунок 4.13 – Компьютерное изображение бацилл (а) и клостридий (б).

Изогнутые палочки называются **вибрионами** (лат. *vibrio* – изгибать). Типичным представителем этих бактерий является холерный вибрион. Изогнутость тела вибриона не превышает одного оборота, поэтому клетка имеет форму запятой (рисунок 4.14).

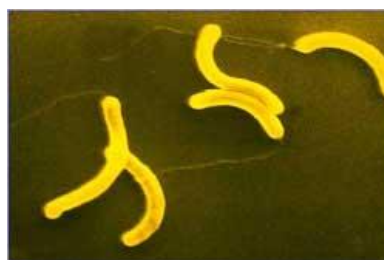


Рисунок 4.14 – Холерный вибрион. Компьютерное изображение.

**Извитые бактерии** выглядят в виде спирали, имеющей один или несколько оборотов. К извитым формам относятся спираиллы и спирохеты.

**Спириллы** (лат. *spira* - изгиб, виток) имеют вид штопора с одним или несколькими завитками (рисунок 4.15). Они являются неподвижными. К патогенным спираллам относится возбудитель содоку (болезнь укуса крыс).

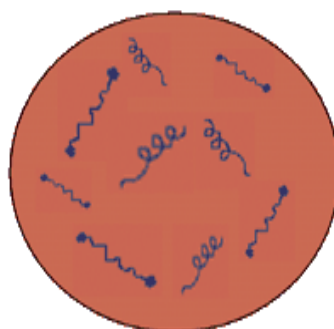


Рисунок 4.15 - Схематическое изображение спираилл.

**Спирохеты** (лат. *spira* – виток, спираль, *haite* - волос) представляют собой тонкие извитые бактерии. В отличие от спирилл спирохеты обладают подвижностью (рисунок 4.16).



Рисунок 4.16 – Внешний вид спирохет, люминесцентная микроскопия.

Спирохеты состоят из **цитоплазматического цилиндра**, покрытого цитоплазматической мембраной. Цитоплазматический цилиндр спирально закручен вокруг пучка осевых **фибрилл**. Снаружи цитоплазматический цилиндр и фибриллы окружены клеточной стенкой. У разных видов спирохет количество фибрилл различно. С помощью фибрилл спирохеты способны совершать вращательные, сгибательные и поступательные движения. При движении спирохеты образуют петли, изгибы, которые называются вторичными завитками (рисунок 4.17).

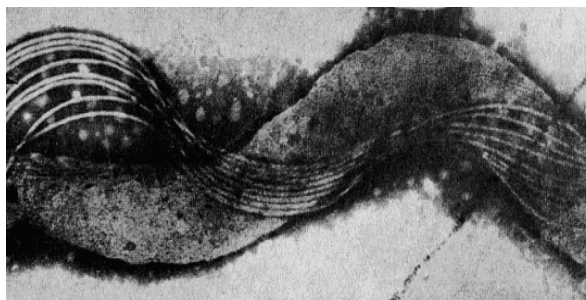


Рисунок 4.17 - Электронная микрофотография спирохеты.

Патогенными для человека спирохетами являются представители родов *Treponema*, *Borrelia* и *Leptospira*.

**Трепонемы** (род *Treponema*) представляют собой извитые бактерии, имеющие 8-12 мелких завитков и 3-4 фибриллы (рисунок 4.18). У человека трепонемы вызывают сифилис (*T. pallidum*) и фрамбезию (*T. pertenue*).



Рисунок 4.18 - Компьютерное изображение трепонемы.



**Боррелии** (род *Borrelia*) - это длинные извитые бактерии, имеющие 3-8 крупных завитков и 7-20 фибрилл (рисунок 4.19). К боррелиям относятся возбудители клещевого боррелиоза (болезни Лайма) и возвратного тифа.



Рисунок 4.19 – Компьютерное изображение боррелий.

**Лептоспиры** (род *Leptospira*) - это извитые бактерии, имеющие мелкие частые завитки. Внешне лептоспиры напоминают закрученную веревку. Они имеют 2 осевые фибриллы. Концы клеток изогнуты крючком и имеют утолщения. Лептоспиры образуют вторичные завитки, в результате чего приобретают S-образную форму (рисунок 4.20).

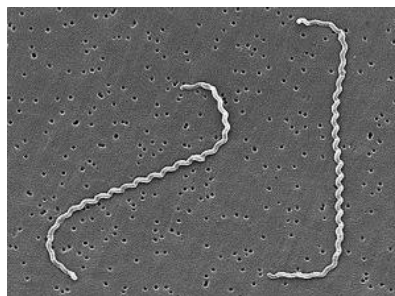
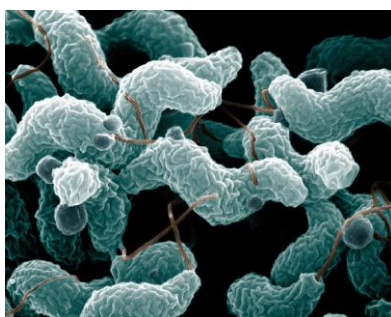


Рисунок 4.20 – Лептоспиры. Сканирующая электронная микроскопия.

Патогенным представителем лептоспир является *L. interrogans*. При попадании в организм с водой или пищей этот возбудитель вызывает развитие лептоспироза, который сопровождается кровоизлияниями и желтухой.

К группе S-образных бактерий относятся представители родов *Campilobacter* и *Helicobacter* (рисунок 4.21).



а



б

Рисунок 4.21 – Компьютерное изображение кампилобактеров (а) и хеликобактера (б).

**Риккетсии** представляют собой мелкие палочковидные бактерии, которые являются облигатными (обязательными) внутриклеточными паразитами. Они размножаются бинарным делением внутри инфицированных клеток. Обитают в организме членистоногих (вши, блохи, клещи), которые являются для них хозяевами или переносчиками. Свое название риккетсии получили по фамилии американского патолога **Х.Т. Риккетса** (рисунок 4.22), который впервые описал одного из возбудителей риккетсиозов - возбудителя пятнистой лихорадки Скалистых гор.



Рисунок 4.22 - Ховард Тэйлор Риккетс (Howard Taylor Ricketts, 1871-1910 гг.).

В зависимости от условий развития форма и размер риккетсий могут изменяться: клетки могут приобретать кокковидную, нитевидную или неправильную форму. Строение риккетсий соответствует структуре грамотрицательных бактерий. Они не образуют спор и капсул, неподвижны. В мазках-отпечатках тканей риккетсии окрашивают по Романовскому-Гимзе: при этом риккетсии окрашиваются в красный цвет, а инфицированные клетки – в синий цвет (рисунки 4.23 и 4.24).



Рисунок 4.23 - Электронограмма ультратонкого среза *Rickettsia sibirica*.

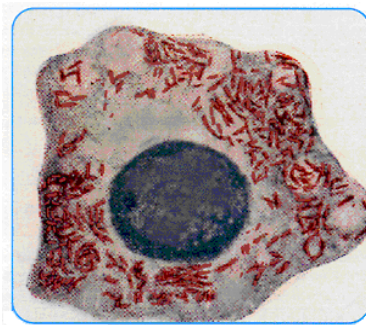


Рисунок 4.24 – Риккетсии сыпного тифа в цитоплазме инфицированных клеток. Окраска карболфуксином и синькой.

У человека риккетсии вызывают эпидемический (вшиный) сыпной тиф (*Rickettsia prowazekii*), клещевой риккетсиоз (*R. sibirica*), пятнистую лихорадку Скалистых гор (*R. rickettsii*) и другие риккетсиозы.

**Хламидии** представляют собой облигатные внутриклеточные кокковидные грамотрицательные бактерии. Хламидии размножаются только в живых клетках. На питательных средах хламидии не растут. Хламидии способны существовать в двух формах:

- ЭТ - элементарные тельца;
- РТ - ретикулярные тельца.

**Элементарные тельца** являются внеклеточной (покоящейся) формой. Они представляют собой мелкие сферические образования с толстой клеточной стенкой, окрашиваются по Романовскому-Гимзе в красный (пурпурный) цвет, метаболически неактивны, неспособны к делению, нечувствительны к антибиотикам. Элементарные тельца попадают в клетку путем эндоцитоза. В клетке формируется вакуоль, внутри которой элементарные тельца увеличиваются в размерах и превращаются в **ретикулярные тельца**, способные к бинарному делению. **Ретикулярные тельца** являются внутриклеточной (вегетативной) формой. Они крупнее элементарных телец в несколько раз, имеют тонкую клеточную стенку, окрашиваются по Романовскому-Гимзе в голубой или фиолетовый цвет, метаболически активны, способны к бинарному делению, чувствительны к антибиотикам (рисунок 4.25).

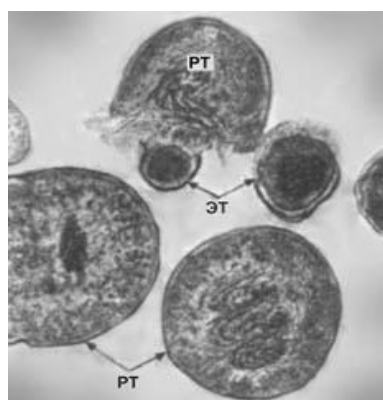


Рисунок 4.25 - Электронная микрофотография хламидий: ЭТ - элементарные тельца, РТ - ретикулярные тельца.

Внутри клеток ретикулярные тельца делятся и превращаются в элементарные тельца, которые выходят из клеток путем экзоцитоза или лизиса клетки. Вышедшие из клетки элементарные тельца инфицируют другие клетки, в результате чего цикл развития хламидий повторяется (рисунок 4.26).

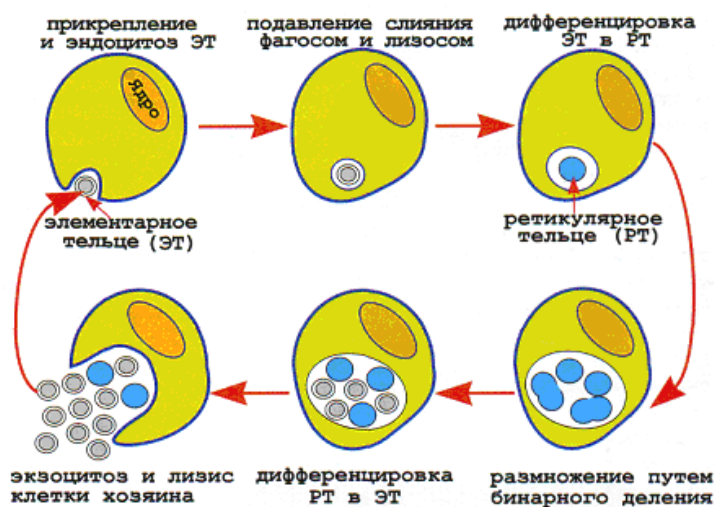


Рисунок 4.26 - Схема жизненного цикла хламидий.

У человека хламидии вызывают поражения глаз (трахома, конъюнктивит), урогенитального тракта, легких и других органов (хламидиозы).

**Микоплазмы** представляют собой мелкие бактерии, окруженные только цитоплазматической мембраной и не имеющие клеточной стенки. Они относятся к классу *Mollicutes*, содержат в цитоплазматической мембране стеролы. Из-за отсутствия клеточной стенки микоплазмы осмотически чувствительны. Имеют разнообразную форму: кокковидную, нитевидную, колбовидную. Эти формы видны при фазово-контрастной микроскопии чистых культур микоплазм (рисунок 4.27).

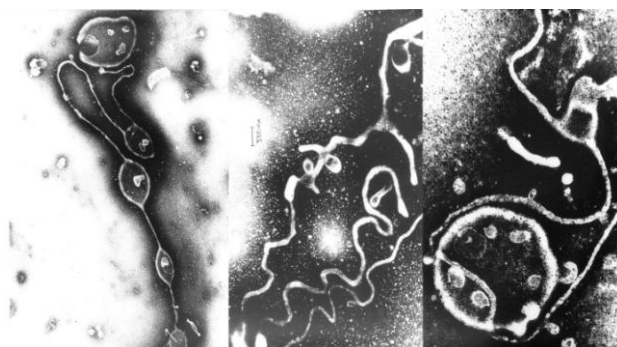


Рисунок 4.27 - Морфология микоплазм.

Размножение микоплазм может происходить путем деления, фрагментации, почкования. После проникновения в макроорганизм микоплазмы прикрепляется к эпителиальным клеткам и паразитируют на их мембране (рисунок 4.28).

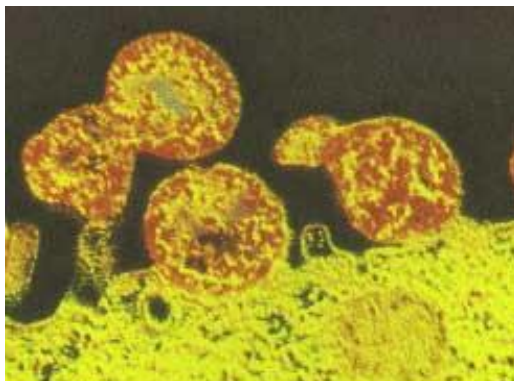


Рисунок 4.28 - Микоплазмы на мембране эукариотической клетки.

Вне организма микоплазмы растут на специальных питательных средах. У человека они вызывают поражения легких (*Mycoplasma pneumoniae*) и мочеполового тракта (*M. hominis*).

**Актиномицеты** представляют собой ветвящиеся, нитевидные или палочковидные грамположительные бактерии. Название актиномицетов происходит от греческих слов *actis* – луч и *mykes* – гриб. Это название указывает на то, что актиномицеты в пораженных тканях образуют клубок плотно переплетающихся нитей с отходящими от центра лучами (устаревшее название актиномицетов – лучистые грибки). Нитевидные переплетающиеся несептированные клетки актиномицетов (гифы) образуют субстратный (первичный) и воздушный (вторичный) мицелий. Это свойство создает им сходство с некоторыми видами грибов. **Субстратный мицелий** формируется в результате врастания клеток в питательную среду, а **воздушный мицелий** образуется на поверхности среды. Актиномицеты размножаются как путем фрагментации мицелия, так и путем образования спор на воздушном мицелии. Споры актиномицетов не обладают термоустойчивостью (рисунок 4.29).

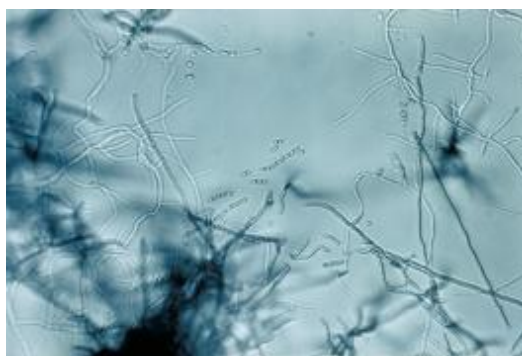


Рисунок 4.29 - Актиномицеты.

Подобную форму клеток имеют нокардии (рисунок 4.30).

Патогенные актиномицеты вызывают актиномикоз, нокардии - нокардиоз. Сапрофитные формы актиномицетов широко распространены в почве, многие из них являются продуцентами антибиотиков.

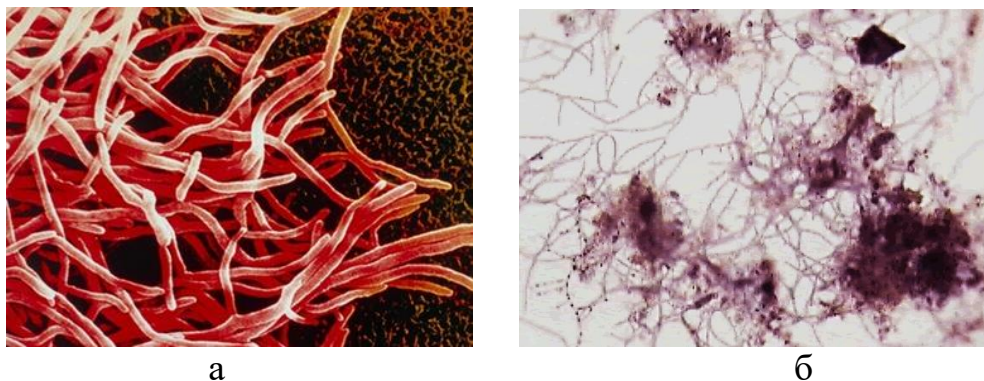


Рисунок 4.30 - Нокардии: а – компьютерное изображение; б - окраска по Граму.

## 4.2. Структура бактериальной клетки

Структура бактерий хорошо изучена с помощью электронной микроскопии целых клеток и их ультратонких срезов. В бактериальной клетке выделяют основные (постоянные) и временные (дополнительные) структуры. **Основные структуры** присущи всем бактериальным клеткам. К ним относятся клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма с включениями, нуклеоид. **Дополнительные структуры** имеются не у всех бактерий. К ним относятся капсула, жгутики, пили, плазмиды. Некоторые бактерии в неблагоприятных условиях способны образовывать споры (эндоспоры). Строение бактериальной клетки представлено на рисунке 4.31.

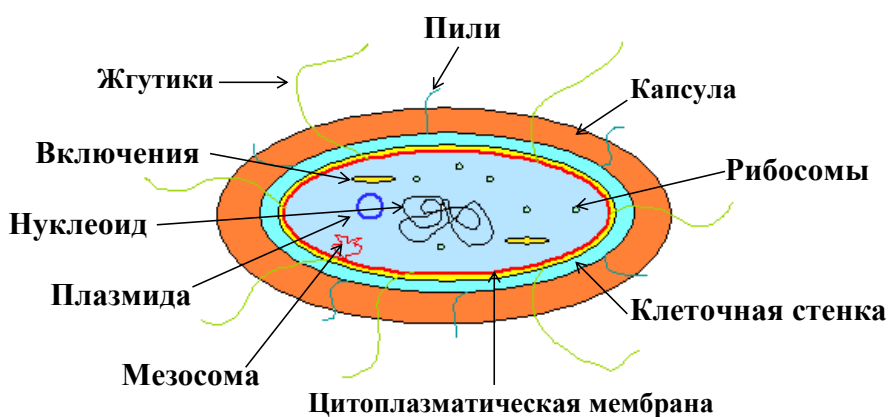


Рисунок 4.31 - Строение бактериальной клетки

**Бактериальная оболочка** состоит из клеточной стенки и располагающейся под ней цитоплазматической мембраны. **Клеточная стенка** - это ригидная структура, которая придает бактериальной клетке определенную форму. Она защищает внутреннее содержимое клетки от вредных воздействий внешней среды, участвует в процессах деления клетки и транспорта метаболитов. На поверхности клеточной стенки располагаются рецепторы для бактериофагов, бактериоцинов, антибиотиков и других химических веществ. По строению клеточной стенки различают

**фирмикутные** бактерии (грамположительные, толстостенные), **грациликотные** бактерии (грамотрицательные, тонкостенные) и бактерии, не имеющие клеточной стенки (**микоплазмы**). Подразделение бактерий на грамположительные (грамположительные) и грамотрицательные (грамнегативные) основано на разном восприятии красителей при окраске по методу, предложенному датским бактериологом **Г.К. Грамом** (рисунок 4.32).



Рисунок 4.32 - Ганс Кристиан Грам (Hans Christian Joachim Gram, 1853-1938 гг.).

**Клеточная стенка грамположительных бактерий** представляет собой гомогенный слой толщиной 20-80 нм. Она состоит из многослойного пептидогликана (муреина), пронизанного молекулами тейхоевой и липотейхоевой кислот (рисунок 4.33).

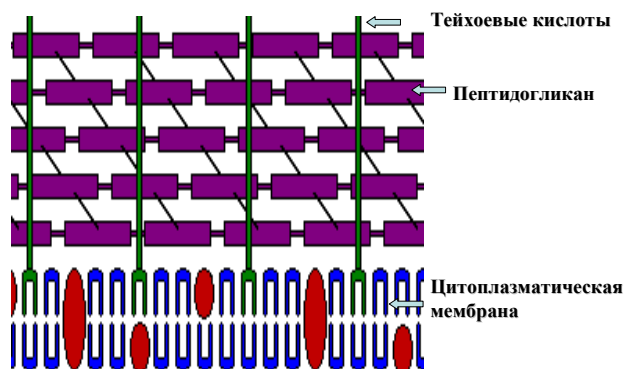


Рисунок 4.33 - Строение клеточной стенки грамположительных бактерий.

**Пептидогликан** клеточной стенки образован параллельно расположенными молекулами гликана, состоящего из остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных вдоль гликозидной связью. В поперечном направлении молекулы гликана соединены пептидной связью, состоящей из четырех аминокислот (тетрапептид). Строение пептидогликана представлено на рисунке 4.34.

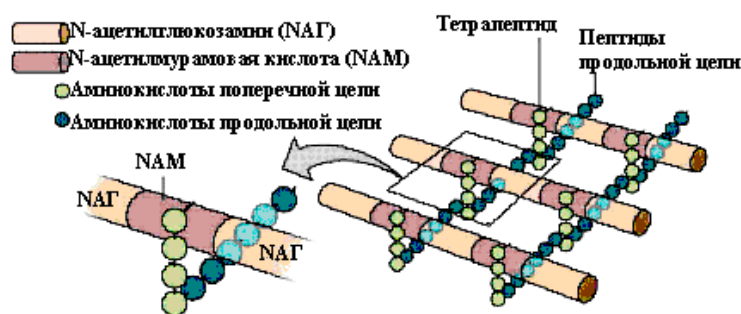


Рисунок 4.34 - Строение пептидогликана.

**Тейхоевые кислоты** (греч. *teichos* - стенка) представляют собой цепи из остатков глицерола и рибитола, соединенных фосфатными мостиками. Пептидогликан и тейхоевые кислоты в конечном итоге формируют так называемый **муреиновый мешок**, покрывающий клетку снаружи. Тейхоевые кислоты позволяют муреиновому мешку растягиваться и сжиматься, действуя наподобие пружин. Тейхоевые кислоты выполняют также антигенную и адгезивную функции грамположительных бактерий. Пептидогликан грамположительных бактерий плотно прилегает к цитоплазматической мембране. Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит также небольшое количество полисахаридов, белков и липидов. В клеточной стенке имеются поры диаметром 1-6 нм, через которые внутрь клетки проникают различные вещества.

При окраске по Граму толстый слой пептидогликана грамположительных бактерий удерживает генциановый фиолетовый в комплексе с йодом. Последующая обработка препарата спиртом вызывает сужение пор в пептидогликане и тем самым усиливает задержку фиолетового красителя в клеточной стенке. Заключительная окраска препарата фуксином не изменяет первоначальной окраски клеток. Грамположительные бактерии окрашиваются в **сине-фиолетовый цвет** (рисунок 4.35).

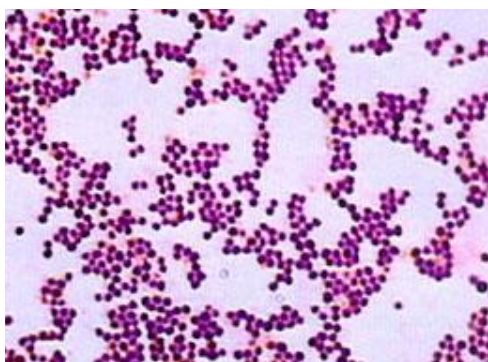


Рисунок 4.35 – Стафилококки, окраска по Граму.

**Клеточная стенка грамотрицательных бактерий** представляет собой структуру толщиной 14-18 нм. В ней выделяют внешнюю (наружную) мембрану (НМ) и тонкий пептидогликановый слой или **муреиновый мешок** (рисунок 4.36).



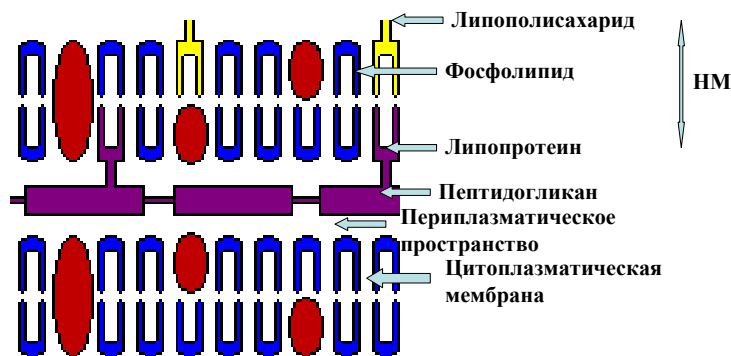


Рисунок 4.36 – Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

**Внешняя мембрана** грамотрицательных бактерий представляет собой фосфолипидный бислой, содержащий белки и липополисахарид. **Липополисахарид** (ЛПС) состоит из трех составных частей (рисунок 4.37):

- **липид А** - специфический гликолипид, встроенной в фосфолипидный бислой, закрепляющий молекулу ЛПС во внешней мембране и придающий липополисахариду токсические свойства;
- **ядро** - центральная (стержневая, коровая) область (лат. *core* - ядро) полисахаридной природы;
- **боковая О-цепь**, образованная повторяющимися олигосахаридами (О-антиген).

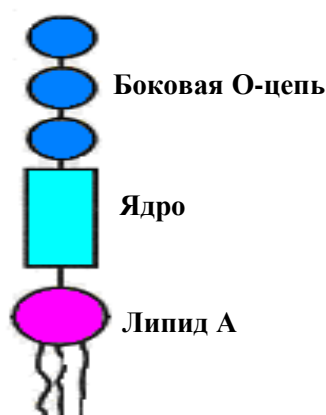


Рисунок 4.37 - Структура ЛПС грамотрицательных бактерий.

С помощью **мембранного липопротеина** внешняя мембрана связана с подлежащим слоем пептидогликана. **Пептидогликан** грамотрицательных бактерий является однослойным (толщина – 2-3 нм) и не содержит тейхоевых кислот. Под слоем пептидогликана располагается цитоплазматическая мембрана. Между внешней мембраной и цитоплазматической мембраной имеется полость, называемая **периплазматическим пространством (периплазмой)** толщиной не более 10 нм. Это пространство заполнено гелем, содержащим транспортные белки и ферменты (протеазы, липазы, фосфатазы, нуклеазы, бета-лактамазы).

**Белки** наружной мембраны включают порины, трансмембранные белки и белки, участвующие в формировании поверхностных структур (пилей, жгутиков). **Порины** образуют каналы для проникновения воды и мелких молекул (массой до

700 Да). **Трансмембранные белки** обеспечивают связь с муреиновым мешком.

При окраске по Граму тонкий слой пептидогликана грамотрицательных бактерий под воздействием этилового спирта утрачивает комплекс генцианового фиолетового и йода. При последующей обработке фуксином или сафранином клетки приобретают **красный цвет** (рисунок 4.38).

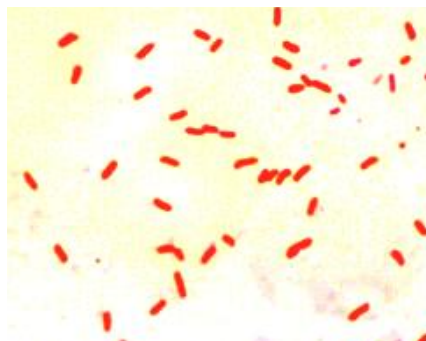


Рисунок 4.38 – Кишечная палочка, окраска по Граму.

Содержание муреина (пептидогликана) у грамположительных бактерий составляет 50-90% сухого вещества клеточной стенки, а у грамотрицательных бактерий - 1-12% (рисунок 4.39).

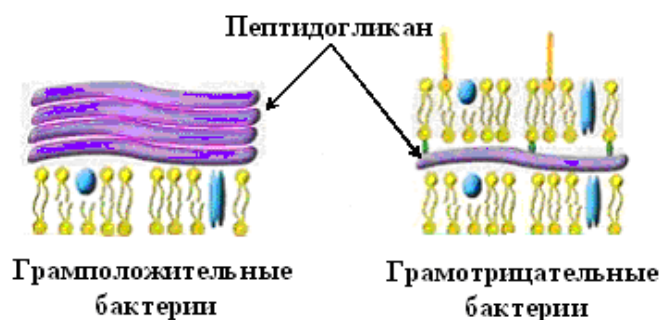


Рисунок 4.39 – Соотношение пептидогликана в клеточных стенках грамположительных и грамотрицательных бактерий.

К грамположительным бактериям относятся все кокки (за исключением гонококков и менингококков), спорообразующие палочки (бациллы и клостридии), микобактерии, коринебактерии, листерии. К грамотрицательным бактериям относятся гонококки и менингококки, не образующие спор палочки, извитые бактерии.

Клеточная стенка бактерий выполняет следующие функции:

- предохраняет клетку от вредных воздействий окружающей среды;
- обеспечивает постоянство формы клетки;
- сообщает бактериальной клетке антигенные свойства;
- регулирует рост и деление клетки;
- участвует в поступлении внутрь клетки некоторых молекул;
- обеспечивает тинкториальные свойства бактерий (отношение к красителям).

Под воздействием некоторых веществ (лизоцима, пенициллина, гуморальных

факторов организма) нарушается синтез компонентов клеточной стенки бактерий. В таких случаях бактерии полностью или частично лишаются клеточной стенки, образуя шаровидные формы. Такие формы имеют размеры, превышающие исходные клетки в несколько раз. Бактерии, полностью лишенные клеточной стенки, называются **протопластами**, а бактерии, частично сохранившие клеточную стенку, называются **сферопластами** (рисунок 4.40).



Рисунок 4.40 – Протопласты и сферопласты бактерий.

Образование протопластов характерно для грамположительных бактерий. Протопластообразование сопровождается утратой толстой пептидогликановой клеточной стенки. Протопласты содержат только цитоплазматическую мембрану (рисунок 4.41). Для их поддержания требуется изотоническая среда. Они устойчивы к антибиотикам и бактериофагам.

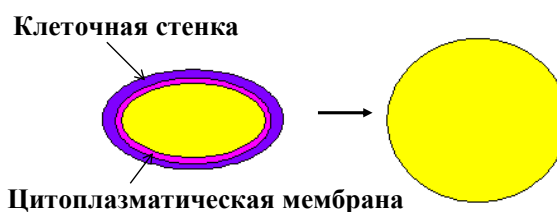


Рисунок 4.41 – Образование протопластов у бактерий.

Сферопласты образуются грамотрицательными бактериями. Образование сферопластов сопровождается утратой внешней мембраны клеточной стенки. Но сферопласты наряду с цитоплазматической мембраной содержат тонкий слой пептидогликана (рисунок 4.42).

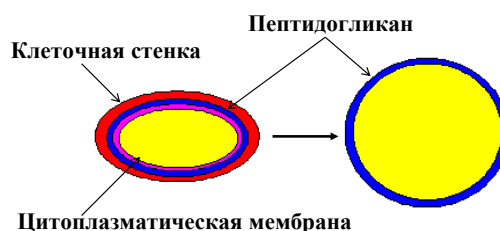


Рисунок 4.42 – Образование сферопластов у бактерий.

Для поддержания сферопластов также требуется среда с повышенным осмотическим давлением. Сферопласты способны взаимодействовать с бактериофагами, так как содержат остатки пептидогликанового слоя. После удаления ингибиторов, вызвавших нарушение синтеза клеточной стенки, измененные бактерии реверсируют в исходное состояние, то есть восстанавливают полноценную клеточную стенку и первоначальную форму клеток.

Бактерии, утратившие способность к синтезу пептидогликана под влиянием антибиотиков или других факторов и способные размножаться, называются L-формами (от названия Института им. Д. Листера в Лондоне, где они впервые были изучены). **L-формы** бактерий представляют собой осмотически чувствительные шаровидные или колбовидные клетки различной величины (рисунок 4.43).

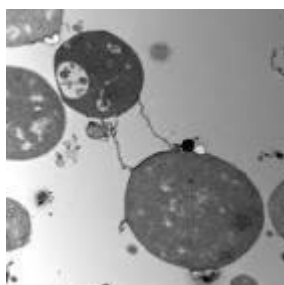


Рисунок 4.43 - L-формы бактерий.

Различают стабильные и нестабильные L-формы. Стабильные L-формы не способны к реверсии в исходные бактериальные клетки. Нестабильные L-формы возвращаются в исходную бактериальную форму после удаления фактора, приведшего к изменению бактерий. L-формы могут образовывать многие возбудители инфекционных болезней, в том числе в организме человека или животных. Образование L-форм бактерий называется **L-трансформацией**.

У некоторых микроорганизмов клеточная стенка имеет особенности строения. В частности, у хламидий клеточная стенка состоит из внутренней цитоплазматической мембраны и внешней мембраны. Каждая мембрана является двойной. В отличие от других грамотрицательных бактерий, клеточная стенка хламидий не имеет пептидогликанового слоя. В состав клеточной стенки хламидий входят пептиды и гликолипиды (аналоги липополисахаридов клеточной стенки грамотрицательных бактерий). Основными белками клеточной стенки хламидий являются белки внешней мембраны OMP 2 и MOMP (рисунок 4.44).

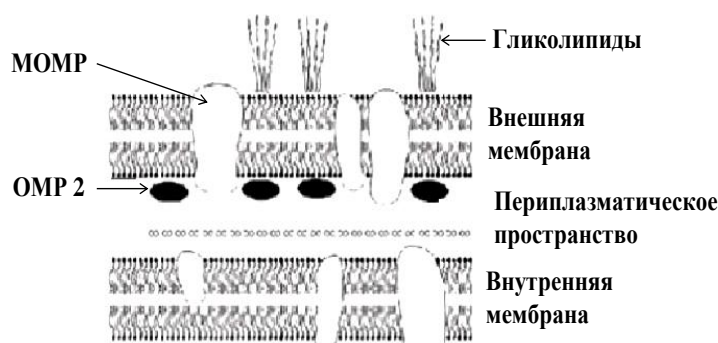


Рисунок 4.44 - Строение клеточной стенки хламидий.

**Цитоплазматическая мембрана** бактерий состоит из двойного слоя фосфолипидов (**бимолекулярный липидный слой**) и мембранных белков (рисунок 4.45).

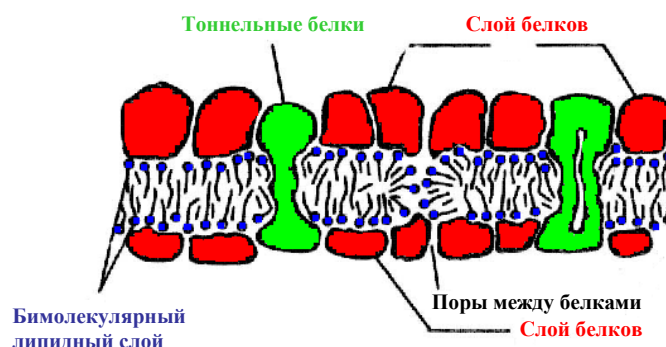


Рисунок 4.45 - Структура цитоплазматической мембраны.

Цитоплазматическая мембрана образует барьер, препятствующий движению веществ внутрь клетки и наружу. **Мембранные белки** подразделяются на поверхностные и погруженные (интегральные, тоннельные). Среди мембранных белков особую роль выполняют **пермеазы**, участвующие в транспорте веществ внутрь клетки (транспортная функция цитоплазматической мембраны).

Цитоплазматическая мембрана окружает цитоплазму бактерий и участвует в регуляции осмотического давления, транспорте веществ и энергетическом метаболизме клетки. Она играет значительную роль в процессах роста и деления клеток, в движении бактерий, в секреции веществ, в спорообразовании, то есть в процессах с высокой затратой энергии.

У многих бактерий в зоне формирования поперечных перегородок при делении клеток цитоплазматическая мембрана образует впячивания (инвагинаты, дивертикулы) в виде сложных мембранных структур. Эти структуры называются **мезосомами**. Они имеют форму цистерн, пузырьков, канальцев (рисунок 4.46).

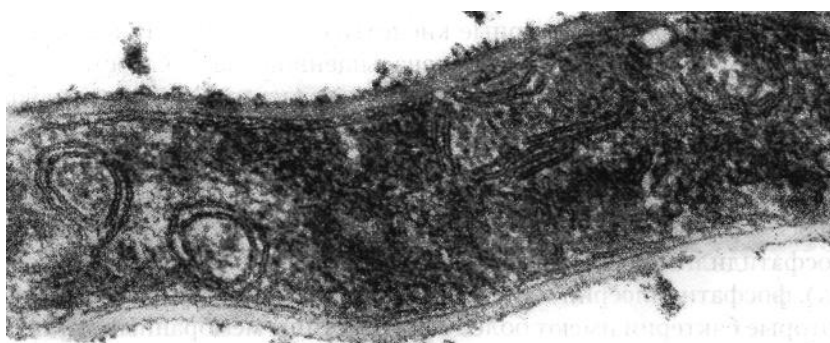


Рисунок 4.46 - Мезосомы у актиномицетов.

Выделяют три типа мезосом: **ламеллярные** (пластинчатые), **везикулярные** (имеющие форму пузырьков) и **тубулярные** (трубчатые). Эти мезосомы различаются по строению. Часто наблюдаются мезосомы смешанного типа. По своему расположению в клетке выделяют **септальные** мезосомы (располагаются в зоне клеточного деления и формирования поперечной перегородки или септы),

**латеральные** (инвагинации периферических участков цитоплазматической мембраны) и мезосомы, к которым прикреплен нуклеоид. Мезосомы выполняют функцию генерации энергии, участвуют в процессах роста и деления клеток, в синтезе углеводов, липидов и других компонентов клетки.

**Цитоплазма** является основной центральной частью клетки. Она отграничена цитоплазматической мембраной. Цитоплазма представляет собой коллоидную систему (цитозоль), состоящую из растворимых белков, рибонуклеиновых кислот, включений запасных органических веществ и многочисленных мелких гранул - рибосом. Включения придают цитоплазме мелкозернистый вид.

**Рибосомы** - это немембранные органоиды бактериальной клетки. Они служат для биосинтеза белка из аминокислот, находящихся в цитоплазме, на основе информации, предоставляемой матричной РНК (мРНК). Рибосомы впервые были описаны румынским биологом Джорджем Палладе в середине 1950-х годов. За определение структуры прокариотической рибосомы ученые из Великобритании Венкатраман Рамакришнан, американец Томас Стейц и ученая из Израиля Ада Йонат в 2009 г. удостоены Нобелевской премии по химии.

Рибосомы представляют собой мелкие образования сферической или овальной формы. Они имеют размер около 15-20 нм. Бактериальные рибосомы имеют коэффициент седиментации 70S и состоят из двух субъединиц - малой (30S) и большой (50S). Они представляют собой нуклеопротеид, в составе которого 60% составляет РНК и 40% - белок. Рибосомные РНК (рРНК) являются консервативными элементами бактерий. 16S рРНК входит в состав малой субъединицы рибосом, а 23S рРНК - в состав большой субъединицы рибосом. Изучение 16S рРНК позволяет оценивать степень родства микроорганизмов (геносистематика). Схематическое строение рибосом представлено на рисунке 4.47.

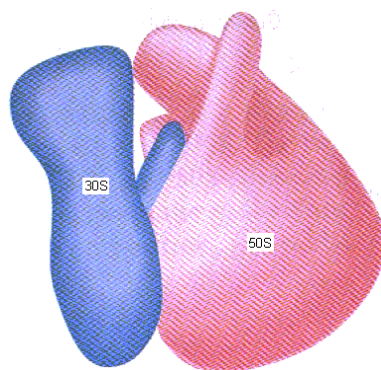


Рисунок 4.47 – Схематическое строение бактериальной рибосомы.

В цитоплазме бактерий находятся различные **включения** в виде гранул полисахаридов, жировых соединений и полифосфатов. Они накапливаются при избытке питательных веществ в окружающей среде и выполняют роль запасных веществ для питания и энергетических потребностей бактерий. **Гранулы полисахаридов** (рисунок 4.48) у одних бактерий содержат крахмал (нейссерии), у других – гликоген (бациллы, клостридии), у третьих - гранулезу (клостридии).

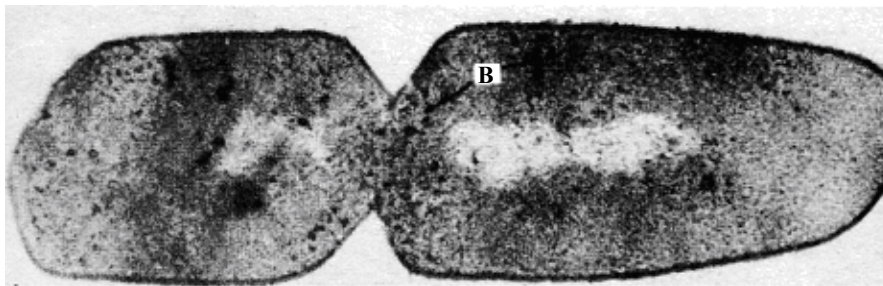


Рисунок 4.48 - Включения (В) гликогена в клетках клостридий.

**Жировые включения** состоят из поли- $\beta$ -оксималяной кислоты, нейтральных жиров и жироросковых веществ (у микобактерий, грибов). **Гранулы полифосфатов** (волютин) являются запасным резервуаром фосфатов, необходимых при синтезе АТФ и ДНК (у коринебактерий, микобактерий, актиномицетов). Волютин обладает сродством к основным красителям и легко выявляется с помощью специальных методов окраски (например, по Нейссеру) в виде метахроматических гранул. Характерное расположение гранул волютина выявляется у дифтерийной палочки в виде интенсивно прокрашивающихся полюсов клетки. При электронной микроскопии они имеют вид электронно-плотных гранул размером 0,1-1,0 мкм (рисунок 4.49).

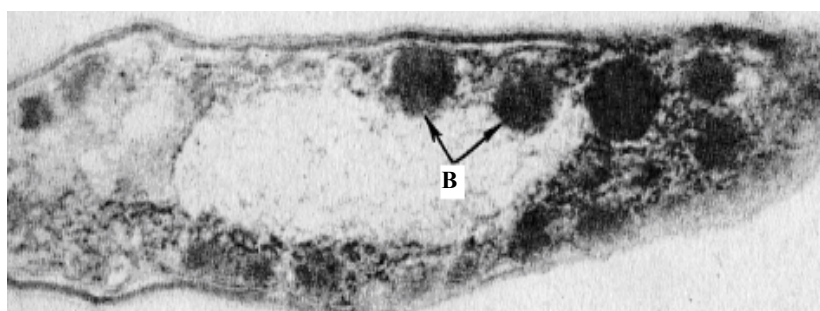


Рисунок 4.49 - Включения (В) зерен волютина в клетках *Corynebacterium diphtheriae*.

**Нуклеоид** является генетическим аппаратом бактерий (эквивалент ядра эукариотической клетки). Он расположен в центральной зоне бактериальной клетки и представляет собой двунитевую молекулу ДНК, замкнутую в кольцо и плотно уложенную наподобие клубка. ДНК в развернутом состоянии имеет длину более 1 мм. Нуклеоид бактерий, в отличие от ядра эукариотических клеток, не имеет ядерной оболочки, ядрышка и гистонов. Обычно в бактериальной клетке содержится одна хромосома, представленная замкнутой в кольцо молекулой ДНК. Нуклеоид выявляется в световом микроскопе после окраски специфическими для ДНК методами: по Фельгену или по Романовскому-Гимзе. При электронной микроскопии ультратонких срезов бактерий нуклеоид имеет вид светлых зон с нитевидными структурами ДНК, связанной определенными участками с цитоплазматической мембраной или мезосомой (рисунок 4.50).

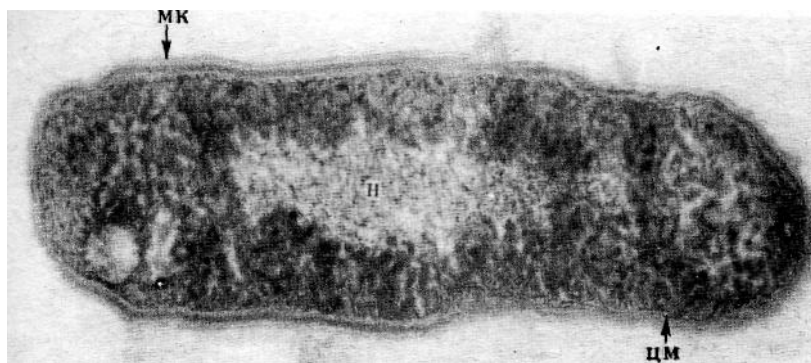


Рисунок 4.50 - Нуклеоид *Corynebacterium diphtheriae*: МК - микрокапсула, ЦМ - цитоплазматическая мембрана, Н - нуклеоид.

Кроме нуклеоида в цитоплазме бактериальной клетки могут находиться внехромосомные ковалентно замкнутые кольцевые молекулы ДНК или **плазмиды** (рисунок 4.51).

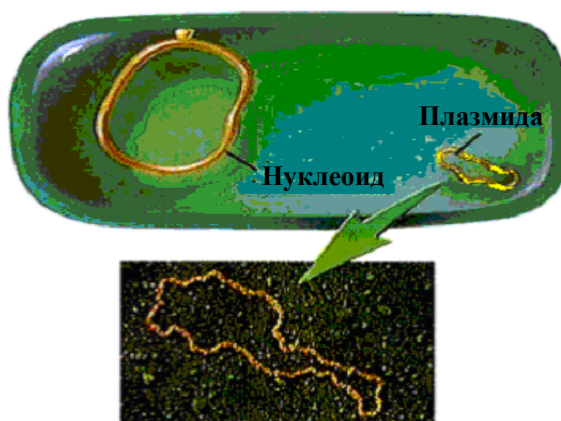


Рисунок 4.51 - Нуклеоид и плазида в бактериальной клетке.

Некоторые плазмиды могут быть интегрированы с бактериальной хромосомой. Плазмиды придают бактериальной клетке определенные селективные преимущества: устойчивость к антибиотикам (R-плазмиды), продуцирование бактериоцинов (Col-плазмиды), синтез токсинов (Tox-плазмиды) и др. Плазмиды, свойства которых не установлены, называются **криптическими**.

**Капсула** является надоболочечной структурой клетки. Она имеет четко очерченные внешние границы и слизистую консистенцию. Она прочно связана с клеточной стенкой бактерий. В зависимости от размеров различают макрокапсулу и микрокапсулу. **Макрокапсула** выявляется в световом микроскопе в виде неокрашенной зоны, окружающей клетку. Толщина макрокапсулы составляет более 0,2 мкм. Капсула хорошо различима в мазках-отпечатках из патологического материала и в мазках, приготовленных из чистых культур бактерий (рисунок 4.52).



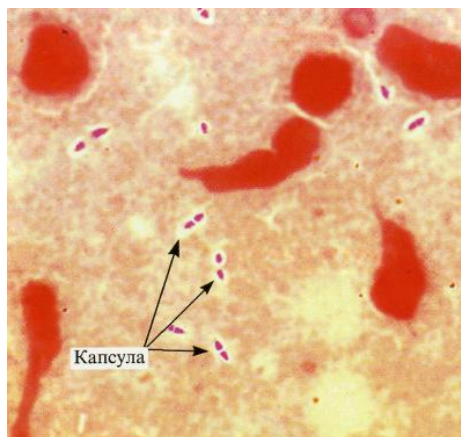


Рисунок 4.52 – Мазок-отпечаток: капсулы пневмококка, окраска по Граму.

В чистых культурах бактерий капсула выявляется путем окраски препарата по методу Бурри-Гинса. При этом используют тушь и раствор фуксина. Тушь создает темный фон вокруг капсулы, а бактерии окрашиваются фуксином в красный цвет (рисунок 4.53).



Рисунок 4.53 - Окраска капсульных бактерий по Бурри-Гинсу.

Капсула состоит из полисахаридов (экзополисахаридов), гликопротеинов, полипептидов. Например, у возбудителя сибирской язвы капсула состоит из полимеров D-глутаминовой кислоты. Капсула гидрофильна, включает большое количество воды. Капсула препятствует фагоцитозу бактерий в организме, способствует адгезии бактерий к субстратам, предохраняет бактерии от высыхания. Капсульные бактерии на плотных питательных средах формируют гладкие блестящие колонии слизистой консистенции. Утрата капсулы снижает патогенность бактерий.

Многие бактерии образуют **микрокапсулу** - слизистое образование на поверхности клетки толщиной менее 0,2 мкм. Микрокапсула выявляется только с помощью электронной микроскопии.

У некоторых бактерий на поверхности клеток обнаруживается слизистый слой. Он не имеет четких внешних границ и прочной связи с клеткой, поэтому легко от нее отделяется. Слизистый слой не виден при световой микроскопии. Он выявляется серологическими методами или при электронной микроскопии. Слизистый слой представляет собой мукоидные экзополисахариды.

**Жгутики** выполняют функцию органа движения бактериальной клетки. Они

представляют собой тонкие нити, берущие начало от цитоплазматической мембраны. Длина жгутиков значительно превышает размеры клетки. Жгутики выявляются при световой микроскопии только после специального окрашивания: серебрением по Морозову, окраской по Грею. Наиболее четко жгутики выявляются при электронной микроскопии при напылении тяжелыми металлами (рисунок 4.54).

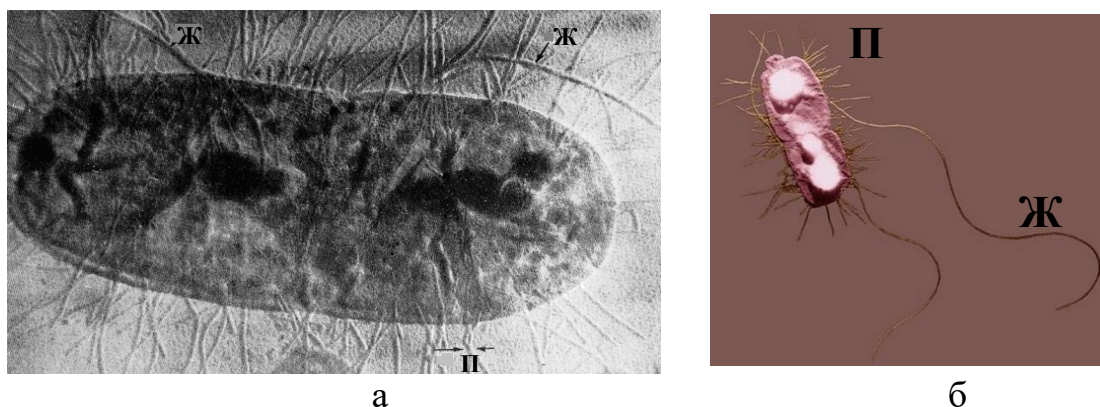


Рисунок 4.54 - Жгутики (Ж) и пили (П) кишечной палочки. Электронная микроскопия (а) и компьютерное изображение (б).

Толщина жгутиков равна 12-20 нм, длина - 3-15 мкм. Жгутик состоит из 3 частей:

- базальное тельце;
- крюк (колесо);
- спиралевидная нить (филамент, собственно жгутик).

Базальное тельце включает в себя стержень с системой дисков и белки мотора. Диска́ми жгутики прикреплены к цитоплазматической мембране и клеточной стенке. Базальное тельце является своего рода электромотором, вращающим жгутик (рисунок 4.55).

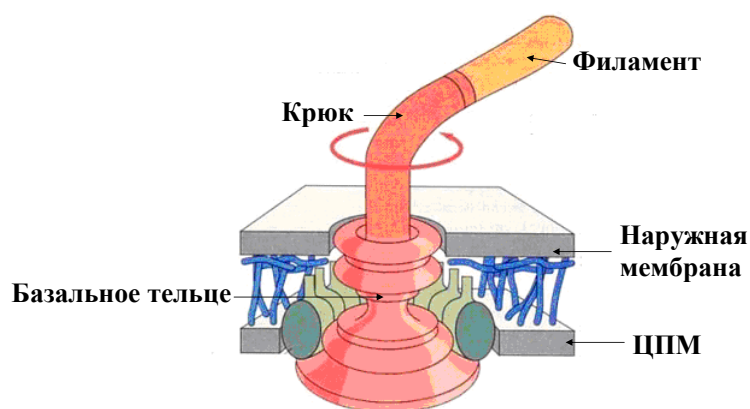


Рисунок 4.55 - Строение жгутика грамотрицательной бактерии.

У грамотрицательных бактерий имеется две пары дисков, а у грамположительных бактерий - одна пара дисков (рисунок 4.56).

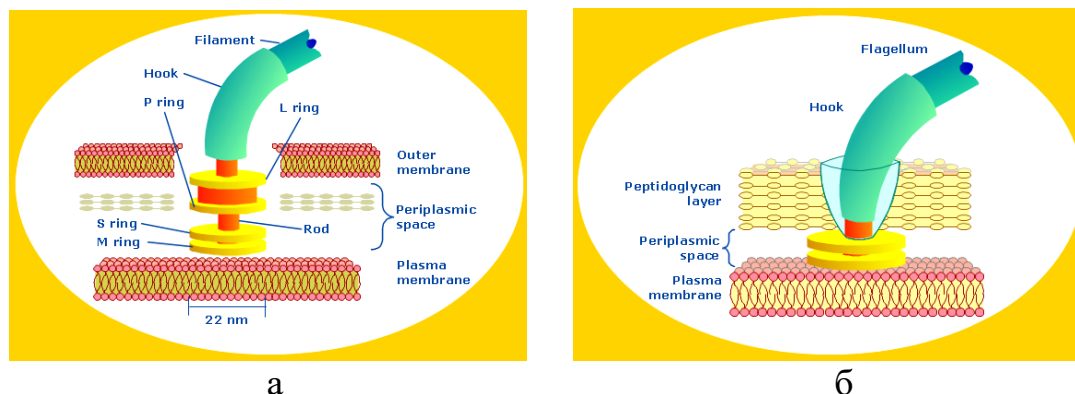


Рисунок 4.56 – Строение жгутиков у грамотрицательных (а) и грамположительных (б) бактерий.

В качестве источника энергии при движении жгутиков используется разность потенциалов на цитоплазматической мембране. Скорость вращения жгутика может достигать 100 об/с. При наличии у бактерии нескольких жгутиков они начинают синхронно вращаться, сплетаясь в единый пучок, образующий своеобразный пропеллер. Жгутики вращаются по часовой или против часовой стрелки. В зависимости от этого клетка движется либо вперед, либо назад.

Жгутики состоят из особого белка **флагеллина** (*flagellum* - жгутик). Этот белок обладает высокой антигенной активностью (Н-антиген бактерий). Субъединицы флагеллина закручены в виде спирали. Количество и расположение жгутиков у разных видов бактерий варьирует. Бактериальная клетка может содержать до 1000 жгутиков. В зависимости от количества и локализации жгутиков выделяют следующие группы бактерий (рисунок 4.57):

- **монотрихи** (греч. *monos* - один, *trichos* - волос) - бактерии, имеющие один жгутик, например, холерный вибрион;
- **лофотрихи** (греч. *lophos* - пучок, *trichos* - волос) - бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном из концов клетки, например, кампилобактерии;
- **амфитрихи** (греч. *amphi* - с обеих сторон, *trichos* - волос) - бактерии, имеющие по одному жгутику или пучку жгутиков на противоположных концах клетки, например, спириллы;
- **перитрихи** (греч. *peri* - около, *trichos* - волос) - бактерии, имеющие большое количество жгутиков, покрывающих всю поверхность клетки, например, кишечная палочка.

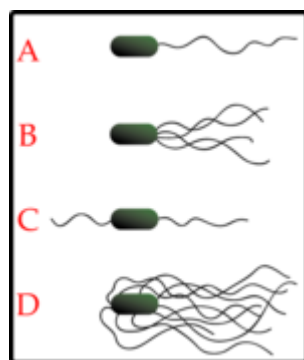


Рисунок 4.57 – Схематическое расположение жгутиков у бактерий: А- монотрих; В – лофотрих; С – амфитрих; D – перитрих.

**Пили** (фимбрии, ворсинки) - это нитевидные выросты на поверхности клетки. Они имеют толщину 2-10 нм и длину 0,3-20 мкм. Пили располагаются либо перитрихально, либо локализуются на одном из концов клетки. Пили берут начало от цитоплазматической мембраны и состоят из белка **пилина**. Белковые субъединицы закручены вокруг полой сердцевины. Пили встречаются как у подвижных, так и неподвижных бактерий. Они обладают антигенностью. Различают **общие пили** или **пили первого типа** (пили-адгезины, отвечают за адгезию бактерий к различным субстратам) и половые пили, **пили второго типа** или **конъюгативные пили** (F-пили). Общие пили детерминируются хромосомными генами, а конъюгативные пили - внехромосомным фактором фертильности (F-плазмидой). Обычно на одну клетку приходится несколько сотен пилей, среди них обнаруживается 1-3 половых пили (рисунок 4.58).

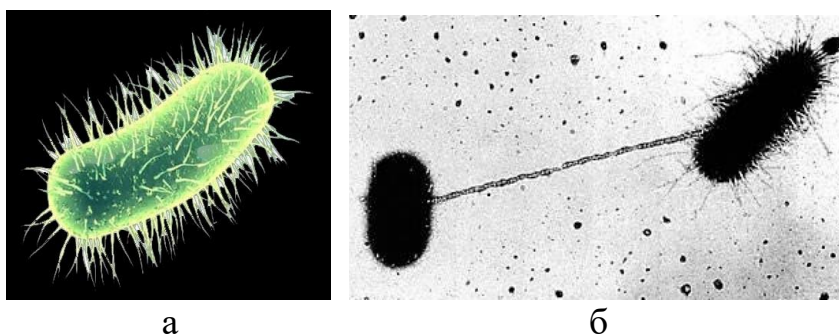


Рисунок 4.58 – Общие (а) и конъюгативные (б) пили.

**Эндоспора** (лат. *spora* - семя, посев) - это устойчивая к неблагоприятным воздействиям покоящаяся форма некоторых грамположительных бактерий. Спорообразование является формой сохранения наследственной информации в неблагоприятных условиях. Эндоспоры образуются внутри вегетативных клеток бактериями родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* (рисунок 4.59).



Рисунок 4.59 - Электронограмма ультратонкого среза столбнячной палочки в процессе спорообразования.

Споры образуются при неблагоприятных условиях существования бактерий (высушивание, дефицит питательных веществ и др.). Внутри бактериальной клетки образуется одна эндоспора. Образование эндоспор способствует сохранению вида и не является способом размножения бактерий. Схема образования спор представлена на рисунке 4.60.

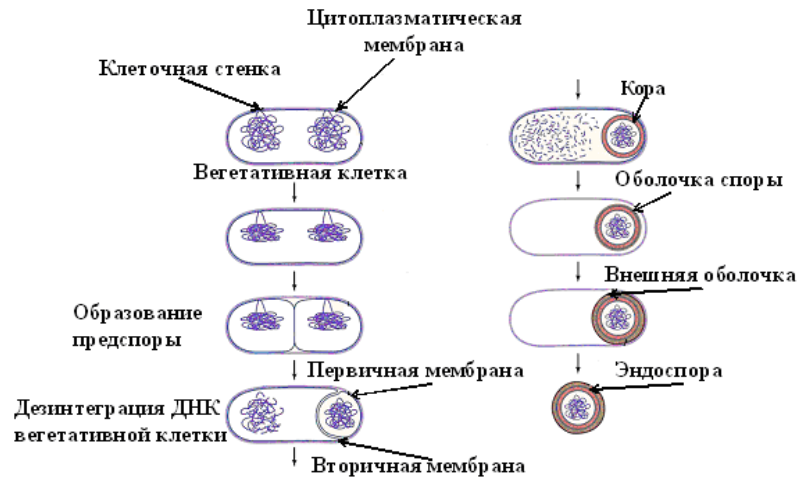


Рисунок 4.60 - Схема образования спор у бактерий.

Процесс спорообразования протекает в несколько этапов. Вначале цитоплазматическая мембрана врастает внутрь клетки и окружает нуклеоид с частью цитоплазмы, формируя **спорогенную зону**. В результате этого клетка разделяется на две части, одна из которых содержит нуклеоид и является будущей спорой. **Стадия предспоры** характеризуется образованием двухслойной оболочки, между мембранами которой в дальнейшем формируется толстый пептидогликановый слой - **кортекс** (кора). **Стадия созревания споры** сопровождается включением большого количества дипиколиновой кислоты и ионов кальция в споровую оболочку. На этой стадии спора покрывается толстой многослойной оболочкой. В последующем остатки материнской клетки лизируются и зрелая спора высвобождается в окружающую среду.

С помощью электронной микроскопии установлено, что снаружи спора имеет тонкую оболочку (экзоспориум), которая представляет собой 2-3-слойное желатинообразное покрытие. Под экзоспориумом располагается оболочка споры. Под оболочкой находится кортекс, внутри которого обнаруживается клеточная стенка споры или стенка ядра споры (стенка сердцевины). Ядро споры содержит нуклеоид, рибосомы, ферменты, белки и другие соединения (рисунок 4.61).

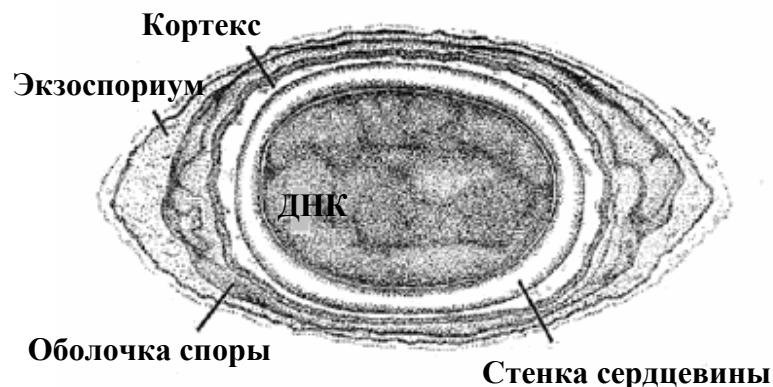
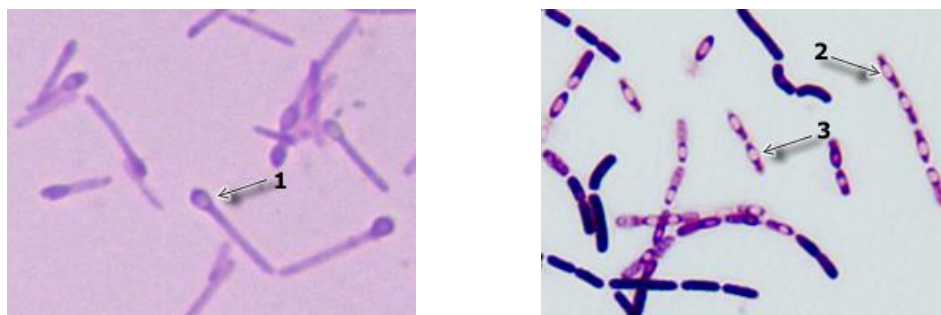


Рисунок 4.61 - Электронная микрофотография споры.

Образование споры продолжается в течение 18-20 часов. Расположение спор в

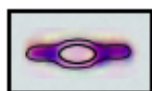
вегетативной клетке бацилл и клостридий может быть **субтерминальным** (у возбудителя ботулизма), **терминальным** (у возбудителя столбняка) и **центральный** (у возбудителя сибирской язвы) Локализация эндоспор в клетке представлена на рисунке 4.62.



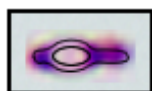
**Расположение спор:**



**1 - терминальное**



**2 - центральное**



**3 - субтерминальное**

Рисунок 4.62 - Расположение спор в вегетативных клетках клостридий и бацилл.

Споры кислотоустойчивы. Для их окраски используют метод Ожешко (Ауески) или Циля-Нельсена. При этом эндоспоры окрашиваются в красный цвет, а вегетативные клетки - в сине-фиолетовый цвет (рисунок 4.63).

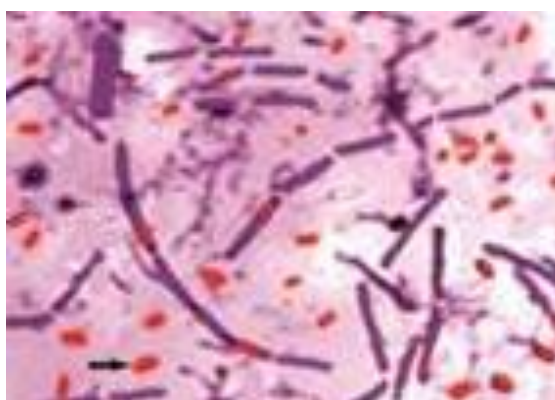


Рисунок 4.63 - Вегетативные клетки и споры сибирязвенного микроба, Окраска по методу Циля-Нельсена.

При попадании споры в благоприятные условия происходит ее прорастание. **Прорастание споры** осуществляется в течение 4-5 часов. В процессе прорастания выделяют несколько стадий. Вначале отмечается **стадия активации**: изменяются

мембранные ферменты, проявляется дыхательная активность. Затем наступает **стадия инициации**, при которой спора активно поглощает воду, набухает, утрачивает термоустойчивость. Образование зрелой вегетативной клетки происходит во время **стадии выростания**, в течение которой происходит синтез белков и образование клеточных структур. Из одной споры вырастает одна вегетативная клетка (рисунок 4.64).

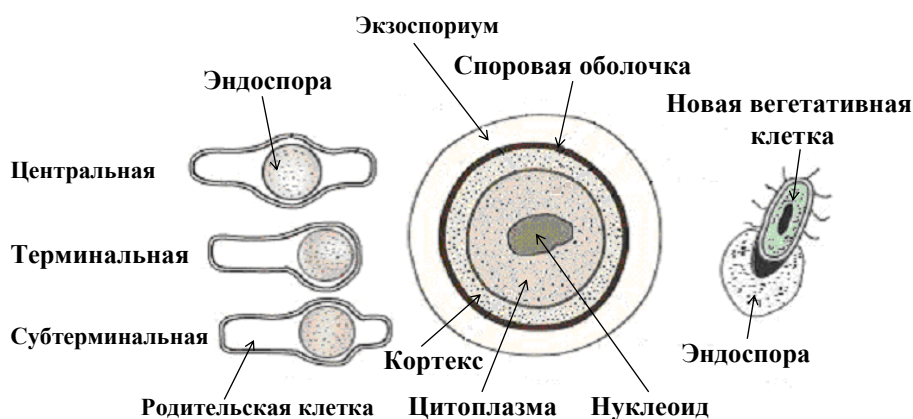


Рисунок 4.64 – Схематическое изображение процесса образования спор и вегетативных клеток.

Клетки некоторых микроорганизмов имеют особое строение. В частности, у спирохет при электронной микроскопии на поверхности клеток выявляется непостоянный мукоидный S-слой. Основным структурным элементом спирохет является **протоплазматический цилиндр**, который представляет собой цитоплазму, окруженную цитоплазматической мембраной и пептидогликановым слоем. Протоплазматический цилиндр закручен вокруг осевых (аксиальных) **фибрилл** (эндофлагелл, жгутиков), объединенных в **периплазматическую нить** и являющихся двигателем клетки. Протоплазматический цилиндр и осевые фибриллы покрыты внешней мембраной (оболочкой). В цитоплазме протоплазматического цилиндра располагается нуклеоид спирохет.

Один конец каждой фибриллы закреплен с помощью крюка в цитоплазматической мембране вблизи полюса протоплазматического цилиндра, а другой конец остается свободным. Пространство между цитоплазматической мембраной и внешней оболочкой, в котором располагаются фибриллы, называется периплазматическим пространством или **эндофлагеллярным комплексом** (рисунок 4.65).

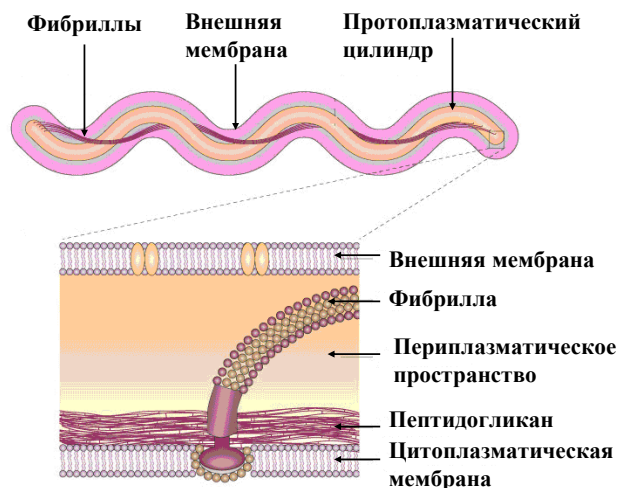


Рисунок 4.65 - Схематическое строение спирохет.

Таким образом, бактериальная клетка имеет сложное строение. Представители разных таксономических групп бактерий имеют специфическую форму, размеры и особенности строения. Форма, размер бактериальных клеток, наличие у них капсулы, жгутиков и пилей, их способность образовывать эндоспоры характеризуют **морфологические свойства бактерий**, а отношение к анилиновым красителям определяют их тинкториальные свойства.

### 4.3. Вопросы для контроля усвоения материала

1. В чем измеряются размеры бактериальных клеток?
2. Назовите основные формы бактерий.
3. Охарактеризуйте кокковые формы бактерий.
4. Перечислите виды кокковых бактерий.
5. Дайте характеристику палочковидных бактерий.
6. Чем отличаются бациллы от клостридий?
7. Охарактеризуйте палочковидные бактерии.
8. Что представляют собой извитые бактерии?
9. Чем отличаются извитые бактерии друг от друга?
10. Чем отличаются извитые бактерии от изогнутых палочек?
11. Назовите основные структуры бактериальной клетки.
12. Перечислите временные структуры бактериальной клетки.
13. Расскажите о различиях бактериальных оболочек грамположительных и грамотрицательных бактерий.
14. Расскажите о протопластах, сферопластах, L-формах бактерий.
15. Охарактеризуйте строение цитоплазматической мембраны бактерий.
16. Что представляет собой цитоплазма бактерий?
17. Какое строение имеют бактериальные рибосомы и какова их функция?
18. Какие включения присутствуют в цитоплазме бактерий?
19. Чем представлен генетический аппарат бактерий?
20. Что представляют собой капсула бактерий, микрокапсула, слизистые



слои?

21. Охарактеризуйте строение жгутиков бактерий.
22. Расскажите о строении и функциях пилей.
23. Дайте характеристику эндоспор бактерий.

#### 4.4. Тренировочные тесты

1. В каких единицах измеряются размеры бактерий:

- в сантиметрах
- в миллиметрах
- + в микрометрах
- в нанометрах
- в ангстремах

2. Какие бактерии имеют спиралевидную форму?

- стафилококки
- + спирохеты
- + боррелии
- бациллы
- клостридии

3. К извитым формам бактерий относятся:

- бациллы
- + лептоспиры
- сальмонеллы
- стафилококки
- + трепонемы

4. В виде цепочек располагаются:

- стафилококки
- микрококки
- + стрептококки
- эшерихии
- лептоспиры

5. Сарцины располагаются:

- одиночно
- попарно
- по 4 клетки
- + в виде пакетов
- в виде гроздьев винограда

6. Стафилококки располагаются:

- одиночно
- попарно

- по 4 клетки
- в виде пакетов
- + в виде гроздьев винограда

7. Диплококки располагаются:

- одиночно
- + попарно
- по 4 клетки
- в виде пакетов
- в виде гроздьев винограда

8. Одну плоскость деления имеют:

- + микрококки
- + стрептококки
- тетракокки
- + диплококки
- сарцины

9. Две плоскости деления имеют:

- микрококки
- стрептококки
- + тетракокки
- диплококки
- сарцины

10. Три плоскости деления имеют:

- микрококки
- стрептококки
- тетракокки
- диплококки
- + сарцины

11. Основными формами бактерий являются:

- + шаровидные (кокки)
- + палочковидные
- + извитые
- звёздчатые
- овоидные

12. К извитым бактериям относятся:

- + спириллы
- + спирохеты
- бациллы
- клостридии
- шигеллы

13. К диплококкам относятся:

- + менингококки
- + гонококки
- бациллы
- стрептококки
- стафилококки

14. К палочковидным микробам относятся:

- + бактерии
- + бациллы
- + клостридии
- микрококки
- диплококки

15. Прокариотические клетки содержат:

- ядро
- + нуклеоид
- + мезосомы
- митохондрии
- аппарат Гольджи

16. Эукариотические клетки содержат:

- нуклеоид
- + ядро
- + аппарат Гольджи
- плазмиды
- мезосомы

17. Какая структура клеточной стенки бактерий отвечает за адгезию к поверхности эукариотической клетки?

- + капсула
- жгутики
- + пили
- нуклеоид
- мезосома

18. Клеточная стенка бактерий выполняет функции:

- защиту от фагоцитоза
- адгезивную
- дыхательную
- + формообразующую
- двигательную

19. Ригидность клеточной стенки бактерий определяет наличие в ее составе:

- белков
- липидов

- тейхоевых кислот
- + пептидогликана
- полисахаридов

20. Форму бактериальной клетки определяет:

- спора
- жгутики
- плазматическая мембрана
- капсула
- + клеточная стенка

21. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий содержит:

- РНК
- + липополисахарид
- пенициллиназу
- бета-лактамазу
- тейхоевые кислоты

22. В состав пептидогликана клеточной стенки входит:

- + тетрапептид
- липополисахарид
- тейхоевая кислота
- + N-ацетилглюкозамин
- флагеллин

23. В состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий входят:

- + пептидогликан
- + липополисахарид
- тейхоевая кислота
- пилин
- флагеллин

24. Липополисахариды грамотрицательных бактерий входят в состав:

- цитоплазматической мембраны
- + клеточной стенки
- капсулы
- нуклеоида
- споровой оболочки

25. Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит:

- + пептидогликан
- + тейхоевые кислоты
- липополисахарид
- рибосомы
- мезосомы

26. N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота входят в состав:

- + клеточной стенки грамположительных бактерий
- + клеточной стенки грамотрицательных бактерий
- микоплазм
- цитоплазмы бактерий
- нуклеоида бактерий

27. Окрашивание грамотрицательных бактерий в красный цвет объясняется:

- образованием в клетке нерастворимого в спирте комплекса веществ
- химической реакцией между йодом и фуксином
- химической реакцией между раствором Люголя и генцианвиолетом
- химической реакцией между фуксином и генцианвиолетом
- + обесцвечиванием клеточной стенки спиртом

28. Окрашивание грамположительных бактерий в фиолетовый цвет объясняется:

- высоким содержанием в клеточной стенке липидов
- + высоким содержанием в клеточной стенке пептидогликана
- + наличием в клеточной стенке тейхоевых кислот
- высокой концентрацией в клетке углеводов
- наличием капсулы

29. Центром метаболической активности бактериальной клетки является:

- + цитоплазматическая мембрана
- клеточная стенка
- метахроматические гранулы
- капсула
- жгутики

30. Функции цитоплазматической мембраны бактериальной клетки:

- + дыхание
- + размножение
- движение
- формообразование
- защита от фагоцитоза

31. Компонент цитоплазматической мембраны бактериальной клетки:

- белок флагеллин
- тейхоевые кислоты
- + фосфолипиды
- дипиколиновая кислота
- N-ацетилглюкозамин

32. Мезосомы бактерий:

- являются производными капсулы
- представляют собой скопления рибосом
- + представляют собой производные клеточной мембраны

- + участвуют в делении клетки
- являются органом движения

33. Мезосомы бактериальной клетки выполняют функцию:

- защиты от фагоцитоза
- защиты от неблагоприятных факторов внешней среды
- + дыхательную
- адгезивную
- двигательную

34. Нуклеоид бактерий:

- это цитоплазма клетки
- окружен ядерной мембраной
- состоит из РНК
- + состоит из ДНК
- содержит аппарат Гольджи

35. Плазмида это:

- фрагмент клеточной мембраны
- фрагмент споровой оболочки
- + кольцевая молекула ДНК
- скопление бактериальных рибосом
- орган движения бактерий

36. Жгутики выявляют при окраске мазка:

- по Граму
- по Бурри-Гинсу
- по Ожешко
- + серебрением по Морозову
- по Цилю-Нильсену

37. Жгутики бактерий состоят из:

- пептидогликана
- полисахаридов
- + белка флагеллина
- тейхоевых кислот
- белка пилина

38. Жгутики бактерий состоят из:

- головки
- + базального тельца
- + крюка
- + филамента
- чехла

39. Жгутики у бактерий выполняют функцию:

- адгезии
- защиты от фагоцитоза
- + движения
- дыхания
- формообразующую

40. Бактерии с одним жгутиком называют:

- лофотрихами
- + монотрихами
- амфитрихами
- перитрихами
- спириллами

41. Бактерии со жгутиками по всей поверхности клетки называют:

- лофотрихами
- монотрихами
- амфитрихами
- + перитрихами
- спириллами

42. Бактерии с пучком жгутиков на конце клетки называют:

- + лофотрихами
- монотрихами
- амфитрихами
- перитрихами
- спириллами

43. Ворсинки общего типа выполняют функцию:

- защиты от фагоцитоза
- защиты от неблагоприятных факторов внешней среды
- дыхательную
- + адгезивную
- двигательную

44. Ворсинки второго типа выполняют функцию:

- двигательную
- адгезивную
- + участвуют в конъюгации
- защиты от фагоцитоза
- дыхательную

45. За сохранение бактерий в неблагоприятных условиях среды отвечают:

- жгутики
- зерна волютина
- + эндоспоры
- плазмиды

- нуклеоид

46. Споры бактерий:

- + устойчивы к действию неблагоприятных факторов
- являются органом движения бактерий
- встречаются у патогенных кокков
- отвечают за адгезию бактерий
- имеют жгутики

47. Эндоспоры образуют:

- грамположительные кокки
- + бациллы
- спирохеты
- + клостридии
- грамотрицательные палочки

48. Спорообразование у бактерий это способ:

- размножения
- + выживаемости
- передвижения
- питания
- проникновения в организм

49. К спорообразующим бактериям относятся:

- стафилококки
- стрептококки
- + бациллы
- вибрионы
- + клостридии

50. Эндоспоры бактерий выполняют функцию:

- защиты от фагоцитоза
- + защиты от неблагоприятных факторов внешней среды
- дыхательную
- размножения
- двигательную

51. Устойчивость бактериальных спор во внешней среде обеспечивается

- наличием капсулы
- + низким содержанием воды
- + наличием дипиколиновой кислоты
- отсутствием нуклеиновых кислот
- + наличием многослойной оболочки

52. Капсула бактерий выполняет функцию:

- + защиты от фагоцитоза



- защиты от неблагоприятных факторов внешней среды
- дыхательную
- формообразующую
- двигательную

53. Внутриклеточные включения у бактерий являются:

- фактором защиты от фагоцитоза
- фактором защиты от неблагоприятных воздействий внешней среды
- + запасом питательных веществ
- источником кислорода
- местом спорообразования

54. Необязательными компонентами бактериальной клетки являются:

- нуклеоид
- + капсула
- цитоплазматическая мембрана
- + споры
- + жгутики

55. Обязательными компонентами бактериальной клетки являются:

- жгутики
- + нуклеоид
- пили
- + цитоплазматическая мембрана
- споры

56. Перечислите основные структуры клетки прокариотов:

- + нуклеоид
- + цитоплазма
- + клеточная стенка
- аппарат Гольджи
- митохондрии

57. Перечислите 3 метода выявления нуклеоида:

- + окраска методом Романовского-Гимзы
- + метод Фельгена
- + электронная микроскопия
- метод Пешкова
- люминесцентная микроскопия

58. Назовите поверхностные структуры бактериальной клетки:

- + жгутики
- + пили
- нуклеоид
- рибосомы
- цитоплазматическая мембрана

59. Назовите расположение споры внутри клетки:

- латеральное
- + центральное
- + субтерминальное
- + терминальное
- угловое

60. В состав цитоплазматической мембраны бактериальной клетки входят:

- + белки
- + фосфолипиды
- + углеводы
- пептидогликан
- факторы роста

61. Перечислите функции цитоплазматической мембраны:

- + активный транспорт веществ
- + дыхание
- формообразующая
- + участие в репликации нуклеоида
- + участие в клеточном делении

62. Функции пептидогликана клеточной стенки:

- + механическая защита
- + формообразующая
- участие в делении клетки
- участие в питании клетки
- спорообразующая

63. Назовите типы бактериальных капсул:

- фосфолипидный слой
- + микрокапсула
- + макрокапсула
- + слизистый слой
- липидный слой

64. Функции капсулы бактерий:

- + защита от фагоцитоза
- + защита от действия антител
- защита от ультрафиолетовых лучей
- защита от действия лизоцима
- защита от высокой температуры

65. По химической природе бактериальные капсулы могут быть:

- + белковыми
- + полисахаридными
- + белково-полисахаридными

- липидными
- липополисахаридными

66. Микрокапсулу имеют:

- шигеллы
- возбудитель сибирской язвы
- + энтеропатогенная кишечная палочка
- + возбудитель коклюша
- + стрептококки

67. Макрокапсулу образуют:

- + пневмококки
- + сибиреязвенная палочка
- энтеропатогенная кишечная палочка
- возбудитель коклюша
- возбудитель туберкулеза

68. Капсула у бактерий выявляется с помощью:

- + окраски по методу Бурри-Гинса
- + электронной микроскопии
- окраски по методу Грамма
- окраски по методу Циля-Нильсена
- окраски по методу Лёффлера

69. В клетках прокариотов встречаются включения:

- + полисахаридов
- + полифосфатов
- + соединения серы
- соли тяжелых металлов
- витамины

70. Спирохеты содержат:

- + цитоплазматический цилиндр
- + фибриллы
- + блефаропласт
- аппарат Гольджи
- ядерную мембрану

71. Способы размножения спирохет:

- + поперечное деление
- + образование цист
- почкование
- фрагментация
- спорами

72. К патогенным спирохетам относятся:

- хламидии
- + трепонемы
- + боррелии
- + лептоспиры
- микоплазмы

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 5. Бактериоскопические методы исследования

### 5.1. Введение

При микробиологической диагностике бактериальных инфекций используются следующие методы исследования:

1. **Микроскопический (бактериоскопический) метод.** Он направлен на обнаружение в исследуемом материале бактерий - возбудителей инфекций и изучение их морфологических и тинкториальных свойств. Морфологические свойства характеризуются формой и размером клеток, а тинкториальные свойства – отношением микроорганизмов к красителям.

2. **Бактериологический метод.** Этот метод предусматривает выделение чистой культуры возбудителя и его идентификацию путем изучения морфологических, культуральных и биохимических свойств микроорганизмов. Культуральные свойства описываются характером роста микробов на питательных средах (форма, размер, особенности колоний, формирующихся на плотных средах, а также характер роста культуры в жидких средах). Биохимические свойства характеризуются способностью к ферментации углеводов (сахаролитическая активность), белков (протеолитическая активность), липидов (липолитические свойства) и других соединений.

3. **Биологический метод.** Он направлен на изучение особенностей взаимодействия возбудителя с макроорганизмом, патогенности и вирулентности возбудителя путем введения в организм лабораторных животных чистой культуры бактерий.

4. **Серологический метод.** С помощью серологических реакций изучается антигенная структура возбудителя и определяются антитела, образующиеся в организме человека или лабораторных животных в ответ на внедрение антигена (возбудителя).

5. **Аллергологический метод** позволяет определить реакцию организма на воздействие антигенов – аллергенов.

6. **Молекулярно-генетические методы** позволяют выявлять фрагменты генома возбудителя в исследуемом материале с помощью молекулярной гибридизации или полимеразной цепной реакции.

Часто при диагностике бактериальных инфекций первостепенное значение приобретают микроскопические (бактериоскопические) методы, позволяющие обнаружить и изучить морфологические и тинкториальные свойства микробов, то есть предположить этиологию заболевания и определить чистоту выделенной культуры. Следовательно, микроскопический метод является первым этапом микробиологической диагностики. Однако этот метод имеет ориентировочное значение, так как его чувствительность составляет примерно 100000 клеток в 1 мл исследуемого материала.

Для микроскопического исследования применяют световую микроскопию и ее разновидности (темнопольную микроскопию, фазово-контрастную микроскопию, люминесцентную микроскопию), а также электронную микроскопию.

## 5.2. История открытия микроскопа

Микробные клетки измеряются в микрометрах – мкм ( $10^{-6}$  м). Средний размер микробных клеток составляет 1-4 мкм, а глаз человека способен различать объекты размером 100 мкм и более. Поэтому микробы невооруженным глазом увидеть нельзя. Для визуализации микроорганизмов их изображение увеличивают с помощью специальных оптических приборов, называемых **микроскопами** (*micro* - мелкий, *scopio* - смотрю, вижу). Процесс изучения формы и структуры микробных клеток с помощью микроскопа называется **микроскопией**. В 1624 г. итальянский физик **Галилео Галилей** разработал оптическое устройство (рисунок 5.1), которое он назвал “оккиолино” (итал. *occholino* – маленький глаз).



Рисунок 5.1 – “Оккиолино” Галилео Галилея.

Друг Галилео Галилея по “Академии зорких” Джованни Фабер (Giovanni Faber) в 1625 г. для обозначения нового прибора предложил термин “микроскоп”. Микроскоп Галилея представлял собой всего лишь зрительную трубу с линзами и небольшим увеличением, недостаточным для обнаружения микроорганизмов, поэтому Галилео Галилей с помощью своего микроскопа изучал насекомых.

Первый микроскоп, пригодный для обнаружения крупных микробов, сконструировали в Голландии шлифовальщики стекол (мастера очков) **Ханс Янсен и его сын Захариас Янсен**. Изготовленный ими микроскоп давал увеличение в 32 раза и представлял собой две выпуклые линзы внутри одной трубки, то есть больше напоминал современный телескоп, нежели микроскоп. Однако с помощью такого оптического устройства римский преподаватель медицины **Атанасиус (Афанасий) Кирхер** обнаружил в гниющих продуктах (мясе, молоке) и в крови больных чумой людей живые существа, названные им “червячками”. Он полагал, что наблюдаемые им живые существа произошли из неживых органических соединений.

Наибольшую известность получили исследования голландского естествоиспытателя **Антони ван Левенгука**. Он увлекался шлифовкой стекол и конструированием линз. В 1673 г. он изобрел микроскоп, дающий увеличение в 150-300 раз. Микроскоп Левенгука представлял собой двояковыпуклую линзу с очень коротким фокусным расстоянием, поэтому при работе микроскоп необходимо было подносить очень близко к глазам. Рассматривая с помощью изобретенного им микроскопа налет с зубов, испражнения, кровь и другие объекты, А. Левенгук

описал неизвестные образования шарообразной, палочковидной и извитой формы. Обнаруженные организмы он назвал “зверушками” или “анималькулюсами”. Зарисовки Левенгука отражали увиденное им многообразие живых существ. Первым из россиян, кто увидел микробов, был Петр I. Он посетил в Голландии А. Левенгука и привез в Россию его микроскоп.

В последующем микроскоп многократно совершенствовался. Наибольший вклад в разработку микроскопа внес английский естествоиспытатель **Роберт Гук**, впервые описавший растительную клетку. Микроскоп Гука представлял собой уже сложную систему линз, объектива и окуляра. Р. Гук впервые в 1678 г. описал технику иммерсии (лат. *immersio* - погружение) для повышения контрастности изображения.

В 1827 г. итальянский астроном и оптик **Д.Б. Амичи** (рисунок 5.2), используя технику иммерсии, сконструировал иммерсионный объектив микроскопа.

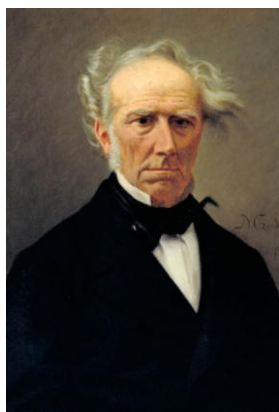


Рисунок 5.2 – Джованни Баттиста Амичи (Giovanni Battista Amici, 1786-1863 гг.).

В 1904 г. австрийский ученый А. Кёлер (A. Keller) для микроскопических исследований использовал феномен люминесценции, то есть свечение объекта в результате испускания части поглощенной энергии в виде кванта света с большей длиной волны. В 1908 г. А. Кёлер совместно с австрийским ученым Г. Зидентопфом (H. Siedentopf) сконструировали первый люминесцентный микроскоп.

Важнейшими характеристиками микроскопа являются увеличение и разрешающая способность. **Увеличение микроскопа** – это отношение линейных размеров изображения к линейным размерам рассматриваемого предмета. Увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Типичные исследовательские микроскопы имеют увеличение окуляра 10, а увеличение объективов – 10, 45 и 100. Следовательно, увеличение такого микроскопа составляет от 100 до 1000.

**Разрешающая способность микроскопа** – это минимальное расстояние между двумя точками, которые в микроскопе наблюдаются раздельно. Разрешение человеческого глаза в режиме наилучшего видения равно 0,2 мм. Микроскоп Янсенов имел увеличение в 30 раз, а его разрешающая способность неизвестна. Микроскоп А. Левенгука имел увеличение в 150-300 раз, его разрешающая способность составляла 0,5 микрона. Современные микроскопы имеют увеличение в 1000 раз, а разрешающую способность - 0,25 микрона.

Световые микроскопы имеют недостаток, связанный с аберрациями

оптических систем - дефектами или погрешностями изображения, обусловленными отклонением луча от того направления, по которому он проходил бы в идеальной оптической среде. В результате aberrаций наблюдаются размытые границы, постороннее окрашивание, цветные контуры исследуемых объектов.

В 1930 - 1933 гг. голландский физик **Ф. Цернике** (рисунок 5.3) при изучении оптических aberrаций разработал метод фазового контраста для микроскопии прозрачных или слабо рассеивающих свет объектов.



Рисунок 5.3 – Фриц Цернике (Frits Zernicke, 1888 – 1966 гг.).

За изобретение фазово-контрастного микроскопа в 1953 г. он был удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

Для изучения тонкой структуры прокариотических и эукариотических клеток и особенно вирусов возможности световых микроскопов ограничены. Для этих целей используются электронные микроскопы. Первый просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) сконструировали в 1931 г. немецкие инженеры-электронщики М. Кнолл и Э. Руска. В 1986 г. Э. Руска за разработку электронного микроскопа был удостоен Нобелевской премии. Первые электронные микрофотографии представителей мира микробов - вирусов бактерий или бактериофагов получил брат Э. Руска - Г. Руска.

В 1938 г. немецкий физик **Манфред фон Арденне** (рисунок 5.4) сконструировал первый сканирующий просвечивающий электронный микроскоп (СПЭМ или STEM), добавив к просвечивающему электронному микроскопу сканирующую систему.



Рисунок 5.4 – Манфред фон Арденне (Manfred von Ardenne, 1907 – 1997 гг.).



В 1948 г. английские специалисты под руководством **Ч. Отли** (Charles William Oatley, 1904-1996 гг.) разработали первый растровый (сканирующий) электронный микроскоп (РЭМ или SEM). С помощью растрового электронного микроскопа достигалось трехмерное изображение исследуемого объекта.

В настоящее время в микробиологических лабораториях используются следующие методы микроскопических исследований:

1. Световая микроскопия и ее разновидности (светлопольная, иммерсионная, фазово-контрастная, темнопольная, люминесцентная микроскопия).
2. Электронная микроскопия (просвечивающая и сканирующая).

### 5.3. Устройство светового микроскопа

Световой микроскоп предназначен для увеличения изображения изучаемого объекта в видимом свете без его искажения. Выделяют следующие части светового микроскопа:

- механическая часть;
- оптическая (увеличительная) часть;
- осветительная часть.

В свою очередь, каждая часть светового микроскопа состоит из отдельных деталей (элементов). Основные детали светового микроскопа представлены на рисунке 5.5.



Рисунок 5.5 – Основные детали светового микроскопа.

Отечественные световые микроскопы по конструкции и комплектации оптикой подразделяются на студенческие, рабочие, лабораторные и исследовательские, поэтому имеют соответствующие обозначения: С – студенческие, Р – рабочие, Л – лабораторные, И – исследовательские.

**Механическая часть микроскопа** предназначена для объединения

оптической и осветительной частей микроскопа. Она включает штатив, коробку для размещения механизмов макро- и микровинтов, основание, предметный столик, тубус, револьвер для крепления и смены объективов, приспособление для крепления конденсора и система винтов для перемещения отдельных частей.

**Штатив** представляет собой дугообразный элемент, соединенный с **коробкой**, предназначенной для размещения механизмов для грубой (макрвинт) и тонкой (микровинт) настройки изображения. Прямоугольное или подковообразное **основание** обеспечивает устойчивость микроскопа. В верхней части коробки располагается **предметный столик** круглой или прямоугольной формы (рисунок 5.6).



Рисунок 5.6 – Предметные столики световых микроскопов.

На предметном столике в специальных отверстиях располагаются клеммы-зажимы для фиксации предметных стекол. По сторонам предметного столика имеются центровочные винты, при помощи которых столик перемещается в разных направлениях, что позволяет передвигать изучаемый препарат.

В верхней части штатива располагается **тубусодержатель** и **револьверное устройство** (револьверная насадка, револьвер), состоящее из двух пластин. Верхняя пластина револьвера закреплена неподвижно, а нижняя пластина вращается. В нижней пластине имеются гнезда с резьбой для установки объективов (рисунок 5.7).



Рисунок 5.7 – Револьверное устройство микроскопа с объективами.

**Тубус** микроскопа может быть наклонный или прямой. В верхней части тубуса располагается окуляр.

Для грубой настройки изображения изучаемого объекта служит

макрометрический винт (макрвинт), для точной настройки – микрометрический винт (микровинт). При вращении макрометрического и микрометрического винтов по часовой стрелке объектив опускается, а при вращении винтов против часовой стрелки объектив поднимается.

Микроскопы могут быть монокулярными, бинокулярными и тринокулярными (рисунок 5.8). Бинокулярные микроскопы имеют два наклонных тубуса, что позволяет рассматривать препарат двумя глазами одновременно. Тринокулярные микроскопы позволяют не только изучать препарат, но и проводить фото- и видеорегистрацию результатов исследования.



Рисунок 5.8 – Монокулярный (а), бинокулярный (б) и тринокулярный (в) световые микроскопы.

**Оптическая часть** светового микроскопа включает объективы и окуляры. **Объектив** представляет собой систему линз, закрепленных в металлическую оправу (рисунок 5.9). На верхнем конце оправы имеется резьба для крепления объектива в гнезде револьвера. Обращенная к препарату линза называется фронтальной, она производит основное увеличение изучаемого объекта. Остальные линзы объектива называются коррекционными. Они предназначены для устранения недостатков оптического изображения.



Рисунок 5.9 – Объективы светового микроскопа.

В зависимости от конструкции, разные объективы обеспечивают разное увеличение исследуемого объекта. **Кратность увеличения** объекта указывается на оправе объектива. Например, объективы малого увеличения обозначаются как 8х, 20х, объективы большого увеличения – 40х, иммерсионные объективы – 90х. Кроме того, на объективе указывается тип оптической коррекции, числовая апертура,

иммерсионная среда (рисунок 5.10).

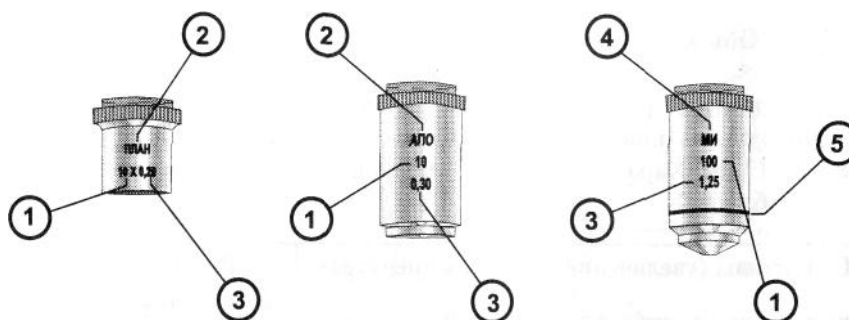


Рисунок 5.19 – Маркировка объективов: 1 – увеличение объектива; 2 – тип оптической коррекции (ПЛАН – объективы – ахроматы с плоским полем, АПО – объективы – апохроматы); 3 – числовая апертура; 4 – иммерсионная среда (МИ или Oil – масляная иммерсия, ВИ или W – водная иммерсия); 5 – цветовая маркировка иммерсионных объективов (черное кольцо – масляная иммерсия, белое кольцо – водная иммерсия).

На корпусе современных объективов указывают также оптическую длину тубуса (например, 160 мм) и толщину покровного стекла (например, 0,17 мм), используемого в работе (рисунок 5.11).



Рисунок 5.11 – Маркировка современного объектива.

**Числовая апертура** характеризует разрешающую способность микроскопа (качество изображения). Чем больше числовая апертура, тем более высокое разрешение имеет объектив, что позволяет различать более мелкие детали.

При использовании оптических систем изображение исследуемых объектов искажается. Основными ошибками или погрешностями изображения являются искажения цвета (появление цветных ореолов – хроматические aberrации) или неравномерности изображения по полю зрения (размытость или неравномерность изображения – кривизна поля). По степени исправления хроматических aberrаций объективы подразделяются на **ахроматические** (ахроматы) и **апохроматические** (апохроматы). Ахроматические объективы исправляют хроматическую aberrацию для длин волн двух цветов (красный и синий), а также сферическую aberrацию для длины волны одного цвета (зеленого). При использовании ахроматических объективов радужная окантовка исследуемых объектов все же остается заметной.

Ахроматы имеют маркировку АСНРО. Апохроматические объективы корректируют хроматизм для длин волн трех цветов (красного, синего и зеленого), а также исправляют сферическую aberrацию для длин волн двух-трех цветов. Поэтому апохроматы дают более четкое изображение. Апохроматические объективы маркируются АРО. Объективы, устраняющие неравномерности изображения по полю зрения (кривизну поля), обозначаются приставкой план- (PLAN – планохроматический объектив, Plan APO – планапохроматический объектив).

Многие производители в настоящее время предлагают флюоритовые объективы, которые имеют маркировку Fluo (Fluorite). В этих объективах хроматические aberrации устранены также как и в ахроматических объективах для длин волн двух цветов (синего и красного), а сферические aberrации – для длин волн двух-трех цветов (синего, красного, зеленого). Поэтому флюоритовые объективы отличаются высокой разрешающей способностью и лучшим контрастом по сравнению с ахроматическими объективами.

По способу применения все объективы делят на сухие и иммерсионные или погружные (*immersio* - погружение). У **сухих объективов** между фронтальной линзой и изучаемым препаратом находится воздух, у **иммерсионных объективов** пространство между фронтальной линзой и препаратом заполнено иммерсионным маслом (кедровым, касторовым, гвоздичным и др.) или водой, в связи с чем различают масляную и водную иммерсию.

**Окуляры** состоят из набора плосковыпуклых линз, помещенных в металлический цилиндр. Линза, обращенная к глазу, называется глазной. На противоположном конце окуляра располагается полевая (собирающая) линза (рисунок 5.12).



Рисунок 5.12 – Окуляр микроскопа.

Линзы окуляра выпуклыми сторонами обращены к исследуемому объекту. Между линзами располагается диафрагма, отсекающая боковые рассеянные лучи и пропускающая центральные (осевые) лучи. Окуляры имеют цифровые обозначения (например, x5, x7, x10, x12, x20), показывающие их собственное увеличение. Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Так, при увеличении объектива x8 и окуляра x7 общее увеличение микроскопа равно 56, а при увеличении объектива x90 и окуляра x20 общее увеличение микроскопа составляет 1800.

**Осветительная часть микроскопа** предназначена для оптимального освещения изучаемых объектов. Она состоит из осветителя, зеркала и конденсора.

Для освещения исследуемых объектов используют естественный или искусственный свет. Однако интенсивность естественного освещения может меняться в зависимости от времени суток и погоды. Поэтому для освещения чаще используют искусственный свет.

**Типовой осветитель** к микроскопу состоит из лампы накаливания и двухлинзового коллектора. В зависимости от конструкции в состав осветителя могут входить ирисовая диафрагма, блок питания с регулятором освещенности, штатив (рисунок 5.13).



Рисунок 5.13 - Осветители к световому микроскопу ОИ-19 (а) и ОИ-32 (б).

В современных моделях осветители встроены в основание микроскопа (рисунок 5.14).



Рисунок 5.14 – Расположение осветителя в основании микроскопа.

**Зеркало** микроскопа (рисунок 5.15) предназначено для направления лучей света от осветителя в конденсор.



Рисунок 5.15 – Зеркало микроскопа.

Одна поверхность зеркала плоская, другая - вогнутая. При естественном освещении используют плоскую поверхность зеркала, при искусственном освещении - вогнутую поверхность зеркала.

**Конденсор** (лат. *condense* – сгущаю, уплотняю) микроскопа (рисунок 5.16) собирает и направляет лучи от источника света на изучаемый объект. Он состоит из светофильтра, ирисовой диафрагмы и 2-3 линз.



Рисунок 5.16 – Конденсор микроскопа (а) и ирисовая диафрагма (б).

**Светофильтр** служит для выделения из видимого света лучей с короткой длиной волны для повышения контрастности изображения.

**Ирисовая диафрагма** находится под конденсором и предназначена для регулирования освещения препарата. Регулировка производится путем сужения или расширения отверстия диафрагмы с помощью специального рычага. Ирисовая диафрагма позволяет направлять на объект только параллельные лучи.

**Ход лучей в световом микроскопе:** от источника света лучи поступают на зеркало, которое направляет их в конденсор. Конденсор фокусирует лучи на изучаемом объекте. Лучи от объекта поступают в объектив, который увеличивает изображение в десятки раз. Затем лучи увеличенного изображения попадают в окуляр, который увеличивает изображение еще в 7-20 раз (рисунок 5.17).

В итоге получается увеличенное перевернутое изображение. Максимальное увеличение светового микроскопа достигает 3000 раз.

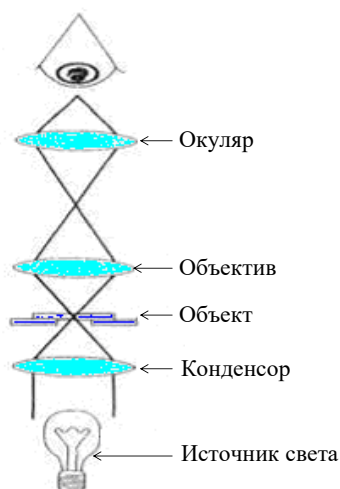


Рисунок 5.17 – Ход лучей в световом микроскопе.

## 5.4. Разновидности световой микроскопии

В зависимости от способа освещения объекта, используемого объектива, вида лучей и других факторов выделяют следующие разновидности световой микроскопии: светлопольная, иммерсионная, фазово-контрастная, темнопольная, люминесцентная микроскопия.

**Светлопольная микроскопия** (метод светлого поля) представляет собой метод исследования окрашенных клеток и тканей, в котором для освещения объекта применяют лучи видимого спектра. Изображение создается за счет различий в степени поглощения света разными участками изучаемого окрашенного объекта (рисунок 5.18).

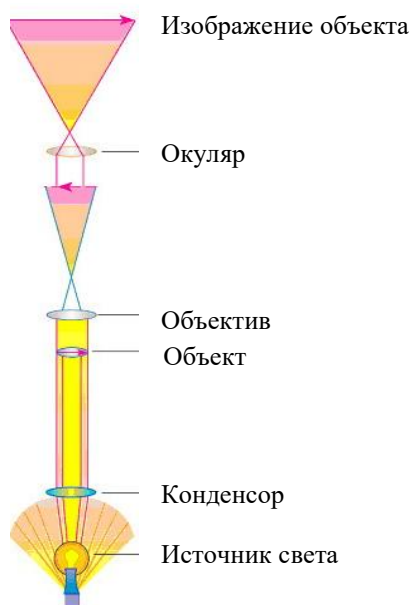


Рисунок 5.18 – Схема лучей при исследовании объекта в светлом поле зрения.

При прохождении луча через окрашенный объект происходит изменение интенсивности света, то есть изменяется амплитуда световой волны. Такие амплитудные изменения хорошо улавливаются глазом человека.

**Иммерсионная микроскопия** представляет собой метод микроскопического исследования, при котором объектив погружают в жидкость, нанесенную на исследуемый препарат. Используемая при этом жидкость называется иммерсионной. Воздух и стекло имеют разный показатель преломления света (соответственно 1,0 и 1,52), поэтому лучи при переходе из одной среды в другую преломляются и рассеиваются. В результате этого изображение изучаемого объекта искажается. Иммерсионная жидкость имеет коэффициент преломления, близкий коэффициенту преломления стекла (соответственно 1,515 и 1,52), поэтому при иммерсионной микроскопии увеличивается четкость изображения изучаемого объекта и разрешающая способность микроскопа. Ход лучей в сухом и иммерсионном объективах представлен на рисунке 5.19.



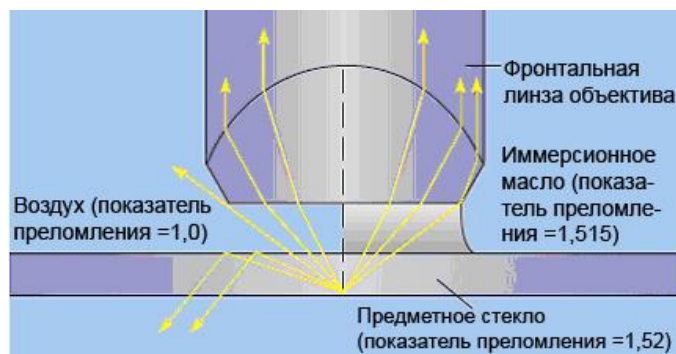


Рисунок 5.19 – Ход лучей в сухом и иммерсионном объективах.

В качестве иммерсионной жидкости используют кедровое или минеральное масло (показатель преломления 1,515), вазелиновое масло (показатель преломления 1,503), водный раствор глицерина (показатель преломления 1,434), воду (показатель преломления 1,333) или другие жидкости. Природное кедровое масло в настоящее время практически не используется, так как со временем на воздухе масло уплотняется, а его показатель преломления изменяется. Поэтому чаще применяется синтетическое иммерсионное масло (рисунок 5.20).



Рисунок 5.20 – Иммерсионное масло.

Для проведения иммерсионной микроскопии используют специальные иммерсионные объективы. Объективы для масляной иммерсии имеют черную полосу на оправе, а объективы для водной иммерсии – белую полосу.

При работе с иммерсионным объективом предварительно при малом увеличении микроскопа (объектив  $\times 8$ ) и поднятом конденсоре устанавливают освещение. Затем на препарат наносят каплю иммерсионного масла и погружают в нее иммерсионный объектив ( $\times 90$ ). С помощью макрометрического винта производят грубую настройку изображения объекта, а с помощью микрометрического винта – точную настройку изображения. Иммерсионная микроскопия используется в первую очередь при изучении окрашенных препаратов (рисунок 5.21).

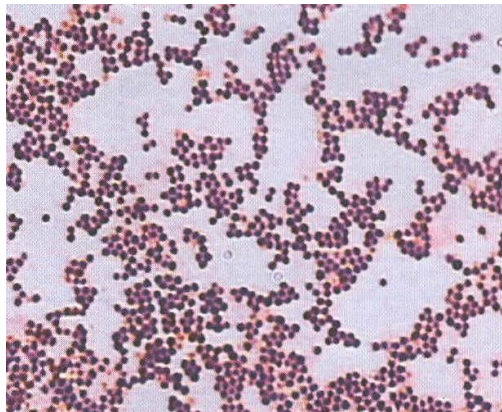


Рисунок 5.21 – Чистая культура стафилококка, окраска по Граму, иммерсионная микроскопия.

**Фазово-контрастная микроскопия** (метод фазового контраста) представляет собой метод микроскопического исследования малококонтрастных неокрашенных объектов, не видимых при обычной световой микроскопии (например, неокрашенных живых бактерий). При фазово-контрастной микроскопии контрастность изображения достигается сдвигом фаз световой волны. Дело в том, что световые волны, проходя через непрозрачные объекты (фиксированные и окрашенные препараты микробов, срезы тканей), меняют величину амплитуды (интенсивность света). Эти изменения улавливаются человеческим глазом. В то же время, живые клетки микроорганизмов прозрачны и слабо поглощают свет, поэтому они изменяют только фазу проходящих лучей (скорость). Такие фазовые изменения глаз человека не улавливает, поэтому объекты выглядят малококонтрастными. Эти изменения становятся видимыми при использовании фазово-контрастной микроскопии, при которой фазовые изменения преобразуются в амплитудные. Таким образом, фазово-контрастная микроскопия позволяет преобразовать малококонтрастное изображение различающихся по плотности структур в контрастное и отчетливое изображение.

Для фазово-контрастной микроскопии используют специальное устройство, состоящее из фазового конденсора, фазовых объективов, вспомогательного микроскопа и светофильтров. В фазовом конденсоре располагается кольцевая диафрагма, имеющая прозрачное световое кольцо. В свою очередь фазовый объектив имеет внутри фазовую пластинку с нанесенным кольцом (фазовым кольцом). Размер светового кольца конденсора должен соответствовать размеру фазового кольца объектива.

При фазово-контрастной микроскопии пучок света проходит через кольцо диафрагмы конденсора и объект, а затем попадает в кольцо фазовой пластинки объектива (рисунок 5.22).

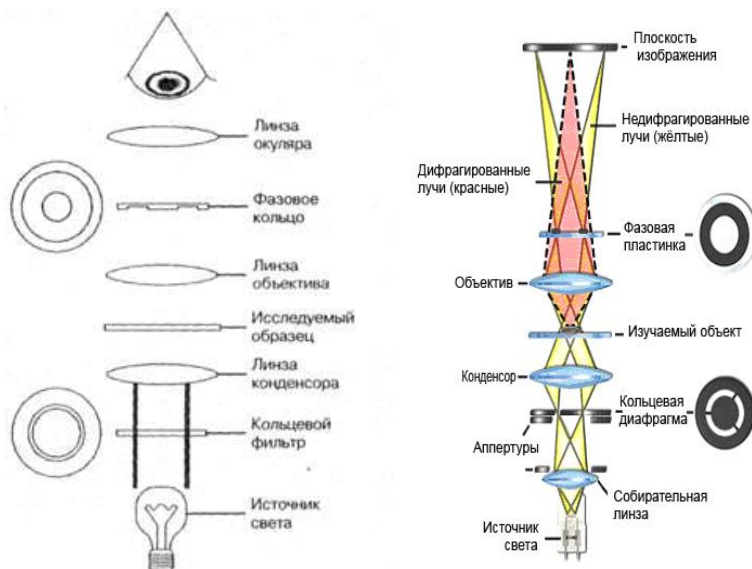


Рисунок 5.22 – Схема фазово-контрастного микроскопа и ход лучей в фазово-контрастном микроскопе.

Свет, прошедший через участок препарата, где нет изучаемого объекта, в последующем проходит через фазовое кольцо объектива и формирует светлое изображение фона. Свет, прошедший через изучаемый объект, изменяет фазу и разделяется на недифрагированные и дифрагированные лучи. Недифрагированные лучи, проходя через фазовую пластинку объектива, получают дополнительный сдвиг фазы. Дифрагированные лучи проходят мимо фазовой пластинки и не изменяют фазы. В окуляре происходит наложение дифрагированных и недифрагированных лучей, в результате чего исследуемый объект (микробная клетка) будет выглядеть темным на светлом фоне. Следовательно, фазовая пластинка преобразует фазовые изменения в амплитудные изменения (изменения интенсивности света). Получаемое при этом изображение называется фазово-контрастным. Фазовое кольцо объектива получают путем травления или путем нанесения на стекло тонкой пленки кобальта или меди. В первом случае изображение объекта выглядит темным на светлом фоне (позитивный фазовый контраст, рисунок 5.23). Во втором случае изображение объекта выглядит светлее окружающего темного фона (негативный фазовый контраст).



Рисунок 5.23 – Фазово-контрастная микроскопия *Bacillus cereus*.

Негативный фазовый контраст используется в так называемом аноптральном микроскопе. **Аноптральная микроскопия** была разработана в 1953 г. финским физиологом А. Вильска. Этот метод представляет собой усовершенствованную

фазово-контрастную микроскопию: на одной из линз объектива нанесено кольцо сажи, а на линзе конденсора – прозрачное кольцо. При использовании такого объектива исследуемый объект получается светлее темного фона. Следовательно, аноптральная микроскопия позволяет получить более контрастное изображение по сравнению с фазово-контрастной микроскопией. Ход лучей в аноптральном микроскопе представлен на рисунке 5.24.

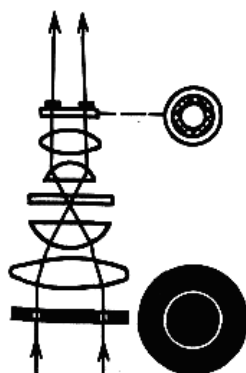


Рисунок 5.24 – Ход лучей в аноптральном микроскопе.

Приспособление для фазово-контрастной микроскопии можно применять в обычном микроскопе. Для этого обычный конденсор заменяется фазовым, а объективы микроскопа - на фазовые объективы (рисунок 5.25).



Рисунок 5.25 – Фазово-контрастные устройства ФКУ-2 (а) и КФ-4 (б).

Фазовый конденсор помещается в кольцо кронштейна вместо обычного конденсора и зажимается винтом. Фазовый конденсор может использоваться для наблюдения обычным способом. Для этого под револьверным диском располагается ирисовая диафрагма, а в револьверном диске имеется свободное отверстие для прохождения всего пучка света.

При **темнопольной микроскопии** (при использовании метода темного поля) объект освещается сбоку, поэтому исследователем воспринимаются отраженные лучи. При темнопольной микроскопии можно обнаружить частицы, которые при светлопольной микроскопии не видны. В основе темнопольной микроскопии лежит

эффект Тиндаля – рассеивание света при прохождении светового пучка через оптически неоднородную среду. Для достижения эффекта Тиндаля используют специальный темнопольный конденсор, который устанавливают на место обычного конденсора. В темнопольном конденсоре внутренняя боковая поверхность зеркальная. Эффект Тиндаля достигается также использованием темнопольного фильтра, представляющего собой кружок черной бумаги, помещенной между линзами конденсора в центральной части так, чтобы только незначительная периферическая часть линзы оставалась свободной. При темнопольной микроскопии в объектив попадает незначительная часть лучей, прошедших через темнопольный фильтр и отраженных объектом.

При темнопольной микроскопии разрешающая способность микроскопа возрастает. Схема темнопольного микроскопа и ход лучей при темнопольной микроскопии представлены на рисунке 5.26.

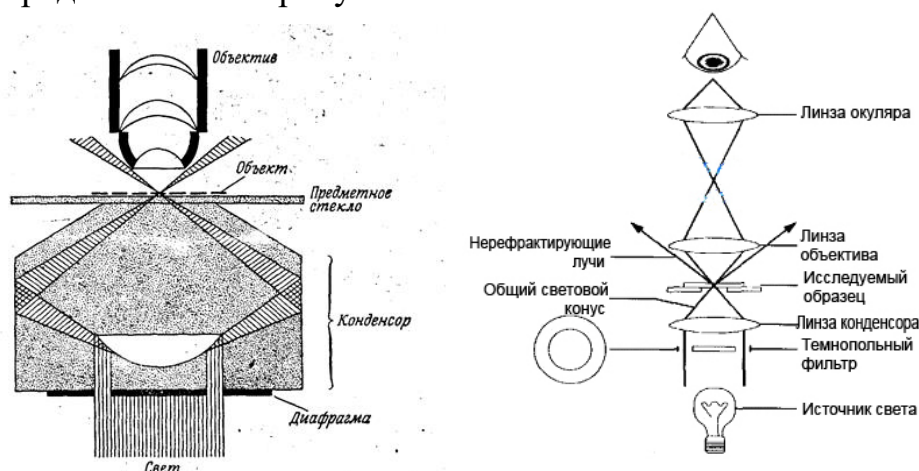


Рисунок 5.26 – Схема темнопольного микроскопа и ход лучей в темнопольном микроскопе.

При темнопольной микроскопии изучают движение живых неокрашенных бактерий, например, спирохет. Препарат для темнопольной микроскопии готовят методом “раздавленная” или “висячая” капля. Неосвещенное поле зрения остается темным, а бактерии выглядят ярко светящимися (рисунок 5.27).

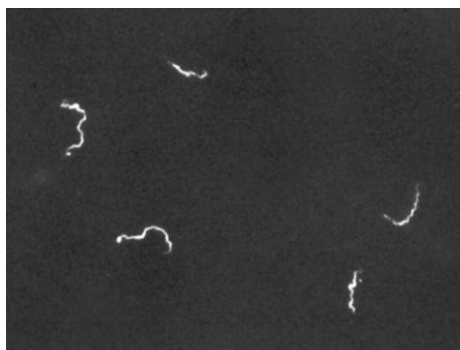


Рисунок 5.27 – *Treponema pallidum* при исследовании методом темнопольной микроскопии.

При темнопольной микроскопии можно увидеть только контуры объекта, но невозможно изучить их внутреннюю структуру.

**Люминесцентная (флюоресцентная) микроскопия** основана на явлении

люминесценции (флюоресценции). Люминесценция (*luminis* - свет, *scentic* - способность светиться) представляет собой способность объекта под влиянием падающего света (синие-фиолетового света или ультрафиолетовых лучей) испускать лучи с большей длиной волны и другого цвета. При люминесцентной микроскопии используют как естественную (первичную, собственную) люминесценцию микробов, так и искусственную (вторичную, наведенную) люминесценцию. Собственная люминесценция наблюдается без предварительного окрашивания изучаемого объекта специальными красителями. Большинство биологических объектов имеют неяркую собственную люминесценцию, поэтому для их изучения используют вторичную люминесценцию.

Вторичная люминесценция возникает после окраски препарата специальными люминесцирующими красителями (флюорохромами, люминофорами), которые способны связываться со специфическими структурами бактериальных клеток. Например, акридиновый оранжевый связывается с нуклеопротеидами клетки, аурамин – с воскоподобными веществами. Поэтому акридиновый оранжевый применяют для выявления нуклеиновых кислот, мукополисахаридов, для обнаружения гонококков, аурамин – кислотоустойчивых бактерий (например, микобактерий туберкулеза), корифосфин – коринебактерий дифтерии, бензпирен и родамин – липидов.

Ход лучей и внешний вид люминесцентного микроскопа представлены на рисунке 5.28.

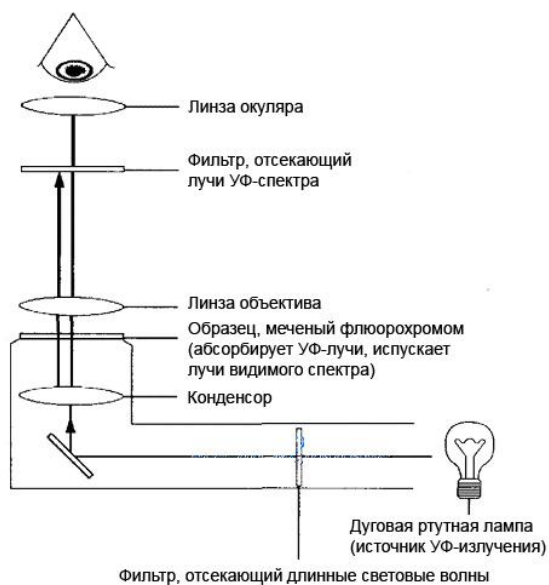


Рисунок 5.28 – Ход лучей и внешний вид люминесцентного микроскопа.

В качестве осветителя в люминесцентном микроскопе применяют ртутную лампу, испускающую ультрафиолетовое излучение. Объективы для люминесцентных исследований имеют маркировку FLUOR.

В люминесцентном микроскопе имеется система светофильтров, пропускающих определенные лучи и задерживающих остальные. Первый (возбуждающий) светофильтр помещают перед конденсором. Он пропускает от источника УФ-излучения (ртутно-кварцевой лампы) только те лучи, которые

возбуждают люминесценцию (сине-фиолетовые или ультрафиолетовые лучи). Второй (пропускающий) светофильтр устанавливают после объектива (в тубусе или в окуляре). Он поглощает возбуждающие лучи (сине-фиолетовые или ультрафиолетовые) и пропускает только свет люминесценции изучаемого объекта (рисунок 5.29).

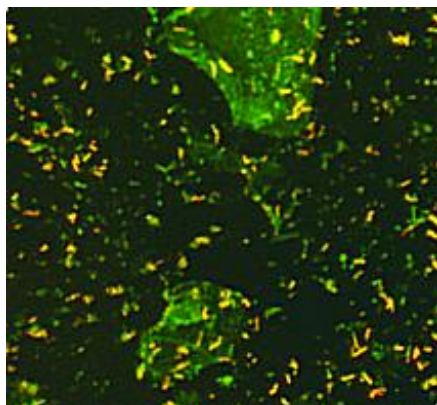


Рисунок 5.29 – Люминесцентная микроскопия микобактерий туберкулеза (палочки желтого цвета).

В последние годы особенно широко используется **иммунолюминесцентная микроскопия** – реакция иммунофлюоресценции (РИФ) с применением специфичных иммуноглобулинов, меченых флюорохромами. В качестве метки чаще всего используют флуоросцеина изотиоцианат (ФИТЦ). Комплекс “антитело + ФИТЦ” позволяет выявлять в РИФ очень низкие концентрации антигенов, в том числе клетки бактерий (рисунок 5.30).



Рисунок 5.30 – Выявление пневмококков с помощью РИФ.

Преимуществами люминесцентной микроскопии являются цветное изображение изучаемого объекта, выявление в исследуемом материале микроорганизмов в небольшой концентрации, возможность использования в качестве экспресс-метода обнаружения и идентификации антигенов.

## 5.5. Правила обращения со световым микроскопом

Для нормальной работы светового микроскопа необходимо выполнять следующие требования:

1. Хранить микроскоп в шкафу или под колпаком для предотвращения запыления линз окуляра, объективов, конденсора и других частей микроскопа.
2. Извлекать микроскоп из шкафа двумя руками, держа за штатив и основание.
3. Не касаться пальцами оптических поверхностей.
4. Очищать линзы от пыли хлопчатобумажной тканью, не оставляющей волосков. Иммерсионное масло удалять с линз объектива салфеткой, смоченной бензином, ксилолом или толуолом. Эфир, ацетон и спирт растворяют клей между линзами и нарушают качество изображения.
5. Регулярно чистить предметный столик.
6. Устанавливать микроскоп для работы недалеко от края стола.
7. После завершения работы убирают препарат, протирают объектив, на предметный столик помещают салфетку револьвер устанавливают в нейтральное положение, тубус и конденсор опускают, микроскоп помещают в шкаф или под колпак.

## 5.6. Электронная микроскопия

Электронная микроскопия используется для изучения субклеточных структур микроорганизмов. В электронном микроскопе освещение исследуемых объектов проводится не световыми лучами, а потоком электронов. Источником электронов в электронном микроскопе является электронная пушка (вольфрамовая нить, нагреваемая электрическим током). В качестве линз в электронном микроскопе используются электромагниты. Выходящий из электронной пушки пучок электронов движется в вакууме под влиянием электромагнитного поля. Конденсорная линза направляет пучок электронов на объект, а увеличивающие линзы создают увеличенное изображение, выводящееся на экран. Разрешающая способность современных электронных микроскопов составляет менее 1 ангстрема ( $10^{-10}$  м).

Интakтные (целые) бактериальные клетки непроницаемы для электронов. Для их исследования в электронном микроскопе используют срезы бактерий толщиной 20-100 нм (1 нанометр равен  $10^{-9}$  м). Такие ультратонкие срезы получают путем заливки исследуемого материала в эпоксидные смолы и разрезания полученных блоков на специальных микротоммах (рисунок 5.31).

Для повышения контрастности изображения объекта при электронной микроскопии используют различные способы контрастирования. Наиболее распространенной является обработка клеток солями тяжелых металлов (хрома, свинца, вольфрама и др.). Структуры клеток, поглотившие эти металлы, выглядят темными и контрастными.





Рисунок 5.31 – Микротом Microm HM 200.

Выделяют два основных вида электронных микроскопов: просвечивающие (ПЭМ) и сканирующие (СЭМ). В **просвечивающем (трансмиссионном) электронном микроскопе** электронный пучок проходит через ультратонкий образец так, что часть электронов рассеивается на образце, а часть – нет. Затем через систему магнитных (увеличивающих) линз на люминесцентном экране создается плоскостное изображение о структуре образца (рисунок 5.32).

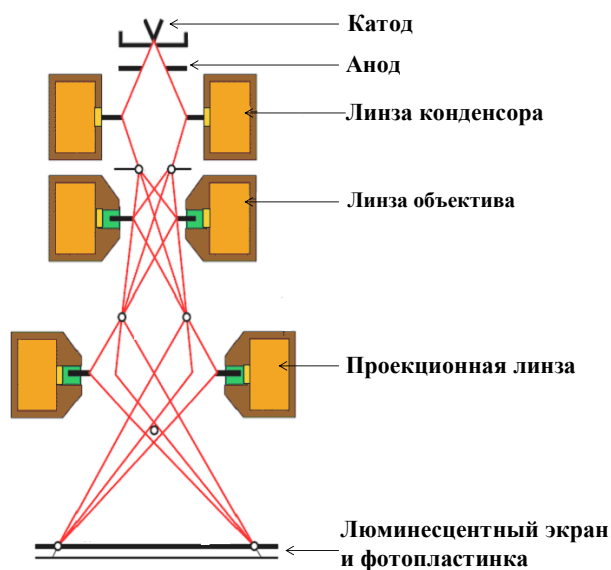


Рисунок 5.32 – Схема просвечивающего электронного микроскопа.

Изображение на экране создает та часть электронов, которая проходит через исследуемый объект. Участки клеток, слабо рассеивающие электроны, на экране выглядят светлыми, а участки клеток, сильно рассеивающие электроны, на экране будут темными (рисунок 5.33).



Рисунок 5.33 – Просвечивающая электронная микроскопия клеток *Bacteroides fragilis*.

Внешний вид просвечивающего (трансмиссионного) электронного микроскопа представлен на рисунке 5.34.



Рисунок 5.34 – Просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100F.

Порядок приготовления образцов для просвечивающей электронной микроскопии:

- химическая фиксация образца альдегидами и четырехокисью осмия;
- обезвоживание образца в органическом растворителе (спирте или ацетоне);
- пропитывание образца эпоксидными смолами;
- разрезание образца на ультрамикротомах;
- размещение образцов на специальных сетках и их контрастирование солями тяжелых металлов.

Устройство **сканирующего (растрового) электронного микроскопа** основано на принципе прохождения пучка электронов по поверхности образца. В сканирующем электронном микроскопе пучок электронов собирается в тонкий луч, которым сканируют образец. Отраженные от поверхности образца электроны собираются и формируют на экране объемное изображение (рисунок 5.35).

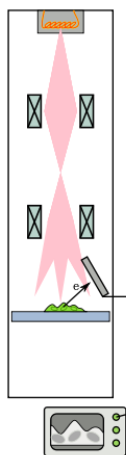


Рисунок 5.35 – Схема сканирующего электронного микроскопа.

При сканирующей электронной микроскопии на поверхность изучаемых объектов в вакуумной камере напыляют электронно-плотные вещества. В результате этого при сканирующей электронной микроскопии формируется трехмерное изображение (рисунок 5.36).

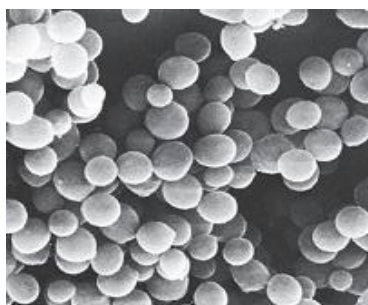


Рисунок 5.36 – Сканирующая электронная микроскопия *Staphylococcus aureus*.

На рисунке 5.37 представлен внешний вид одного из современных сканирующих электронных микроскопов.



Рисунок 5.37 – Сканирующий электронный микроскоп JSM-7600F.

Главным преимуществом электронной микроскопии является его высокая разрешающая способность, позволяющая изучать ультраструктуру бактерий, строение вирусов и макромолекул. В настоящее время электронная микроскопия широко используется в сочетании с другими методами исследований – гистохимическими, иммунологическими (рисунок 5.38).

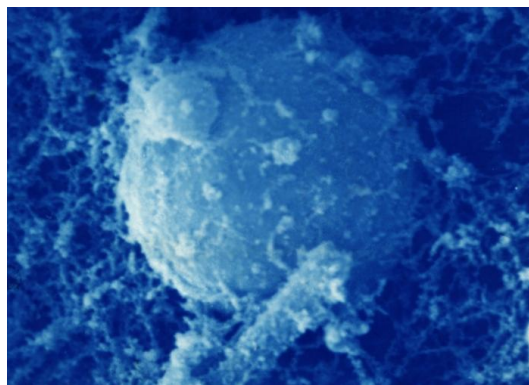


Рисунок 5.38 – Сканирующая электронная микроскопия фагоцита, поглощающего бактериальную клетку.

Такие исследования позволяют изучать не только структуру бактерий, но и механизмы развития инфекции.

### 5.7. Оборудование рабочего места для микроскопирования

Для приготовления препарата для микроскопирования в бактериологической лаборатории оборудуют рабочее место, на котором размещают штатив для пробирок, спиртовку, спички, предметные и покровные стекла в склянке со спиртом, бактериологическую петлю, емкость с дезраствором, бутылку с сифоном и с дистиллированной водой для промывания препаратов, мостик, чашку для окраски препаратов и сбора мусора (кристаллизатор), емкости с красителями и фиксирующими жидкостями, карандаши и другие необходимые принадлежности (рисунок 5.39).



Рисунок 5.39 – Оборудование рабочего места для микроскопирования.

Принадлежности, используемые при оборудовании рабочего места для приготовления микроскопических препаратов, представлены на рисунке 5.40.

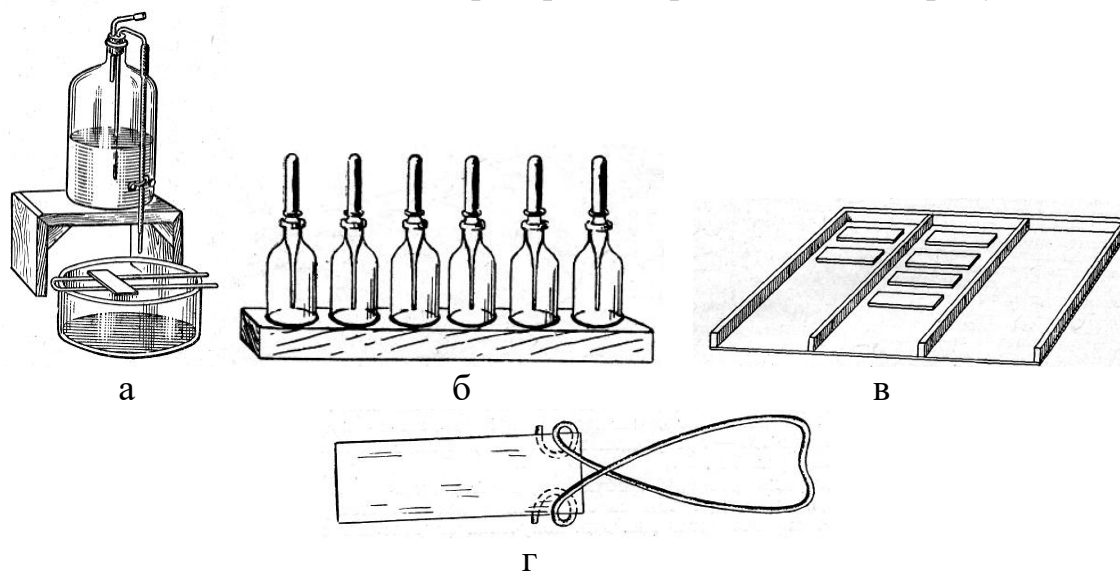


Рисунок 5.40 – Приспособление для окраски и промывания препаратов (а), емкости с пипетками для растворов красок (б), подставка для предметных стекол (в), пружинный зажим для предметных стекол (г).

Вместо пружинного зажима для предметных стекол используется также анатомический пинцет. В настоящее время растворы красителей выпускаются в виде рабочих растворов в полиэтиленовых флаконах.

## 5.8. Подготовка предметных стекол для микроскопического исследования

С помощью микроскопии изучают морфологические (форма и размер клеток) и тинкториальные (отношение к красителям) свойства бактерий. Микроскопическому исследованию подвергают препараты, приготовленные из живых или убитых (фиксированных и окрашенных) бактерий. В качестве исследуемого материала используют кровь, мокроту, гной, фекалии и другой инфицированный материал от больного, а также чистую культуру бактерий, выросшую на питательных средах. Из этих материалов готовят препарат – мазок. Из пораженных органов и тканей можно приготовить мазок-отпечаток. Для приготовления препаратов используют предметные стекла. Для длительного сохранения окрашенных препаратов и при приготовлении препаратов “раздавленная капля” используют покровные стекла.

**Подготовка предметных и покровных стекол.** Предметные и покровные стекла для микроскопических исследований должны быть чистыми и хорошо обезжиренными. Доказательством хорошего обезжиривания стекла является равномерное распределение капли жидкости на его поверхности. Подготовленные стекла хранят в банке с притертой пробкой в сухом виде либо в спирте или в смеси Никифорова – смеси спирта с эфиром в соотношении 1:1. Перед приготовлением препарата стекло фламбируют (прожигают в пламени спиртовки).

Новые не бывшие в употреблении стекла вначале моют в воде, затем выдерживают в смеси спирта с эфиром. Новые стекла можно также кипятить в

течение 10 минут в 1% растворе натрия гидрокарбоната (соды) с последующим промыванием в дистиллированной воде.

Бывшие в употреблении стекла погружают на 1-2 часа в концентрированную серную кислоту или в смесь серной кислоты с калием двуххромовокислым (хромовую смесь). После этого стекла промывают в проточной воде и кипятят в 5% растворе натрия гидрокарбоната в течение 30 минут. После ополаскивания в чистой воде их высушивают в сушильном шкафу или при комнатной температуре.

### **5.9. Приготовление препаратов для микроскопирования микробов в живом состоянии**

Препараты живых микробов используют для изучения размеров, формы клеток, их подвижности и других признаков. Микробы в этих препаратах находятся в естественном, неизменном состоянии. Изучение микробов в живом состоянии позволяет выявить ряд свойств, не обнаруживаемых у фиксированных микробов, в частности, подвижность бактерий.

Микроскопирование микробов в живом состоянии имеет такие недостатки как низкая контрастность живых клеток и невозможность длительного наблюдения за микробной клеткой в связи с ее быстрым перемещением в поле зрения в результате активной подвижности некоторых бактерий или в связи с броуновским движением жидкости. Поэтому микроскопирование микробов в живом состоянии позволяет получить только общее представление о морфологии бактерий. После завершения микроскопирования живых патогенных бактерий препарат обязательно погружают в емкость с дезинфицирующим раствором.

Для микроскопического исследования бактерий в живом состоянии используют препараты “раздавленной капли” или “висячей капли”. Микроскопирование таких препаратов лучше осуществлять в темном поле.

**Препарат “раздавленная капля”** готовится следующим образом. На середину сухого предметного стекла с соблюдением правил асептики наносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой каплю дистиллированной воды или физиологического раствора. В эту каплю бактериологической петлей вносят культуру бактерий и тщательно перемешивают до однородного состояния. Жидкую культуру наносят на стекло пастеровской пипеткой. Каплю осторожно накрывают чистым покровным стеклом: краем покровного стекла прикасаются к поверхности предметного стекла рядом с каплей, наклоняют покровное стекло над каплей и опускают его. При приготовлении препарата следят за тем, чтобы в суспензии не образовались пузырьки воздуха. Правильно приготовленная “раздавленная капля” заполняет все пространство между покровным и предметным стеклом, при этом жидкость не должна выступать за края покровного стекла. Излишки жидкости убирают полоской фильтровальной бумаги. После исследования препарат помещают в емкость с дезраствором. Иногда этот препарат называют препаратом “придавленная капля”. Если требуется рассматривать препарат продолжительное время, то края покровного стекла предварительно смазывают вазелином (рисунок 5.41).

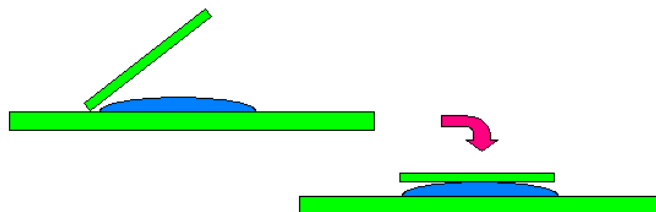


Рисунок 5.41 – Порядок приготовления препарата “раздавленная капля”.

**Препарат “висячая капля”.** Для длительного (в течение 1-2 суток) изучения живых микробов готовят препарат “висячая капля”, в котором предотвращают высыхание препарата путем размещения капли в герметичной камере. Для приготовления такого препарата используют специальное предметное стекло с лункой. На середину покровного стекла наносят каплю жидкой культуры микроба. Края лунки предметного стекла смазывают вазелином. Предметное стекло переворачивают лункой вниз, слегка прижимают его к покровному стеклу так, чтобы капля оказалась в центре лунки, а лунка герметично закрылась покровным стеклом. После этого препарат переворачивают. Капля должна свободно свисать в лунку, не соприкасаясь с его дном и краями (рисунок 5.42).

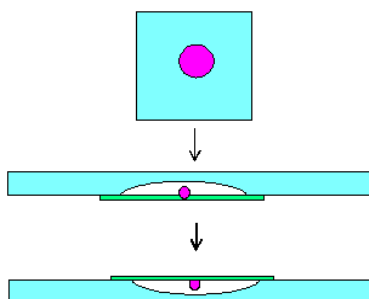


Рисунок 5.42 – Порядок приготовления препарата “висячая капля”.

С помощью препарата “висячая капля” можно изучать процесс размножения бактерий, спорообразование и другие свойства живых микробов. Для увеличения контрастности изучаемых объектов препарат исследуют в слегка затемненном поле. Для этого сужают диафрагму конденсора. После микроскопического исследования препараты живых бактерий помещают в емкость с дезраствором.

## 5.10. Приготовление препаратов для микроскопирования микробов в окрашенном состоянии

Этапы приготовления препаратов окрашенных микробов:

1. Приготовление мазка на предметном стекле.
2. Высушивание мазка.
3. Фиксация препарата.
4. Окрашивание мазка.
5. Высушивание препарата.

### Приготовление препарата из культуры с плотной питательной среды.

На середину чистого предметного стекла наносят каплю стерильной дистиллированной воды или физраствора. В пламени спиртовки прожигают бактериологическую петлю, охлаждают ее и отбирают немного материала с питательной среды. При отборе материала пробирку держат в левой руке сверху между большим и указательным пальцами, а пробку извлекают в пламени горелки мизинцем правой руки. При отборе материала с агара в чашке Петри чашку размещают рядом с горячей спиртовкой, приподнимают крышку левой рукой и отбирают материал петлей. После отбора материал переносят в каплю жидкости на стекле, тщательно круговыми движениями перемешивают и распределяют по площади не менее  $1\text{ см}^2$ . После приготовления препарата петлю сразу же фламбируют в пламени горелки и помещают в штатив. Препарат высушивают на воздухе.

**Приготовление препарата из жидкой микробной культуры.** В этом случае бактериологическую петлю прожигают на пламени горелки, остужают и каплю материала наносят на поверхность стекла. Отбор материала из пробирки производят указанным выше способом при соблюдении правил асептики. Круговыми движениями каплю материала распределяют по стеклу на площади не менее  $1\text{ см}^2$ . После приготовления препарата петлю фламбируют в пламени горелки и помещают в штатив, а приготовленный препарат высушивают на воздухе.

Для приготовления препарата из жидкой микробной культуры можно использовать пастеровскую пипетку, которую после нанесения капли на стекло помещают в емкость с дезинфицирующим раствором.

Порядок приготовления препарата из микробной культуры в пробирке представлен на рисунке 5.43.

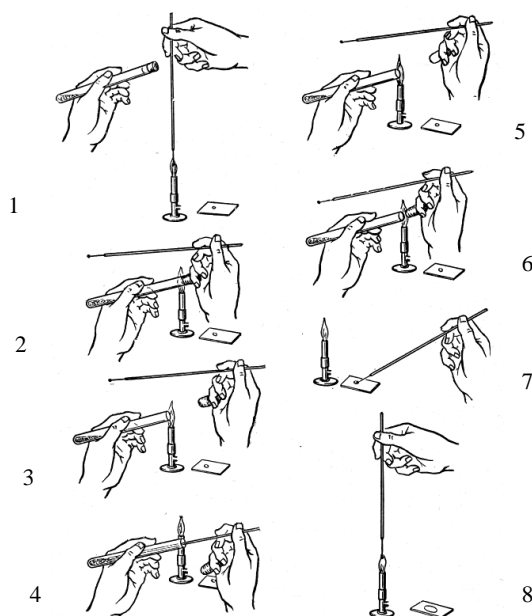


Рисунок 5.43 – Схема приготовления препарата – мазка из микробной культуры со скошенного агара в пробирке. Цифры указывают последовательность выполнения операций.

Правильно приготовленный мазок должен быть тонким, иметь круглую или



овальную форму, быть размером 1-2 см<sup>2</sup>, материал в нем должен быть распределен равномерно.

**Приготовление препарата - мазка из мокроты и гноя.** Бактериологическую петлю фламбируют в пламени спиртовки и остужают. Стерильной петлей исследуемый материал наносят на середину предметного стекла и плотно прижимают его другим предметным стеклом. Предметные стекла раздвигают в разные стороны за свободные концы. В результате этого получают два препарата - мазка (рисунок 5.44).

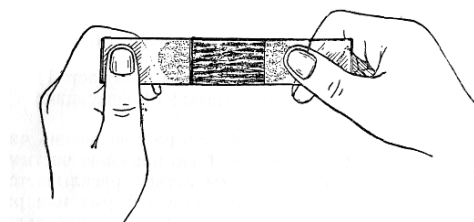


Рисунок 5.44 – Приготовление препарата - мазка из мокроты и гноя.

**Приготовление препарата - мазка из крови.** Место взятия крови протирают этиловым спиртом. Затем производят укол. Предметным стеклом прикасаются к капле крови, выступающей при уколе. Стекло с каплей крови кладут на горизонтальную поверхность и придерживают левой рукой; а правой рукой к капле придвигают под углом в 45° шлифованное стекло. Капля крови должна равномерно растекаться по краю шлифованного стекла. Плотнo прижимая и не меняя угла наклона, шлифованное стекло продвигают по предметному стеклу. В результате этого на предметном стекле получается равномерный мазок (рисунок 5.45).

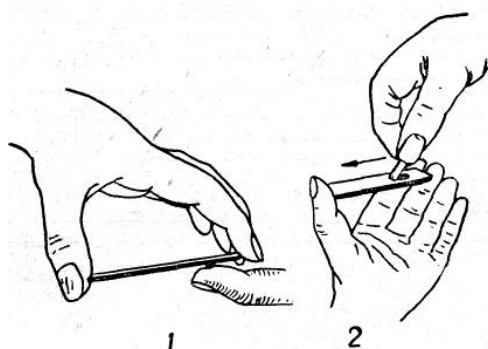


Рисунок 5.45 - Приготовление мазка крови: 1 – взятие капли крови на предметное стекло; 2 – приготовление мазка крови с помощью шлифованного стекла.

**Приготовление мазка – отпечатка тканей.** При исследовании патологического или трупного материала (ткань, орган) ножницы смачивают в этиловом спирте, обжигают на пламени горелки, остужают и срезают кусочек исследуемой ткани (органа). К срезу ткани плотно прижимают предметное стекло. В результате этого на стекле остается мазок – отпечаток.

**Высушивание мазков.** Приготовленные препараты чаще всего высушивают на воздухе при комнатной температуре. Для ускорения высыхания препарат осторожно подогревают в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки или в

термостате при температуре 36-38°C. Правильно высушенный препарат имеет вид сплошного белого налета на поверхности предметного стекла.

**Фиксация препарата.** Высушенный препарат фиксируют, то есть закрепляют на предметном стекле. При фиксации происходит также инактивация микробов. Фиксацию проводят с помощью физического или химического способа.

**Физический способ фиксации препарата.** Высушенный препарат медленно проводят 2-3 раза через верхнюю часть пламени горелки. Затем препарат остужают на воздухе (рисунок 5.46).



Рисунок 5.46 – Фиксация препарата пламенем.

**Химический способ фиксации препарата.** Высушенный препарат помещают в стаканчик с фиксирующей жидкостью или 1-2 капли фиксирующей жидкости наносят на препарат. Экспозиция - 3-5 минут. В качестве фиксирующих химических средств чаще всего используют эфир, этиловый или метиловый спирт, смесь спирта с эфиром (смесь Никифорова) в соотношении 1:1. После фиксации препарат промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

После фиксации с обратной стороны мазка восковым карандашом или маркером обводят границу (зону) препарата, чтобы после окраски точно знать место его нахождения. Фиксированные и окрашенные препараты микробов не опасны, сохраняются без изменений в течение нескольких недель.

**Окрашивание мазка.** Препараты для микроскопирования окрашивают органическими красителями. Красители поступают в продажу в виде сухих порошков. В лаборатории сначала готовят насыщенные спиртовые растворы красителей, а потом из насыщенных растворов готовят разведенные (рабочие) растворы. В настоящее время в продажу поступают также готовые разведенные растворы красок для окрашивания микробов тем или иным способом.

При окрашивании мазка достаточно несколько капель краски, которые наносятся на мазок при помощи пипетки или капельницы. По истечении времени окрашивания краску сливают, а препарат промывают водой. Остатки воды удаляют с помощью фильтровальной бумаги. Досушивают препарат на воздухе. Для микроскопирования используют совершенно сухой мазок, так как остатки воды образуют с иммерсионным маслом мутную эмульсию, затрудняющую исследование препарата.

#### **Порядок микроскопирования:**

1. Зеркало микроскопа устанавливают в соответствии с освещением

(естественное или искусственное) и под малым увеличением (объектив х40, окуляр х7) и поднятом конденсоре регулируют освещенность поля зрения.

2. На окрашенный препарат капают каплю иммерсионного масла и препарат устанавливают на предметный столик микроскопа (при необходимости препарат закрепляют держателями).

3. Обычный объектив микроскопа заменяют на иммерсионный (х90).

4. Наблюдая сбоку, с помощью макрометрического винта осторожно опускают тубус до соприкосновения иммерсионного объектива с маслом.

5. Наблюдая в окуляр и осторожно поворачивая макрометрический винт, определяют контуры микробных клеток и с помощью микрометрического винта добиваются их ясного изображения. Изучают препарат.

6. Поднимают тубус и убирают препарат с предметного столика. Объектив протирают мягкой салфеткой, смоченной бензином.

7. Револьвер устанавливают в нейтральное положение, подкладывают под него салфетку, опускают револьвер и конденсор.

**Красители.** В микробиологической практике для окрашивания микробов используют кислотные (кислые, протоплазматические), нейтральные и щелочные (основные, ядерные) органические красители.

Из **кислых красителей** используют:

- **красные красители:** фуксин кислый, эозин, эритрозин, конго красный;
- **желтые красители:** пикриновая кислота, конго;
- **черные красители:** нигрозин.

Из **основных красителей** чаще применяют:

- **красные красители:** фуксин основной феноловый, сафранин, нейтральный красный, пиронин;
- **фиолетовые красители:** метиловый фиолетовый, генциановый фиолетовый (генциан виолет), кристаллический фиолетовый;
- **синие красители:** метиленовый синий, метиленовый голубой, азур II, виктория;
- **зеленые красители:** малахитовый зеленый, метиленовый зеленый;
- **желто-коричневые красители:** везувин, хризоидин.

В работе используют как спиртовые, так и водные растворы красителей. Спиртовые растворы красителей более устойчивы. Их готовят заранее, заливая сухой краситель этиловым спиртом (96%) в соотношении 1:10. Насыщенные растворы красителей хранят в банках с притертыми пробками. Водные растворы красителей являются нестойкими и окрашивают клетки медленно. Для усиления действия красителя к нему добавляют протравляющее вещество, которое способствует разрыхлению клеточной оболочки и лучшему прокрашиванию микробов. В качестве протравляющих веществ используют формалин, фенол, щелочи. Рецепты приготовления растворов наиболее часто используемых красителей представлены в приложении 1 к данному разделу.

При окрашивании микробов в зависимости от числа применяемых красителей используют простые и сложные (дифференциальные) методы. В простых методах применяют один краситель, в сложных – несколько красителей. Простое окрашивание позволяет судить о величине, форме и взаимном расположении микробных клеток. При этом клетка окрашивается в один цвет, но разные структуры

клетки могут окрашиваться с разной интенсивностью. При сложных методах окрашивания разные клеточные структуры окрашиваются в разные цвета, что позволяет судить о структурных особенностях микробов.

**Простой метод окрашивания.** При простом окрашивании чаще всего используют фуксин Пфейффера или метиленовую синьку по Лёффлеру. Приготовленный и фиксированный препарат окрашивают фуксином в течение 1-2 минут, а метиленовой синькой – в течение 3-5 минут. При простом окрашивании на фиксированный препарат наносят 1-2 капли раствора красителя и выдерживают требуемое время. Окрашивание препарата можно также производить в емкости с раствором красителя или с помощью полоски фильтровальной бумаги, которую помещают на препарат и смачивают 2 каплями раствора красителя. При этом добиваются плотного прилегания бумаги к поверхности стекла. Для окрашивания можно использовать также полоску фильтровальной бумаги, предварительно пропитанную красителем и высушенную. Такую полоску бумаги накладывают на препарат, наносят на нее несколько капель дистиллированной воды и выдерживают необходимое для окрашивания время. По истечении времени окрашивания избыток красителя сливают (убирают полоску бумаги), препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют.

**Сложные методы окрашивания** применяются для детального изучения структуры бактериальной клетки. При сложных методах окрашивания используют несколько красителей. В лабораторной практике из сложных методов окрашивания наиболее часто применяют методы Грама (идентификация грамположительных и грамотрицательных бактерий), Циля-Нельсена (окрашивание кислотоустойчивых бактерий), Бурри-Гинса (выявление капсулы), Ожешко (окрашивание спор) и некоторые другие. Сложные методы окрашивания микробов представлены в приложении 2 к настоящему разделу.

**Метод Грама** является самым универсальным сложным методом окрашивания бактерий. Все бактерии при окрашивании по Граму распределяются на две группы: грамположительные (грамположительные) и грамотрицательные (грамнегативные). Грамположительные микробы окрашиваются в фиолетовый (синий) цвет, грамотрицательные - в красный (розовый) цвет (рисунок 5.47).

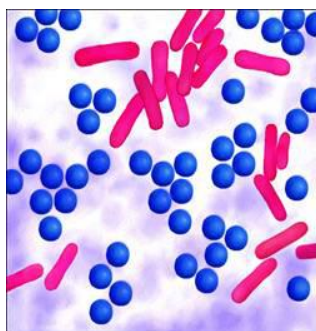


Рисунок 5.47 – Грамположительные кокки (синие) и грамотрицательные палочки (розовые).

Отношение к окраске по Граму является важным тинкториальным признаком, который учитывается при идентификации бактерий.

**Методика окрашивания бактерий по Граму** (рисунок 5.48):

1. На фиксированный препарат наносят несколько капель раствора генцианового фиолетового или помещают полоску фильтровальной бумаги, на которую наливают раствор красителя. Краситель выдерживают в течение 1-2 минут, после чего избыток красителя сливают или снимают фильтровальную бумагу.

2. Не промывая препарата, наносят несколько капель раствора Люголя и выдерживают в течение 1-2 минут до почернения препарата. Избыток красителя сливают.

3. На препарат наносят несколько капель этилового спирта (96%) и выдерживают в течение 30 секунд. После этого спирт сливают, препарат промывают водой, избыток воды сливают.

4. На препарат наносят несколько капель раствора фуксина и выдерживают в течение 1-2 минут. Избыток красителя смывают водой.

5. Препарат высушивают фильтровальной бумагой и досушивают на воздухе.

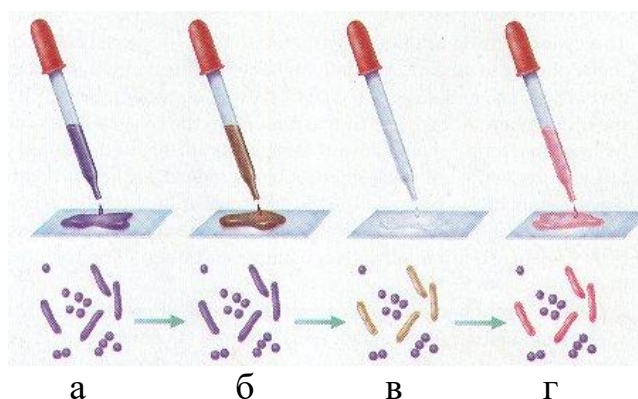


Рисунок 5.48 – Порядок окраски по Граму: а – окраска генциановым фиолетовым; б – окраска раствором Люголя; в – обесцвечивание спиртом; г – окраска фуксином.

После высушивания препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

**Метод Грама в модификации А.В. Синева** предусматривает использование фильтровальной бумаги, пропитанной генциановым фиолетовым, приготовленным по следующему рецепту: генциановый фиолетовый - 1 г, спирт этиловый 96% - 100 мл, глицерин - 5 мл. Фильтровальную бумагу пропитывают красителем, высушивают и нарезают полосками по размеру покровного стекла. При окрашивании на фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги, наносят несколько капель дистиллированной воды и выдерживают в течение 2 минут. После этого бумагу снимают, оставшуюся жидкость сливают, препарат промывают водой. Затем на препарат последовательно наносят раствор Люголя на 2 минуты, этиловый спирт на 20-30 секунд и снова промывают водой. В заключении на препарат на 1-2 минуты наносят раствор фуксина, избыток красителя смывают водой, препарат высушивают при комнатной температуре или фильтровальной бумагой.

Этапы окрашивания бактерий по Граму и результаты окрашивания представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Этапы окрашивания по Граму

Краситель	Продолжительность	Результат окрашивания
-----------	-------------------	-----------------------

	окрашивания	грамположительные	грамотрицательные
Генциановый фиолетовый	1-2 минуты	синие	синие
Раствор Люголя	1-2 минуты	синие	синие
Этиловый спирт	30 секунд	синие	бесцветные
Фуксин	1-2 минуты	синие	красные

Впервые этот метод окрашивания микробов описал в 1884 г. датский бактериолог Г. К. Грам (рисунок 5.49).



Рисунок 5.49 – Ганс Кристиан Йоахим Грам (Hans Christian Joachim Gram, 1853-1938 гг.).

Окрашивание микробов по Граму зависит от строения и химического состава клеточной стенки бактерий (рисунок 5.50).

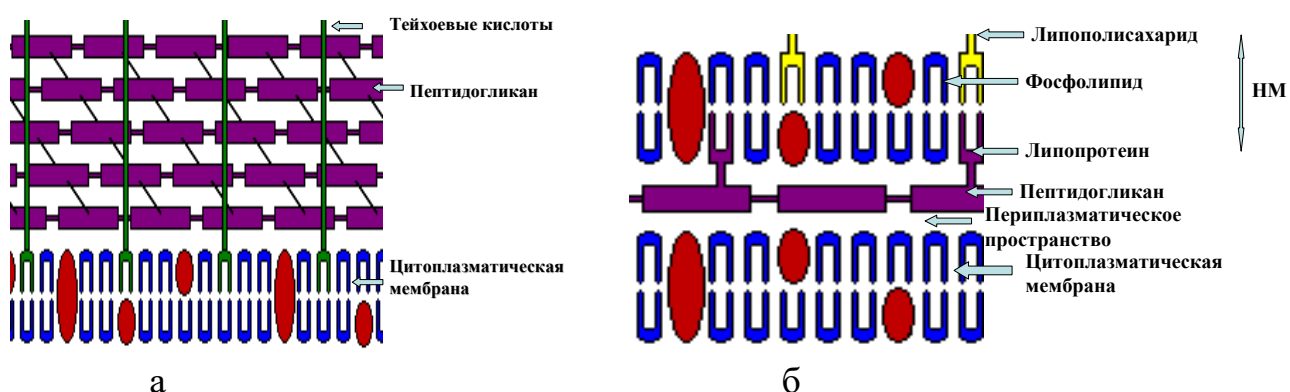


Рисунок 5.50 – Строение клеточной стенки грамположительных (а) и грамотрицательных (б) бактерий (НМ – наружная мембрана).

В клеточной стенке грамположительных микробов содержится большое количество пептидогликана и тейхоевых кислот, с которыми генциановый фиолетовый в присутствии раствора Люголя образует комплекс. Этот комплекс не растворяется этиловым спиртом, поэтому клетка прочно удерживает генциановый фиолетовый. Кроме того, при обработке препарата этиловым спиртом сужаются поры в слое пептидогликана, что также препятствует выходу комплекса из клеточной стенки. Такие бактерии окрашиваются генциановым фиолетовым и в

последующем не воспринимают фуксин, в результате чего клетки имеют фиолетовую окраску.

У грамотрицательных микробов не образуется прочного соединения генцианового фиолетового и йода с компонентами клеточной стенки. На последующих этапах красители легко вымываются этиловым спиртом. Такие клетки дополнительно окрашиваются фуксином в красный (розовый) цвет.

Все бактерии при окраске по Граму распределяются следующим образом (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Распределение бактерий на группы при окрашивании по Граму

Морфологическая группа бактерий	Грамположительные	Грамотрицательные
Кокки	Все кокки, кроме нейссерий	Нейссерии (гонококки и менингококки)
Палочки	Спорообразующие палочки (бациллы и клостридии) Ветвящиеся и способные к ветвлению палочки (микобактерии, коринебактерии) Листерии	Все остальные палочки
Извитые бактерии	Нет	Все извитые бактерии (спириллы, спирохеты)

Промышленностью выпускаются приборы для автоматического окрашивания бактерий по Граму (рисунок 5.51).



Рисунок 5.51 – Прибор для автоматического окрашивания по Граму.

Кислотоустойчивые бактерии с трудом воспринимают красители в результате наличия в клеточной стенке специфических компонентов (липиды, воска). Основным методом окрашивания кислотоустойчивых бактерий является метод Циля-Нельсена. Этот метод предложили в 1883 г. для окрашивания микобактерий туберкулеза немецкий бактериолог Франц Циль (Franz Ziehl, 1857 – 1926 гг.) и немецкий патолог Ф. Нельсен (рисунок 5.52).



Рисунок 5.52 – Фридрих Карл Адольф Нельсен (Friedrich Carl Adolf Neelsen, 1854 – 1898 гг.).

### **Методика окрашивания бактерий по Цилю-Нельсену:**

1. На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги и наносят несколько капель карболового фуксина Циля. Можно использовать заранее заготовленную пропитанную фуксином и высушенную фильтровальную бумагу, на которую наносят 2-3 капли воды.

2. Мазок с краской 2-3 раза подогревают на пламени спиртовки до появления паров, каждый раз отставляя препарат в сторону для охлаждения.

3. Бумажку с краской снимают и остывший препарат промывают водой.

4. Препарат обесцвечивают 5% раствором серной кислотой.

5. Препарат тщательно промывают водой.

6. Докрашивают препарат раствором метиленовой синьки в течение 3-5 минут.

Кислотоустойчивые бактерии по методу Циля-Нельсена окрашиваются в рубиново-красный цвет, некислотоустойчивые бактерии - в синий цвет (рисунок 5.53).

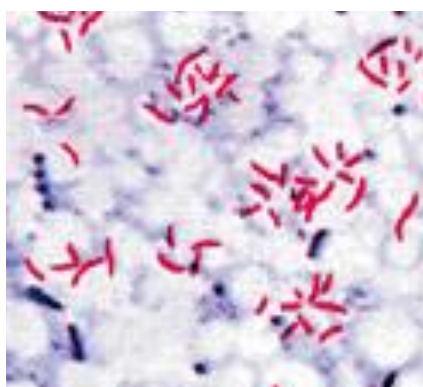


Рисунок 5.53 – Окрашивание микобактерий туберкулеза (рубиново-красные палочки) методом Циля-Нельсена.

Для окрашивания бактерий по Цилю-Нельсену выпускаются готовые наборы красителей (рисунок 5.54).





Рисунок 5.54 – Набор красителей для окрашивания бактерий по Цилю-Нельсену.

Для выявления **капсулы** у бактерий применяют метод окрашивания **по Бурри-Гинсу**. Для этого на предметное стекло наносят каплю туши, а рядом с ней - каплю исследуемого материала. Обе капли тщательно перемешивают и с помощью стекла со шлифованным ребром из полученной смеси готовят толстый мазок. Мазок высушивают, фиксируют на пламени спиртовки и окрашивают фуксином или сафранином в течение 2-3 минут. Краситель сливают, мазок высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Бактерии окрашиваются в красный цвет, капсулы остаются неокрашенными и четко выделяются на черном фоне (рисунок 5.55).

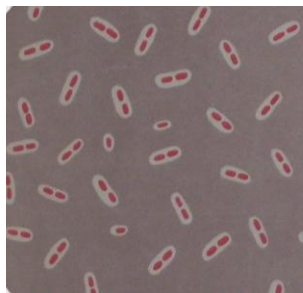


Рисунок 5.55 – Окрашивание капсулы методом Бурри-Гинса.

**Окрашивание спор** бактерий проводят методами Циля-Нельсена или Ожешко (Ауески). При использовании этих методов вегетативные клетки окрашиваются в синий цвет, а споры – в красный цвет. При окрашивании спор **по методу Ожешки** на предметном стекле готовят густой мазок исследуемой культуры, высушивают его и, не фиксируя, наливают на него 0,5% раствор соляной кислоты. Препарат подогревают в течение 2 минут до появления паров. Кислоту сливают. После этого препарат промывают водой, высушивают и фиксируют. На препарат помещают полоску фильтровальной бумаги и наносят несколько капель карболового фуксина Циля. Препарат подогревают на пламени спиртовки до появления паров. Затем препарат обесцвечивают 5% серной кислотой и докрашивают дополнительно метиленовой синькой в течение 3-5 минут. Споры окрашиваются фуксином в ярко-красный цвет, а вегетативные клетки обесцвечиваются серной кислотой и окрашиваются метиленовой синькой в синий цвет (рисунок 5.56).

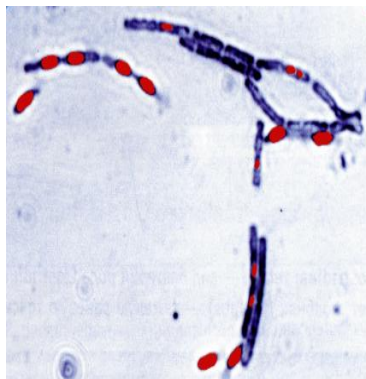


Рисунок 5.56 – Окраска спор *Bacillus cereus* методом Ожешко.

Таким образом, для выявления отдельных структур бактериальной клетки применяют сложные методы окрашивания, представленные в таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Сложные методы окрашивания клеточных структур бактерий

Структура бактерий	Метод окрашивания	Вид препарата
Клеточная стенка	У некислотоустойчивых – метод Грама	Грамположительные бактерии – фиолетовые Грамотрицательные бактерии - розовые
	У кислотоустойчивых – метод Циля-Нельсена	Кислотоустойчивые бактерии – красные Некислотоустойчивые бактерии - синие
Споры	По Ожешко	Споры – красные Вегетативные клетки - синие
Капсула	По Бурри-Гинсу	Капсула бесцветная Микробная клетка - красная
Жгутики	По Морозову	Жгутики – светло-желтые Микробная клетка – темно-коричневая
Нуклеоид	По Романовскому-Гимзе	Нуклеоид – фиолетовый Цитоплазма – бледно-розовая
Зерна волютина	По Нейссеру	Зерна волютина – синие Микробная клетка - желтая

### Приложение 5.1. Рецепты приготовления растворов красителей

#### 1. Фуксин основной, насыщенный спиртовый раствор:

Фуксин основной	10 г
Этанол (96%)	100 мл

Фуксин основной вносят в этанол, перемешивают, смесь оставляют на сутки для насыщения раствора.

## 2. Фуксин основной карболовый (фуксин Циля):

Насыщенный спиртовой раствор основного фуксина	10 мл
Водный раствор фенола (5%)	100 мл

Растворы спешивают, через 48 часов смесь фильтруют. Краситель отличается устойчивостью.

На практике применяют также следующий рецепт приготовления карболового фуксина:

Фуксина (основного)	1 г
Карболовой кислоты кристаллической	5 г
Спирта 96°	10 мл
Глицерина	несколько капель
Воды дистиллированной	100 мл

Порошок фуксина тщательно растирают с карболовой кислотой в ступке, добавив несколько капель глицерина; во время растирания приливают понемногу спирт. Когда смесь превратится в полужидкую кашицу (без комков), приливают понемногу, продолжая все время размешивать, дистиллированную воду. Дают постоять 2 суток, после чего фильтруют.

## 3. Фуксин основной, водно-спиртовой или водный (Пфейффера):

Карболовый фуксин Циля	1 мл
Вода дистиллированная	9 мл

Разбавленный раствор фенола нестойк, поэтому его готовят перед применением.

## 4. Метиленовый синий, насыщенный раствор:

Метиленовый синий	3 г
Этанол (96%)	100 мл

Компоненты смешивают, оставляют на 2-3 суток при периодическом перемешивании, затем фильтруют. Раствор устойчив при хранении.

## 5. Метиленовый синий, разбавленный раствор:

Насыщенный раствор метиленового синего	1 мл
Вода дистиллированная	40 мл

## 6. Уксуснокислая синька Нейссера:

Метиленовый синий	0,1 г
Этанол (96%)	2 мл
Уксусная кислота	5 мл
Дистиллированная вода	100 мл

## 7. Метиленовый синий по Лёффлеру:

Насыщенный раствор метиленового синего	30 мл
Вода дистиллированная	100 мл
Гидроокись калия, 1% раствор	1 мл

После смешивания компонентов смесь выдерживают в течение суток и фильтруют, после чего краситель готов к употреблению. Раствор стойкий и хорошо хранится в течение длительного времени.

**8. Генциановый фиолетовый феноловый раствор:**

Раствор I.

Генциановый фиолетовый	1 г
Этанол (96%)	10 мл

Раствор 2.

Фенол	2,5 г
Вода дистиллированная	до 100 мл

После полного растворения генцианового фиолетового раствора свешивают.

**9. Карболовый генцианвиолет** готовят также по следующему рецепту:

Генцианвиолет	1 г
Карболовая кислота кристаллическая	5 г
Спирт (96%)	10 мл
Глицерин	несколько капель
Вода дистиллированная	100 мл

Порошок генцианвиолета тщательно растирают с карболовой кислотой в ступке, добавив несколько капель глицерина; во время растирания приливают понемногу спирт. Когда смесь превратится в полужидкую кашицу (без комков), приливают понемногу, продолжая все время размешивать, дистиллированную воду. Дают постоять 2 суток, после чего фильтруют.

**10. Кристаллический фиолетовый (по Хукеру):**

Раствор I.

Кристаллический фиолетовый	2 г
Этанол (96%)	20 мл

Раствор 2.

Аммоний щавелевокислый	0,8 г
Вода дистиллированная	80 мл

Растворы смешивают и выдерживают перед использованием 2 суток.

**11. Раствор эритрозина:**

Эритрозин	3 г
Вода дистиллированная	200 мл
Фенол	5 г

После растворения эритрозина и фенола смеси дают отстояться сутки.

**12. Жидкую натуральную тушь** разводят водопроводной водой в десять раз (1 мл туши в 9 мл воды), разливают в пробирки по 3-5 мл, автоклавируют при 0,5 ати. После этого суспензии дают отстояться 2 недели и используют для окраски некоторых компонентов клетки, в частности – капсул.

**13. Сафранин.** 2 г краски растворяют в 100 мл смеси спирта этилового 96%-ного и дистиллированной воды поровну или в 100 мл кипящей дистиллированной воды. Фильтруют.

**14. Малахитовый зеленый** (водный раствор). 1 г краски растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Фильтруют.

**15. Конго красный:** 3 г краски растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

**16. Раствор Люголя.** 2 г калия йодида растворяют в 25 мл дистиллированной воды. Затем к раствору добавляют 1 г йода кристаллического, доводят до 300 мл дистиллированной водой, фильтруют.

**17. Раствор везувина:**

Везувин	2 г
Спирт (96%)	60 мл
Дистиллированная вода	40 мл

Смесь кипятят, после охлаждения – фильтруют.

## Приложение 5.2. Методы окрашивания микробов

**1. Метод Ольта.** Используется для выявления капсулы бактерий. Мазок окрашивают 2-3%-ным раствором сафранина. Краситель готовят перед употреблением, растворяя его в горячей воде с последующим фильтрованием. Окрашивают при легком нагревании в течение 1-3 минут и быстро промывают водой. Препарат не высушивают, на нем должна быть вода, накрывают покровным стеклом и рассматривают под иммерсионной системой микроскопа. Световые лучи, проходя через слой воды, усиливают разницу в преломлении лучей от капсулы и тела микробной клетки. В поле зрения микроскопа видно, что тела микробных клеток окрашены в красный цвет, капсулы - в желтый.

**2. Метод Михина.** Используется также для выявления капсулы бактерий. Фиксированный мазок окрашивают метиленовым голубым Лёффлера в течение 2-3 минут при подогревании. Краситель быстро смывают водой, мазок высушивают. При микроскопировании тела микробных клеток выглядят темно-синими, капсулы - светло-розовыми.

**3. Окрашивание зерен волютина по методу Нейссера.** Для этого фиксированный мазок окрашивают уксуснокислой синькой в течение 1 минуты. Затем краску сливают, препарат промывают водой и обрабатывают раствором Люголя в течение 20-30 секунд. Не промывая водой, мазок окрашивают везувином в течение 10-15 секунд. Затем препарат промывают водой, высушивают и исследуют с иммерсионной системой. Тела бактерий окрашиваются в нежный светло-коричневый цвет, зерна волютина - в темно-синий, почти черный цвет.

**4. Окрашивание спор по методу Златогорова.** Мазок фиксируют над пламенем горелки. Затем на поверхность мазка помещают полоску фильтровальной бумаги, окрашенной основным феноловым фуксином Циля. Бумагу смачивают 3-5 каплями воды. Препарат подогревают в течение 5-7 минут, обесцвечивают 3%-ным водным раствором серной кислоты в течение 5-10 секунд и промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят метиленовым голубым в течение 2-3 минут, после чего мазок промывают водой и высушивают. Споры окрашиваются в красный цвет, а вегетативные клетки - в синий.

**5. Окрашивание спор по Пешкову.** После фиксации препарата над пламенем горелки мазок окрашивают метиленовым голубым Лёффлера в течение 15-20 секунд, подогревая над пламенем спиртовки. Препарат промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного в течение 30 секунд. Затем препарат промывают водой и высушивают. При этом методе споры окрашиваются в голубой или синий цвет, а вегетативные формы – в розовый.

**6. Окрашивание жгутиков бактерий по методу Леффлера.** Взвесь бактерий вносят в каплю воды (не размазывая ее петлей), нанесенную на

предметное стекло, и дают высохнуть. Для обеспечения сохранности жгутиков необходимо чрезвычайно осторожное обращение с мазком во время всех манипуляций. Обрабатывают 15-20 минут при комнатной температуре протравой следующего состава: 1 мл насыщенного спиртового раствора фуксина и смесь из 10 мл 25% водного раствора танина с 5 мл насыщенного водного раствора сернокислого железа (протраву готовят за несколько суток до употребления; перед употреблением ее отфильтровывают). Препарат тщательно промывают водой, высушивают на воздухе. Докрашивают фуксином Циля в течение 3-4 минут при легком подогревании (без образования паров). Затем препарат промывают водой, высушивают над пламенем горелки.

**7. Окрашивание микробов по Романовскому-Гимзе.** Краска Романовского-Гимза – это смесь азура, эозина и метиленовой синьки. Раствор этой краски сине-фиолетового цвета. Она окрашивает клеточную цитоплазму в голубой цвет, а ядра клеток, зернистость, слизь, капсулы бактерий - в красно-фиолетовый цвет. Окрашивание по Романовскому-Гимзе позволяет обнаружить различные структурные компоненты клеток. Непосредственно перед окрашиванием бактерий к 10 мл дистиллированной воды добавляют 10 капель краски Романовского-Гимзы и тотчас же наливают на фиксированный препарат (или погружают препарат в стаканчик с краской). Через 1 час краску сливают, препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

**8. Окрашивание гликогена** проводится путем добавления к капле культуры такого же количества раствора Люголя. При соединении с раствором Люголя гликоген приобретает красно-бурую окраску.

**9. Окрашивание гранулезы** осуществляется следующим образом. К капле микробной культуры добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом. Под иммерсионной системой микроскопа видны микробные клетки и окрашенные в синий цвет зерна гранулезы.

**10. Окрашивание жира.** Жир окрашивают спиртовым раствором Судана III (0,05 г Судана III в 100 мл 96%-ного этилового спирта). С этой целью к капле культуры добавляют краситель и тщательно перемешивают. Препарат высушивают и микроскопируют. Капли жира окрашиваются в красный цвет, а цитоплазма бактерий остается неокрашенной.

**11. Окрашивание зерен волютина.** Волютин в микробных клетках встречается в виде гранул, которые состоят из полифосфатов. Гранулы волютина в микробной клетке обнаруживаются при окрашивании препарата по Омелянскому. С этой целью приготовленный мазок фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 30 секунд карболовым фуксином Циля. После промывания мазок обесцвечивают 1%-ным раствором серной кислоты в течение 20-30 секунд. Затем мазок вновь промывают водой и дополнительно окрашивают слабым раствором метиленового голубого (1:40) в течение 15-20 секунд. Микроскопическая картина: гранулы волютина красные, цитоплазма синяя.

## 5.11. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Расскажите об устройстве механической части светового микроскопа.

2. Расскажите об устройстве оптической части светового микроскопа.
3. Расскажите об устройстве осветительной части светового микроскопа.
4. Расскажите о принципиальном устройстве электронного микроскопа.
5. Что представляет собой микроскопия в светлом поле зрения?
6. Что такое иммерсионная микроскопия?
7. Расскажите об использовании фазово-контрастной микроскопии.
8. Что такое темнопольная микроскопия?
9. Что такое люминесцентная микроскопия и в чем ее преимущества?
10. Расскажите о правилах приготовления препаратов для микроскопии микробов в живом состоянии.
11. Расскажите о правилах приготовления препаратов для микроскопии микробов в окрашенном состоянии.
12. Что представляют собой простые методы окрашивания микробов?
13. Что такое сложные методы окрашивания микробов, какие сложные методы окрашивания микробов Вы знаете?
14. Сущность окраски по Граму.
15. Какие методы окрашивания применяют для выявления капсул, спор и жгутиков бактерий?

## 5.12. Тренировочные тесты

1. К механической части микроскопа относится:
  - объектив
  - окуляр
  - + штатив
  - зеркало
  - конденсор
2. К оптической части микроскопа относятся:
  - + объективы
  - тубус
  - + окуляр
  - микровинт
  - осветитель
3. К осветительной части светового микроскопа относятся:
  - макровинт
  - + конденсор
  - + зеркало
  - предметный столик
  - револьвер
4. К простым методам окрашивания микробов относится окрашивание:
  - по Граму
  - по Цилю-Нельсену

- + метиленовым синим
- по Пешкову
- + фуксином

5. К сложным методам окрашивания микробов относятся окрашивание:

- + по Граму
- + по Цилю-Нельсену
- фуксином
- метиленовым синим
- + по Ожешко

6. Назовите сложные методы окраски:

- генцианвиолетом
- + Циля-Нельсена
- + Бурри-Гинса
- метиленовым синим
- фуксином

7. Окрашивание грамотрицательных бактерий в красный цвет объясняется:

- образованием в клетке нерастворимого в спирте комплекса веществ
- химической реакцией между йодом и фуксином
- химической реакцией между раствором Люголя и генцианвиолетом
- химической реакцией между фуксином и генцианвиолетом
- + обесцвечиванием клеточной стенки спиртом

8. Окрашивание грамположительных бактерий в фиолетовый цвет объясняется:

- высоким содержанием в клеточной стенке липидов
- + высоким содержанием в клеточной стенке пептидогликана
- + наличием в клеточной стенке тейхоевых кислот
- высокой концентрацией в клетке углеводов
- наличием капсулы

9. Жгуты выявляют при окраске мазка:

- по Граму
- по Бурри-Гинсу
- по Ожешко
- + серебрением по Морозову
- по Цилю-Нельсену

10. Капсула у бактерий выявляется с помощью:

- + окраски по методу Бурри-Гинса
- + электронной микроскопии
- окраски по методу Грама
- окраски по методу Циля-Нильсена
- окраски по методу Лёффлера



11. Кислотоустойчивые бактерии окрашивают с помощью:

- метода Грама
- + метода Циля-Нельсена
- метода Ожешко
- метода Бури-Гинса
- раствора Люголя

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 6. Строение и репродукция вирусов

### 6.1. Форма и размеры вирусов

Вирусы - это мельчайшие формы жизни, не имеющие клеточного строения. Вирусы образуют отдельное царство (*Vira*). От других микробов вирусы отличаются характерными для них уникальными свойствами.

1. **Ультрамикроскопические размеры вирусов.** Вирусы измеряются в нанометрах (1 мм = 1000 мкм, 1 мкм = 1000 нм). По размерам вирусы подразделяются на **мелкие** (например, вирус полиомиелита) - размер вирусных частиц 10-25 нм, **средние** (например, вирусы гриппа) - размер вирионов составляет 100-120 нм, **крупные** (например, вирус натуральной оспы) - размер вирусных частиц около 350 нм (рисунок 6.1).

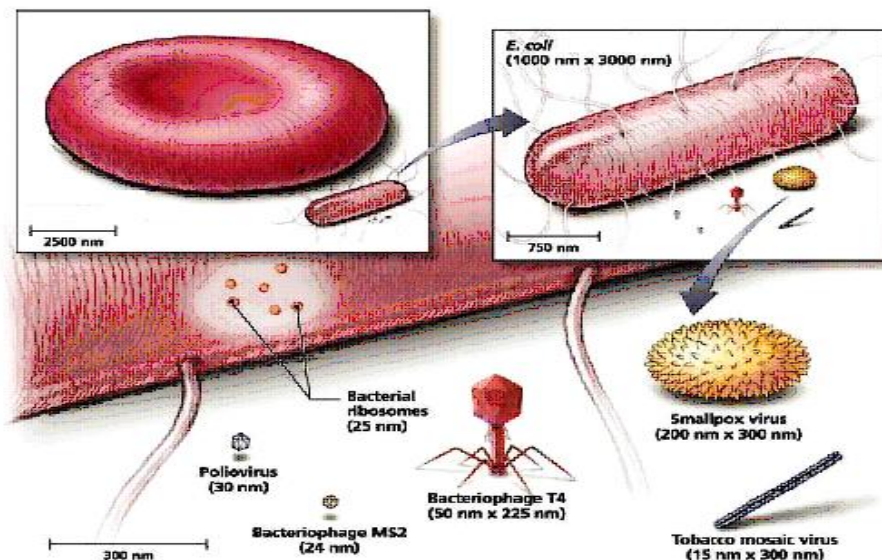


Рисунок 6.1 – Сравнительная характеристика размеров клеток и вирусных частиц.

2. **Наличие только одного типа нуклеиновой кислоты - ДНК или РНК.** По этому признаку все вирусы разделены на два класса - ДНК-содержащие вирусы и РНК-содержащие вирусы.

3. **Облигатный внутриклеточный паразитизм.** Вирусы способны реплицироваться (размножаться) только внутри живых клеток, так как у них отсутствуют собственные системы, синтезирующие белок и генерирующие энергию.

4. **Простое строение вириона (вирусной частицы).** Вирион состоит из генома (ДНК или РНК), покрытого одной (капсидом) или двумя (капсидом и суперкапсидом) оболочками. У вирусов отсутствуют такие клеточные элементы как цитоплазма, клеточные мембраны, рибосомы и др.

5. **Дизъюнктивной (разобщенной) способ репродукции** внутри клетки. При репродукции вирусов в разных частях инфицированной клетки синтезируются

нуклеиновые кислоты и белки, которые затем объединяются в дочерние вирусные частицы. Синтез компонентов вирусных частиц происходит либо в цитоплазме, либо в цитоплазме и ядре клетки.

Морфологию и структуру вирусов изучают в основном с помощью электронной микроскопии. Препараты для электронной микроскопии готовят специальными методами:

- **методом напыления** (на подложку из чистого углерода или коллодия наносят вирусосодержащий материал, лиофильно высушивают и напыляют тяжелые металлы - в частности, палладий);

- **методом реплик** (вирусосодержащий материал заливают тонким слоем пластмассы и микроскопируют);

- **методом негативного контрастирования** (вирусосодержащий материал помещают на подложку, добавляют раствор уранилацетата, который попадает во все углубления вириона и создает для электронов непроницаемый фон).

Размеры вирионов определяют с помощью ультрафильтрации через фильтры с известным диаметром пор в нм или методом ультрацентрифугирования. Крупные вирионы можно увидеть в световом микроскопе в виде мелких внутриклеточных образований - включений (например, тельца Пашена при оспе, тельца Бабеша-Негри при бешенстве).

Вирусная частица называется **вирионом**. Выделяют следующие формы вирионов:

- **палочковидная форма** (рисунок 6.2) характерна для вируса табачной мозаики;

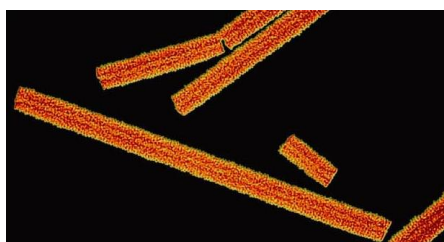
- **пулевидная форма** (рисунок 6.3) присуща вирусу бешенства;

- **сферическая форма** (рисунок 6.4) отмечается у многих вирусов, в частности у герпесвирусов, вируса иммунодефицита человека;

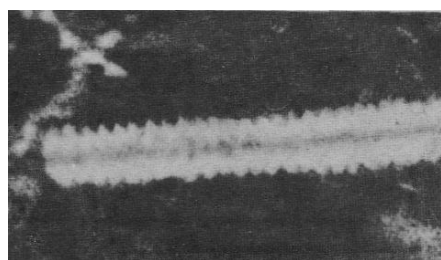
- **нитевидная форма** (рисунок 6.5) наблюдается у филовирусов;

- **овальная форма** (рисунок 6.6) характерна для вируса натуральной оспы;

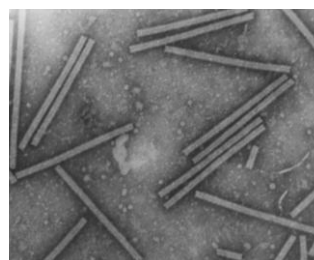
- **сперматозоидная форма** (рисунок 6.7) отмечается у большинства вирусов бактерий (бактериофагов).



а

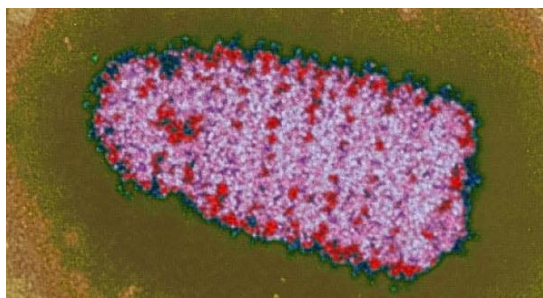


б

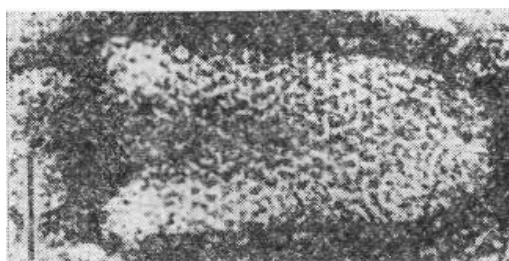


б

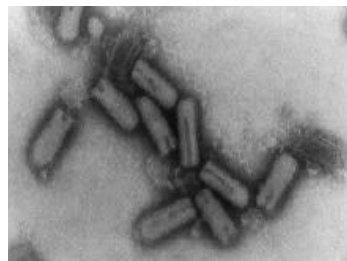
Рисунок 6.2 - Палочковидная форма вирионов. Компьютерная окраска (а) и электронная микроскопия (б).



а



б



б

Рисунок 6.3 - Пулевидная форма вирионов. Компьютерная окраска (а) и электронная микроскопия (б).

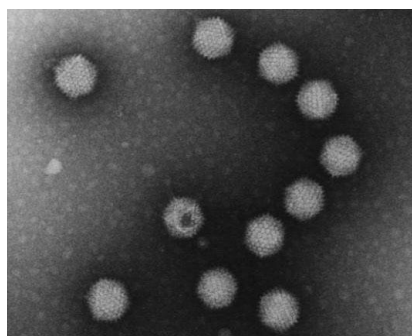
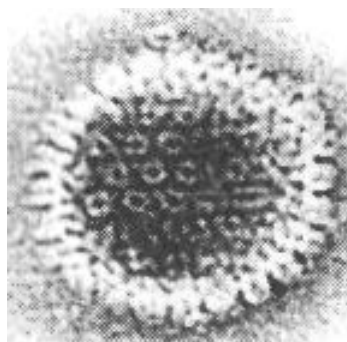
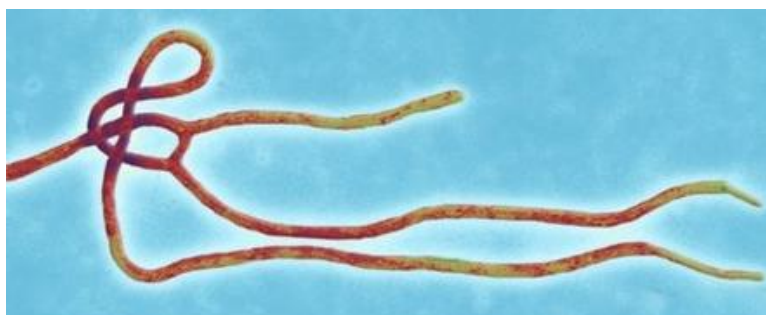
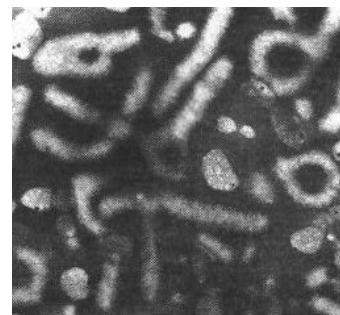


Рисунок 6.4 - Сферическая форма вирионов. Электронная микроскопия.



а



б

Рисунок 6.5 - Нитевидная форма вирионов. Компьютерная окраска (а) и электронная микроскопия (б).

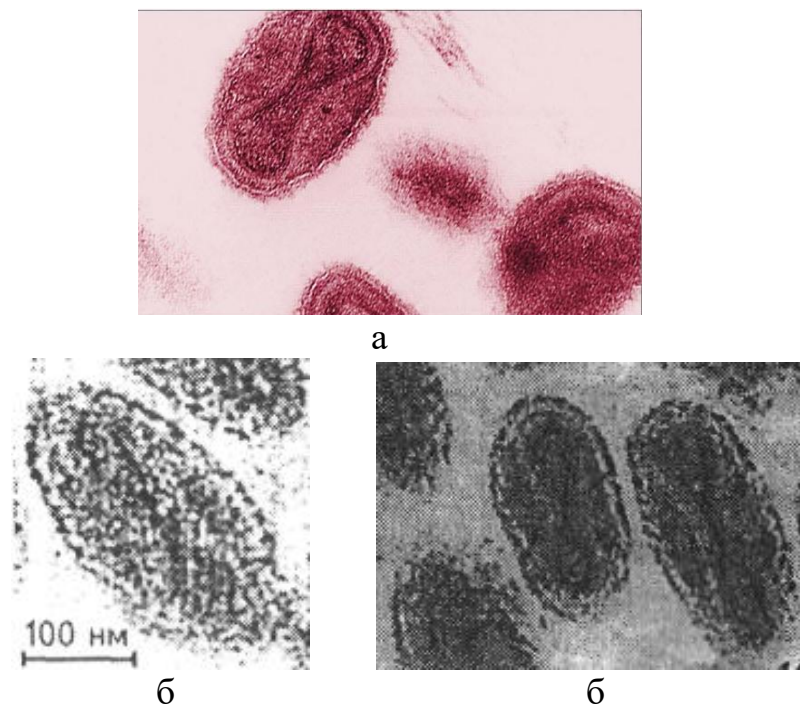


Рисунок 6.6 - Овальная форма вириона вируса натуральной оспы. Компьютерная окраска (а) и электронная микроскопия (б).

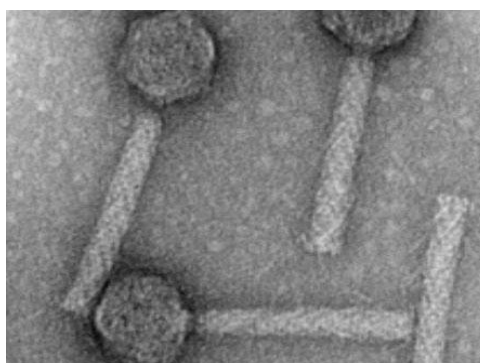


Рисунок 6.7 - Сперматозоидная форма вирионов. Электронная микроскопия бактериофагов.

## 6.2. Структура вирусов

По своей структуре вирусы представляют собой геометрически правильные образования, состоящие из центральной части (генома) и одной или двух оболочек. В зависимости от количества оболочек вирусы подразделяются на 2 типа:

- **простые вирусы** (просто устроенные, безоболочечные, “голые”), состоящие из нуклеиновой кислоты и одной белковой оболочки - капсида;
- **сложные вирусы** (сложно устроенные, оболочечные, “одетые”), содержащие кроме нуклеиновой кислоты и капсида внешнюю липопротеиновую оболочку (суперкапсид).

Сравнительное схематическое изображение простого и сложного вирусов представлено на рисунках 6.8 и 6.9.

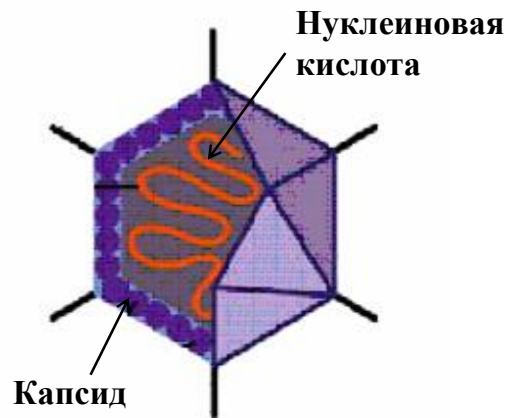


Рисунок 6.8 - Схематическое изображение простого (безоболочечного) вируса.

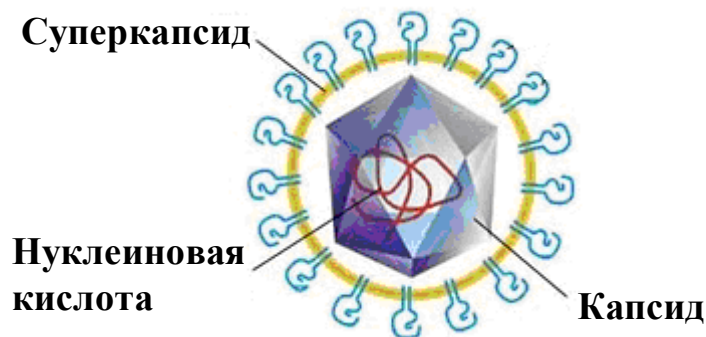


Рисунок 6.9 - Схематическое изображение сложного (оболочечного) вируса.

В центре вириона располагается **нуклеиновая кислота (вирусный геном)**. Снаружи нуклеиновая кислота покрыта белковой оболочкой - **капсидом** (лат. *capsa* – футляр, коробка). Капсид как чехлом окружает вирусную нуклеиновую кислоту. Вирусный геном и капсид вместе образуют **нуклеокапсид**. Капсид состоит из повторяющихся морфологических субъединиц - **капсомеров**. Простые вирусы могут быть как РНК-содержащими, так и ДНК-содержащими (рисунок 6.10).

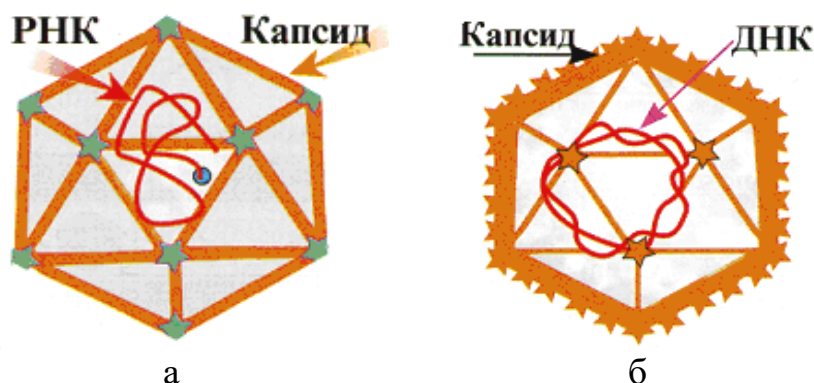


Рисунок 6.10 - Просто устроенные (безоболочечные) РНК-содержащий (а) и ДНК-содержащий (б) вирусы.

Каждый капсомер построен из одной или нескольких гомологичных или

гетерологичных полипептидных цепей, которые соединены друг с другом дисульфидной связью. Таким образом, каждый капсомер может быть мономерным (содержать один полипептид) либо полимерным (включать несколько полипептидов). Например, у вируса табачной мозаики 2130 одинаковых капсомеров.

У сложных вирусов наряду с капсидом имеется дополнительная оболочка - суперкапсид (пеплос, покрывало). Суперкапсид состоит из двойного слоя липидов и специфических вирусных белков. Суперкапсидная оболочка вируса является модифицированной цитоплазматической мембраной клетки, в которой репродуцировался данный вирус. Модификация происходит путем встраивания вирусных белков в участки цитоплазматической мембраны инфицированной клетки. Сложные вирусы также могут быть как РНК-содержащими, так и ДНК-содержащими (рисунок 6.11).



Рисунок 6.11 - Сложно устроенные (оболочечные) ДНК-содержащий вирус герпеса (а) и РНК-содержащий вирус гриппа (б).

На поверхности некоторых оболочечных вирусов располагаются **шипы** или шипики (пепломеры, суперкапсидные белки) - это липопротеиновые или гликопротеиновые выступы. Например, у вируса гриппа имеется два типа шипов: гемагглютинин и нейраминидаза. Шипы выполняют функцию взаимодействия вирусных частиц с чувствительными клетками. Если удалить шипы детергентом, то вирус полностью теряет инфекционную активность. В электронном микроскопе шипы выглядят в виде отростков разной формы (рисунок 6.12).

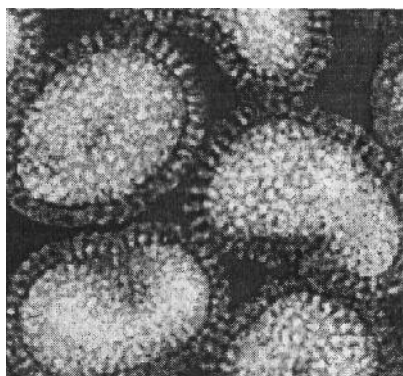


Рисунок 6.12 - Электронная микрофотография вируса гриппа типа А.

Суперкапсид и капсид выполняют функции защиты генома от воздействия повреждающих факторов внешней среды, обуславливают взаимодействие вирусов с восприимчивой клеткой и проникновение вирусного генома в ее цитоплазму, а также определяют антигенные, иммуногенные и многие другие свойства (гемагглютинацию, гемадсорбцию, слияние клеток и др.).

У некоторых сложных вирусов между суперкапсидом и капсидом расположен слой белка, который называется **матриксом** (мембранный, матриксный белок, М-белок, внутренняя белковая мембрана). Этот белок способствует взаимодействию суперкапсида с нуклеокапсидом (рисунок 6.13).

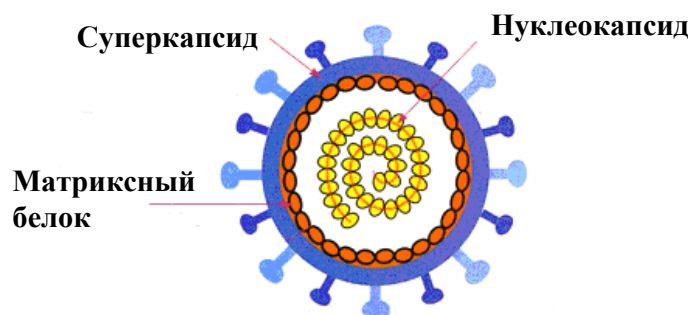


Рисунок 6.13 - Матриксный белок вирусов.

Нуклеокапсид у оболочечных вирусов часто обозначают термином “сердцевина” (core).

### 6.3. Типы симметрии вирусов

Капсомеры капсида состоят из одной или нескольких молекул белка, соединенных друг с другом и уложенных вокруг нуклеиновой кислоты в определенном порядке. В результате этого образуются симметричные структуры. Способ укладки капсомеров и форма образующихся структур определяют **тип симметрии** вириона. Различают три типа симметрии вирионов: спиральный, кубический и смешанный.

**I группа** - вирусы, имеющие **спиральный тип симметрии**. Этот тип симметрии характерен для вирусов, у которых капсомеры соединяются с геномом и образуют спиралевидную или винтообразную структуру (например, у вируса табачной мозаики). Капсомеры таких вирусов уложены в спирали одинакового диаметра. Витки спирали тесно прилегают друг к другу. Спиральный тип симметрии характерен для палочковидной, пулевидной или нитевидной форм вирусов (рисунок 6.14).



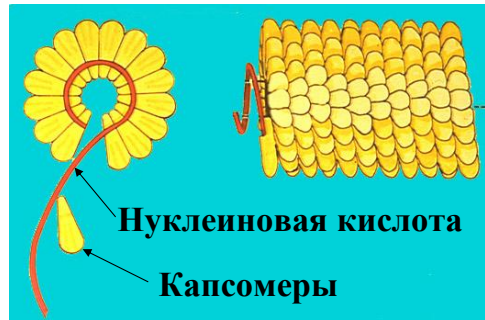


Рисунок 6.14 - Модель вируса со спиральным типом симметрии.

**II группа** - вирусы, имеющие **кубический тип симметрии**. При кубическом типе симметрии капсомеры уложены вокруг нуклеиновой кислоты в виде правильного многогранника: додекаэдра (12 граней) и икосаэдра (20 граней) (рисунок 6.15).

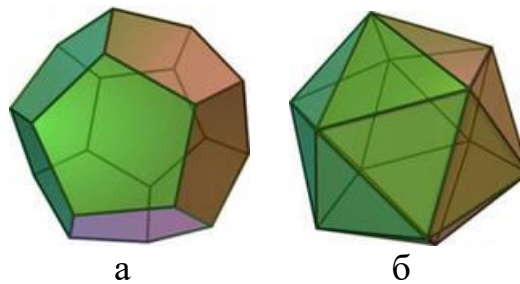


Рисунок 6.15 - Правильные многогранники: додекаэдр (а) и икосаэдр (б).

Вирусы, имеющие кубический тип симметрии, принимают сферическую форму (рисунок 6.16).

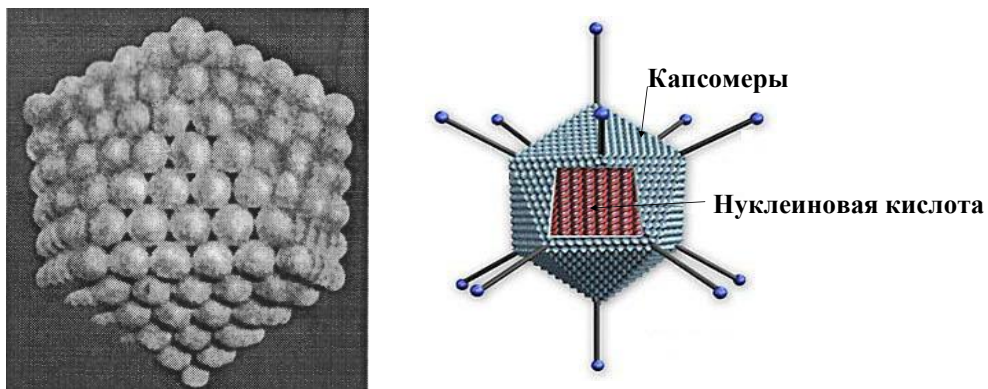


Рисунок 6.16 - Модель вируса с кубическим типом симметрии.

Такой тип симметрии имеют вирусы герпеса, полиомиелита и многие другие.

**III группа** - вирусы, имеющие **комбинированный (смешанный, сложный) тип симметрии**. Такой тип симметрии характерен для вирусов бактерий (бактериофагов), имеющих вид сперматозоида. При этом головка бактериофага имеет форму многогранника с кубическим типом симметрии, а хвостовой отросток – цилиндрическую форму со спиральным типом симметрии (рисунок 6.17).

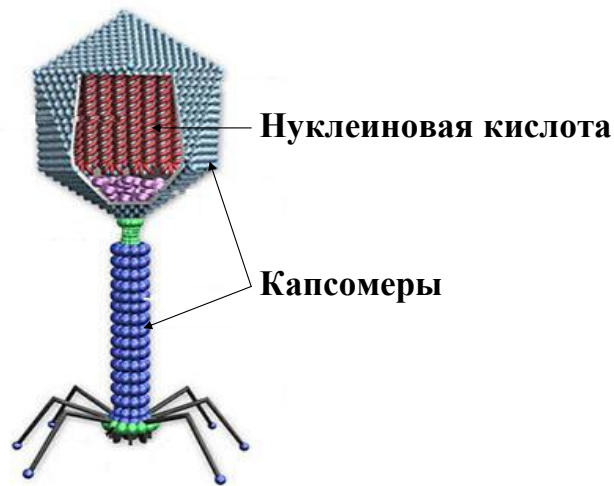


Рисунок 6.17 - Модель бактериофага с комбинированным типом симметрии.

Тип симметрии определяется только нуклеокапсидом, суперкапсид при этом не учитывается. Например, вирус гриппа снаружи выглядит как сферическая структура, хотя нуклеокапсид состоит из 8 фрагментов, каждый из которых имеет спиральный тип симметрии (рисунки 6.18).

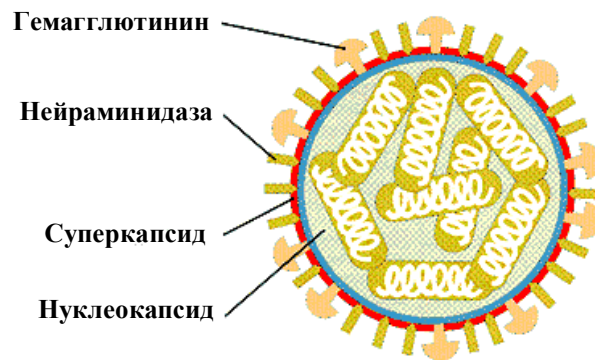


Рисунок 6.18 - Схематическое изображение вириона вируса гриппа с фрагментированным геномом.

Подобное строение можно наблюдать у других вирусов (рисунки 6.19 и 6.20).

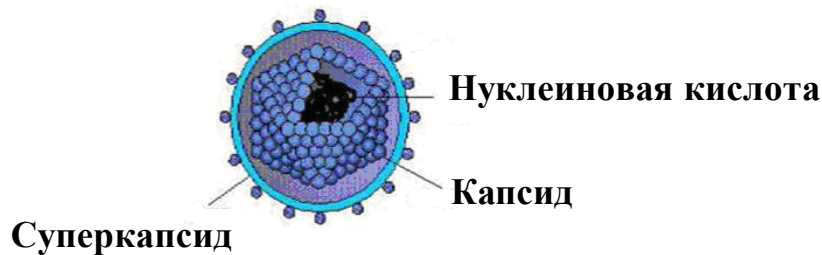


Рисунок 6.19 - Строение оболочечного вириона с икосаэдрическим нуклеокапсидом.

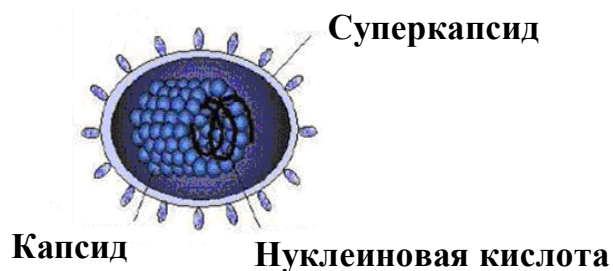


Рисунок 6.20 - Строение оболочечного вириона со спиральным нуклеокапсидом.

Таким образом, тип симметрии определяет форму простого вируса или форму нуклеокапсида сложного вируса, но не влияет на форму оболочечного вируса.

#### 6.4. Вирусный геном

В отличие от бактерий вирусы содержат только один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК). Нуклеиновые кислоты вирусов, составляющие вирусный геном, имеют в своем составе те же компоненты, что и геномы других организмов:

- пуриновые основания (аденин и гуанин);
- пиримидиновые основания (цитозин и тимин в ДНК или цитозин и урацил в РНК);
- углеводы (рибоза в РНК или дезоксирибоза в ДНК);
- остатки фосфорной кислоты.

**Вирусный геном** может быть представлен либо РНК (РНК-содержащие вирусы), либо ДНК (ДНК-содержащие вирусы). При этом нуклеиновая кислота может быть однонитевой или двунитевой. У некоторых РНК-содержащих вирусов (например, у вируса гриппа) геном может состоять из нескольких фрагментов нуклеиновой кислоты (**фрагментированный геном**). Вирусы, содержащие фрагментированную молекулу нуклеиновой кислоты, называются **полигеномными** вирусами. У полигеномных вирусов каждый фрагмент заключен в свою капсидную оболочку. Нуклеиновые кислоты могут быть линейными или кольцевыми. Содержание нуклеиновой кислоты в вирионе разных вирусов составляет от 1 до 32% массы вириона.

Геном вирусов содержит от 3 до 100 и более генов, которые подразделяются на структурные и регуляторные. Структурные гены кодируют синтез белков, входящих в состав вириона, регуляторные гены изменяют метаболизм инфицированной клетки и регулируют скорость репродукции вирусов.

Таким образом, вирусные геномы по количеству цепей бывают однонитевыми (одноцепочечными) и двунитевыми (двуцепочечными), по форме - линейными и кольцевыми (циркулярными), по протяженности - непрерывными и фрагментированными.

**Геном ДНК-содержащих вирусов** может быть представлен следующими типами (рисунок 6.21).

1. **Однонитевая линейная ДНК.** Примером таких вирусов являются парвовирусы.

2. **Двунитевая линейная ДНК.** Такой тип вирусного генома характерен, в

частности, для вируса герпеса.

3. **Двунитевая кольцевая ДНК.** Такой тип генома характерен для папилломавирусов.

4. **Двунитевая кольцевая ДНК с дефектом одной цепи.** Такой геном характерен, в частности, для вируса гепатита В, у которого одна цепь двунитевой кольцевой молекулы ДНК короче другой цепи.





- **Однонитевая линейная ДНК (парвовирусы)** 
- **Двунитевая линейная ДНК (вирус герпеса)** 
- **Двунитевая кольцевая ДНК (папилломавирус)** 
- **Двунитевая кольцевая ДНК с дефектом одной цепи (гепатит В)** 

Рисунок 6.21 - Схематическое изображение генома ДНК-содержащих вирусов.

Молекулярная масса ДНК вирусов позвоночных варьирует в широких пределах: от 0,7-1,5 МД у цирковирусов и парвовирусов до 150-375 МД у вирусов оспы.

**Геном РНК-содержащих вирусов**, патогенных для человека, может быть представлен следующими типами (рисунок 6.22):

1. **Одноцепочечная нефрагментированная РНК, обладающая матричной активностью** (позитивная, или +РНК), то есть способная выступать в качестве иРНК. Примерами таких вирусов являются пикорнавирусы.

2. **Одноцепочечная нефрагментированная РНК, не обладающая матричной активностью** (негативная, или -РНК). Минус-РНК не способна выполнять функцию иРНК. В связи с этим вирион имеет в своем составе фермент РНК-зависимую РНК-полимеразу. Этот фермент на основе вирусной РНК синтезирует матричную РНК, необходимую для трансляции вирусспецифических белков. Примерами таких вирусов являются парамиксовирусы и рабдовирусы.

3. **Одноцепочечная фрагментированная РНК, не обладающая матричной активностью** (негативная, минус-РНК). Такой вирион имеет фрагментированный геном и транскриптазу. К этим вирусам относятся ортомиксовирусы (РНК вириона состоит из 8 фрагментов).

4. **Двухцепочечная фрагментированная РНК;** вирион имеет транскриптазу. К этому типу относятся реовирусы (10 фрагментов РНК).

5. **Вирусы, геном которых представлен двумя идентичными нитями позитивной РНК** (диплоидный геном). Вирионы имеют фермент обратную

транскриптазу. Эта группа включает ретровирусы.

**б. Одноцепочечная кольцевая РНК.** Такой геном имеет только один вирус, вирус дельта-гепатита. Это дефектный вирус, для его размножения необходим вирус-помощник (вирус гепатита В).

Наличие сегментов увеличивает кодирующую емкость генома. Среди РНК-содержащих вирусов различают вирусы, имеющие плюс-нить РНК, и вирусы, содержащие минус-нить РНК. **Плюс-нить РНК** выполняет как наследственную (геномную) функцию, так и функцию информационной РНК (иРНК), так как они имеют характерные окончания (“шапочки”) для распознавания рибосом клеток макроорганизма. **Минус-нить РНК** выполняет только наследственную функцию и не может выполнять функцию иРНК. Минус-нить РНК в инфицированной клетке служит матрицей для синтеза иРНК. Синтез комплементарной молекулы иРНК у таких вирусов происходит только в присутствии вирусного белка - фермента транскриптазы, который обязательно находится в структуре минус-нитевых вирусов (в клетках ее аналога нет).

- **Однонитевая линейная “+”РНК** (полиовирус) 
- **Однонитевая линейная “-” РНК** (парагрипп) 
- **Однонитевая линейная фрагментированная “-” РНК** (грипп) 
- **Двунитевая линейная фрагментированная РНК** (ротавирус) 

Рисунок 6.22 - Схематическое изображение основных типов генома РНК-содержащих вирусов.

Геном некоторых вирусов в процессе репродукции может включаться в хромосому инфицированной клетки и находиться в ней в виде **провируса** достаточно длительное время. В определенных условиях провирус “выщепляется” из хромосомной ДНК и участвует в образовании дочерних вирусных частиц (рисунок 6.23).

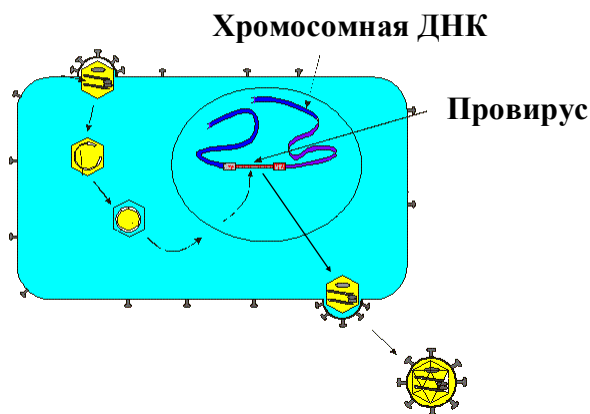


Рисунок 6.23 - Схематическое изображение интеграции вирусной нуклеиновой кислоты в геном клетки (состояние провируса).

Нуклеиновые кислоты некоторых вирусов (например, вирусов герпеса) могут длительное время находиться в цитоплазме инфицированных клеток в виде автономной структуры, напоминающей плазмиду.

### 6.5. Вирусные белки

Белки составляют от 50 до 90% всей массы вирусов. Основная часть белка входит в состав вирусных оболочек. Небольшое количество белка связано с нуклеиновой кислотой и сосредоточено в центральной части вириона. Вирусные белки подразделяются на структурные и неструктурные. **Структурные вирусные белки** входят в состав зрелых внеклеточных вирионов. В зависимости от места расположения в вирионе выделяют следующие структурные белки: капсидные белки, матриксные белки, суперкапсидные белки (рисунок 6.24).

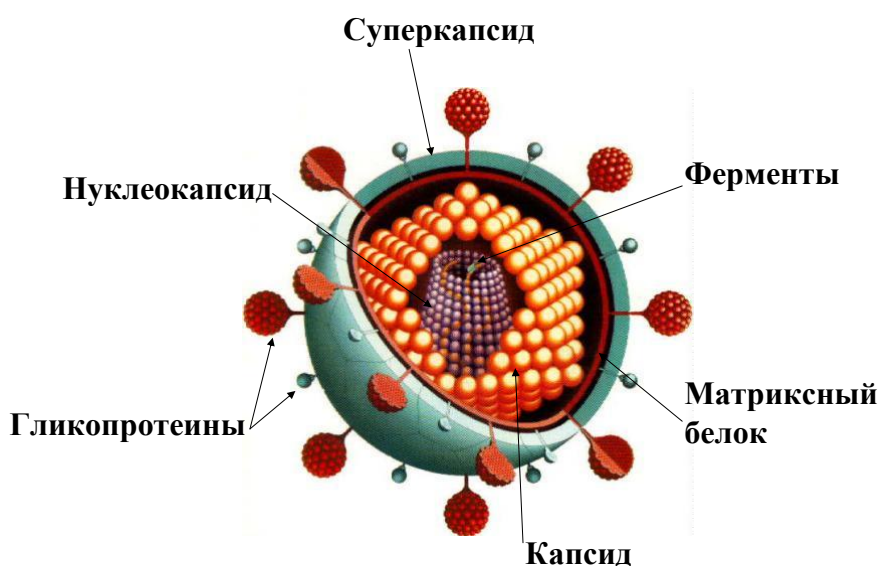


Рисунок 6.24 – Локализация структурных вирусных белков.

Вирусный капсид состоит из **капсомеров**. Среди **капсидных белков** выделяют группу полипептидов, образующих комплекс с вирусными нуклеиновыми кислотами. Эти белки называются **нуклеокапсидными** (NP-белками). Некоторые вирусы в составе нуклеокапсида несут **ферменты**, необходимые для репликации вируса в инфицированной клетке. Например, в вирионах минус-нитевых РНК-содержащих вирусов имеется РНК-зависимая РНК-полимераза (транскриптаза); в вирионах ретровирусов присутствует РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза, ревертаза). У простых вирусов в составе капсида находятся также поверхностные или **рецепторные белки**.

Среди **суперкапсидных белков** выделяют **наружный белок** (выполняет функции рецепторного белка), **мембранный белок** (обеспечивает интернализацию вируса, то есть проникновение вируса в клетку и его депротенизацию). **Матриксный белок** выполняет структурную функцию. Суперкапсидные белки (**пепломеры**) располагаются в наружной оболочке сложных вирусов. У большинства сложных вирусов суперкапсидные белки формируют на поверхности вириона выступы или шипы длиной 7-10 нм.

**Неструктурные вирусные белки** не входят в состав вириона. Они кодируются вирусным геномом, образуются внутри инфицированной клетки и принимают участие в процессах внутриклеточной репродукции вирусов. В последующем они не встраиваются в состав дочерних вирионов. К неструктурным белкам относятся регуляторы экспрессии вирусного генома, предшественники вирусных белков, ингибиторы клеточного биосинтеза, вирусные ферменты.

Вирусные белки выполняют следующие **функции**:

1. **Защитная функция** - экранирование нуклеиновой кислоты вируса от ультрафиолетовых лучей, химических веществ, нуклеаз.

2. **Адресная функция** - адсорбция вируса на клеточных рецепторах с помощью прикрепительных белков и проникновение вириона в чувствительную клетку хозяина. У сложных вирусов адресную функцию выполняют белки суперкапсида, а у простых вирусов - один из белков капсида. На поверхности одной клетки может быть до  $10^4$ - $10^5$  рецепторов для адсорбции вирусов. Для каждого вируса имеются определенные чувствительные клетки (тропизм вирусов): для вируса гриппа чувствительными клетками является мерцательный эпителий верхних дыхательных путей (эпителиотропный вирус), для вируса бешенства - нейроны головного мозга (нейротропный вирус).

3. **Регулирующие функции** – регулирование процессов репродукции вирусов. Эту функцию выполняют структурные или неструктурные вирусные белки (ферменты).

Ферменты играют важную роль в репродукции вируса, так как участвуют в репликации вирусных нуклеиновых кислот. Среди ферментов особое значение принадлежит ДНК-зависимой РНК-полимеразе и РНК-зависимой РНК-полимеразе или обратной транскриптазе. Вирусные ферменты подразделяются на **вирионные** и **вирусиндуцированные**.

**Вирионные ферменты** входят в состав внеклеточных вирионов, приносятся в клетку при инфицировании и участвуют в процессах репродукции вирусов. Они подразделяются на 2 группы: **ферменты первой группы** обеспечивают проникновение вирусных нуклеиновых кислот в клетку и выход дочерних

вирусных популяций из клетки, а ферменты второй группы участвуют в процессах репликации и транскрипции вирусного генома внутри инфицированной клетки.

**Вирусиндуцированные ферменты** детерминированы вирусным геномом. Эти ферменты синтезируются непосредственно в клетках после инфицирования их вирусом, участвуют в процессах образования вирусного потомства, но в дальнейшем не входят в состав вирионов.

## 6.6. Липиды и полисахариды вирусов

В составе некоторых вирусов присутствуют липиды и полисахариды. **Липиды** локализуются в основном в суперкапсидной оболочке сложных вирусов. Вирионы приобретают липиды в составе фрагмента модифицированной цитоплазматической мембраны клеток в процессе репродукции при выходе из клетки путем почкования. Модификация включает встраивание в цитоплазматическую мембрану вирусных белков. Поэтому липидный состав вирионов отражает тот тип клетки, в которой размножился вирус (рисунок 6.25).

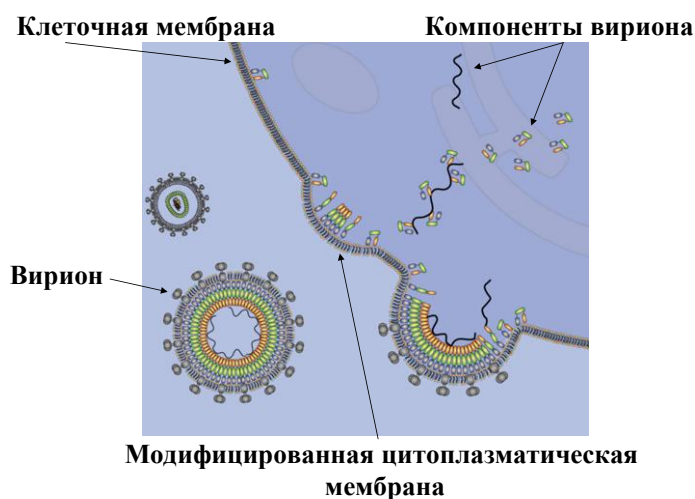


Рисунок 6.25 – Формирование суперкапсидной оболочки вирусов.

Количество липидов составляет 15-35% сухой массы сложных вирусов. В составе липидов обнаруживают фосфолипиды (50-60%) и холестерин (20-30%). Липидный компонент стабилизирует структуру вирусной частицы.

У оболочечных вирусов в составе суперкапсидной оболочки присутствуют гликопротеины и гликолипиды, содержащие углеводы. Их присутствие также связано с модификацией клеточной мембраны в процессе сборки и выхода вирионов из инфицированной клетки. Среди углеводов в вирионах в основном обнаруживают фруктозу, сахарозу, маннозу, галактозу. Углеводы обеспечивают конформацию белковых молекул и защищают их от действия протеаз.



## 6.7. Классификация вирусов

В настоящее время вопросами систематики вирусов занимается Международный комитет по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Основными таксономическими единицами вирусов являются: отряд (-*virales*), семейство (-*viridae*), подсемейство (-*virinae*), род (-*virus*) и вид (-*virus*). Классификация вирусов 2012 г. включает 7 отрядов (*Caudovirales*, *Herpesvirales*, *Ligamenvirales*, *Mononegavirales*, *Nidovirales*, *Picornavirales*, *Tymovirales*). Всего насчитывается 6 порядков, 87 семейств, 19 подсемейств, 349 родов, около 2284 видов и свыше 3000 неклассифицированных еще вирусов.

В 1971 г. американский биохимик, молекулярный биолог и вирусолог лауреат Нобелевской премии Д. Балтимор (рисунок 6.26) предложил классификацию вирусов, основанную на типе геномной нуклеиновой кислоты и способе её репликации.

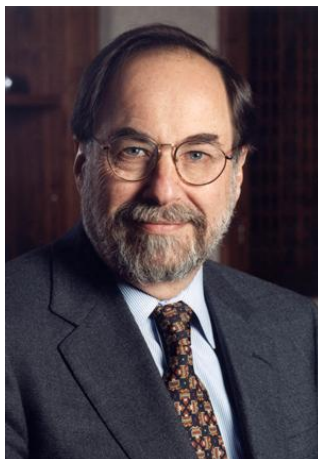


Рисунок 6.26 - Дэйвид Балтимор (David Baltimore, 1938 г.р.).

Классификация вирусов по Балтимору включает в себя следующие группы:

I группа – вирусы, содержащие двуцепочечную (дц) ДНК и не имеющие РНК-стадии (например, герпесвирусы, поксвирусы).

II группа – вирусы, содержащие одноцепочечную (оц) ДНК (например, парвовирусы).

III группа – вирусы, содержащие двуцепочечную (дц) РНК (например, ротавирусы).

IV группа – вирусы, содержащие одноцепочечную (оц) плюс-РНК (например, пикорнавирусы, флавивирусы).

V группа – вирусы, содержащие одноцепочечную (оц) РНК негативной или двойной полярности (например, ортомиксовирусы, филовирусы).

VI группа – вирусы, содержащие одноцепочечную (оц) плюс-РНК и имеющие в процессе жизненного цикла стадию синтеза ДНК на матрице РНК (например, ретровирусы).

VII группа – вирусы, содержащие двуцепочечную (дц) ДНК и имеющие в процессе жизненного цикла стадию синтеза ДНК на матрице РНК (например, вирус гепатита В).

Современная классификация вирусов объединяет классификацию ICTV и классификацию по Балтимору. При этом учитываются такие свойства вирусов как морфология вирионов (размер и форма, тип симметрии), физико-химические свойства (молекулярная масса, плавучая плотность, устойчивость к физическим и химическим факторам), структура генома (тип нуклеиновой кислоты, размер, наличие сегментов, количество нитей, форма молекулы нуклеиновой кислоты), количество и свойства структурных и неструктурных белков, наличие липидов, генетическое сходство с другими вирусами, наличие суперкапсидной оболочки, таксономическая принадлежность организма – хозяина.

## 6.8. Жизненный цикл вирусов

Под жизненным циклом понимают процесс репродукции вируса внутри инфицированной клетки. Особенности репродукции вирусов зависят от типа вирусного генома. Однако существуют некоторые **общие закономерности репродукции вирусов:**

1. **Все РНК-содержащие вирусы**, кроме вирусов гриппа и ретровирусов, **репродуцируются в цитоплазме клетки**. Геномы вирусов гриппа и ретровирусов при репродукции проникают в ядро инфицированной клетки.

2. **Репродукция всех ДНК-содержащих вирусов**, кроме вирусов оспы, **протекает как в ядре, так и в цитоплазме клетки**. При этом в ядре происходит транскрипция и репликация вирусных нуклеиновых кислот, а в цитоплазме клетки – трансляция вирусных белков и сборка дочерних вирионов. Размножение вирусов оспы происходит полностью в цитоплазме клетки.

3. **Нуклеокапсидные белки вирусов синтезируются на свободных полирибосомах** (не связанных с мембраной), а **суперкапсидные белки - на рибосомах, ассоциированных с мембранами**.

4. **Белки некоторых вирусов после образования подвергаются протеолитическому процессингу** (расщеплению или разрезанию).

5. **Суперкапсидные белки оболочечных вирусов** при транспортировке к клеточной мембране подвергаются **гликозилированию**.

**Жизненный цикл вирусов** включает следующие этапы (рисунок 6.27):

1. Адсорбция вирусов на мембране клетки.
2. Проникновение вируса в клетку.
3. Депротенизация (освобождение вирусной нуклеиновой кислоты).
4. Синтез компонентов вирусов (вирусных нуклеиновых кислот и вирусных структурных белков).
5. Формирование (сборка) зрелых дочерних вирионов.
6. Выход дочерних вирионов из клетки.

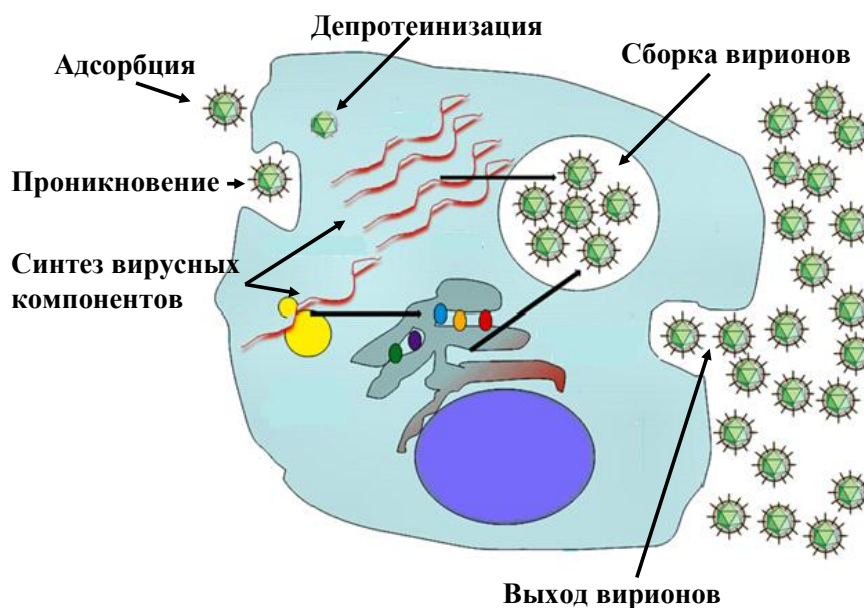


Рисунок 6.27 – Этапы жизненного цикла вирусов.

**Адсорбция** вируса на мембране клетки происходит путем взаимодействия вирусного белка (антирецептора) с клеточными рецепторами. Для каждого вируса на клеточной мембране существуют специфические рецепторы, с которыми вирусы связываются. По химической природе рецепторы, на которых фиксируются вирусы, могут быть мукопротеиновыми или липопротеиновыми. За распознавание клеточных рецепторов отвечают белки вириона (капсидные или суперкапсидные).

Антирецепторы вирионов называются **прикрепительными белками**. Они имеют форму нитей, шипов, грибовидных структур. В процессе адсорбции важную роль играют электрические заряды: вирусы несут отрицательный заряд, а участки клеточной стенки - положительный заряд. Процесс адсорбции протекает в течение 5-90 минут. На одной клетке адсорбируется множество вирусных частиц, так как количество специфических рецепторов на поверхности одной клетки составляет  $10^4$ - $10^5$ . Процесс адсорбции вируса на поверхности клетки представлен на рисунке 6.28.



Рисунок 6.28 - Процесс адсорбции вируса на поверхности клетки.

**Проникновение вируса в клетку** происходит путем слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной или путем **рецептор-опосредованного эндоцитоза**.

Путем **слияния** суперкапсида с клеточной мембраной в клетку проникают в основном оболочечные вирусы. В этом процессе участвуют специфические **белки слияния**. При этом происходит высвобождение нуклеокапсида в цитоплазму клетки (рисунок 6.29).

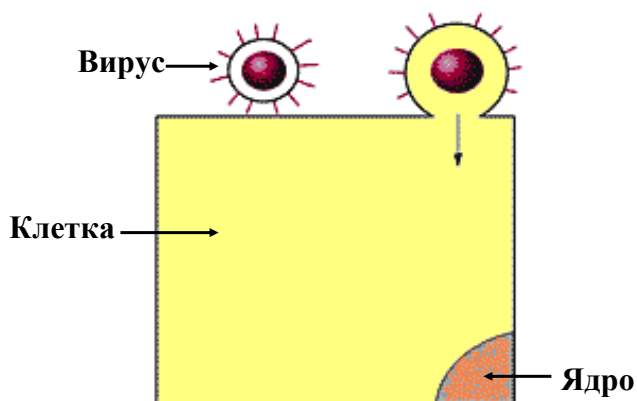


Рисунок 6.29 - Схема проникновения вируса в клетку путем слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной.

Путем **рецептор-опосредованного эндоцитоза** в клетку проникают в основном безоболочечные вирусы. Вначале вирус связывается со специфическими рецепторами на клеточной поверхности. Затем происходит инвагинация (впячивание) клеточной мембраны, образование внутриклеточных вакуолей (эндосом) и их слияние с лизосомами. В дальнейшем вирусный геном в цитоплазме клетки высвобождается из эндосомы (рисунок 6.30).

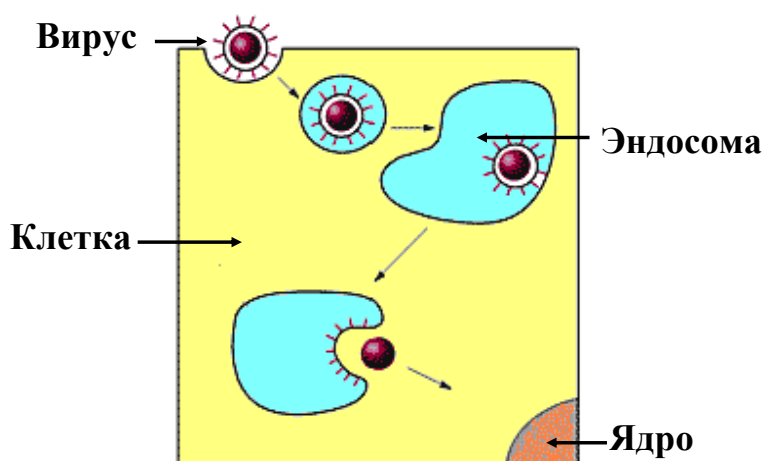


Рисунок 6.30 – Схема проникновения вируса путем рецептор-опосредованного эндоцитоза.

**Депротеинизация (освобождение вирусной нуклеиновой кислоты или**

**раздевание вируса)** происходит с помощью протеолитических ферментов клетки (протеаз и липаз). Смысл раздевания заключается в удалении вирусных оболочек. Конечными продуктами раздевания вирусов являются сердцевины, нуклеокапсиды или нуклеиновые кислоты. Для некоторых вирусов конечным продуктом являются нуклеиновые кислоты, связанные с внутренним вирусным белком.

После депротеинизации вирусы невозможно выделить из культуры клеток. Этот этап репродукции известен как **теневая фаза (фаза эклипса или затмения)**, во время которой вирус перестает существовать как оформленный вирион.

**Синтез компонентов вирусов** включает репликацию вирусных нуклеиновых кислот и синтез вирусных белков. В зависимости от типа вирусного генома (ДНК-содержащие или РНК-содержащие вирусы) синтез компонентов дочерних вирионов протекает либо в цитоплазме, либо в цитоплазме и ядре клетки.

У **ДНК-содержащих вирусов** проникший в цитоплазму нуклеокапсид транспортируется к ядру клетки. Вирусная ДНК проникает в клеточное ядро, где протекает **транскрипция** - переписывание информации с ДНК на РНК с помощью клеточной полимеразы. Исключение составляет ДНК-содержащий вирус оспы, у которого транскрипция протекает в цитоплазме клетки при участии вирусспецифического фермента (ДНК-полимеразы), который проникает в клетку в составе вириона. В результате транскрипции на матрице одной из нитей ДНК синтезируется иРНК, которая перемещается в цитоплазму клетки и запускает процесс **трансляции** – перевода генетической информации с иРНК на последовательность аминокислот в вирусных белках. Синтез белков происходит на рибосомах клетки. Одновременно в ядре клетки протекает процесс **репликации** (образование дочерних нуклеиновых кислот на матрице материнской ДНК). Синтезированные дочерние молекулы ДНК в составе нуклеокапсида перемещаются из ядра клетки в цитоплазму путем почкования, захватывая фрагмент ядерной мембраны. В цитоплазме клетки завершается сборка дочерних вирионов и их выход из клетки.

Таким образом, реализация генетической информации у ДНК-содержащих вирусов идет следующим образом:

ДНК → транскрипция → иРНК → трансляция → белок

**Плюс-РНК-содержащие вирусы** адсорбируются на специфических клеточных рецепторах и проникают внутрь клетки путем эндоцитоза. Репликация плюс-РНК вирусов происходит в цитоплазме клеток. При этом функции иРНК выполняет вирусная нуклеиновая кислота. В результате трансляции на рибосомах образуется белковая молекула, которая разрезается клеточными протеазами на структурные и неструктурные вирусные белки. При этом образуется также полимеразы, которая способствует образованию минус-РНК на матрице родительской плюс-РНК. На матрице минус-РНК происходит синтез молекул плюс-РНК, участвующих в биосинтезе белков дочерних вирионов. Высвобождение дочерних вирионов сопровождается лизисом клетки или происходит путем почкования. У ретровирусов при репродукции образуется промежуточный продукт в виде молекулы ДНК.

Таким образом, реализация генетической информации у позитивных РНК-

содержащих вирусов идет без этапа транскрипции:

плюс-РНК → трансляция → белок

**Минус-РНК-содержащие вирусы** проникают в клетку путем адсорбции или слияния с клеточной мембраной. Геном таких вирусов не может выполнять функцию иРНК, поэтому в цитоплазме клетки на матрице минус-РНК вначале синтезируется плюс-РНК. Этот процесс катализируется полимеразой (транскриптазой), находящейся в составе проникшего в клетку вириона. При синтезе плюс-РНК образуются полные нити и короткие нити. Короткие плюс-РНК-нити участвуют в синтезе ферментов и белков для дочерних популяций. Полные нити плюс-РНК служат матрицей для синтеза молекул минус-РНК дочерних вирионов. Дочерние вирионы транспортируются к модифицированным участкам клеточной мембраны и высвобождаются почкованием, захватывая фрагмент клеточной мембраны. Этот фрагмент клеточной мембраны служит для вирусной частицы суперкапсидом.

Таким образом, реализация генетической информации у РНК-содержащих вирусов с негативным геномом по следующей схеме:

минус-РНК → транскрипция → иРНК → трансляция → белок

**РНК-содержащие ретровирусы** имеют уникальный путь репродукции. После проникновения в клетку генетическая информация с РНК этих вирусов переписывается на ДНК. Этот процесс называется **обратной транскрипцией**. Для его осуществления требуется специфический фермент - **обратная транскриптаза** или **ревертаза**. Этот фермент приносится в клетку в составе ретровирусов. Затем вновь образованная ДНК интегрирует с клеточным геномом и в его составе участвует в образовании иРНК, необходимой для синтеза вирусных белков. Транскрипцию интегрированной ДНК в составе клеточных геномов (переписывание информации с ДНК на иРНК) осуществляет клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза.

Таким образом, у ретровирусов отмечается следующий путь передачи генетической информации:

РНК → обратная транскрипция → ДНК → транскрипция → иРНК → трансляция → белок

В эукариотической клетке многие вирусные белки подвергаются **посттрансляционным модификациям**: гликозилированию, ацилированию, сульфированию, протеолитическому нарезанию и фосфорилированию. **Гликозилирование** белков заключается в присоединении к полипептиду углеводных остатков. Образовавшиеся гликопротеины входят в состав вирусных оболочек и находятся на поверхности вирусных частиц. **Ацилирование** белков заключается в присоединении к протеину 1-2 молекул жирных кислот. **Сульфирование** белков протекает путем связывания с углеводными остатками гликопротеина сульфатной группы. **Протеолитическое нарезание** характерно для

многих вирусных белков. Оно осуществляется клеточными ферментами в специфических точках полипептидной молекулы. После этого белки приобретают функциональную активность. **Фосфорилирование** характерно для белков, связанных с вирусным геномом. Оно осуществляется как вирусными, так и клеточными ферментами.

Таким образом, синтез нуклеиновых кислот и вирусных белков протекает в разных структурах клетки, то есть синтез компонентов вирионов в клетке разобщен. Такой способ репродукции вирусов называется **дизъюнктивным** (разобщенным). **Сборка дочерних вирионов** возможна только при специфическом узнавании вирусных нуклеиновых кислот и белков и самопроизвольном их соединении друг с другом. **У просто устроенных вирусов** нуклеиновая кислота и белки взаимодействуют на мембранах эндоплазматического ретикулума, в результате чего формируется упорядоченная структура. **У сложно устроенных вирусов** сборка осуществляется многоступенчато. Вначале нуклеиновые кислоты взаимодействуют с внутренними белками, образуя нуклеокапсиды (сердцевины). Затем нуклеокапсиды выстраиваются с внутренней стороны клеточной мембраны под теми участками, которые модифицированы оболочечными вирусными белками. В результате этого происходит самосборка вирусных частиц. Количество зрелых вирионов, сформировавшихся в одной клетке, колеблется от 10 до 10000 и более.

**Выход вирионов из клетки (высвобождение дочерних вирионов)** осуществляется двумя способами: путем лизиса клетки (взрывной способ выхода) и путем почкования. **Выход из клетки путем лизиса (“взрыва”)** связан с деструкцией клетки. Такой способ характерен для безоболочечных вирусов, у которых отсутствует суперкапсидная оболочка. **Выход вирионов из клетки путем почкования** в основном характерен для оболочечных вирусов. При этом способе клетка может некоторое время сохранять жизнеспособность. Вирусы, содержащие суперкапсид, высвобождаются медленно (в течение 2-6 часов). Вначале у них суперкапсидные белки устанавливаются на наружной поверхности клеточной мембраны в виде своеобразных шипов, вытесняя клеточные белки. Затем через модифицированную клеточную мембрану проходит нуклеокапсид с образованием суперкапсидной оболочки. Весь цикл репродукции у РНК-вирусов продолжается 4-8 часов, а у ДНК-вирусов – 12-24 часа.

## 6.9. Культивирование вирусов

Культивирование вирусов проводят при изучении клиники и патогенеза вирусных заболеваний, при диагностике вирусных инфекций, а также для приготовления диагностических и вакцинных препаратов, используемых в вирусологии. Культивирование вирусов осуществляют в трех биологических системах:

- в организме лабораторных животных;
- в развивающихся куриных эмбрионах;
- в культурах клеток.

Для заражения биологических систем из исследуемого материала готовят суспензию, в которую добавляют антибиотики для освобождения от посторонней

микрофлоры (бактерий и грибов). После этого исследуемый материал вводят в биологическую систему.

**Лабораторные животные.** В вирусологических исследованиях используют белых мышей, белых крыс, морских свинок, золотистых хомячков, кроликов и других лабораторных животных (рисунок 6.31).



Рисунок 6.31 – Лабораторные животные, используемые в вирусологических исследованиях: а – белая мышь, б – золотистый хомячок.

Лабораторных животных заражают вирусосодержащим материалом различными способами (подкожно, внутримышечно, внутривенно, интраназально, интрацеребрально и т. д.). Способ заражения выбирают в зависимости от тропизма (избирательности поражения тканей) вирусов (рисунок 6.32).



Рисунок 6.32 – Внутривентральное (а) и интрацеребральное (б) заражение белых мышей.

О репродукции вирусов в организме животных судят по развитию у них видимых клинических проявлений заболевания, патоморфологическим изменениям органов и тканей, а также на основании реакции гемагглютинации (РГА) с суспензией из органов, содержащих вирусы. РГА основана на способности многих вирусов вызывать склеивание (агглютинацию) эритроцитов человека, птиц и млекопитающих в результате взаимодействия вирусных белков (гемагглютининов) с рецепторами эритроцитов.

**Развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ)** в вирусологических исследованиях используют в возрасте 5-12 дней. С использованием развивающихся куриных эмбрионов возможно приготовить большое количество вирусосодержащего материала, что особенно важно в производстве вакцин или других лечебно-



профилактических препаратов.

Способы заражения РКЭ (рисунок 6.33):

- на ХАО;
- в аллантоисную полость;
- в амниотическую полость;
- в желточный мешок;
- в тело эмбриона.

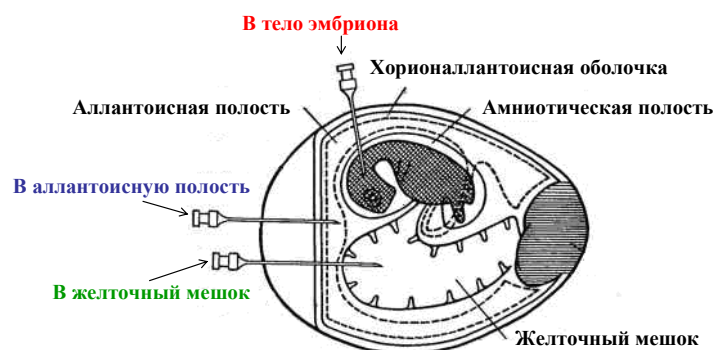


Рисунок 6.33 – Способы заражения куриного эмбриона.

Признаками репродукции вирусов в РКЭ является гибель эмбриона, патологоанатомические изменения в оболочках и тканях эмбриона (оспины, кровоизлияния), положительная реакция гемагглютинации. О гибели свидетельствует прекращение движений эмбриона, выявляемое при их овоскопировании, то есть просвечивании (рисунок 6.34).



Рисунок 6.34 – Овоскопирование куриных яиц.

Погибшие эмбрионы вскрывают, содержимое извлекают (рисунок 6.35) и проводят патологоанатомическое исследование. Эмбриональную жидкость смешивают с эритроцитами для определения гемагглютинации.



Рисунок 6.35 – Вскрытие куриного эмбриона.

Наиболее широкое распространение для культивирования вирусов получила **культура клеток**. Клеточную культуру получают из органов и тканей человека, животных, птиц. Метод получения культуры клеток для выращивания вирусов разработали американские вирусологи Дж. Эндерс (John Franklin Enders, 1897-1985 гг.), Т. Уэллер (Thomas Huckle Weller, 1915-2008 гг.) и Ф. Роббинс (Frederick Chapman Robbins, 1916-2003 гг.). В 1954 г. они получили Нобелевскую премию за технику культивирования вируса полиомиелита в тканевых культурах. Клетки, полученные из различных органов и тканей, размножают вне организма на искусственных питательных средах в специальной лабораторной посуде (рисунок 6.36).

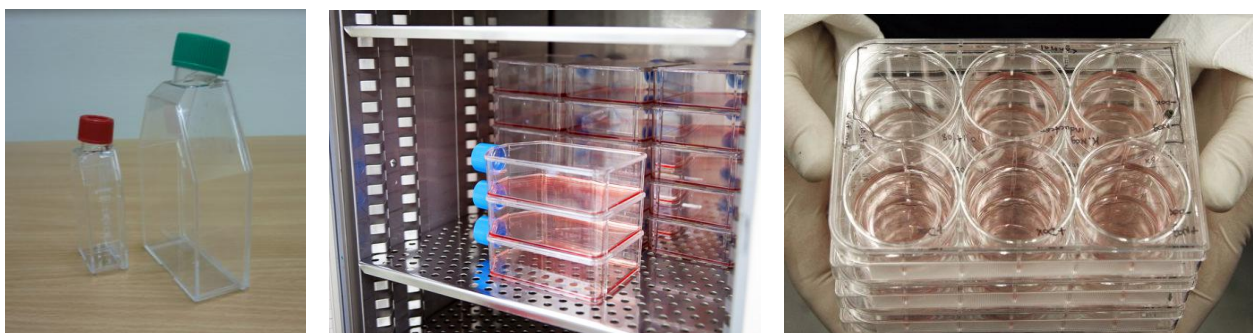


Рисунок 6.36 – Посуда для клеточных культур.

При выращивании клеточных культур необходимо выполнять следующие условия:

- соблюдать правила асептики;
- использовать лабораторную посуду из нейтрального стекла;
- использовать сложные по составу питательных сред (среда 199, Игла), содержащие минеральные соли, аминокислоты, витамины, глюкозу, сыворотку крови животных или человека, буферные растворы;
- добавлять к питательной среде антибиотики для подавления роста посторонних микробов;
- соблюдать оптимальную температуру культивирования (36-38,5<sup>0</sup>С).

**По способу культивирования** клеточные культуры подразделяются на следующие виды:

1. **Однослойные (монослойные) культуры клеток** – клетки способны прикрепляться и размножаться на поверхности химически нейтрального стекла лабораторной посуды в виде монослоя.

2. **Суспензионные культуры клеток** – клетки способны размножаться во всем объеме питательной среды при постоянном ее перемешивании. Модификацией этого метода является проточное культивирование, при котором в специальный аппарат непрерывно добавляют свежую питательную среду и удаляют отработанную.

3. **Смешанные культуры клеток** – способны культивироваться как на поверхности подложки, так и в суспензии.

**По способу получения** культуры клеток подразделяются на следующие виды:

1. **Органные культуры** – цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие исходную структуру вне организма.

2. **Первичные культуры** клеток способны размножаться только в первых генерациях, то есть выдерживают не более 5-10 пассажей после выделения из тканей. Первичные культуры получают путем обработки кусочков тканей (нормальной, опухолевой, эмбриональной) протеолитическими ферментами (трипсином, коллагеназой), которые разрушают межклеточные связи в тканях с образованием изолированных клеток. Разобщенные клетки помещают в питательную среду и вносят в стеклянный сосуд. Клетки прикрепляются к стенке сосуда и размножаются, образуя монослой (слой толщиной в одну клетку). С помощью специальных веществ (трипсина, версена) клетки можно снять с поверхности сосуда и перенести в другой. Такая манипуляция называется пассажем. К первичным клеточным культурам относятся культуры фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ), клетки почек человека (КПЧ) и др. (рисунок 6.37).

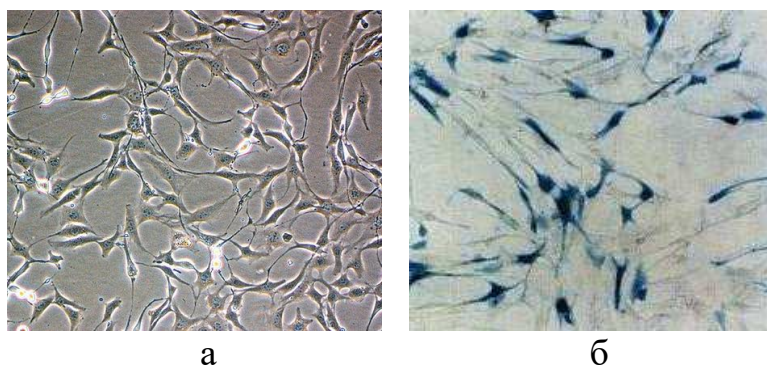


Рисунок 6.37 – Первичная культура клеток (а - культура мышечных фибробластов: б – культура фибробластов человека).

3. **Полуперевиваемые (диплоидные) культуры клеток** имеют ограниченную продолжительность жизни и выдерживают 40-50 пассажей. Их получают обычно из диплоидных клеток эмбриона человека. В процессе пассажей они сохраняют диплоидный набор хромосом и не претерпевают злокачественной трансформации. В частности, к полуперевиваемым культурам клеток относится культура легких эмбриона человека (рисунок 6.38)

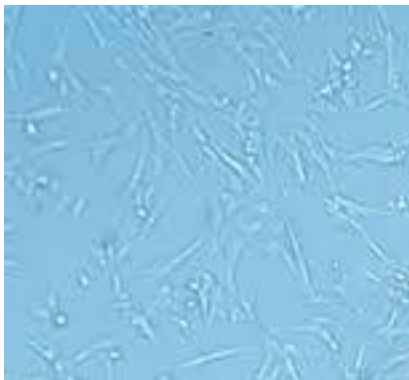


Рисунок 6.38 – Полуперевиваемая культура легких эмбриона человека.

4. **Перевиваемые (стабильные, пассажные) культуры клеток** выдерживают многочисленные пассажи и способны размножаться в лабораторных условиях десятки лет. Их получают преимущественно из опухолевых тканей. По сравнению с первичной культурой перевиваемая культура имеет продолжительный срок культивирования и высокую скорость размножения. К числу перевиваемых относятся культуры клеток карциномы шейки матки (HeLa), раковой опухоли гортани (HEp-2) и др. (рисунок 6.39).

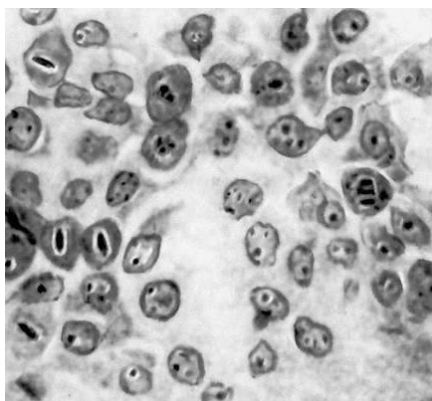


Рисунок 6.39 – Перевиваемая культура клеток HEp-2.

**Заражение культур клеток** проводят следующим образом. Из сосудов с выросшим монослоем клеток удаляют остатки питательной среды, монослой отмывают раствором Хенкса и вносят вирусосодержащий материал. Через 1-1,5 часа остатки вирусосодержащего материала удаляют, вносят поддерживающую питательную среду и культуру инкубируют в термостате.

О репродукции вирусов в культуре клеток судят на основании следующих феноменов:

1. **Цитопатическое действие (ЦПД)** или цитопатический эффект (ЦПЭ) вирусов представляет собой патологические изменения морфологии клеток вплоть до их гибели в результате репродукции вирусов. Для обнаружения ЦПД культуры клеток просматривают под малым увеличением светового микроскопа. ЦПД проявляется фрагментацией клеток (разрушение клеток на отдельные фрагменты), вакуолизацией цитоплазмы, разрушением митохондрий, образованием симпластов (формированием гигантских многоядерных клеток) и округлением клеток, то есть

образованием шаровидных форм (рисунок 6.40).

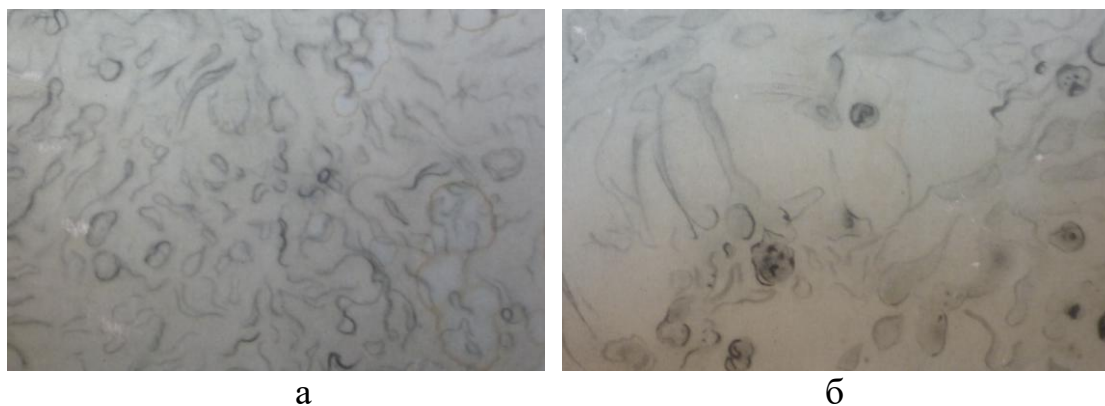


Рисунок 6.40 – Проявление ЦПД: а – нормальные клетки; б – шаровидные формы.

**2. Образование внутриклеточных включений.** Включения могут локализоваться как в ядре (внутриядерные включения), так и в цитоплазме (цитоплазматические включения). Они представляют собой скопления вирусных частиц или отдельных компонентов вирусов. Их выявляют с помощью светового или люминесцентного микроскопа после окрашивания зараженных клеток анилиновыми красителями или флюорохромами. Цитоплазматические включения формируются при натуральной оспе (тельца Гварниери), бешенстве (тельца Бабеша-Негри), а внутриядерные включения – при аденовирусной инфекции, герпесе (рисунок 6.41).

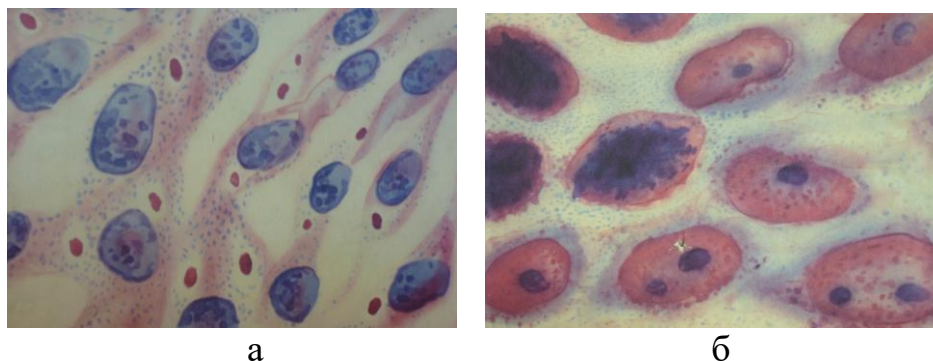


Рисунок 6.41 – Цитоплазматические включения при оспе (а) и внутриядерные включения при аденовирусной инфекции (б).

**3. Образование бляшек (негативных колоний) под агаровым покрытием.** Представляют собой участки разрушенных вирусами клеток в сплошном монослое. Видны невооруженным глазом в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток. Каждая бляшка формируется потомством одного вириона. Бляшки, образуемые разными вирусами, различаются по размеру, форме, срокам появления (рисунок 6.42).



Рисунок 6.42 – Бляшки на монослое клеточной культуры.

4. **Реакция гемадсорбции.** Гемадсорбция - способность культур инфицированных вирусом клеток адсорбировать на своей поверхности эритроциты (рисунок 6.43).

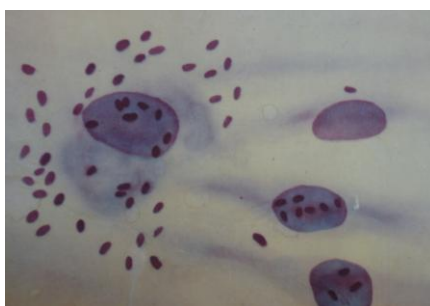


Рисунок 6.43 – Реакция гемадсорбции.

5. **Цветная реакция** регистрируется по изменению цвета индикатора, находящегося в питательной среде для культур клеток. Если вирусы не размножаются в культуре клеток, то живые клетки в процессе своего метаболизма выделяют кислые продукты, изменяющие цвет индикатора. При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается и клетки погибают, в результате чего среда сохраняет первоначальный цвет индикатора (рисунок 6.44).

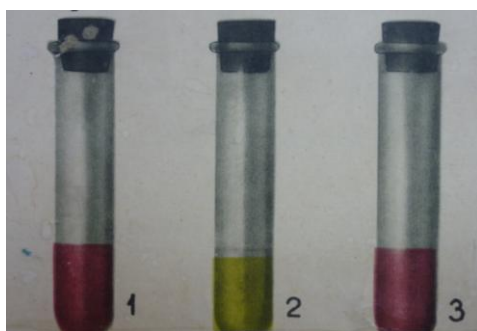


Рисунок 6.44 - Цветная реакция: 1 – исходный цвет питательной среды; 2 – изменение цвета среды в результате метаболизма клеток; 3 – сохранение исходного цвета среды в результате гибели клеток под действием вирусов.

Питательные среды для культур клеток подразделяются на ростовые и поддерживающие. **Ростовые среды** применяются для выращивания клеточных культур. Они обогащены сыворотками крови человека или животных. Количество

сыворотки составляет 2-30%. **Поддерживающие среды** применяются для сохранения монослоя клеток после заражения их вирусами. Оптимальное значение рН (7,2-7,6) при культивировании вирусов поддерживают с помощью бикарбонатного буфера. В качестве индикатора используют феноловый красный, который становится оранжево-желтым при закислении и малиновым при защелачивании среды.

### 6.10. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Какую форму имеют вирионы?
2. Какими методами изучают размеры и форму вирионов?
3. Каковы особенности строения вирусов бактерий?
4. На какие типы подразделяются вирионы по своей структуре?
5. Охарактеризуйте строение просто устроенных вирусов.
6. Каково строение сложно устроенных вирусов?
7. Назовите типы симметрии вирусов.
8. Каковы функции нуклеиновых кислот вирусов?
9. В чем отличие позитивных и негативных вирусных РНК?
10. Назовите виды вирусных белков.
11. Каковы функции вирусных белков?
12. Какие вирусные ферменты Вы знаете?
13. Дайте характеристику липидов, входящих в состав вирионов.
14. Охарактеризуйте углеводы, входящие в состав вирионов.
15. Что такое жизненный цикл вирусов?
16. Назовите этапы жизненного цикла вирусов.
17. Расскажите о репродукции ДНК-содержащих вирусов.
18. Расскажите о репродукции плюс-РНК-содержащих вирусов.
19. Расскажите о репродукции минус-РНК-содержащих вирусов.
20. Какими способами дочерние вирионы выходят из клетки?
21. Назовите методы культивирования вирусов.
22. Какие эффекты наблюдаются при репродукции вирусов в организме лабораторных животных?
23. Как проявляется репродукция вирусов в РКЭ?
24. Какие эффекты наблюдаются при репродукции вирусов в культуре клеток?

### 6.11. Тренировочные тесты

1. Приоритет открытия вирусов принадлежит:
  - А. Левенгуку
  - Р. Коху
  - И.И. Мечникову
  - + Д.И. Ивановскому
  - Л. Пастеру

2. Уникальными свойствами вирусов являются:

- + облигатный внутриклеточный паразитизм
- наличие двух типов нуклеиновых кислот (ДНК и РНК)
- + наличие только одного типа нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК)
- + дизъюнктивный способ репродукции
- рост на сложных питательных средах

3. Химический состав вирусов представлен:

- пептидогликаном
- + белками
- + нуклеиновыми кислотами
- + углеводами
- + липидами

4. Структурными компонентами вирусов являются:

- ядро
- + капсид
- клеточная стенка
- + геном
- + суперкапсид

5. Морфологическими субъединицами капсида вирусов являются:

- нуклеиновые кислоты
- + капсомеры
- тейхоевые кислоты
- пили
- полисахариды

6. Типы симметрии вирусов:

- круговой
- + спиральный
- сегментированный
- + кубический
- + комбинированный

7. Молекулярную массу вирусов определяют с помощью:

- аналитических весов
- фильтрации через бактериальные фильтры
- электронной микроскопии
- + ультрацентрифугирования
- световой микроскопии

8. Оболочечные вирусы чувствительны к:

- антибиотикам
- + эфиру
- + хлороформу



- сульфаниламидам
- желчным кислотам

9. В основу современной классификации вирусов заложены следующие критерии:

- + тип нуклеиновой кислоты
- + тип симметрии
- + наличие или отсутствие суперкапсида
- + облигатный внутриклеточный паразитизм
- + круг восприимчивых хозяев

10. Размеры вирусов выражаются в:

- метрах
- сантиметрах
- микрометрах
- + нанометрах
- миллиметрах

11. По форме вирусы подразделяются на:

- кубические
- + сферические
- + пулевидные
- + палочковидные
- цилиндрические

12. Вирусы размножаются:

- спорами
- митозом
- бинарным делением
- + дизъюнктивной репродукцией
- почкованием

13. Процесс репродукции вирусов начинается со стадии:

- проникновения вируса в клетку
- + адсорбции на клетке
- синтеза нуклеиновой кислоты
- синтеза белка
- депротенинизации

14. В состав сложных вирусов входит:

- + геном (ДНК или РНК)
- аппарат Гольджи
- рибосомы
- + капсид
- + суперкапсид

15. Вирусный геном, выполняющий в процессе репродукции функцию иРНК,

называется:

- репродуктивным
- вирулентным
- + плюс-нитевой РНК
- рекомбинантным
- минус-нитевой РНК

16. Характерными свойствами вирусов являются:

- + наличие одного типа нуклеиновой кислоты
- способность синтезировать токсины
- + отсутствие белоксинтезирующего аппарата
- + дизъюнктивный тип репродукции
- способность к росту на сложных питательных средах

17. В состав простых вирусов входят:

- + нуклеиновая кислота
- + капсид
- суперкапсид
- матриксный белок
- аппарат Гольджи

18. В состав сложных вирусов входят:

- + геном
- мезосомы
- + суперкапсид
- + матриксный белок
- лизосомы

19. Выход дочерней вирусной популяции из инфицированной клетки происходит путем:

- эндоцитоза
- + почкования
- + лизиса клетки
- деления клетки
- образования цист

20. Сборка дочерних вирионов протекает:

- во внеклеточном пространстве
- в клеточной стенке
- в рибосомах
- + в цитоплазме клеток
- в митохондриях

21. Культивирование вирусов осуществляют:

- в жидкой питательной среде
- на плотной питательной среде

- + в РКЭ
- + в организме лабораторных животных
- + в культуре клеток

22. Вирусы - это:

- грамположительные микроорганизмы
- грамотрицательные микроорганизмы
- + неклеточные формы жизни
- продуценты интерферона
- продуценты антител

23. Репродукция вирусов может происходить:

- + в клеточных культурах
- в мясо-пептонном бульоне
- на кровяном агаре
- в среде 199
- + в организме лабораторных животных

24. Сущность научного открытия Ивановского Д.И.:

- создание первого микроскопа
- + открытие вирусов
- открытие явления фагоцитоза
- получение антирабической вакцины
- открытие явления трансформации

25. Характерное свойство вирусов:

- наличие митохондрий
- + наличие одного типа нуклеиновой кислоты
- наличие ядерной оболочки
- наличие белоксинтезирующих систем
- способность к бинарному делению

26. Обратная транскриптаза содержится в составе вириона:

- парамиксовирусов
- + ретровирусов
- аденовирусов
- энтеровирусов
- ортомиксовирусов

27. Характерными свойствами вирусов являются:

- + наличие одного типа нуклеиновой кислоты
- способность синтезировать экзотоксины
- + дизъюнктивный способ репродукции
- способность синтезировать экзоферменты
- способность образовывать капсулу

28. Вирусы культивируют:

- + в куриных эмбрионах
- в жидкой питательной среде
- на плотной питательной среде
- в полужидкой питательной среде
- + в культурах клеток

29. Признаки размножения вирусов на лабораторных животных:

- цветная проба
- образование бляшек
- + характерная клиника
- + гибель животных
- реакция гемадсорбции

30. Признаки размножения вирусов в культуре клеток:

- + цветная проба
- + образование бляшек
- характерная клиника
- гибель животных
- + реакция гемадсорбции

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 7. Строение и свойства бактериофагов

### 7.1. Введение

**Бактериофаги** (греч. *phagos* - пожирающий, лат. *bacteriophaga* - разрушающий бактерии) - это вирусы бактерий, обладающие способностью специфически проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и при выходе потомства вызывать в большинстве случаев разрушение (лизис) бактерий.

Впервые о явлении бактериофагии сообщил в 1896 г. британский бактериолог Эрнест Ханкин (1865-1939 гг.). Он отметил, что вода рек Индии обладает бактерицидными свойствами в отношении холерных вибрионов. При исследовании воды он выявил наличие в ней факторов, проникающих через бактериальный фильтр и вызывающих лизис возбудителя холеры.

В 1898 г. явление бактериофагии наблюдал русский ученый Н.Ф. Гамалея (рисунок 7.1) на примере спонтанного лизиса сибиреязвенных бактерий.



Рисунок 7.1 - Николай Федорович Гамалея (1859-1949 гг.).

Н.Ф. Гамалея обнаружил, что мутная суспензия клеток возбудителя сибирской язвы иногда может просветляться, а образующаяся прозрачная жидкость в течение 6-12 часов способна вызывать разрушение свежих культур сибиреязвенного микроба. Это явление он назвал перевиваемым лизисом бактерий. Вещества, способные разрушать бактерии, автор назвал “бактериолизинами”.

В 1915 г. английский бактериолог Ф. Туорт (рисунок 7.2) описал феномен “стекловидного перерождения” колоний стафилококков. Он отметил, что некоторые штаммы стафилококка образовывали колонии, которые со временем изменяли свою типичную форму и становились прозрачными. Клетки из измененных колоний теряли способность к пересевам, а внесение их в свежие культуры стафилококков приводило к лизису бактерий. При микроскопическом исследовании прозрачных колоний стафилококков обнаруживались разрушенные бактериальные клетки. Ф. Туорт объяснял это явление существованием бактериолитического фактора, вырабатываемого самими бактериями.



Рисунок 7.2 - Фредерик Туорт (Frederick Twort, 1877-1950 гг.).

В 1917 г. канадский микробиолог Ф. д'Эрелль (рисунок 7.3) при изучении возбудителя дизентерии наблюдал лизис бактериальной культуры при внесении в нее фильтрата испражнений больных людей. Добавление даже одной капли фильтрата испражнений к мутной бульонной культуре дизентерийных бактерий приводило к полному просветлению жидкости. Лизирующее действие агента не только сохранялось, но и значительно усиливалось после многократного пассирования на культуре дизентерийных бактерий.



Рисунок 7.3 - Феликс Хьюберт д'Эрелль (Felix Hubert d'Herelle, 1873-1949 гг.),

Подобный эффект Ф. д'Эрелль наблюдал на плотных питательных средах, засеянных смесью литического агента и дизентерийных бактерий. При этом на фоне сплошного бактериального роста появлялись участки округлой формы, на которых рост культуры отсутствовал – так называемые стерильные пятна, участки лизиса бактерий, негативные колонии, бляшки. На основании своих опытов Ф. д' Эрелль сделал заключение о том, что литический агент является паразитом бактерий, проходящим через фильтры. Этот литический агент Ф. д'Эрелль назвал **бактериофагом** (“пожирателем” бактерий), а литическое действие бактериофага - **бактериофагией**. В последующем это явление было названо феноменом Туорта - д'Эрелля (разрушение бактерий в результате инфицирования их бактериальными вирусами).

Кроме того Ф. д'Эрелль высказал предположение, что бактериофаг

размножается внутри микробных клеток, в результате чего в окружающую среду поступают многочисленное дочернее потомство. Размножение бактериофага в микробных клетках на плотной питательной среде проявляется формированием стерильных пятен или негативных колоний. В жидкой питательной среде размножение бактериофага приводит к просветлению среды. Позднее было установлено, что бактериофаги размножаются только внутри бактерий определенных видов. Это наблюдение позволило использовать бактериофаги в лечебных целях. Ф. д'Эрелль впервые применил бактериофаги для лечения бубонной чумы в Египте и холеры в Индии.

В 1934-1937 гг. Ф. д'Эрелль работал в Тбилиси, где участвовал в создании НИИ бактериофагов, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиава (рисунок 7.4).



Рисунок 7.4 - Феликс д'Эрелль и Григорий Элиава в Тбилиси.

В последующие годы бактериофаги были обнаружены более чем у 100 видов патогенных и непатогенных бактерий. Однако изучение ультраструктуры бактериофагов стало возможным после изобретения электронного микроскопа. Первый просвечивающий электронный микроскоп сконструировали в 1931 г. немецкие инженеры-электронщики М. Кнолл и Э. Руска. Первые электронные микрофотографии бактериофагов получил брат Э. Руска - Г. Руска (рисунок 7.5).

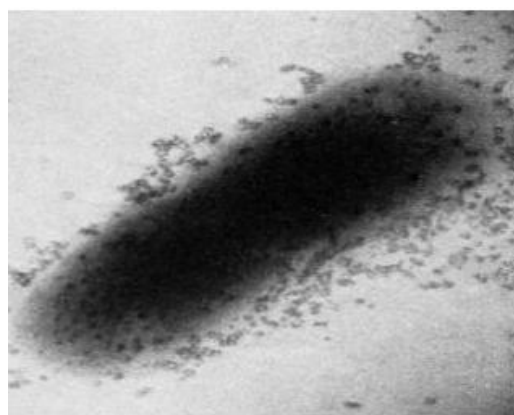


Рисунок 7.5 - Гельмут Руска (Helmuth Ruska, 1908-1973 гг.) и сделанная им электронная фотография кишечной палочки, инфицированной бактериофагом.

Бактериофаги широко распространены в природе - их выделяют из воды,

почвы, кишечника человека, животных и птиц, из продуктов питания, то есть из тех объектов, в которых обитают микроорганизмы. Во внешнюю среду бактериофаги могут попадать с выделениями больных, реконвалесцентов и носителей. В связи с этим бактериофаги кишечных бактерий являются показателем фекального загрязнения почвы и воды.

Бактериофаги находят широкое практическое применение. В 1921 г. Ричард Брайонг и Джозеф Мэйсин впервые описали способ лечения стафилококковых поражений кожи с помощью бактериофагов. С тех пор бактериофаги находят широкое применение для диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

## 7.2. Классификация бактериофагов

Вирусы бактерий объединены в класс *Bacteriophagae*. При классификации бактериофагов учитывают морфологию фаговых частиц, спектр действия, физико-химический состав, антигенную структуру и другие свойства. Согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов в зависимости от типа нуклеиновой кислоты бактериофаги подразделяются на ДНК- и РНК-содержащие. Большинство фагов относится к ДНК-содержащим вирусам с нуклеокапсидом, организованным по принципу смешанной симметрии. В состав бактериофагов может входить как одноцепочечные, так и двуцепочечные молекулы ДНК или РНК. По морфологии фаговых частиц и типу нуклеиновой кислоты бактериофаги распределены на семейства (таблица 6.1).

Таблица 7.1 – Семейства бактериофагов

Бактериофаги	Семейства	Особенности строения
ДНК-содержащие бактериофаги	<i>Myoviridae</i>	Головка сферической или овальной формы и сокращающийся хвостовой отросток, двунитевая ДНК
	<i>Siphoviridae</i>	Головка сферической формы и длинный несокращающийся хвостовой отросток, двунитевая ДНК
	<i>Podoviridae</i>	Головка сферической формы и короткий несокращающийся хвостовой отросток, двунитевая ДНК
	<i>Lipothrixviridae</i>	Нитевидная форма, двунитевая ДНК
	<i>Plasmaviridae</i>	Округлая форма, двунитевая ДНК
	<i>Corticoviridae</i>	Округлая форма, липиды в составе многослойной оболочки, шипы, двунитевая ДНК
	<i>Fuselloviridae</i>	Форма лимона, короткий хвостовой отросток, двунитевая ДНК
	<i>Tectiviridae</i>	Округлая форма, отсутствие хвостового отростка, шипы, двунитевая ДНК



	<i>Microviridae</i>	Округлая форма, отсутствие хвостового отростка, однонитевая ДНК
	<i>Inoviridae</i>	Палочковидная форма, однонитевая ДНК
РНК-содержащие бактериофаги	<i>Cystoviridae</i>	Сферическая форма, сегментированная двунитевая РНК
	<i>Leviviridae</i>	Сферическая форма, плюс-РНК

**По форме** бактериофаги подразделяются на следующие морфологические группы или типы (рисунок 7.6):

- нитевидные фаги;
- мелкие фаги без отростка;
- кубические фаги с аналогом (рудиментом) отростка;
- фаги с коротким отростком (хвостом);
- фаги с длинным отростком и несокращающимся чехлом;
- фаги с длинным отростком и сокращающимся чехлом.





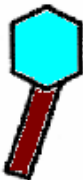
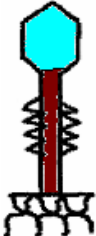
Морфологические типы бактериофагов					
1	2	3	4	5	6
					
Нитевидные фаги	Фаги без отростка	Фаги с аналогом отростка	Фаги с коротким отростком	Фаги с длинным отростком и несокращающимся чехлом	Фаги с длинным отростком и сокращающимся чехлом

Рисунок 7.6 – Распределение бактериофагов на морфологические типы.

Каждый бактериофаг вызывает лизис (растворение) определенного вида бактерий. Поэтому бактериофаги обозначают буквами латинского или русского алфавита с цифровым индексом, перед которыми указывают название вида бактерий (например, фаги *E. coli* T2). Фаги, лизирующие дизентерийные бактерии, называются дизентерийными бактериофагами, лизирующие сальмонеллы - сальмонеллезными бактериофагами, лизирующие дифтерийные бактерии - дифтерийными бактериофагами и т. д. Бактериофаги не способны инфицировать эукариотические клетки.

**По спектру литического действия** выделяют следующие группы бактериофагов:

- **типовые** (типоспецифические) бактериофаги (Т-фаги) взаимодействуют с отдельными типами (вариантами) бактерий внутри одного вида;

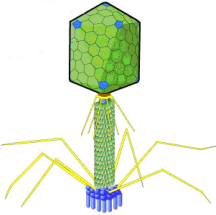



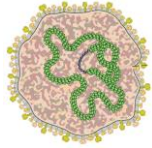
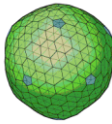
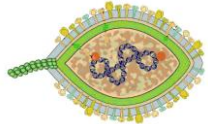
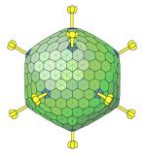
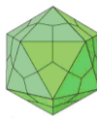

- **моновалентные** бактериофаги (монофаги) взаимодействуют с бактериями одного вида;

- **поливалентные** бактериофаги (полифаги) взаимодействуют с бактериями нескольких родственных видов.

По механизму взаимодействия с клетками бактериофаги подразделяются на вирулентные и умеренные. **Вирулентные бактериофаги** (литические бактериофаги) проникают в бактерии, размножаются в них и выходят из бактериальной клетки, вызывая ее лизис. **Умеренные бактериофаги** после проникновения в клетку встраивают свою нуклеиновую кислоту в геном бактерии и не вызывают ее лизиса.

### 7.3. Строение и химический состав бактериофагов

Строение бактериофагов изучают с помощью электронной микроскопии. При этом для контрастирования образцы напыляют металлами или фосфорно-вольфрамовой кислотой. Особенности строения бактериофагов разных семейств представлены на рисунке 7.7.

ДНК-содержащие фаги				
				
<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>	<i>Lipothrixviridae</i>	<i>Plasmaviridae</i>
				
<i>Corticoviridae</i>	<i>Fuselloviridae</i>	<i>Tectiviridae</i>	<i>Microviridae</i>	<i>Inoviridae</i>
РНК-содержащие фаги				

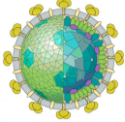
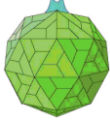
	
<i>Cystoviridae</i>	<i>Leviviridae</i>

Рисунок 7.7 – Особенности строения ДНК- и РНК-содержащих фагов.

Бактериофаги разных морфологических типов и семейств значительно отличаются друг от друга по своему строению. Бактериофаги первого морфологического типа представляют собой палочковидные или нитевидные структуры (рисунок 7.8).

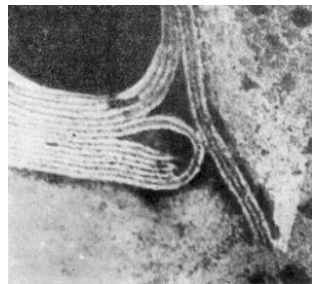


Рисунок 7.8 - Бактериофаги первого морфологического типа. Электронная микроскопия.

Фагами первого морфологического типа являются представители семейств *Lipothrixviridae* и *Inoviridae* (рисунки 7.9 и 7.10).

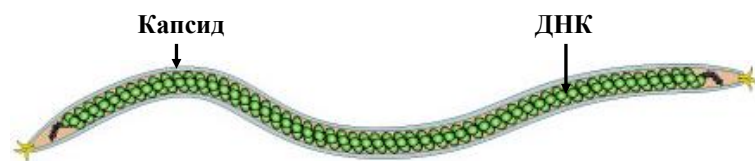
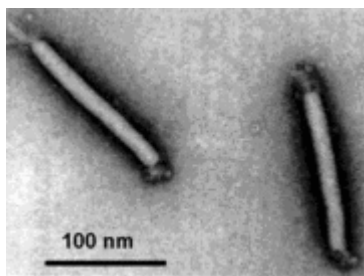


Рисунок 7.9 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Lipothrixviridae*.

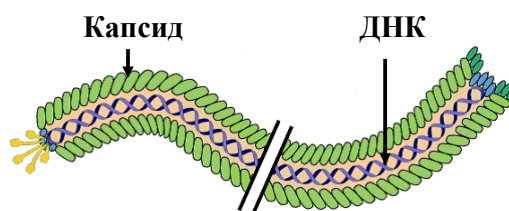
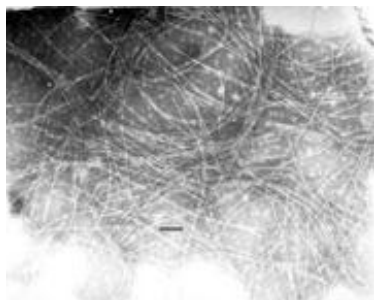


Рисунок 7.10 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Inoviridae*.

Бактериофаги второго морфологического типа состоят из одной головки без отростка (рисунок 7.11).

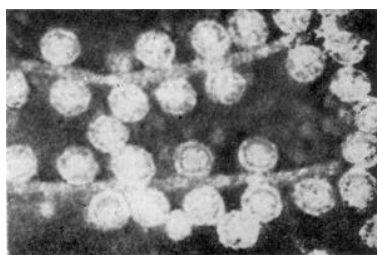


Рисунок 7.13 - Бактериофаги второго морфологического типа. Электронная микроскопия.

Бактериофаги, не имеющие хвостового отростка, относятся к семействам *Plasmaviridae*, *Corticoviridae* и *Microviridae* (рисунки 7.12-7.14).

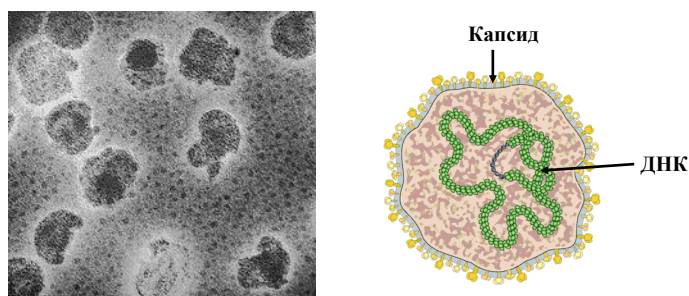


Рисунок 7.12 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Plasmaviridae*.

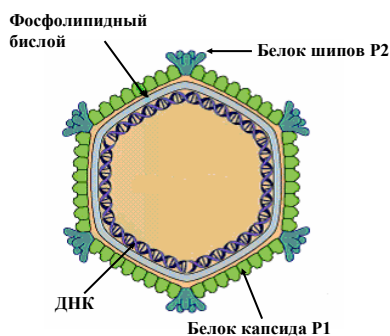


Рисунок 7.13 - Строение фагов семейства *Corticoviridae*.

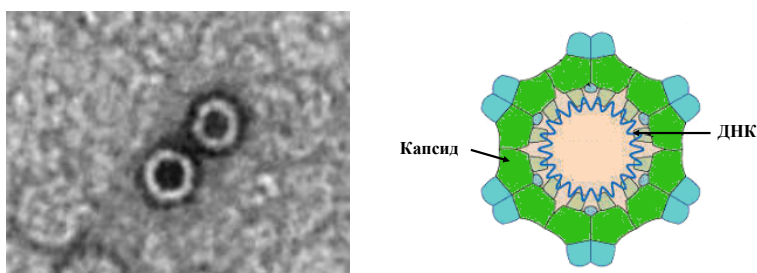


Рисунок 7.14 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Microviridae*.

Бактериофаги третьего морфологического типа имеют головку и небольшие выступы или аналоги отростка (рисунок 7.15).

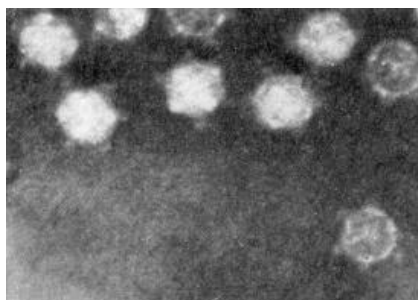


Рисунок 7.15 - Бактериофаги третьего морфологического типа. Электронная микроскопия.

Выступы и аналоги отростка отмечаются у представителей семейств *Tectiviridae*, *Cystoviridae* и *Leviviridae* (рисунки 7.16-7.19).

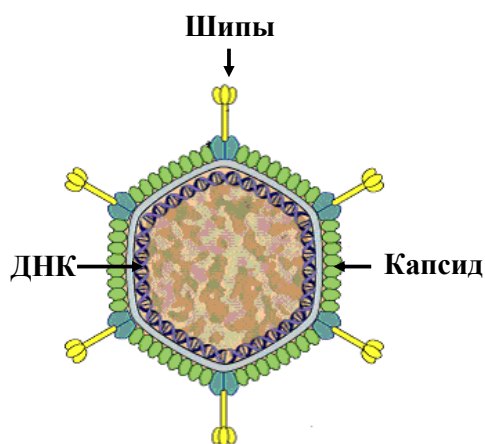


Рисунок 7.16 - Строение фагов семейства *Tectiviridae*.

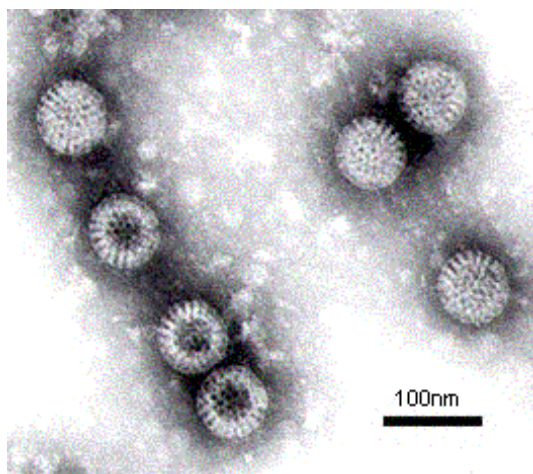


Рисунок 7.17 - Электронная микрофотография бактериофагов семейства *Cystoviridae*.

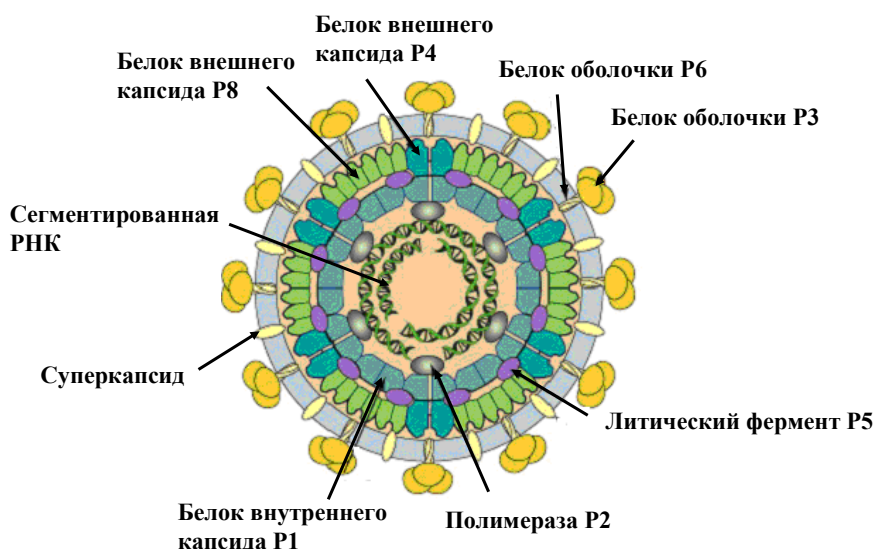


Рисунок 7.18 - Схема строения фагов семейства *Cystoviridae*.

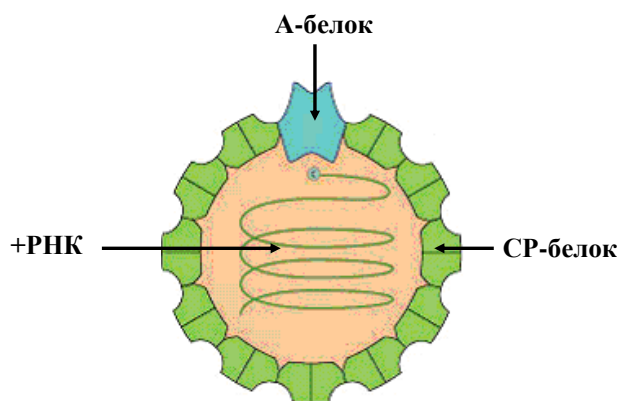


Рисунок 7.19 – Строение фагов семейства *Leviviridae*.

Бактериофаги четвертого морфологического типа содержат головку и короткий отросток (рисунок 7.20).

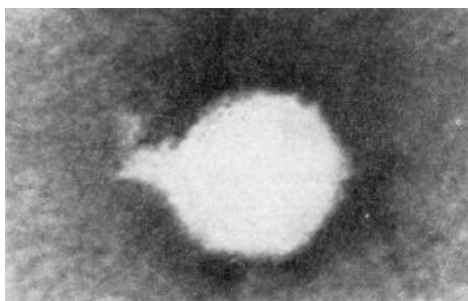


Рисунок 7.20 - Бактериофаги четвертого морфологического типа. Электронная микроскопия.

К бактериофагам четвертого морфологического типа относятся представители семейства *Podoviridae* и *Fuselloviridae* (рисунки 7.21 и 7.22).

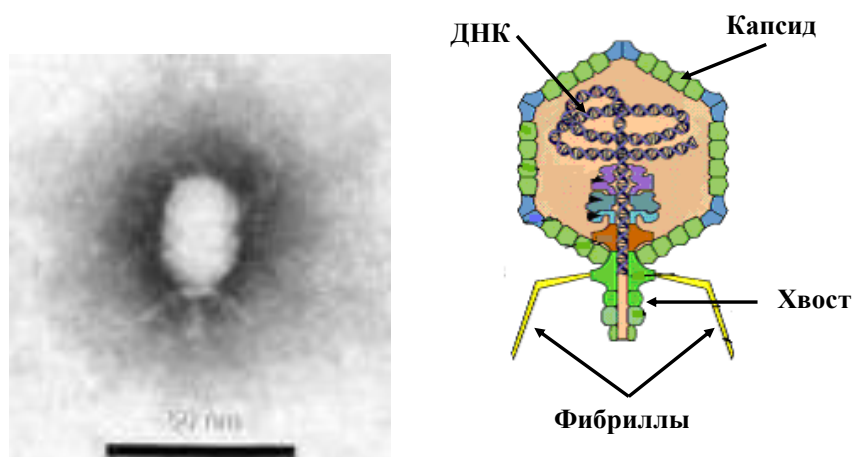


Рисунок 7.21 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Podoviridae*.

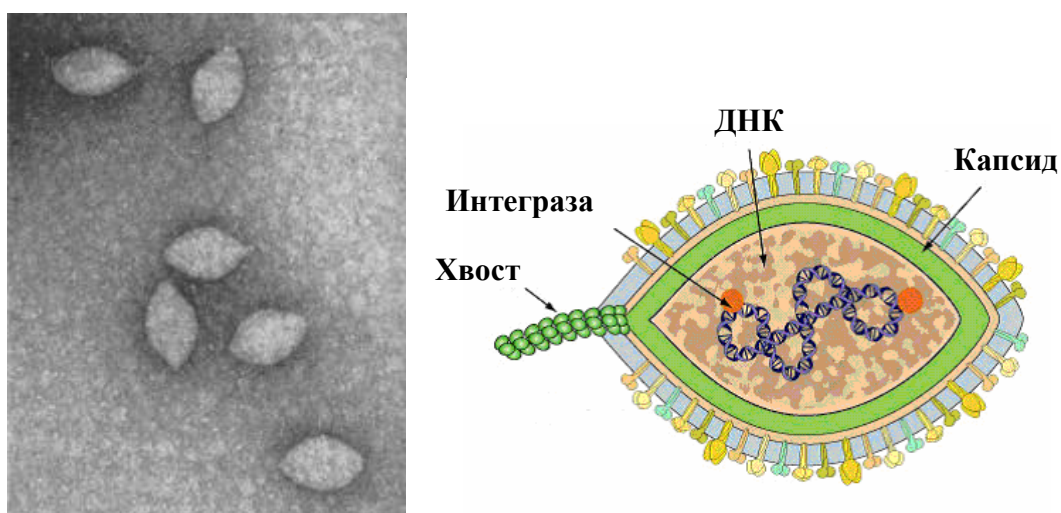


Рисунок 7.22 – Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Fuselloviridae*.

Бактериофаги пятого морфологического типа состоят из головки и длинного отростка, чехол которого не способен сокращаться (рисунок 7.23).

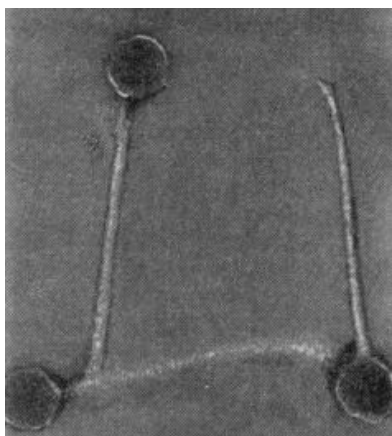


Рисунок 7.23 - Бактериофаги пятого морфологического типа. Электронная микроскопия.

К пятому морфологическому типу относятся бактериофаги семейства *Siphoviridae* (рисунок 7.24).

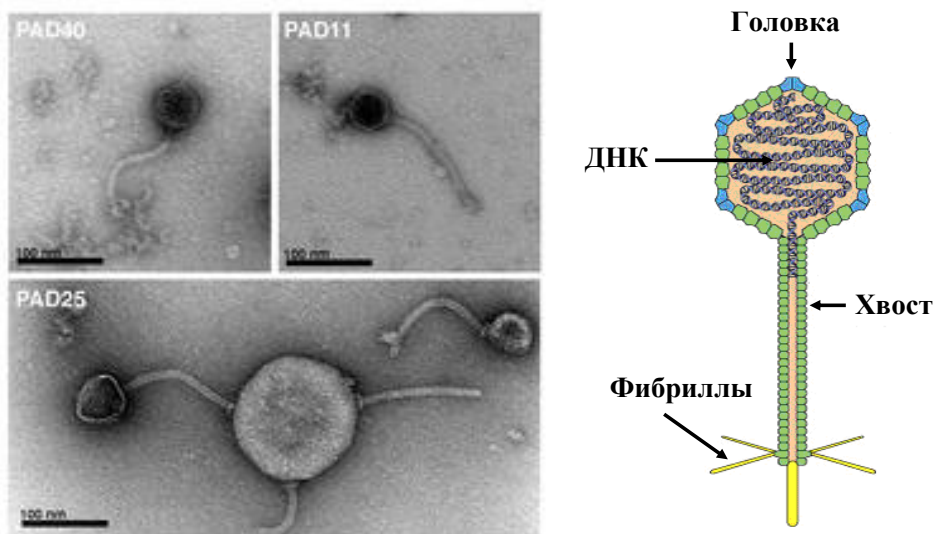


Рисунок 7.24 – Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Siphoviridae*.

Шестой морфологический тип объединяет бактериофаги, состоящие из головки и отростка, окруженного чехлом. Особенностью бактериофагов этого типа является то, что чехол, окружающий отросток, способен сокращаться (рисунок 7.25).



Рисунок 7.25 - Бактериофаги шестого морфологического типа. Электронная микроскопия.

Представителями шестого морфологического типа являются бактериофаги, относящиеся к семейству *Myoviridae* (рисунок 7.26).

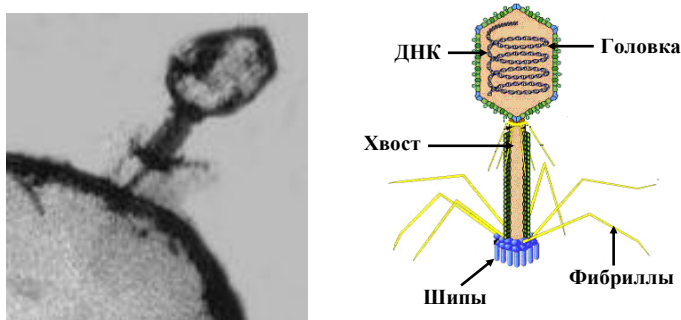


Рисунок 7.26 – Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Myoviridae*.



Типичная фаговая частица состоит из головки и хвостового отростка. Длина хвостового отростка обычно в 2-4 раза больше диаметра головки. Размеры бактериофагов колеблются от 2 до 200 нм. Чем крупнее бактериофаги, тем больше у них генов и сложнее их жизненный цикл. Большинство бактериофагов напоминают сперматозоиды (головастики, барабанные палочки), то есть относятся к шестому морфологическому типу.

**Головка** фага имеет округлую или овальную форму диаметром 60-95 нм. Внутри головки содержится **геном** бактериофага, представленный нуклеиновой кислотой. Нуклеиновые кислоты бактериофагов могут быть однонитевыми, двунитевыми, линейными, кольцевыми. У большинства фагов геном образует спирально упакованная двойная нить ДНК. У некоторых фагов в головке находится белок, обеспечивающий суперспирализацию молекулы ДНК. В таком виде ДНК может упаковываться в сравнительно небольшом объёме головки. Нуклеиновая кислота бактериофага окружена белковой оболочкой - **капсидом**. Капсид состоит из белковых молекул (**капсомеров**), организованных по принципу кубической симметрии. Нуклеиновая кислота и капсид вместе составляют **нуклеокапсид**.

**Хвостовой отросток** бактериофагов организован по принципу спиральной симметрии. Отросток имеет длину до 250 нм и толщину 10-25 нм. Он состоит из **полого стержня** и **сократительного чехла**, который присоединяется к **воротничку**, окружающему стержень около головки. Белковый стержень является продолжением белковой оболочки головки. Стержень заканчивается шестиугольной **базальной пластинкой** с шестью **шипами** (зубцами). От каждого зубца отходит по одной нити (фибриллы) длиной 150 нм. У Т-чётных фагов концы фибрилл опущены вниз, а у нечётных фагов концы нитей загнуты вверх. Базальная пластинка и нити обуславливают адсорбцию бактериофага на бактериальной клетке. У некоторых бактериофагов в дистальной части хвостового отростка содержится лизоцим (эндолизин), облегчающий проникновение нуклеиновой кислоты бактериофага в бактериальную клетку. Строение бактериофага представлено на рисунке 7.27.

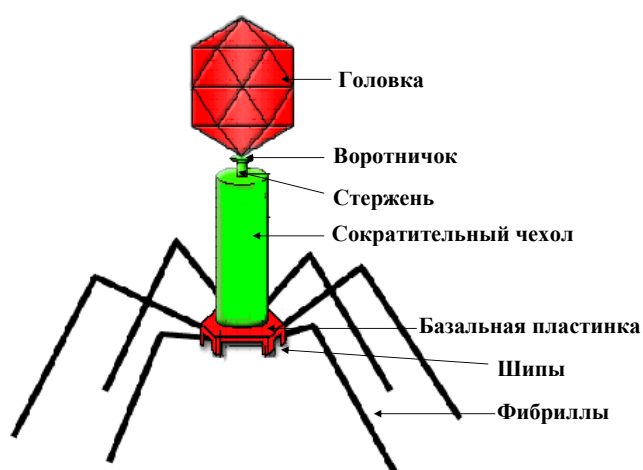


Рисунок 7.27 - Строение типичного бактериофага.

Сократительный чехол состоит из спирально свернутого белкового тяжа, обладающего способностью сокращаться. Эта способность к сокращению имеет

большое значение при внедрении нуклеиновой кислоты бактериофага в бактериальную клетку. При адсорбции бактериофага на клеточной стенке бактерии чехол сокращается, стержень проникает внутрь клетки и по нему нуклеиновая кислота впрыскивается в клетку.

Фаговая частица содержит 40-50% нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), 50-60% белка, до 12-17% углеводов, 2% липидов.

Бактериофаг является строгим **внутриклеточным паразитом**, так как он размножается только внутри бактериальной клетки. Он не культивируется на искусственных питательных средах и в живых биологических системах (культуры клеток, куриные эмбрионы, лабораторные животные).

Основным признаком бактериофагов является специфичность. **Специфичность бактериофагов** выражается в том, что каждый бактериофаг способен лизировать только определенный вид бактерий.

Бактериофаги обладают выраженными **антигенными свойствами**. При парентеральном введении бактериофага в организме образуются антитела, нейтрализующие литическую (растворяющую) активность фага. При этом действие антифаговых сывороток строго специфично. Кроме того фаги по антигенным свойствам отличаются друг от друга. У некоторых родственных фагов обнаруживаются групповые антигены. По антигенным свойствам фаги подразделяют на серологические группы. Для получения антифаговых сывороток используют кроликов, которых иммунизируют подкожно дважды в течение 3 недель. Сыворотку освобождают от форменных элементов центрифугированием.

#### 7.4. Резистентность фагов

По сравнению с вирусами человека и животных бактериофаги более устойчивы к действию физических и химических факторов. Бактериофаги хорошо переносят высушивание и замораживание, длительно выживают при низких температурах (минус 195°C), сохраняют активность в широком диапазоне рН (2,5-8,5). Большинство бактериофагов инактивируется при температуре выше 65-70°C. Ультрафиолетовое и ионизирующее излучения снижают адсорбционную способность фага и его патогенность.

Сулема (0,5% раствор), фенол (1-2% раствор), спирт, эфир и хлороформ не оказывают на фаги инактивирующего действия. Губительно действует на бактериофаги 1% раствор формалина. Фаги быстро погибают при кипячении, действии кислот, ультрафиолетовых лучей, химических дезинфицирующих веществ. Вещества, не инактивирующие фаги, но вызывающие гибель бактерий (в частности, хлороформ), используются для сохранения бактериофагов и предотвращения их контаминации микроорганизмами.

#### 7.5. Взаимодействие фага с бактериальной клеткой

По характеру взаимодействия с бактериальной клеткой различают вирулентные и умеренные фаги. **Вирулентные фаги** проникают в бактериальную

клетку, репродуцируются в ней и вызывают ее лизис (**литический цикл**). **Умеренные фаги**, проникнув в бактериальную клетку, встраивают свою ДНК в геном бактерии и в виде профага передаются по наследству от клетки к клетке, не вызывая лизиса бактерий (**лизогенный цикл**). Жизненный цикл вирулентного фага складывается из следующих стадий.

1. **Адсорбция** бактериофага на клеточной стенке бактерий (рисунок 7.28).

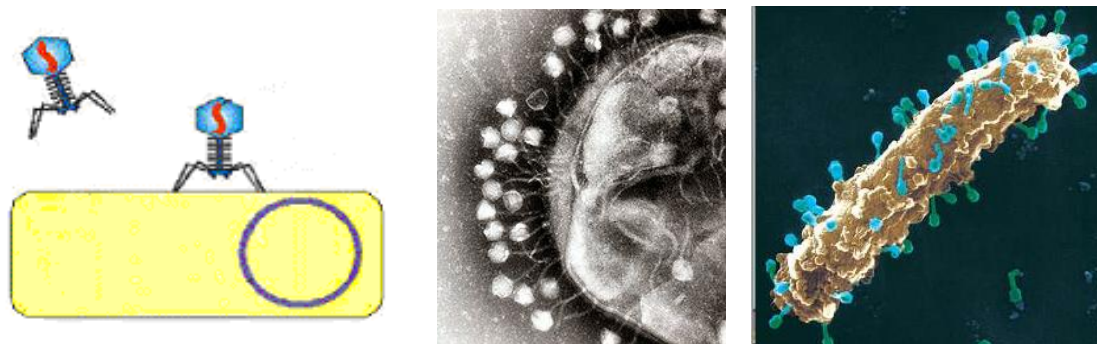


Рисунок 7.28 - Адсорбция бактериофага на клеточной стенке бактерии.

В процессе адсорбции фаги прикрепляются своими жгутиками (фибриллами), шипами или специфическими белками к фагоспецифическим рецепторам на клеточной стенке бактерий. На бактериях без клеточной оболочки (протопластах, L-формах) фаги не адсорбируются. Некоторые мелкие фаги в качестве рецепторов используют F-пили бактерий (рисунок 7.29).

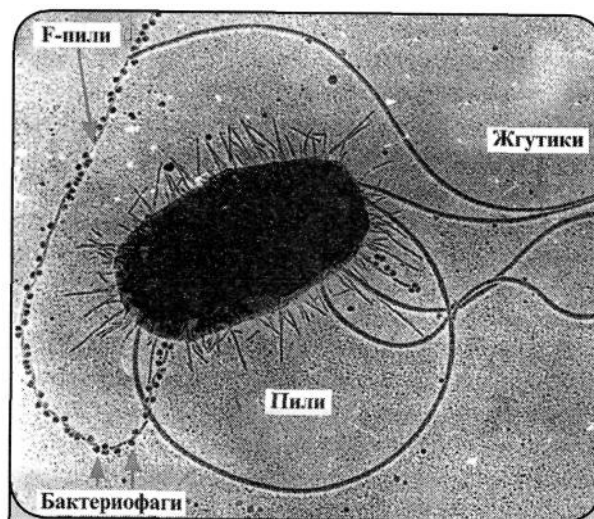


Рисунок 7.29 – Электронная фотография кишечной палочки, на F-пилях которой адсорбированы бактериофаги.

Адсорбция фага зависит от pH среды, температуры, наличия в среде катионов. Например, в дистиллированной воде адсорбция фага не происходит; наличие двухвалентных катионов кальция и магния стимулирует процесс адсорбции. На одной бактериальной клетке может адсорбироваться до 200-300 частиц фага.

Различают обратимую и необратимую фазы адсорбции. **Обратимая фаза**

характеризуется тем, что после адсорбции частицы фага можно отделить от клетки путем энергичного встряхивания. Во время **необратимой фазы адсорбции** частицы фага не отделяются от бактериальной клетки.

2. **Проникновение нуклеиновой кислоты фага (инъекция, пенетрация)** внутрь бактериальной клетки (рисунок 7.30).

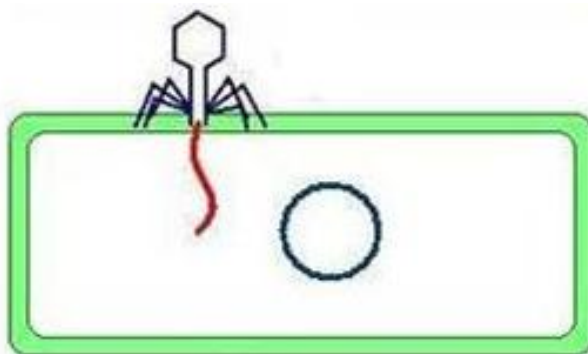


Рисунок 7.30 - Введение ДНК фага в бактериальную клетку.

После адсорбции происходит ферментативное расщепление клеточной стенки лизоцимом, находящимся в дистальной части фагового отростка. Одновременно в сократительном чехле бактериофага высвобождаются ионы кальция, которые активируют АТФазу. В результате этого происходит сокращение чехла и вталкивание стержня хвостового отростка через цитоплазматическую мембрану внутрь клетки. По каналу стержня ДНК фага впрыскивается в цитоплазму бактериальной клетки. Поскольку диаметр стержневого канала незначительно превышает диаметр молекулы ДНК (около 20 нм), то ДНК попадает в цитоплазму в линейной форме. При этом капсид и отросток остаются вне клетки (рисунок 7.31).



Рисунок 7.31 - Пустые фаговые капсиды и отростки на поверхности клетки.

Около 10% фаговой ДНК активно впрыскивается внутрь клетки во время сокращения чехла, а остальная часть ДНК втягивается в цитоплазму бактерии благодаря процессам транскрипции и трансляции.

При адсорбции фагов на половых ворсинках проникновение нуклеиновой

кислоты происходит по каналу F-пили.

3. **Биосинтез компонентов фага** внутри бактериальной клетки (рисунок 7.32).

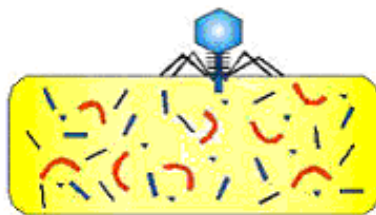


Рисунок 7.32 - Биосинтез компонентов фага.

Инъецированная нуклеиновая кислота вызывает перестройку метаболизма бактериальной клетки: прекращается синтез бактериальных нуклеиновых кислот и белков. В эту стадию ДНК бактериофага транскрибируется с помощью собственной транскриптазы. Образующаяся иРНК поступает на рибосомы клетки-хозяина, где синтезируются фаговые белки.

4. **Сборка структурных компонентов фаговых частиц** (рисунок 7.33).

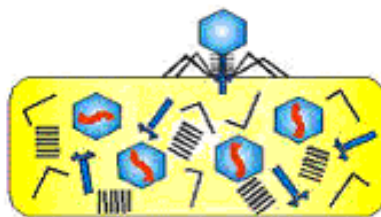


Рисунок 7.33 – Сборка структурных компонентов фаговых частиц.

Вновь синтезированные белки в цитоплазме клетки формируют капсиды, отростки и другие структуры дочерних фаговых частиц. Затем нуклеиновая кислота фагов заполняет пустотелые капсиды головок.

5. **Сборка (морфогенез) зрелых фаговых частиц** (рисунок 7.34).

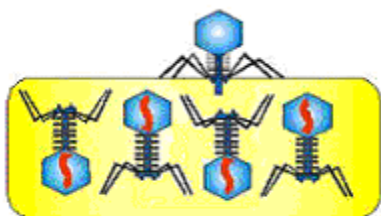


Рисунок 7.34 - Сборка зрелых фаговых частиц.

Заполненный нуклеиновой кислотой капсид взаимодействует с хвостовой частью и образует зрелую фаговую частицу. Соединение хвоста с головкой происходит только после полной их сборки. Точно так же ворсинки присоединяются к хвосту только после полного соединения отростка с головкой. Благодаря строгому генетическому контролю со стороны фага обеспечивается последовательность и

согласованность всех процессов сборки зрелых фаговых частиц. После сборки в каждой бактериальной клетке накапливается до 200 частиц фага (рисунок 7.35).

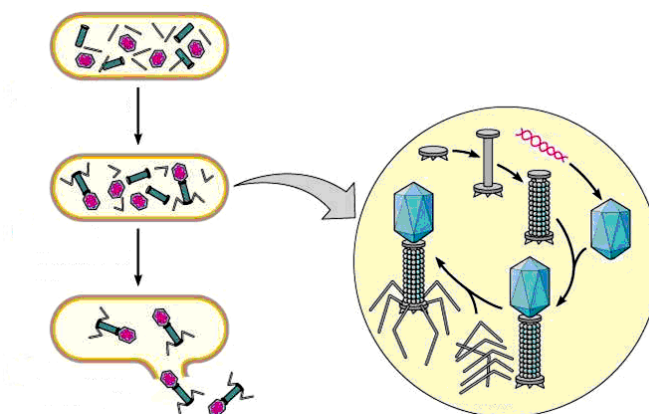


Рисунок 7.35 – Сборка фаговых частиц.

#### 6. Выход фаговых частиц из клетки (рисунок 7.36).

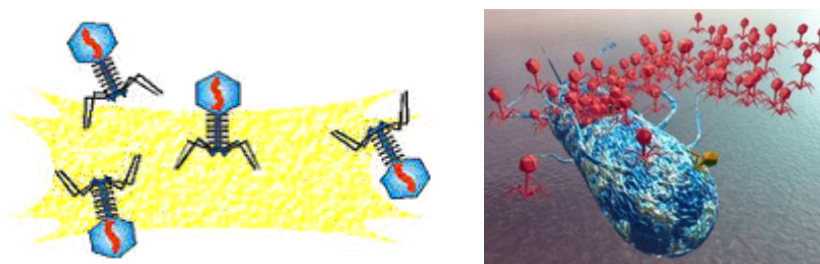


Рисунок 7.36 - Выход фаговых частиц из клетки.

Вновь образованные фаговые частицы выходят наружу в результате лизиса клеточной оболочки изнутри фаговым лизоцимом. Он синтезируется на последнем этапе размножения фага. Некоторые нитевидные фаги высвобождаются из клетки путем прохождения нуклеиновой кислоты через цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку бактерий. Во время такого прохождения фаги приобретают капсиды. Один цикл от момента адсорбции фага на поверхности клетки до выхода потомства из клетки продолжается 30-40 минут. Такие циклы продолжаются до тех пор, пока не будут лизированы все чувствительные к фагу клетки.

ДНК умеренных фагов после проникновения в цитоплазму встраивается в геном бактериальной клетки. ДНК фага, встроенная в хромосому бактерии, называется **профагом**, а культура таких бактерий – **лизогенной культурой** (рисунок 7.37).

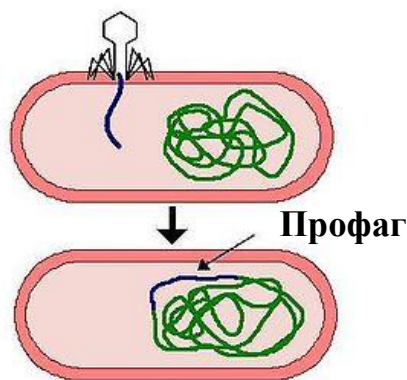


Рисунок 7.37 - Лизогенная культура бактерий.

Совместное сосуществование бактерии и умеренного бактериофага называется **лизогенией** (от греч. *lysis* - разложение, *genesis* - происхождение). Различают монолизогенность и полилизогенность. Бактериальная культура, образующая после индукции один вид фага, называется **монолизогенной**, а бактериальная культура, образующая несколько видов фагов, называется **полилизогенной**.

ДНК умеренного фага встраивается в строго определенную область генома, синхронно с ним реплицируется и передается по наследству. При лизогении фагового потомства не образуется, так как в бактерии синтезируется специфический низкомолекулярный белок **репрессор**, подавляющий транскрипцию фаговых генов. Биосинтез репрессора детерминируется генами профага. Лизогенные бактерии приобретают **иммунитет (невосприимчивость)** к последующему проникновению и размножению в них родственного фага.

У некоторых лизогенных культур спонтанно или под действием физических факторов и химических веществ (УФ-лучи, ионизирующее излучение, перекисные соединения, митомицин С и др.) профаг может исключаться из хромосомы и становиться литическим фагом. Этот процесс называется **индукцией профага**. Он заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий.

Лизогенизация бактерий может приводить к изменению их морфологических, культуральных, ферментативных, антигенных и биологических свойств. При этом профаг может придавать бактерии новые ранее отсутствовавшие у нее свойства. Феномен изменения свойств микробов под влиянием профага называется **фаговой конверсией** (от лат. *conversio* - превращение). Например, профаг придает дифтерийной палочке способность продуцировать экзотоксин.

Таким образом, различают следующие типы взаимодействия фагов с бактериями:

- **продуктивный тип взаимодействия**, при котором в клетке образуется фаговое потомство, обуславливающее лизис бактерий;
- **интегративный тип взаимодействия**, при котором нуклеиновая кислота фага встраивается в геном бактерии и сосуществует с ним в течение длительного времени.

Схема продуктивного и интегративного типов взаимодействия бактериофага и клетки представлена на рисунке 7.38.

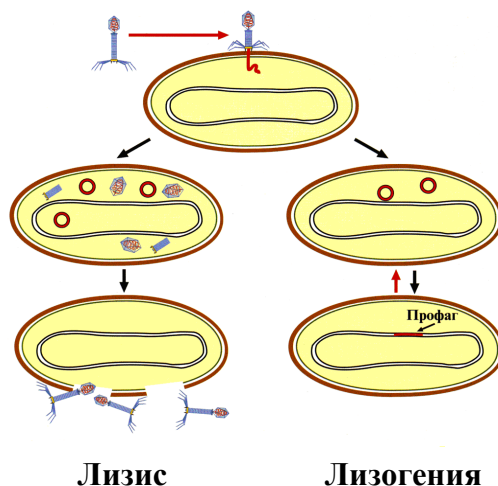
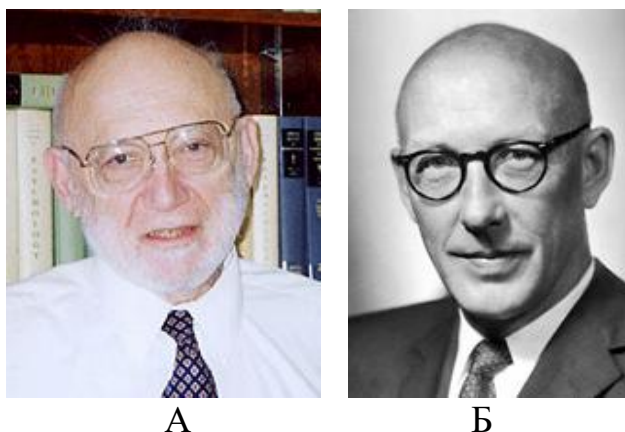


Рисунок 7.38 - Схема продуктивного и интегративного путей развития фага.

Некоторые умеренные фаги могут быть **дефектными**, то есть неспособными образовывать зрелые фаговые частицы ни в естественных условиях, ни при индукции профага.

### 7.6. Участие бактериофагов в генетическом обмене у бактерий

Умеренные фаги, встраиваясь в геном микробной клетки, способны захватывать некоторые бактериальные гены и передавать их новому хозяину. Передача генов от одной бактерии (от бактерии – донора) другой бактерии (бактерии – реципиенту) с помощью умеренного фага называется **трансдукцией**. Различают три типа трансдукции: неспецифическую (общую, генерализованную), специфическую (локализованную) и abortивную. Впервые **неспецифическую трансдукцию** описали Д. Ледерберг и Э. Тейтем (рисунок 7.39).



А

Б

Рисунок 7.39 – А - Джошуа Ледерберг (Joshua Lederberg, 1925-2008 гг.), Б - Эдвард Тейтем (Edward Lawrie Tatum, 1909-1975 гг.).

Механизм неспецифической трансдукции заключается в том, что в процессе внутриклеточного размножения фага в его геном случайно включается какой-либо фрагмент бактериальной ДНК. В результате этого возникают фаговые частицы, у которых наряду с собственной фаговой ДНК содержится фрагмент ДНК бактерии.



Эти фаги сохраняют инфекционную способность и при адсорбции на бактериальной клетке вводят в нее ДНК клетки донора. В случае встраивания принесенного фрагмента ДНК в гомологичную область генома клетки-реципиента этот признак будет наследственно закрепляться (рисунок 7.40).

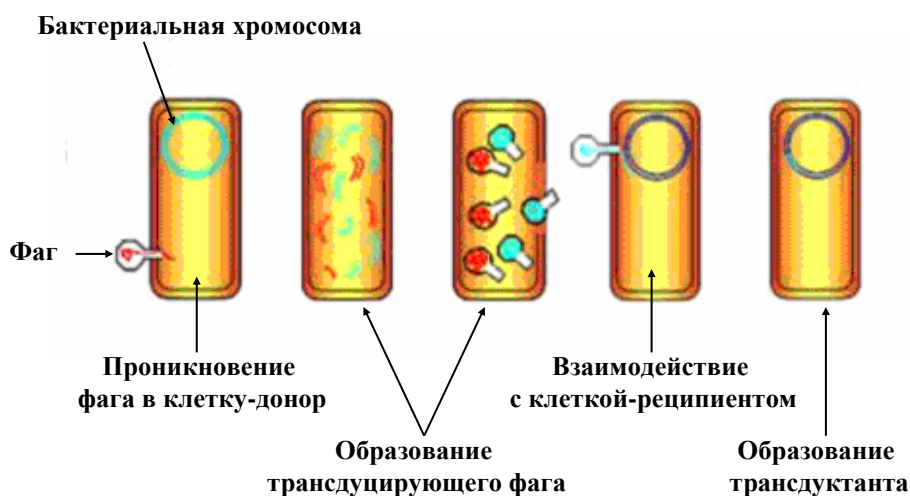


Рисунок 7.40 – Схема трандукции.

Введенная ДНК клетки-донора наделяет клетку-реципиент (трансдуктант) новыми признаками.

При **специфической трандукции** фаги переносят только определенные гены клетки-донора. Это связано с тем, что при специфической трандукции образование трансдуцирующего фага происходит в результате соединения его ДНК со строго определенными генами донора. При освобождении такой фаг захватывает только рядом расположенную строго определенную область хромосомы донора и передает ее реципиенту. В последующем наблюдается интеграция умеренного фага в определенный участок генома реципиента. При этом происходит не только лизогенизация, но и появление у реципиента нового признака (**лизогенная конверсия**). Например, умеренный фаг способен вызывать лизогенную конверсию дифтерийной палочки, превращая нетоксигенную культуру в токсигенную.

В некоторых случаях переносимый фрагмент ДНК не встраивается в геном реципиента, а сохраняется автономно в цитоплазме клетки. Это явление называется **абортивной трандукцией**. При делении бактерий фаговая ДНК передается только одной из двух дочерних клеток.

При трандукции возможен перенос генов, которые детерминируют питательные потребности бактерий, устойчивость клеток к лекарственным препаратам, ферментативную активность, подвижность, факторы патогенности и другие свойства.

## 7.7. Практическое применение бактериофагов

Способность бактериофагов лизировать клетки бактерий определенных видов позволяет использовать их для диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Бактериофаги применяют для установления источника

инфекции, путей передачи возбудителя, для выявления бактерий во внешней среде, при проведении генно-инженерных исследований.

**Фагодиагностика.** Бактериофаги используются при диагностике сибирской язвы, брюшного тифа, дизентерии и других инфекционных заболеваний. Высокая чувствительность бактерий к специфическому фагу позволяет отличить близкородственные виды, (например, возбудителя чумы от возбудителя псевдотуберкулеза, холерный вибрион от холероподобного). С помощью бактериофагов можно определить типы (варианты) внутри одного вида бактерий (в частности, измененные штаммы бруцелл и сибиреязвенного микроба).

При проведении фагодиагностики культивирование бактерий осуществляют на плотной или в жидкой питательных средах. Размножение фагов в бактериальных культурах на плотных питательных средах сопровождается лизисом бактерий и образованием зон просветления (стерильных пятен или негативных колоний). Разные фаги формируют негативные колонии определенных размеров и формы. Размножение бактериофагов в жидких культурах сопровождается просветлением среды, бывшей перед заражением фагом мутной.

В лабораториях применяют несколько методов выявления специфического действия фагов:

1. **Метод Отто** (метод стекающей капли) используется для идентификации неизвестных бактерий с помощью известных диагностических фагов (фагоидентификация, фаготипирование). Для выполнения этого метода на чашку с МПА наносится капля суточной бульонной культуры и шпателем круговыми движениями распределяется по поверхности агара. Затем наносится капля суспензии известного бактериофага и наклоном чашки дают капле стечь по поверхности агара. Посевы инкубируют в термостате в течение суток, после чего учитывают результаты. При соответствии фага и бактерий в месте нанесения диагностического фага наблюдается отсутствие роста культуры (рисунок 7.41).



Рисунок 7.41 - Фагоидентификация бактерий по методу Отто.

2. **Метод Фишера** используется для идентификации неизвестных бактерий с помощью известных фагов. Для выполнения этого метода каплю испытуемой суточной бульонной культуры наносят на МПА и шпателем распределяют по поверхности агара. Затем чашку условно делят на квадраты. В каждый квадрат наносят по капле суспензий разных фагов. После суточного культивирования в термостате учитывают результаты. При соответствии бактерий и фага

обнаруживаются зоны лизиса (рисунок 7.42).

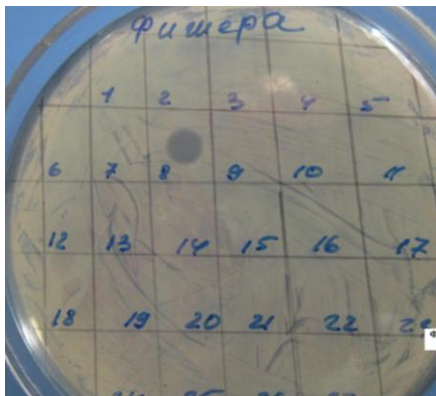


Рисунок 7.42 – Фаготипирование бактерий по методу Фишера.

3. **Метод Фюрта** используется для типирования неизвестных бактерий с помощью известных фагов. При выполнении этого метода в расплавленный и остуженный до 45-50<sup>0</sup>С МПА добавляют суспензию известного бактериофага и тщательно перемешивают. Полученную смесь разливают в чашки Петри. Каждую чашку условно делят на несколько секторов, в которые высевают штрихом исследуемые культуры. Чашки инкубируют в термостате, после чего учитывают результаты. Рост культуры будет отсутствовать в том секторе, в котором бактерии и фаг соответствуют друг другу (рисунок 7.43).

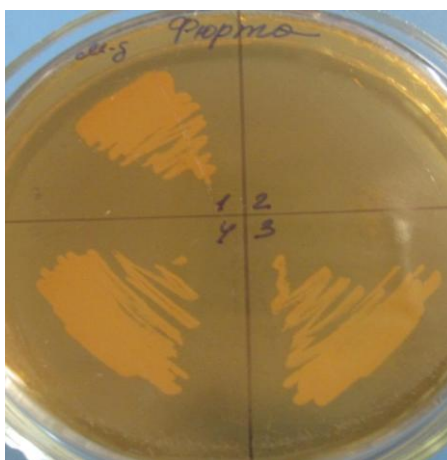


Рисунок 7.43 – Фагоидентификация бактерий по методу Фюрта.

Фаготипирование используют также для выявления источника и путей распространения инфекции (**эпидемиологическое маркирование**). При этом выделение бактерий одного фаговара от разных больных указывает на общий источник их заражения.

**Санитарно-показательное значение бактериофагов.** По содержанию некоторых бактериофагов во внешней среде можно судить о присутствии в них соответствующих бактерий. Например, наличие фагов кишечных бактерий свидетельствует о фекальном загрязнении объектов внешней среды. Поэтому бактериофаги кишечных бактерий используются в качестве санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ). Во внешней среде бактериофаги выжи-

вают в течение 8-9 месяцев, поэтому их обнаруживают как при свежем фекальном загрязнении, так и после отмирания бактерий кишечной группы. При этом одновременное обнаружение фага и кишечной палочки указывает на свежее фекальное загрязнение, а обнаружение одного фага - на давнее фекальное загрязнение.

При исследовании питьевой воды определяют присутствие и количество колифагов – фагов, лизирующих представителей рода *Escherichia*. Колифаги являются индикаторами загрязнения воды патогенными энтеровирусами и очистки питьевой воды от энтеровирусов. Для определения количества колифагов определенное количество питьевой воды смешивают с расплавленным питательным агаром и культурой кишечной палочки. Смесь разливают в чашки Петри и инкубируют в термостате. Через 72 часа учитывают зоны лизиса, образовавшиеся на сплошном газоне *E. coli*. Результаты выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 см<sup>3</sup> воды.

**Индикация бактерий с помощью реакции нарастания титра фага.** Присутствие каких-либо микроорганизмов в исследуемой пробе (воде, пищевых продуктах) можно установить с помощью бактериофагов. Этот прием основан на специфичности действия бактериофагов: бактериофаг *E. coli* лизирует только кишечную палочку, холерный бактериофаг вызывает лизис только холерного вибриона и т. д. Для установления присутствия определенных бактерий в исследуемую пробу добавляют известное количество специфического фага. При наличии гомологичных бактерий фаг размножается, в результате чего нарастает его титр (количество). Следовательно, реакция нарастания титра фага основана на увеличении количества фага при его контакте с возбудителем непосредственно в исследуемом материале.

Реакцию нарастания титра фага используют при диагностике дизентерии и брюшного тифа, для выявления бактерионосительства при брюшном тифе, для обнаружения брюшнотифозных и дизентерийных бактерий в воде и молоке, для обнаружения дизентерийных микробов на предметах внешней среды, для выявления чумного микроба и холерного вибриона в воде.

**Фагопрофилактика** – это предупреждение бактериальных инфекций путем применения бактериофагов. В профилактических целях бактериофаг используется в тех случаях, когда возбудитель известен. Фагопрофилактика проводится в комплексе с другими методами. В настоящее время по эпидемическим показаниям фагопрофилактику проводят только при дизентерии и брюшном тифе. Фагопрофилактика имеет ряд преимуществ: возможность использования в больших количествах, быстрота действия, легкость введения, полная безвредность.

**Фаготерапия** – это способ лечения некоторых бактериальных инфекций (брюшного тифа, дизентерии, холеры и др.) специфическими бактериофагами. При использовании бактериофагов в лечебных целях предварительно определяют чувствительность возбудителей к данному бактериофагу. В настоящее время применение фагов с лечебной целью проводится редко. Это в первую очередь связано с широким применением антибиотиков.

В терапевтических целях часто используют смесь разных фагов: против протей, кишечной палочки и энтерококка; против синегнойной палочки и других гноеродных микробов. Поливалентные препараты могут включать бактериофаги против различных вариантов бактерий одного вида (например, против пяти

серологических групп сальмонелл).

Для профилактического и терапевтического применения бактериофаги выпускаются в виде таблеток или в жидком виде (рисунок 7.44).



Рисунок 7.44 – Готовые лекарственные формы препаратов бактериофагов.

В косметических целях фаги применяются в составе гелей (рисунок 7.45).



Рисунок 7.45 – Гели с бактериофагами.

**Генная инженерия.** Трансдуцирующие фаги широко используются в генной инженерии. В частности, феномен неспецифической трансдукции применяется для картирования генома бактерий.

## 7.8. Выделение и производство бактериофагов

**Выделение бактериофагов.** Бактериофаги выделяют из субстратов, контаминированных бактериями, или из лизогенных бактерий, содержащих профаг. В качестве субстрата используют отделяемое гнойных ран, испражнения, сточные воды, старые бактериальные культуры. Для индукции профага на бактериальную культуру воздействуют химическими веществами или физическими факторами (митомицином С, УФЛ, ионизирующим излучением и др.). Индуцированный профаг обуславливает синтез фаговых частиц и вызывает лизис бактериальных клеток.

После этого суспензию субстратов (или лизат бактериальной культуры) фильтруют через мелкопористые фильтры или центрифугируют. Полученный фильтрат (центрифугат) исследуют на способность лизировать чувствительные бактерии. С этой целью фильтрат наносят на питательную среду, засеянную бактериями, в которых способен размножиться фаг. О присутствии фага судят по лизису бактериальной культуры. На плотных питательных средах фаги обнаруживаются либо с помощью спот-теста (анг. *spot* – пятно), либо методом агаровых слоев по А. Грациа (рисунок 7.46).

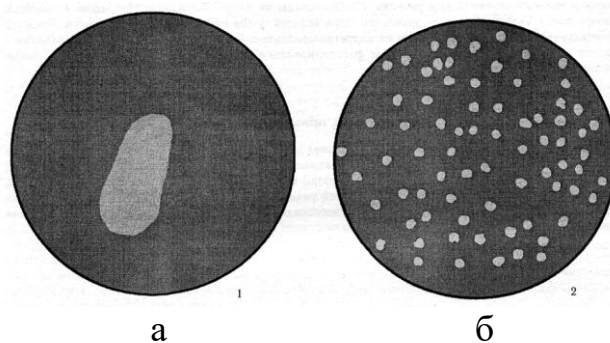


Рисунок 7.46 - Обнаружение бактериофагов в исследуемом материале:  
а – спот-тест; б – титрование по Грациа.

При проведении **спот-теста** (капельного теста) на поверхность агара в чашке Петри высевают бактериальную культуру, а затем на нее наносят каплю суспензии бактериофага. В месте нанесения фага бактериальная культура лизируется и образуется стерильное пятно. Иногда каплю суспензии бактериофага наносят ближе к краю чашки, а затем чашку наклоняют, позволяя фаговой суспензии стечь по поверхности агара. В этом случае роста бактериальной культуры не будет в виде “**фаговой дорожки**”.

**Метод агаровых слоев по Грациа** (A. Gratia, 1936) используется как для выделения фага, так и для определения его титра. При выполнении этого метода в чашку Петри наливают слой МПА. После застывания на этот слой наливают 2 мл расплавленного и охлажденного до 45<sup>0</sup>С полужидкого (0,7%) агара, в который предварительно добавляют каплю бактериальной суспензии и определенный объем суспензии фага. После застывания верхнего слоя агара чашку инкубируют в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 18-24 часов (рисунок 7.47).

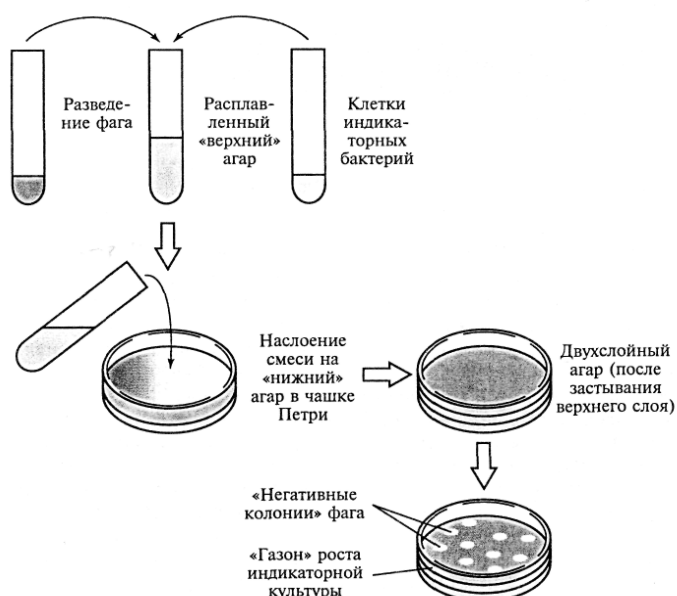


Рисунок 7.47 – Определение количества фаговых частиц методом агаровых слоев по Грациа.

Бактерии размножаются внутри верхнего слоя агара, образуя сплошной непрозрачный фон, на котором хорошо видны негативные колонии фага в виде стерильных пятен. Считается, что каждая негативная колония образуется за счет размножения одной фаговой частицы. Метод Грациа позволяет рассчитывать концентрацию (титр) фага в исходной суспензии (рисунок 7.48).

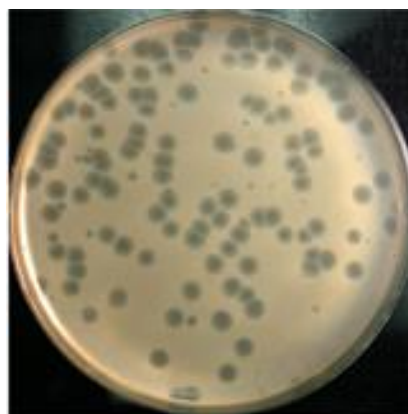


Рисунок 7.48 – Негативные колонии бактериофага в агаре.

Количества фаговых частиц выражают в **бляшкообразующих единицах (БОЕ/мл)**. Титр фага в исходной суспензии рассчитывают по формуле:

$$N = y/vx,$$

где: N - титр фага;

y - количество негативных колоний;

v - объем использованного фильтрата фага;

x - разведение суспензии фага.

Например, если 0,1 мл фильтрата фага в разведении  $10^{-5}$  образует 250 негативных колоний, то титр равен  $250:0,1 \times 10^{-5} = 2,5 \times 10^8$  БОЕ/мл.

При использовании жидкой питательной среды проводят **титрование по методу Аппельмана**. В этом случае готовят серию десятикратных разведений фильтрата бактериофага и определенное количество разведений вносят в свежезасаженный бульон. Максимальное разведение фильтрата, вызывающее полный лизис бульонной культуры чувствительных бактерий, принимается за титр бактериофага.

**Получение фаговой суспензии с высоким титром** производится путем инфицирования концентрированной жидкой бактериальной культуры или путем высева смеси фага и бактерий на питательный агар. В последующем фаги освобождают от остатков питательной среды и бактериальных клеток центрифугированием или фильтрованием через бумажные фильтры. Получаемая при этом суспензия фага может содержать до  $10^{11}$ - $10^{12}$  фаговых частиц в 1 мл.

**Большие количества фага получают** путем добавления в аппараты с бульонными культурами бактерий суспензии фага, выдерживают при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  одни сутки, затем фильтруют. Полученный фильтрат проверяют на чистоту, стерильность, безвредность и активность.

## 7.9. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Открытие явления бактериофагии и бактериофагов.
2. Классификация бактериофагов на семейства.
3. Распределение фагов на морфологические типы.
4. Распределение фагов на группы по спектру литического действия.
5. Умеренные и вирулентные бактериофаги.
6. Строение бактериофагов.
7. Резистентность фагов.
8. Продуктивный тип взаимодействия фага с клеткой (жизненный цикл вирулентных фагов).
9. Интегративный тип взаимодействия фага с клеткой (жизненный цикл умеренных фагов).
10. Неспецифическая трансдукция.
11. Специфическая трансдукция
12. Абортивная трансдукция.
13. Использование фагов в диагностике инфекционных заболеваний.
14. Применение фагов для профилактики и лечения инфекций.
15. Фаги как объект генной инженерии.
16. Схема выделения и приготовления препаратов фагов.

## 7.10. Тренировочные тесты

1. Явление бактериофагии впервые описал:  
- А. Левенгук



- Р. Кох
- + Н.Ф. Гамалея
- И.И. Мечников
- Ф. д' Эрелль

2. Стекловидное перерождение стафилококков описал:

- + Ф. Туорт
- Р. Кох
- Л. Пастер
- И.И. Мечников
- Ф. д' Эрелль

3. Понятия “бактериофагия” и “бактериофаг” предложены:

- Ф. Туортом
- Р. Кохом
- Л. Пастером
- И.И. Мечниковым
- + Ф. д' Эреллем

4. Первую электронную фотографию бактериофага сделал:

- Ф. Туорт
- Н.Ф. Гамалея
- Л. Пастер
- + Г. Руска
- Ф. д' Эрелль

5. Бактериофаги можно обнаружить в:

- + сточных водах
- консервированных продуктах
- + кишечнике человека
- стерильных материалах
- + почве

6. Бактериофаги:

- + проходят через бактериальные фильтры
- растут на питательных средах
- + размножаются внутри клеток
- содержат оформленное ядро
- имеют аппарат Гольджи

7. Типичные бактериофаги содержат:

- + головку
- капсулу
- эндоспоры
- + базальную пластинку
- + отростки

8. Большинство фагов имеют форму:

- + сперматозоидную
- кубовидную
- овоидную
- цилиндрическую
- бобовидную

9. Геном большинства фагов представлен:

- РНК
- + ДНК
- ДНК-азой
- протеазой
- лизоцимом

10. У ДНК-содержащих фагов молекула ДНК имеет форму:

- линейной нити
- кольца с разрывом
- фрагментированной нити
- отдельных сегментов
- + кольца

11. Фаги состоят из:

- + нуклеиновой кислоты
- липополисахарида
- пептидогликана
- щелочей
- + белка

12. Проникновению генома фага в клетку способствует наличие на базальной пластинке:

- цитокина
- фибринолизина
- гиалуронидазы
- + лизоцима
- перфорины

13. Последовательность стадий взаимодействия вирулентного фага с бактериальной клеткой:

- выход фаговых частиц из клетки, биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и белков капсида, адсорбция фага на клеточной стенке, проникновение в клетку, сборка фаговых частиц
- биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и белков капсида, выход фаговых частиц из клетки, адсорбция фага на клеточной стенке, сборка фаговых частиц, проникновение в клетку
- адсорбция фага на клеточной стенке, проникновение в клетку, сборка фаговых частиц, выход фаговых частиц из клетки, биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и

белков капсида

- + адсорбция фага на клеточной стенке, проникновение в бактерию, биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и белков капсида, сборка фаговых частиц, выход фаговых частиц из бактериальной клетки
- выход фаговых частиц из клетки, сборка фаговых частиц, биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и белков капсида, проникновение в клетку, адсорбция фага на клеточной стенке

14. По характеру взаимодействия с бактериальными клетками выделяют:

- нейтральные фаги
- + умеренные фаги
- abortивные фаги
- + вирулентные фаги
- условно-патогенные фаги

15. Типы взаимодействия фага с бактериальной клеткой:

- умеренный
- + продуктивный
- abortивный
- + интегративный
- нейтральный

16. Профаг представляет собой:

- + ассоциированный с бактериальной хромосомой геном фага
- отросток фага
- капсид фага
- головку фага
- базальную пластинку фага

17. Неспецифическую трансдукцию впервые описали:

- Ф. Туорт
- Г. Руска
- + Д. Ледерберг и Э. Татум
- Н.Ф. Гамалея
- Ф. д' Эрелль

18. Бактериальные клетки, содержащие профаг, называются:

- + лизогенными
- ауксотрофными
- прототрофными
- термофильными
- фототрофными

19. Лизогенизация обуславливает:

- + фаговую конверсию
- трансформацию

- трансдукцию
- конъюгацию
- депротеинизацию

20. В результате фаговой конверсии наблюдается:

- + переход неvirulentных бактерий в virulentные
- изменение окраски по Граму
- + приобретение способности к продукции экзотоксина
- превращение аэробов в анаэробы
- превращение анаэробов в микроаэрофилы

21. Лизогенная конверсия - это:

- один из этапов размножения бактериофагов
- изменчивость фагов под действием мутагена
- + изменение свойств бактерий при включении в их геном профага
- результат конъюгации
- результат трансформации

22. Способ размножения бактериофагов:

- половой
- поперечное деление
- + внутриклеточная репродукция
- с помощью спор
- почкование

23. Количество фаговых частиц определяют титрованием по методу:

- Р. Коха
- + А. Грациа
- Н.Ф. Гамалея
- Ф. д'Эрелля
- Ф. Туорта

24. Бактериофаги применяются для:

- терапии вирусных инфекций
- + фаготипирования бактерий
- профилактики вирусных инфекций
- + лечения бактериальных инфекций
- + генно-инженерных исследований

25. Активность фага определяют путем определения:

- размеров
- массы
- + титра
- формы
- подвижности

26. При фагодиагностике применяют методы:

- Грациа
- + Отто
- + Фишера
- Аппельмана
- + Фюрта

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 8. Физиология бактерий

Физиология микробов - это раздел микробиологии, изучающий химический состав микробных клеток, механизмы поступления питательных веществ внутрь клетки, энергетический и конструктивный метаболизм, системы секреции веществ из бактериальной клетки, рост и размножение бактерий.

Изучение физиологии микроорганизмов началось с работ французского ученого Л. Пастера и немецкого ученого Р. Коха, положивших начало физиологическому периоду развития микробиологии. Л. Пастер первым установил роль бактерий в спиртовом, молочнокислом и уксуснокислом брожении. Р. Кох предложил использовать для выращивания бактерий плотные питательные среды на основе желатина и агара, разработал метод выделения чистых культур бактерий на плотных питательных средах.

### 8.1. Химический состав микробов

Бактерии имеют сложное химическое строение. 70% общей массы бактериальной клетки составляет вода. Часть воды находится в свободном состоянии, а часть - в связанном состоянии (входит в состав компонентов клетки). Сухое вещество составляет 30% массы клетки. В составе сухого вещества на долю белков приходится 52%, углеводов – 17%, липидов – 9%, РНК – 16%, ДНК – 3%, минеральные вещества – 3% (рисунок 8.1).

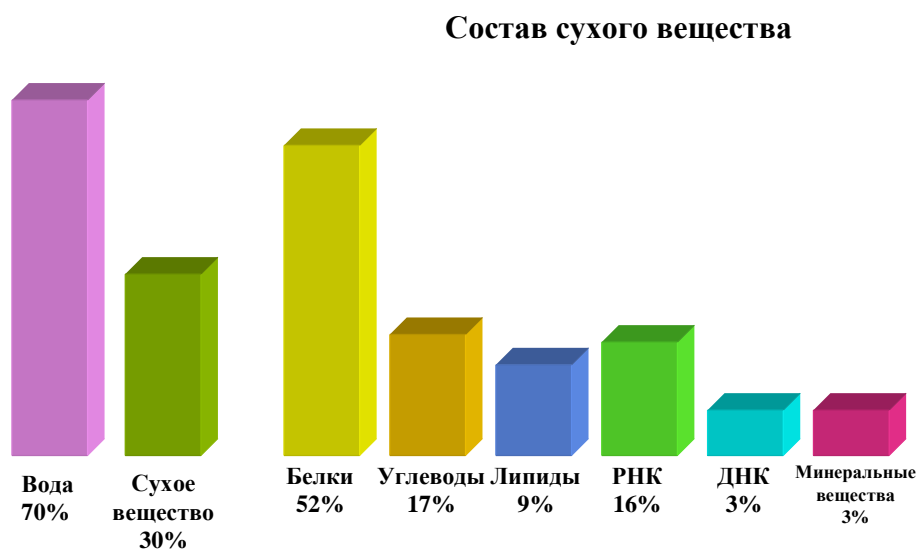


Рисунок 8.1 – Химический состав микробной клетки.

Из числа химических элементов в составе микроорганизмов имеются (по отношению к сухому веществу): азот – 8 - 15%, углерод – 45 - 55%, кислород – 25 - 30%, водород – 6 – 8%, минеральные вещества – 2 - 15% (рисунок 8.2).



Рисунок 8.2 – Химические элементы микробной клетки.

Азот, углерод, кислород и водород принято называть **органогенами**, так как в основном из них состоят органические вещества.

К минеральным веществам относятся **макроэлементы** (сера, фосфор, калий, кальций, магний, железо, кремний, хлор) и **микроэлементы** (марганец, молибден, кобальт, цинк, медь, никель, ванадий, бор). Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, липидов, фосфолипидов. Сера содержится в составе некоторых аминокислот (цистина, цистеина). Магний обеспечивает активность ряда ферментов, например, протеазы. Железо является необходимым элементом для осуществления процессов дыхания и энергетического обмена. Химические элементы образуют в микробных клетках различные органические вещества: белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, витамины и др.

**Белки** представлены простыми белками - **протеинами** и сложными белками – **протеидами**. Простые белки состоят из аминокислот, а сложные белки, кроме протеина, содержат еще небелковую простетическую группу. Простетическая группа может быть представлена жироподобными веществами — липоидами (липопротеиды), нуклеиновыми кислотами (нуклеопротеиды).

#### **Функции белков:**

- структурная (определяют структуру клетки);
- каталитическая (часть белков являются ферментами);
- двигательная (белок флагеллин – белок жгутиков);
- транспортная (белки - переносчики);
- защитная (белки, входящие в состав клеточной стенки);
- резервная (белки, находящиеся в составе запасных веществ).

**Углеводы** (в основном, полисахариды) выполняют энергетическую роль в бактериальной клетке. Углеводы представлены многоатомными спиртами (сорбит, маннит, дульцит); полисахаридами (гликоген, декстрин, целлюлоза), моносахаридами (глюкоза, глюконовая кислота и др.).

**Липиды** - истинные жиры, **липоиды** - жироподобные вещества. Одни бактерии содержат небольшое количество липидов (3-7%), другие бактерии содержат значительное количество липидов (до 40%). Бактериальные липиды состоят из свободных жирных кислот, нейтральных жиров, восков, фосфолипидов.

Высокое содержание липидов обуславливает устойчивость некоторых бактерий (например, микобактерий туберкулеза) к спиртам, щелочам, кислотам.

**Нуклеиновые кислоты** бактерий представлены РНК и ДНК. РНК в основном содержится в рибосомах, ДНК - в нуклеоиде. ДНК является носителем наследственной информации бактерий. Нуклеоид бактерий содержит около 1 тысячи генов. Почти все они кодируют синтез ферментов. Для каждого вида бактерий характерен свой набор ферментов.

## 8.2. Ферменты бактерий и их выявление

Все обменные процессы в бактериальной клетке идут с участием ферментов (энзимов). Ферменты выполняют функцию биокатализаторов. Они представляют собой простые или сложные белки. Принято различать экзоферменты и эндоферменты. **Экзоферменты** выделяются микробной клеткой во внешнюю среду. Часть экзоферментов связана с питанием бактерий, так как они расщепляют питательные вещества до такой формы, которая способна усваиваться микробной клеткой. **Эндоферменты** участвуют в разложении питательных веществ внутри клетки и в превращении их в составные части клетки (рисунок 8.3).



Рисунок 8.3 – Действие экзо- и эндоферментов бактерий.

Одни ферменты синтезируются бактериальной клеткой постоянно (**конститутивные ферменты**), другие ферменты синтезируются только при контакте с определенным субстратом (**индуцибельные ферменты**). В частности, конститутивными ферментами являются ферменты гликолиза – ферменты окисления глюкозы (гексокиназа, глюкозоизомераза, альдолаза и др.). Индуцибельными ферментами являются бета-галактозидаза (катализирует расщепление лактозы на глюкозу и галактозу) и бета-лактамаза (расщепляет бета-лактамы антибиотики).

Все ферменты подразделяются на шесть классов:

- оксидоредуктазы;
- трансферазы;
- гидролазы;



- лиазы;
- изомеразы;
- лигазы (синтетазы).

**Оксидоредуктазы** – это ферменты, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции и встречаются во всех живых клетках. Их основная функция – обеспечение организма энергией в доступной для использования форме. Важнейшими представителями оксидоредуктаз являются дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, гидроксилазы, оксигеназы, каталаза. При идентификации бактерий в основном используют методы выявления каталазы и цитохромоксидазы.

Каталаза разлагает пероксид водорода на воду и молекулярный кислород. Этот фермент выявляют по образованию пузырьков кислорода после смешивания микробной суспензии с 1% раствором перекиси водорода на стекле или после нанесения раствора перекиси водорода на культуру, выросшую на поверхности плотной питательной среды (рисунок 8.4).

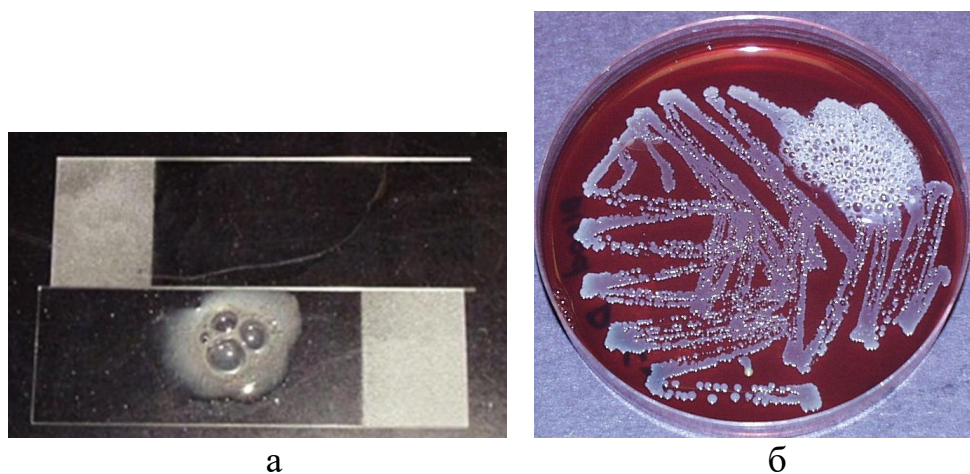


Рисунок 8.4 – Выявление бактериальной каталазы на предметном стекле (а) и на поверхности плотной питательной среды (б).

Цитохромоксидаза окисляет молекулы цитохрома С, восстанавливая кислород. Цитохромоксидазу обнаруживают смачиванием бумажки специальным реактивом (1% спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола; 1% водный раствор N-диметил- $\beta$ -фенилендиамина дигидрохлорида). Нанесение на бумажку капли суточной культуры бактерий приводит к появлению синего окрашивания. Для этих же целей выпускают также специальные слайды (рисунок 8.5).

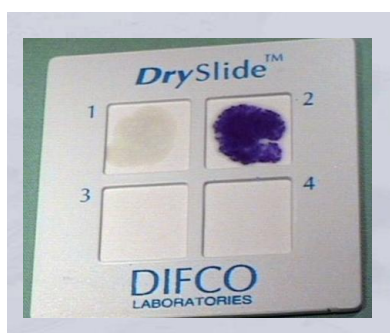


Рисунок 8.5 – Тест на цитохромоксидазу.

**Трансферазы** – ферменты, которые катализируют перенос отдельных радикалов ( $\text{PO}_3$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CN}_3$ ), частей молекул или целых атомных группировок от одних соединений к другим. К трансферазам относятся ацетилтрансфераза, фосфотрансфераза, аминотрансфераза, метилтрансфераза. Эти ферменты в повседневной лабораторной практике не определяют.

**Гидролазы** – ферменты, которые катализируют реакции расщепления и синтеза белков, жиров и углеводов с участием воды. К этому классу ферментов относятся пептидогидролазы или протеазы – ферменты, расщепляющие белки; гидролазы гликозидов или гликозидазы, расщепляющие гликозиды ( $\beta$ -фруктофуранозидаза,  $\alpha$ -глюкозидаза,  $\beta$ -галактозидаза); эстеразы, катализирующие расщепление сложных эфиров (липаза, фосфатаза). При идентификации бактерий в первую очередь изучают ферменты, расщепляющие углеводы и белки. Способность бактерий расщеплять углеводы, называется сахаролитической активностью, а способность расщеплять белки – протеолитической активностью. Эти признаки выявляются по конечным продуктам расщепления субстратов после посева изучаемой культуры на специальные питательные среды. При ферментации сахаров выявляют образование кислоты (молочной, уксусной, муравьиной) или кислоты и газа (углекислого газа, водорода), а при распаде белков – образование щелочей, сероводорода, индола, аммиака.

Для выявления гликозидаз используют жидкие или полужидкие среды Гисса. **Жидкие среды Гисса** представляют собой пептонную воду, содержащую один из углеводов (лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу и т. д.) и индикатор Андресе (кислый фуксин, обесцвеченный щелочью). Для улавливания образующихся газов в пробирку помещают поплавок (микропробирку вверх дном), который при стерилизации заполняется средой. Исходный цвет среды – соломенно-желтый. При расщеплении углевода до кислоты наблюдается только изменение цвета среды на красный, а при образовании еще и газа последний скапливается в поплавке. Если углевод не расщепляется, цвет среды не изменяется (рисунок 8.6).



Рисунок 8.6 – Жидкая среда Гисса: а – исходная среда; б – разложение углевода до кислоты; в – разложение углевода до кислоты и газа.

**Полужидкие среды Гисса** содержат 0,2-0,5% МПА, 1% одного из углеводов и индикатор ВР (вводно-голубая краска и розоловая кислота). Исходный цвет среды – розово-серый. При расщеплении углевода цвет среды становится голубым, а при образовании газа отмечаются разрывы среды или пузырьки газа (рисунок 8.7).

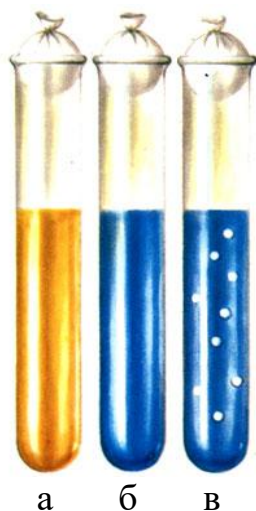


Рисунок 8.7 - Полужидкая среда Гисса: а – исходная среда: б – разложение углевода до кислоты: в – разложение углевода до кислоты и газа.

Каждый вид бактерий ферментирует только определенный спектр углеводов, поэтому в одних пробирках цвет среды меняется, а в других – остается исходным, в результате чего наблюдается “пестрый ряд”. Иными словами, для каждого вида бактерий характерен свой “пестрый ряд”. Это позволяет отличить один вид бактерий от другого.

**Протеазы** бактерий выявляют при посеве чистой культуры на специальные питательные среды (мясо-пептонный желатин - МПЖ, молочный агар, мясо-пептонный бульон – МПБ). Результат оценивают по разжижению желатина, разложению казеина молока вокруг колоний или по конечным продуктам распада белков.

Разные виды бактерий имеют разную форму разжижения желатина: золотистый стафилококк – в виде воронки, холерный вибрион – в виде гвоздя (рисунок 8.8).

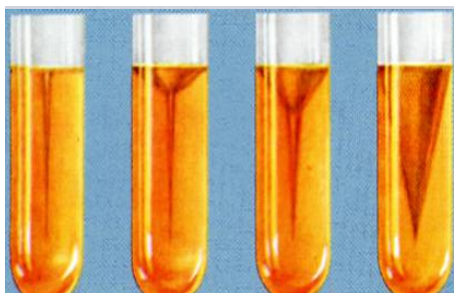


Рисунок 8.8 – Характер разжижения желатина.

Протеолиз казеина проявляется образованием зон просветления вокруг

колоний (рисунок 8.9).



Рисунок 8.9 – Протеолиз казеина.

Конечными продуктами распада белков могут быть индол, сероводород и аммиак. Для обнаружения этих продуктов используют индикаторные бумажки, которые помещают внутрь пробирки между стенкой пробирки и ватно-марлевой пробкой. Индикатором на **индол** (продукт разложения триптофана) является щавелевая кислота. Пропитанная щавелевой кислотой бумажка при наличии индола меняет белый цвет на розовый. В настоящее время тестирование культур на образование индола проводят при помощи реактива Ковача или реактива Эрлиха (рисунок 8.10).

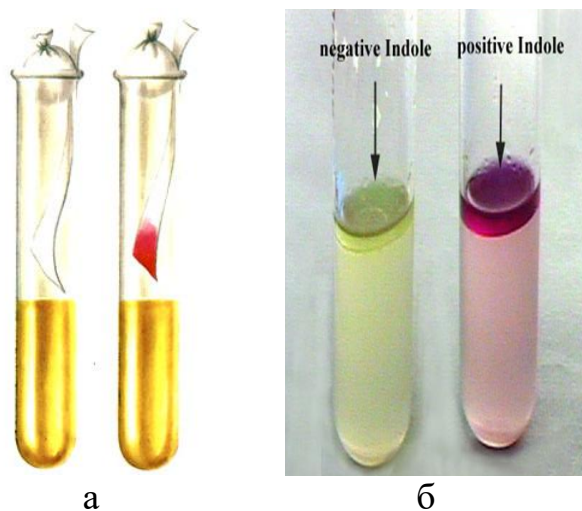


Рисунок 8.10 – Тест на индол с помощью индикаторных полосок (а) и при помощи реактива Ковача (б).

Индикатором на **сероводород** (продукт разложения серосодержащих аминокислот – цистина, цистеина, метионина) является ацетат свинца. При наличии сероводорода белая бумажка приобретает черный цвет за счет образования сульфида свинца (рисунок 8.11).

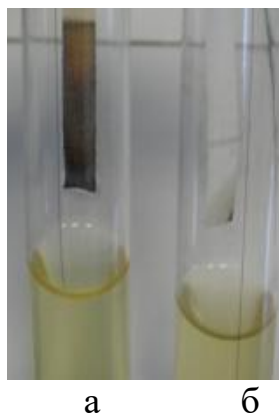


Рисунок 8.11 – Тест на сероводород: а – положительный тест; б – контроль.

Выявление сероводорода у представителей семейства энтеробактерий проводят на дифференциально-диагностических средах Клиглера или Олькеницкого. Положительный результат проявляется образованием преципитата черного цвета в результате восстановления сульфатов в сульфиты (рисунок 8.12).



Рисунок 8.12 – Рост энтеробактерий на средах Клиглера (а) и Олькеницкого (б). Черный цвет среды указывает на образование сероводорода.

Индикатором на **аммиак** (продукт разложения фенилаланина) является лакмусовая полоска бумаги. При наличии аммиака красная лакмусовая бумажка приобретает синий цвет.

**Лиазы** – это ферменты, которые катализируют отщепление от субстратов определенных химических групп с образованием двойных связей или присоединение отдельных групп (например, аминогрупп, альдегидных групп) по месту двойных связей без участия воды (декарбоксилазы, дезаминазы). В частности, выявление декарбоксилаз проводится на питательных средах с добавлением соответствующей аминокислоты (например, лизиндекарбоксилазу определяют на среде с лизином).

**Изомеразы** – это ферменты, производящие глубокие внутримолекулярные перестройки, то есть превращение органических соединений в их изомеры (изомеразы, трансферазы, топоизомеразы). В лабораторной практике эти ферменты не выявляют.

**Лигазы (синтетазы)** – это ферменты, которые катализируют синтез сложных органических веществ (сшивание, лигирование) из простых соединений с одновременным разрывом фосфатных связей (аспарагинсинтетаза, кокарбоксилазы).

У патогенных бактерий часть экзоферментов называется **ферментами агрессии**. Эти экзоферменты способствуют проникновению и распространению

бактерий в тканях макроорганизма, а также ослабляют его защитные силы. К ферментам агрессии относятся гиалуронидаза, коллагеназа, лецитиназа, ДНКаза, лейкоцидин, гемолизин, плазмокоагулаза, фибринолизин, нейраминидаза, протеаза и др.

В лабораторных условиях определяют такие ферменты патогенности бактерий как гемолизин, лецитиназу, ДНКазу, плазмокоагулазу и фибринолизин.

**Гемолизин** вызывает гемолиз эритроцитов. Присутствие гемолизина можно установить на кровяном агаре по образованию зоны просветления (зоны гемолиза) вокруг колоний (рисунок 8.13).

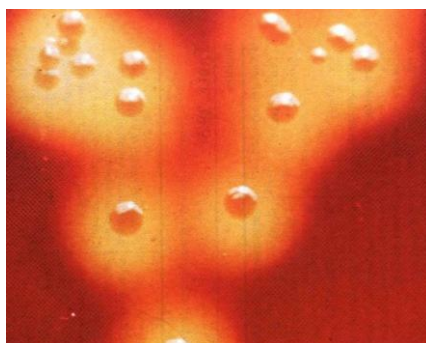


Рисунок 8.13 – Гемолиз эритроцитов на кровяном агаре.

**Лецитиназа** расщепляет лецитины на фосфохолины и нерастворимые в воде диглицериды. На желточном агаре действие этого фермента проявляется в виде опалесцирующей зоны (радужного венчика) вокруг колоний (рисунок 8.14).



Рисунок 8.14 – Выявление лецитиназы на желточном агаре.

**ДНКаза** катализирует гидролитическое расщепление полинуклеотидной цепи ДНК с образованием отдельных нуклеотидов и олигонуклеотидов. Для выявления ДНК-азы используют агар, содержащий водный раствор ДНК и раствор кальция хлорида. После выращивания культуры на чашки наносят раствор соляной кислоты. Положительная реакция проявляется прозрачной зоной деполимеризованной ДНК вокруг колоний на мутном фоне, образованном в результате взаимодействия ДНК с соляной кислотой (рисунок 8.15).

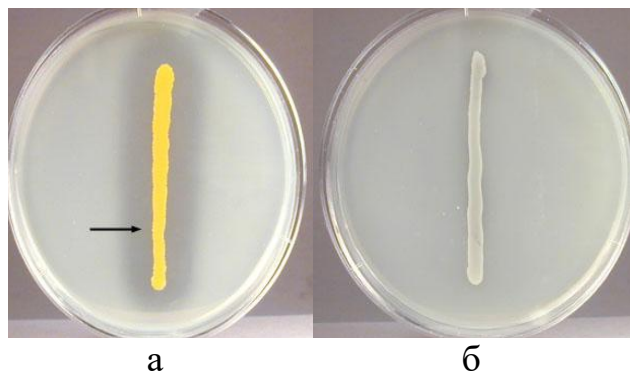


Рисунок 8.15 – Выявление ДНКазы стафилококков: а – положительная реакция, б – отрицательная реакция..

**Плазмокоагулаза** вызывает коагуляцию плазмы крови (образование сгустка). **Фибринолизин** лизирует фибриновые сгустки. Присутствие плазмокоагулазы и фибринолизина определяется с помощью одного теста. В пробирку с плазмой вносят исследуемую культуру. При наличии плазмокоагулазы через 3-4 часа при комнатной температуре образуется сгусток. При дальнейшем культивировании при температуре 36<sup>0</sup>С в случае синтеза фибринолизина сгусток разжижается (рисунок 8.16).

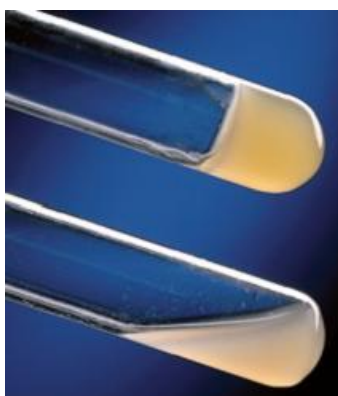


Рисунок 8.16 – Коагуляция плазмы крови (верхняя пробирка) и разжижение сгустка (нижняя пробирка).

Такие ферменты патогенности как нейраминидаза, гиалуронидаза, коллагеназа в лабораторных условиях в повседневной практике не определяются.

### 8.3. Механизмы транспорта веществ внутрь бактериальной клетки

Поступление питательных веществ внутрь бактериальной клетки происходит разными способами. Различают следующие типы переноса питательных веществ из внешней среды в бактериальную клетку:

1. Пассивный перенос (по градиенту концентрации без затрат энергии):
  - простая диффузия;
  - облегченная диффузия.
2. Активный перенос (против градиента концентрации с затратой энергии с помощью пермеаз):

- активный транспорт;
- транслокация радикалов.

**Простая диффузия** (осмос) – это поступление питательных веществ из окружающей среды через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану в результате разницы концентраций питательных веществ в теле бактериальной клетки и в питательной среде (по градиенту концентрации). При этом концентрация вещества вне клетки выше, чем внутри клетки. Переносимое вещество не взаимодействует с компонентами клеточной мембраны. Процесс осуществляется без затрат энергии. Посредством пассивной диффузии в клетку поступают газы, вода и некоторые ионы, например, ионы натрия (рисунок 8.17).

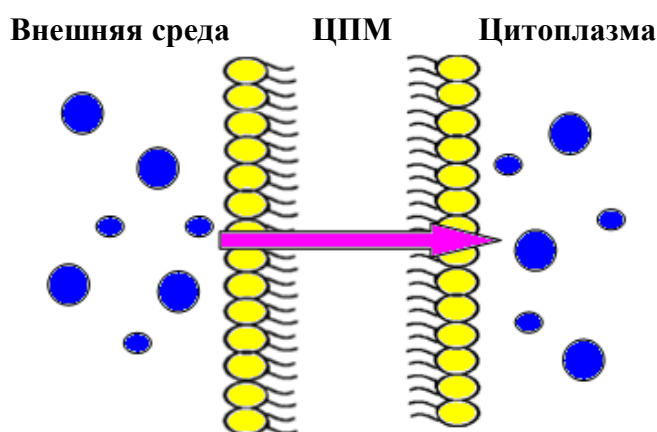


Рисунок 8.17 – Схема простой диффузии.

**Облегченная диффузия** – это транспорт веществ через клеточную мембрану с помощью белка-переносчика (паромщика) - **транслоказы**. При этом концентрация вещества в среде превышает его концентрацию в клетке, то есть перенос осуществляется по градиенту концентрации. Процесс идет без затрат энергии. Для микробов примером облегченной диффузии является перенос глицерина (рисунок 8.18).

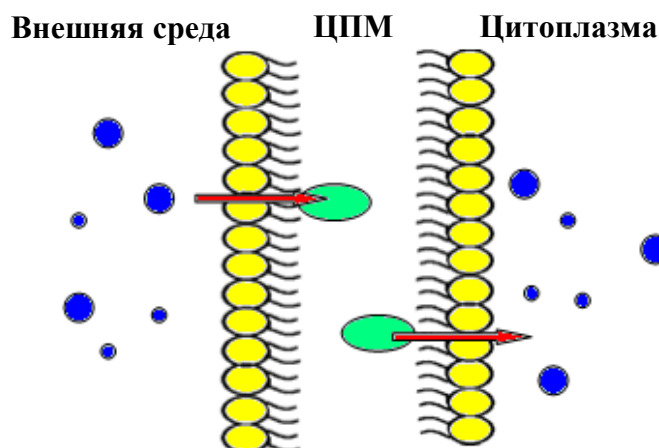


Рисунок 8.18 – Схема облегченной диффузии.



**Активный транспорт** осуществляется также с помощью белков-переносчиков – **пермеаз** (лат. *permeo* – прохожу, проникаю), но с затратой энергии. Энергия необходима для модификации белка-переносчика на внутренней стороне мембраны. Активный транспорт направлен против градиента концентрации и позволяет создать значительную концентрацию вещества внутри клетки при его небольшом количестве в питательной среде. Пермеаза на внешней стороне цитоплазматической мембраны связывается специфически с молекулой субстрата и с помощью АТФ транспортирует ее к внутренней стороне мембраны. На внутренней поверхности мембраны пермеаза высвобождает субстрат в цитоплазму. С помощью активного транспорта в бактериальную клетку поступает основное количество питательных веществ в виде небольших молекул - аминокислоты, некоторые сахара, органические кислоты (рисунок 8.19).

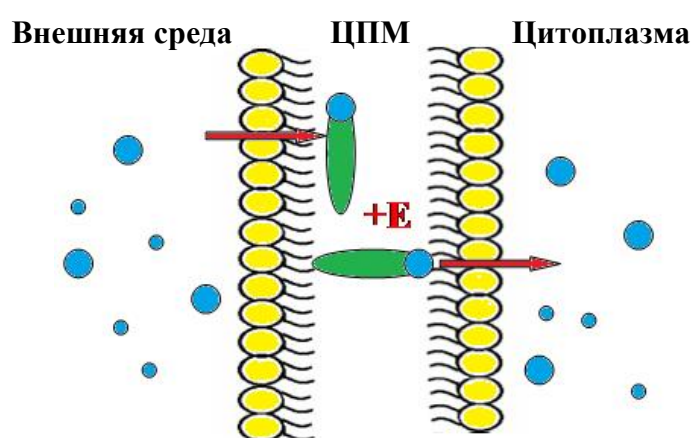


Рисунок 8.19 – Схема активного транспорта.

**Транслокация радикалов** также осуществляется с помощью пермеаз и с затратой энергии. При этом в процессе переноса происходит химическая модификация переносимого вещества. Этим способом переносятся пурины, пиримидины, некоторые сахара (рисунок 8.20).

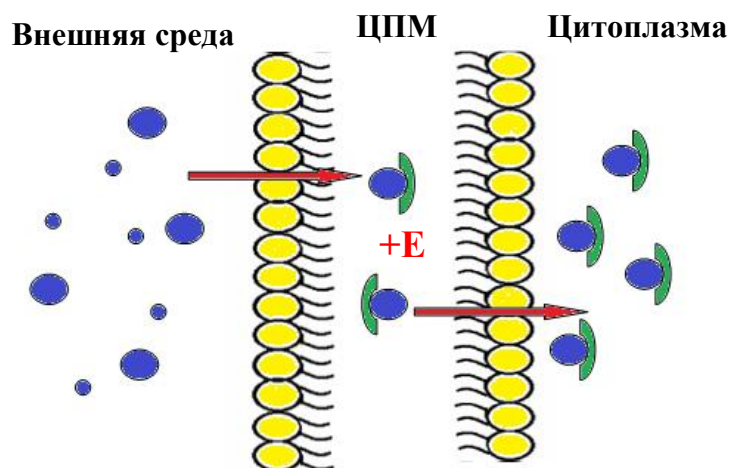


Рисунок 8.20 – Схема транслокации радикалов.

Таким образом, разные питательные вещества транспортируются в бактериальную клетку либо по градиенту концентрации, либо против градиента концентрации, либо с затратой энергии, либо без затрат энергии. Поступив в клетку, питательные вещества вступают в биохимические реакции, в результате которых образуются как источники энергии, так и структурные компоненты клетки.

#### 8.4. Метаболизм бактерий

В микробной клетке постоянно протекают реакции, обеспечивающие ее жизнедеятельность. При этом из мономеров формируются клеточные полимерные структуры. Мономеры поступают в клетку в готовом виде из внешней среды или синтезируются самой клеткой. Эти реакции катализируются ферментами. Обмен веществ бактериальной клетки с окружающей средой и превращение одних веществ в другие внутри микробной клетки под влиянием ферментов называется **метаболизмом**. Следовательно, метаболизм - это направленное преобразование веществ внутри клетки. При этом в клетке происходят последовательные ферментативные реакции разрушения и синтеза биомолекул. Промежуточные или конечные вещества, образующиеся в результате этих реакций, называются **метаболитами**. Метаболизм бактерий включает питание, получение энергии, рост и размножение бактерий, а также их взаимодействие с окружающей средой.

В обмене веществ выделяют два процесса, протекающих одновременно: катаболизм и анаболизм. Взаимосвязь процессов катаболизма и анаболизма в микробной клетке представлена на рисунке 8.21.

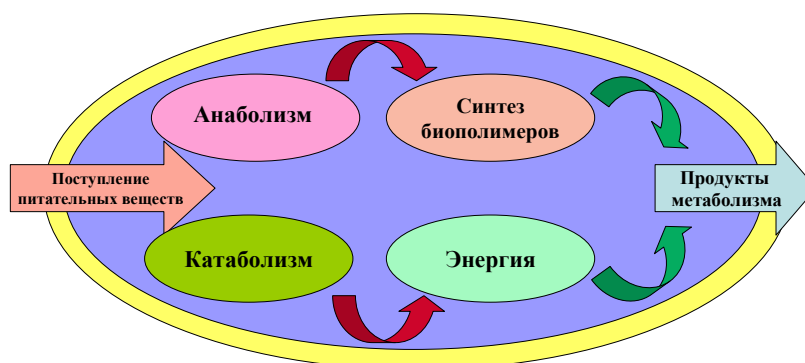


Рисунок 8.21 – Взаимосвязь процессов катаболизма и анаболизма.

**Катаболизм** – это энергетический метаболизм, процесс расщепления, разложения, распада питательных веществ на составляющие фрагменты. Этот процесс характеризуется выделением свободной энергии и расходом огромной массы питательного субстрата. Энергия в бактериальной клетке накапливается в форме молекул АТФ. Примером катаболизма является превращение глюкозы до углекислого газа и воды.

**Анаболизм** – это конструктивный (пластический) метаболизм, характеризующийся синтезом макромолекул и образованием структурных элементов бактериальной клетки. Анаболизм протекает с поглощением энергии при

расходе небольшого объема питательных веществ. Синтез белков происходит из аминокислот, синтез нуклеиновых кислот – из пуриновых и пиримидиновых оснований, синтез липидов – из глицерина и жирных кислот, синтез полисахаридов – из моносахаров.

Таким образом, попавшие внутрь клетки питательные вещества в результате серии последовательных биохимических реакций под действием эндоферментов превращаются в низкомолекулярные соединения (катаболизм) или в сложные компоненты клеток (анаболизм). Схема обмена веществ у бактерий представлена на рисунке 8.22.

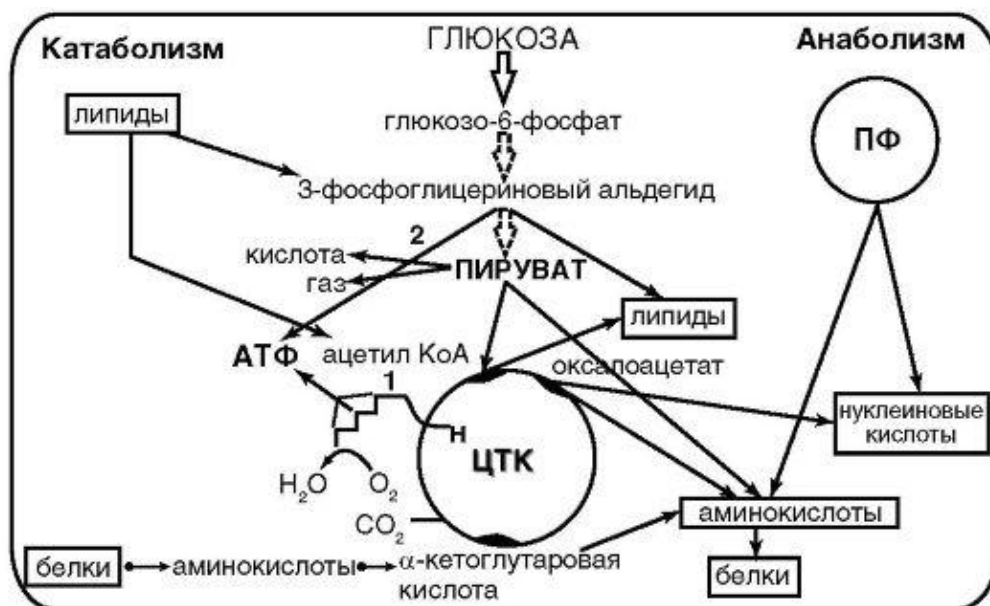


Рисунок 8.22 – Схема обмена веществ у бактерий.

**По типу питания все живые организмы подразделяются на две группы:**

- **организмы, имеющие голозойный тип питания** (характерен для животных, имеющих органы для принятия пищи, ее переваривания и выведения);
- **организмы, имеющие голофитный тип питания** (характерен для микробов, не имеющих органов для принятия пищи). Питательные вещества у них проникают через всю поверхность тела. При помощи гидролитических экзоферментов они осуществляют внешнее переваривание, то есть расщепляют белки, жиры и углеводы до простых молекул, которые поступают внутрь клетки и подвергаются в дальнейшем при необходимости воздействию эндоферментов. Есть микроорганизмы, способные утилизировать некоторые элементы в газообразном состоянии или из неорганических соединений.

Для разных бактерий присущи свои способы усвоения химических соединений и свои источники энергии. Самым необходимым химическим элементом для бактерий является углерод, поскольку он служит каркасом биомолекул (белков, углеводов, жирных кислот). **По источнику углерода** бактерии подразделяются на 2 группы:

- **аутоотрофы** (греч. *autos* – сам, *trophe* - питание) - микроорганизмы, усваивающие углерод из неорганических соединений (углекислоты воздуха или карбонатов);

- **гетеротрофы** (греч. *heteros* – другой, *trophe* – питание) - микроорганизмы, использующие углерод органических соединений.

Автотрофы, использующие для синтеза органических веществ энергию видимого света и инфракрасных лучей, называются **фототрофами** (фотосинтезирующими бактериями). Автотрофы, использующие для биосинтетических целей энергию, заключенную в химических связях неорганических веществ, называются **хемотрофами** (хемосинтезирующими бактериями).

Гетеротрофы в зависимости от субстрата подразделяются на 2 подгруппы:

- **сапрофиты** (греч. *sapros* – гнилой, *phyton* – растение) – микроорганизмы, живущие за счет использования углерода мертвых субстратов;

- **паразиты** (греч. *parasites* – нахлебник) – микроорганизмы, живущие на поверхности или внутри организма хозяина и питающиеся за его счет.

Таким образом по типу питания бактерии можно подразделить на группы (рисунок 8.23).

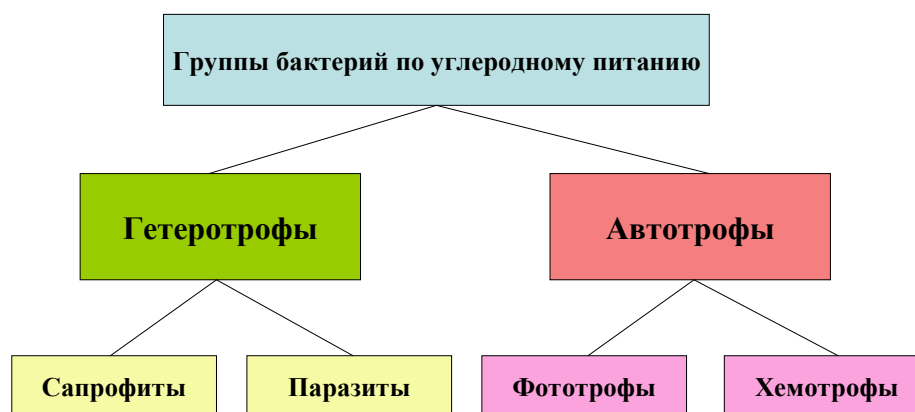


Рисунок 8.23 – Распределение бактерий по источнику углерода.

Гетеротрофные бактерии, способные расти на питательных средах, в состав которых входит одно органическое вещество в качестве источника углерода, а остальные химические элементы содержатся в составе неорганических соединений, называются **прототрофами**.

Бактерии, для роста и размножения которых требуются дополнительные органические вещества, называются **ауксотрофами**. Такие дополнительные органические вещества называются факторами роста. К **факторам роста** относятся аминокислоты, витамины, пурины, пиримидины, пентозы, гексозы, липиды.

Микробы, способные размножаться только в живых клетках организма (например, вирусы, риккетсии), называются **абсолютными внутриклеточными паразитами**. Микроорганизмы, способные длительно переживать и размножаться в клетках хозяина и на искусственных питательных средах (например пастереллы, листерии, иерсинии и др.), называются **факультативными внутриклеточными паразитами**. Некоторые микробы (например хламидии) обладают “энергетическим” паразитизмом. Они имеют собственный метаболизм, но зависят от энергетического обмена клеток хозяина.

В качестве источника углерода бактерии чаще всего используют углеводы,

спирты, различные органические кислоты. Наиболее полноценными источниками углерода для питания микробов являются сахара (особенно гексозы) и многоатомные спирты (глицерин, маннит, сорбит и др.). Эти соединения включают в искусственные питательные среды для выращивания микроорганизмов.

**По способу усвоения азотистых веществ** микробы подразделяются на 4 группы:

- **протеолитические** - микробы, способные расщеплять нативные белки, пептиды и аминокислоты;
- **дезаминирующие** - микробы, способные отщеплять аминогруппы только у свободных аминокислот;
- **нитритно-нитратные** - микробы, усваивающие окисленные формы азота;
- **азотфиксирующие** микробы, обладающие свойством питаться атмосферным азотом.

Основным источником азота у микроорганизмов - автотрофов являются неорганические соединения азота, а у гетеротрофных микроорганизмов - аминокислоты, которые они получают из белков животного организма или из питательных сред.

Необходимые для жизни минеральные вещества микроорганизмы получают из естественной питательной среды. Серу бактерии получают из сульфатов или из некоторых аминокислот (цистин, цистеин). Фосфор входит в состав фосфорнокислых солей. Калий, магний и железо микроорганизмы также получают из различных солей.

Для восполнения биомассы бактериальной клетке требуется источник энергии. Бактериальная клетка запасает энергию в форме молекул АТФ. **По источнику энергии** микроорганизмы подразделяются на следующие группы:

- **фототрофы** – источником энергии является свет;
- **хемотрофы** – получают энергию за счет окислительно-восстановительных реакций. Среди хемотрофов выделяют литотрофы и органотрофы. **Литотрофы** в качестве доноров электронов используют неорганические вещества, а **органотрофы** в качестве доноров электронов используют органические соединения.

**По источникам углерода и энергии** выделяют следующие группы микроорганизмов:

- **фотоавтотрофы** – источником энергии является – свет, а источником углерода – углекислый газ. К этой группе относятся высшие растения, водоросли, многие фотосинтезирующие бактерии;
- **фотогетеротрофы** – источник энергии - свет, источник углерода – органическое вещество (пурпурные и зеленые бактерии);
- **хемоавтотрофы** – источник энергии – химическое вещество, источник углерода – углекислый газ (бактерии);
- **хемогетеротрофы** – источник энергии – химическое вещество, источник углерода – органическое вещество (простейшие, грибы, бактерии).

#### 8.4.1. Энергетический метаболизм бактерий

Для обеспечения жизнедеятельности бактериальной клетке необходима энергия. Энергия в бактериальной клетке накапливается в форме молекул АТФ.

Синтез АТФ у бактерий может происходить в результате следующих процессов:

- дыхание (окислительный метаболизм);
- брожение (ферментативный или бродильный метаболизм);
- смешанный метаболизм.

Схемы окислительного и бродильного механизмов представлены на рисунке

8.24.

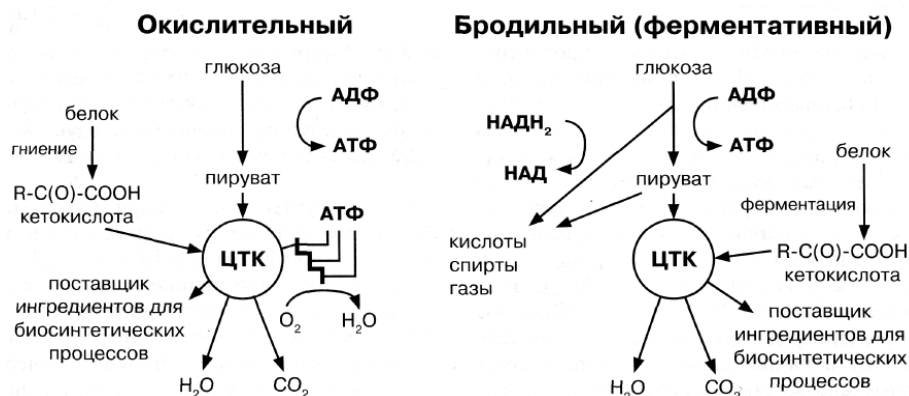
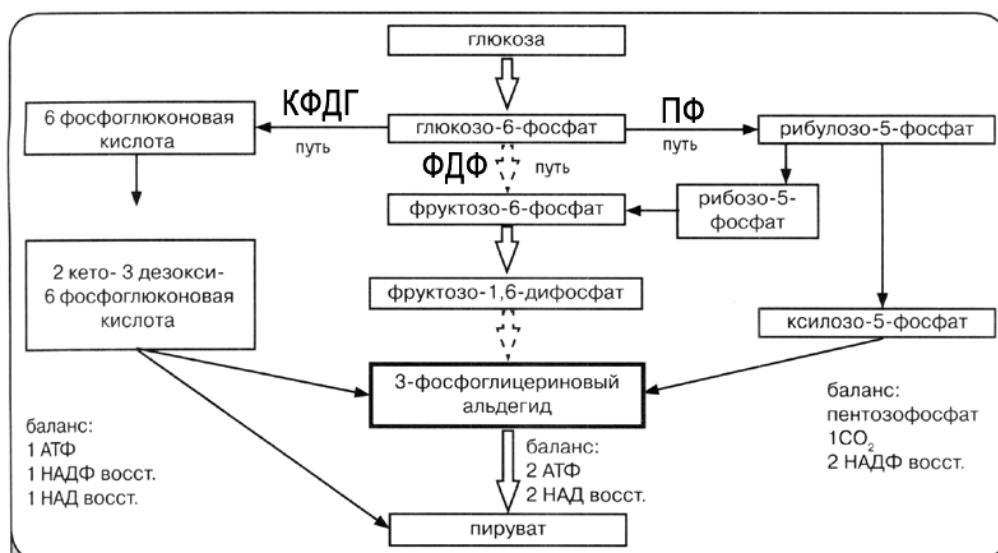


Рисунок 8.24 – Типы метаболизма у бактерий в зависимости от способа получения энергии.

Тип метаболизма обусловлен реакциями образования АТФ, конечными продуктами этих реакций и условиями культивирования микроорганизмов. Процессы энергетического обмена у бактерий связаны в основном с расщеплением глюкозы. Начальной стадией окисления глюкозы является гликолиз, характерный как для аэробных, так и для анаэробных бактерий.

У бактерий выделяют следующие пути окисления глюкозы (рисунок 8.25):

- **ФДФ-путь** (фруктозо-1,6-дифосфат) - гликолиз с образованием из глюкозы пирувата, пиридиннуклеотидов и АТФ;
- **КДФГ-путь** (2-кето-3-дезоксиглюконовая кислота) – образование из глюкозы пирувата, НАДФН и АТФ;
- **ПФ-путь** (пентозо-фосфат) – образование из глюкозы пентоз, пирувата, пиридиннуклеотидов и АТФ.



### Рисунок 8.25 – Пути расщепления глюкозы у бактерий.

**Дыхание** – это метаболический процесс получения энергии в реакциях окисления – восстановления путем последовательного переноса электронов от одного соединения к другому до конечного акцептора. Таким образом, образование АТФ при дыхании происходит в результате транспорта электронов. Процесс переноса электронов происходит в цитоплазматической мембране или во внутриклеточных мембранных структурах. Этот процесс протекает с участием сложной мультиферментной системы, которая называется **дыхательной цепью**. Доноры электронов при этом окисляются, отдавая электроны, а акцепторы – восстанавливаются, принимая электроны. Донорами электронов в процессах дыхания могут быть как органические соединения (у органотрофов), так и неорганические вещества (у литотрофов). Конечным акцептором электронов при дыхании служат либо молекулярный кислород (аэробное дыхание), либо неорганические соединения (анаэробное дыхание). Выделяющаяся при этом энергия запасается в молекулах АТФ. Органические соединения обычно полностью окисляются до углекислого газа. Таким образом, дыхание бактерий – это цепь биохимических окислительно-восстановительных реакций, в ходе которых образуется АТФ.

Если конечным акцептором электронов при дыхании служит молекулярный кислород, то такой тип дыхания называется **аэробным**. При аэробном типе дыхания реакции расщепления сложных соединений происходят в присутствии кислорода. Размножение аэробных бактерий также происходит в присутствии кислорода.

Если акцептором электронов при дыхании служат неорганические соединения (сульфаты, нитраты, карбонаты), то такой тип дыхания называется **анаэробным**. При анаэробном типе дыхания реакции расщепления сложных соединений происходят в бескислородных условиях. Размножение аэробных бактерий также протекает при отсутствии кислорода.

**По типу дыхания** бактерии подразделяются на несколько групп.

**Облигатные (строгие) аэробы** растут и размножаются только при свободном доступе кислорода (например, микобактерии туберкулеза); они требуют для своего развития присутствия в среде культивирования не менее 20% кислорода. Кислород для облигатных аэробов является конечным акцептором электронов.

**Микроаэрофильные бактерии (микроаэрофилы)** развиваются при низкой (до 1%) концентрации кислорода в окружающей атмосфере (например, лептоспиры, бруцеллы).

**Факультативные анаэробы** развиваются как при доступе кислорода воздуха, так и при его отсутствии (энтеробактерии). Они обладают смешанным типом метаболизма: в присутствии кислорода энергия у них запасается в результате дыхания, а при отсутствии кислорода процесс получения энергии переключается на брожение.

**Облигатные анаэробы** растут и размножаются только в бескислородных условиях (возбудитель ботулизма). Тип метаболизма у них бродильный.

**Аэротолерантные микроорганизмы** не используют кислород для получения энергии, но могут развиваться в его атмосфере (например, молочнокислые бактерии).

Различное отношение микроорганизмов к кислороду связано с наличием у

них различных ферментных систем, в частности, супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы, которые участвуют в нейтрализации токсичных перекисных соединений.

**Брожение** – это процесс получения энергии, при котором донорами и акцепторами электронов служат органические соединения (углеводы, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания и др.). При брожении конечный акцептор водорода образуется за счет самого субстрата. Например, при брожении глюкозы ее молекула, состоящая из 6 атомов углерода, вначале фосфорилируется, а затем расщепляется на две молекулы по 3 атома углерода. Одна из этих молекул после отщепления фосфора в конечном счете превращается в молекулу пировиноградной кислоты. Восстановление пировиноградной кислоты сопровождается образованием молекулы молочной кислоты.

Продуктами брожения являются органические кислоты, спирты, газы. Эти восстановленные конечные органические соединения выделяются в питательную среду и накапливаются в ней. В зависимости от природы конечных продуктов различают спиртовое, молочнокислое, муравьинокислое, маслянокислое брожение. Получение энергии путем брожения наблюдается у облигатных и факультативных анаэробов в бескислородной среде.

**Спиртовое брожение** характерно в основном для дрожжей и некоторых видов бактерий. Конечными продуктами спиртового брожения являются этиловый спирт и углекислый газ. Из одной молекулы глюкозы получается две молекулы этанола и две молекулы углекислого газа. Этот вид брожения используется в виноделии, хлебопекарной промышленности.

**Молочнокислое брожение** наблюдается у лактобацилл, бифидобактерий, стрептококков. Конечными продуктами молочнокислого брожения являются молочная кислота, уксусная кислота, этиловый спирт. Этот вид брожения используется при получении молочнокислых продуктов питания.

**Муравьинокислое брожение** характерно для энтеробактерий и вибрионов. Конечными продуктами этого вида брожения являются муравьиная, янтарная, молочная кислота, ацетоин.

**Маслянокислое брожение** характерно для строгих анаэробов (в частности, клостридий). При этом продуктами сбраживания углеводов являются масляная, уксусная, капроновая и другие органические кислоты, бутанол, ацетон, изопропанол и другие соединения.

Таким образом, образование АТФ у аэробных и анаэробных бактерий протекает разными путями (рисунок 8.26).



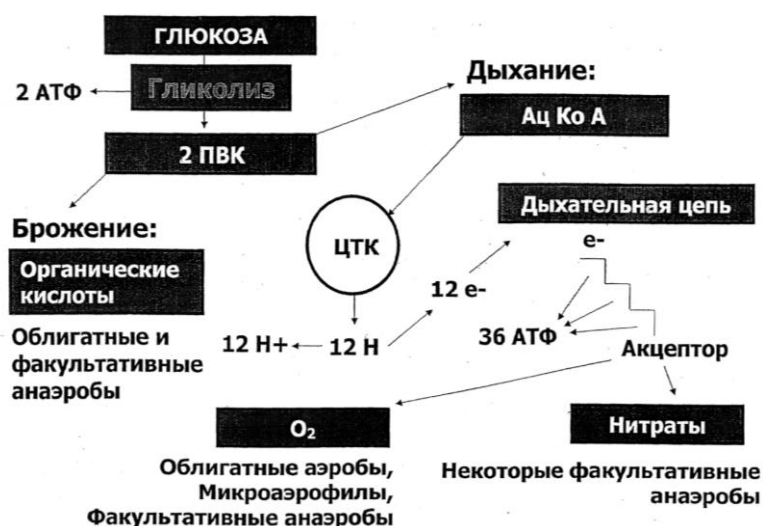


Рисунок 8.26 – Образование АТФ у аэробов и анаэробов.

Образующаяся в клетке энергия в последующем расходуется в процессе роста и размножения микроорганизмов.

#### 8.4.2. Конструктивный метаболизм бактерий

Основные компоненты клетки синтезируются из аминокислот, фосфатов, пуриновых и пиримидиновых оснований, органических кислот. Поставщиками этих веществ являются в том числе и промежуточные продукты энергетического метаболизма.

Выше было сказано, что среди бактерий выделяют **прототрофы**, которые способны синтезировать все компоненты клетки из одного источника углерода и энергии. В случае, когда бактерии теряют способность синтезировать какой-либо фермент, участвующий в биосинтетических реакциях, то для их роста и размножения требуется недостающее вещество, которое называется **фактором роста**. Такие бактерии называются **ауксотрофами**. Факторами роста могут быть аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины.

**Биосинтез белков.** В процессе катаболизма бактерии разлагают белки под действием протеаз с образованием пептидов. В последующем под действием пептидаз пептиды разрушаются до аминокислот. В результате распада аминокислот клетка получает ионы аммония, которые требуются для синтеза собственных аминокислот. Большинство бактерий обладает способностью синтезировать все 20 аминокислот, из которых состоят белки. Белки в бактериальной клетке выполняют ферментативную функцию, а также являются составной частью структурных компонентов клетки (ЦПМ, ее производных, клеточной стенки, жгутиков, капсулы, спор).

Углеродные скелеты аминокислот образуются из промежуточных продуктов обмена. Исходным материалом служат промежуточные продукты фруктозофосфатного (ФДФ) и пентозофосфатного (ПФ) путей, цикл трикарбоновых кислот: пируват, кетоглутаровая кислота, оксалоацетат, фумарат,

эритрозо-4-фосфат, рибозо-4-фосфат. Аминогруппы в состав аминокислот вводятся в результате непосредственного аминирования или переаминирования. Перевод неорганического азота в органические соединения происходит всегда через аммиак. Нитраты, нитриты и молекулярный азот предварительно восстанавливаются в аммиак и только лишь после этого включаются в состав органических соединений.

В результате прямого аминирования образуются лишь L-аланин, L-аспартат, L-глутамат и L-глутамин. Все остальные аминокислоты получают свою аминогруппу в результате переаминирования, с одной из “первичных” аминокислот. В большинстве случаев аминогруппа вводится на последнем этапе синтеза путем переаминирования.

**Биосинтез нуклеотидов.** Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды – это те строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кроме того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав многих коферментов и служат для активации и переноса аминокислот, сахаров, липидов в реакциях полимеризации.

Исходным соединением для образования пентозной части нуклеотидов служит рибозо-5-фосфат, образующийся в ПФ-пути. Углеродный скелет пиримидинов происходит из аспартата, который образуется в цикле трикарбоновых кислот. Атомы азота и аминогруппы пуринов и аминосодержащих пиримидинов происходят из аспартата и глутамина.

**Биосинтез липидов.** Жиры или липиды являются важными компонентами ЦПМ и клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также служат запасными веществами. В бактериальных жирах преобладают длинноцепочечные (C14- - C18) насыщенные жирные кислоты и ненасыщенные жирные кислоты, содержащие одну двойную связь. Сложные липиды представлены фосфатидилинозитом, фосфатидилглицерином и фосфатидилэтанололамином.

Ключевым промежуточным продуктом для биосинтеза жирных кислот является ацетил-коэнзим А. Ключевыми промежуточными продуктами для синтеза фосфолипидов является продукт ФДФ-пути: диоксиацетилфосфат, восстанавливающийся в глицеро-3-фосфат, который соединяется с остатками жирных кислот.

**Биосинтез углеводов.** Углеводы представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди- и полисахаридов, а также комплексных соединений. Полисахариды входят в состав некоторых капсул, крахмал и гликоген являются запасными питательными веществами.

Синтез глюкозы происходит из пирувата, за счет обратных реакций, путей распада глюкозы. Для обхода реакций, идущих только в одном направлении, имеются обходные пути, например, глиоксилатный цикл.

## 8.5. Транспорт веществ из бактериальной клетки

Для обеспечения жизнедеятельности бактерии должны не только поглощать из внешней среды питательные вещества, но и выделять в окружающую среду гидролитические ферменты, токсины и другие соединения (метаболиты).

У грамположительных микробов белки секретируются непосредственно во

внешнюю среду. У грамотрицательных бактерий секретлируемые соединения должны транспортироваться через две мембраны клеточной оболочки. Наличие наружной мембраны привело к тому, что у грамотрицательных бактерий в процессе эволюции сформировалось несколько систем секреции, различающихся по структуре и функциям. В настоящее время у бактерий выявлено 7 систем секреции.

Белки, секретлируемые по I пути (**система секреции I типа, T1SS**), пересекают внутреннюю цитоплазматическую и наружную мембраны в один этап в результате образования во внутренней мембране, периплазматическом пространстве и наружной мембране одной поры (канала). Эта система секреции включает 3 компонента: АТФ-связывающую кассету (ABC-компонент, ATP-binding cassette), белки, соединяющие мембраны (MFP, membrane fusion protein) и белки наружной мембраны (OMP, outer membrane protein). Секреция в этом случае протекает без участия *sec*-белков (рисунок 8.27).

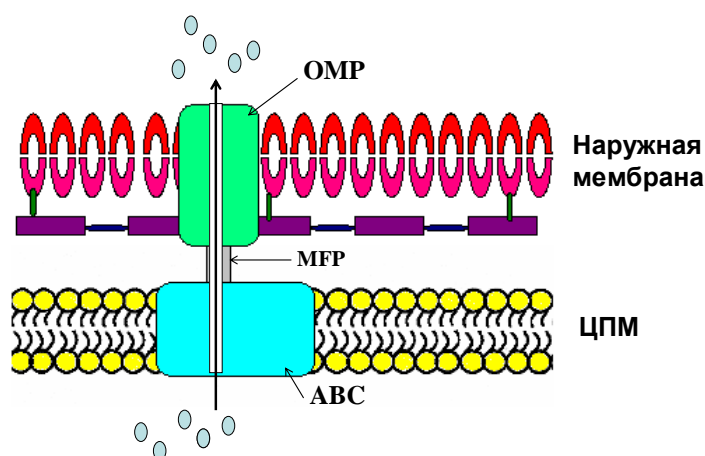


Рисунок 8.27 – Бактериальная система секреции I типа.

Этим путем секретлируются пороформирующие токсины: гемолизины, металлопротеазы, некоторые гидролитические ферменты, внеклеточная аденилатциклаза *B. pertussis*.

**Система секреции II типа (T2SS)** обеспечивает секрецию гидролитических ферментов, некоторых токсинов, протеинов, участвующих в формировании поверхностных структур бактериальной клетки (в частности, пилей). Эта система секреции широко представлена среди грамотрицательных бактерий, в связи с чем ее называют общим секреторным путем (GSP – general secretory pathway). Белки, секретлируемые по II пути, проходят через внутреннюю и наружную мембраны отдельными этапами при участии *sec*-белков. После транслокации через внутреннюю мембрану секретлируемые белки задерживаются в периплазматическом пространстве, где изменяют свою конформацию. В результате таких изменений секретлируемый белок приобретает окончательную структуру и транспортируется через наружную мембрану (рисунок 8.28).

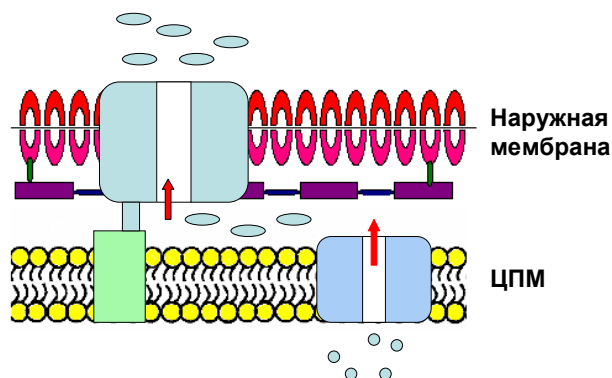


Рисунок 8.28 - Бактериальная система секреции II типа.

По II типу из бактериальных клеток выделяется холерный токсин, фосфолипаза С, эластаза, экзотоксин А и другие факторы патогенности *P. aeruginosa*.

**Система секреции III типа (Т3SS)** грамотрицательных бактерий в основном предназначена для транспорта из клетки компонентов жгутиков. Этот путь используется также для направленной доставки в клетку хозяина бактериальных белков - эффекторов. В результате действия этих белков нарушаются функции клетки хозяина. Система секреции III типа представляет собой шприцеподобную структуру (инъектисому), состоящую из нескольких белков и способную инъецировать эффекторные белковые молекулы непосредственно в цитозоль клетки хозяина (рисунок 8.29).

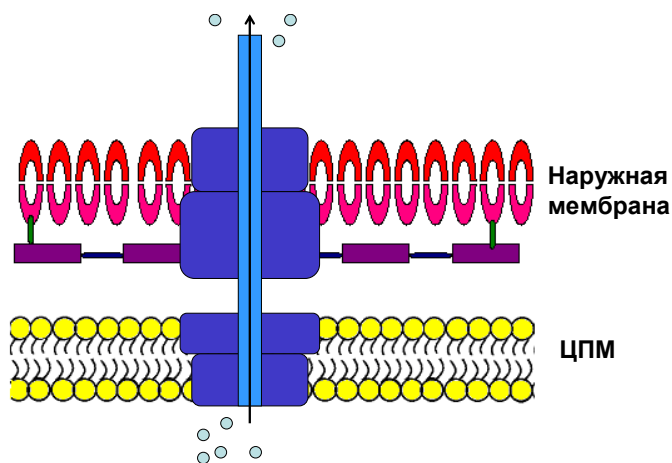


Рисунок 8.29 - Бактериальная система секреции III типа.

Эффекторные белки вызывают реорганизацию цитоскелета клетки хозяина, в результате чего бактерии проникают в клетку. Система секреции III типа обнаружена у *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *P. aeruginosa*, *Chlamydia*, некоторых энтеропатогенных *E. coli*, других бактерий. Т3SS вносит существенный вклад в развитие патогенеза заболевания. Строение системы секреции III типа сальмонелл, полученное с помощью электронного микроскопа, представлено на рисунке 8.30.

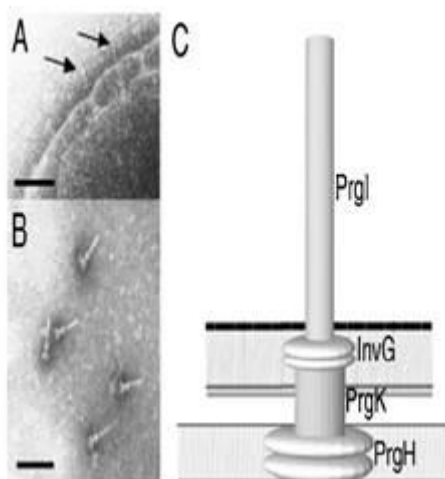


Рисунок 8.30 - Строение системы секреции III типа. А – электронная микрофотография зоны контакта бактериальной клетки и клетки хозяина; В – инъектисомы в свободном состоянии; С – схема строения инъектисомы сальмонелл (обозначены белки, формирующие аппарат секреции).

Белки, секретируемые по системе III типа, пересекают внутреннюю цитоплазматическую и наружные мембраны в один этап без участия *sec*-белков.

**Система секреции IV типа (T4SS)** Белки, секретируемые по IV пути, проходят через внутреннюю и наружную мембрану отдельными этапами при участии *sec*-белков (рисунок 8.31).

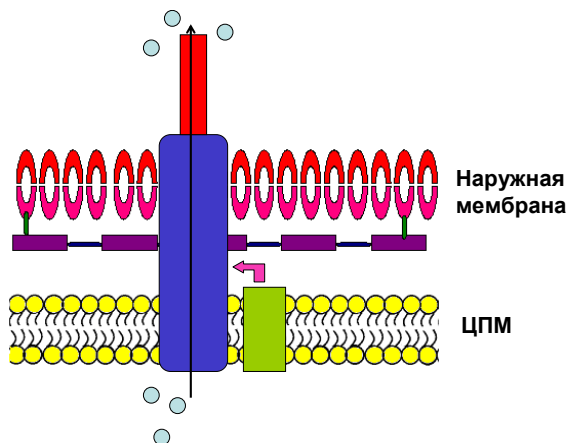


Рисунок 8.31 - Бактериальная система секреции IV типа.

Система секреции IV типа встречается у *Helicobacter pylori*, легионелл, бруцелл и других патогенов. В частности, с помощью этой системы бруцеллы после фагоцитоза вводят через стенку фагосомы в цитоплазму эукариотической клетки эффекторные белки, препятствующие слиянию фагосомы с лизосомой.

**Система секреции V типа (T5SS)** отличается тем, что в периплазматическом пространстве из части секретируемого полипептида формируется цилиндрическая структура, выполняющая роль поры, через которую белок выходит наружу. По этому пути секретируются IgA-протеаза у *N. gonorrhoeae*, белок пертактин у *B. pertussis*, адгезины многих патогенов (рисунок 8.32).

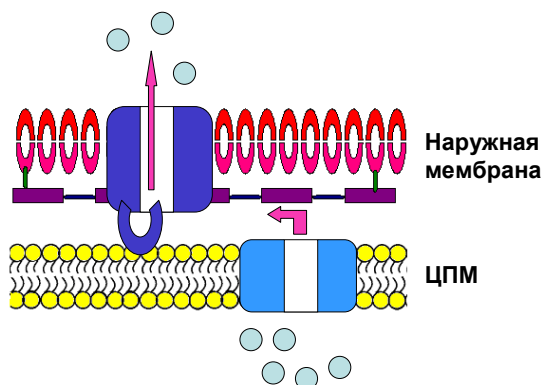


Рисунок 8.32 - Бактериальная система секреции V типа.

Система секреции V типа называется также системой автотранспортеров, так как в ней С-концевая последовательность белка отвечает за экспорт N-терминального домена через наружную мембрану. С помощью этой системы секреции транспортируются белки большой молекулярной массы, состоящие не менее чем из 3000 аминокислотных остатков.

**Система секреции VI типа (Т6SS)** обеспечивает доставку секретируемых белков непосредственно в цитоплазму клеток хозяина. Эта система секреции встречается у *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis* и других патогенов. Т6SS представляет собой полую структуру, состоящую из колец. В процессе сборки она постепенно удлиняется, проходит через наружную мембрану, растет до соприкосновения с мембраной эукариотической клетки, прокалывает ее и осуществляет инъекцию эффекторных молекул (рисунок 8.33).

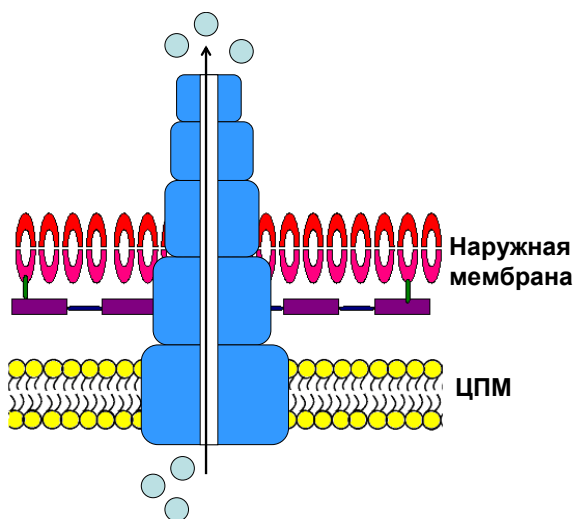


Рисунок 8.33 – Бактериальная система секреции VI типа.

**Система секреции VII типа (Т7SS)** характерна для микобактерий (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. marinum*). В составе этой системы секреции присутствует две поры. Одна пора располагается в цитоплазматической мембране, а другая - в микомембране - наружной части клеточной стенки, содержащей липиды (рисунок 8.34).

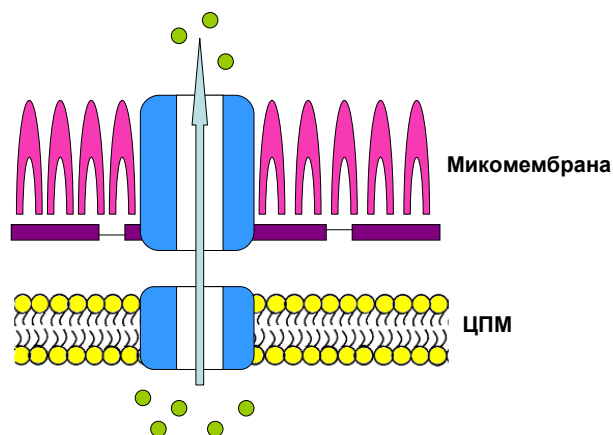


Рисунок 8.34 – Бактериальная система секреции VII типа.

Таким образом, среди бактериальных систем секреции описаны как одноэтапные (одношаговые), так и двухэтапные (двухшаговые). У одноэтапных систем секреции перенос белков происходит непосредственно из цитоплазмы во внешнюю среду. У двухэтапных систем секреции секретируемый белок вначале переносится из цитоплазмы бактериальной клетки в периплазматическое пространство, а затем – во внешнюю среду.

### 8.6. Рост и размножение бактерий

Полученная клеткой энергия в процессе дыхания или брожения используется для роста и размножения бактерий.

**Рост** - это увеличение массы отдельной клетки в результате синтеза клеточного материала. Во время роста размеры клетки увеличиваются. После достижения определенных размеров клетка прекращает рост и начинает делиться (размножаться). **Размножение** бактерий – это способность бактерий к самовоспроизведению (увеличению количества особей).

Для подавляющего большинства бактерий характерно **бинарное поперечное деление**, приводящее к образованию двух одинаковых дочерних клеток (рисунок 8.35).

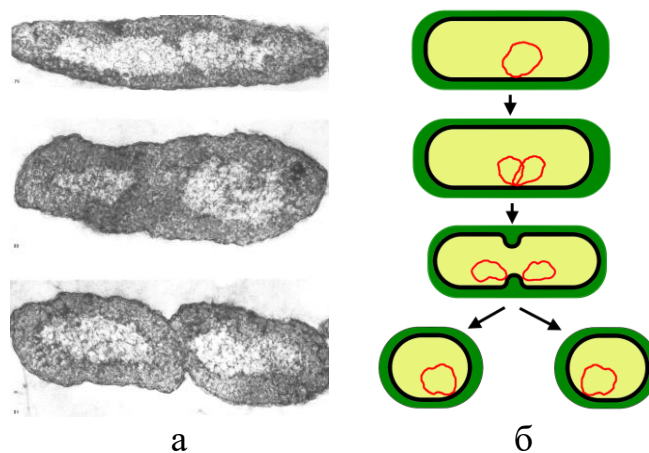


Рисунок 8.35 - Бинарное деление бактериальной клетки: а – электронная микрофотография; б – схема деления.

Деление бактериальной клетки начинается после завершения репликации бактериальной хромосомы. При репликации каждая из двух нитей ДНК служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи ДНК. В репликации участвует фермент ДНК-полимераза. В результате удвоения родительской ДНК происходит образование двуспиральных дочерних молекул ДНК. Затем в средней части клетки формируется поперечная перегородка (септа), которая делит цитоплазму материнской клетки на две дочерние. Одновременно с этим синтезируется клеточная стенка, образующая полноценную перегородку между двумя дочерними клетками.

Некоторые микроорганизмы размножаются путем **почкования**. Особенно этот способ характерен для дрожжей. При почковании на одном из полюсов материнской клетки образуется маленький вырост (почка). Постепенно почка достигает размеров материнской клетки и отделяется от нее (рисунок 8.36).

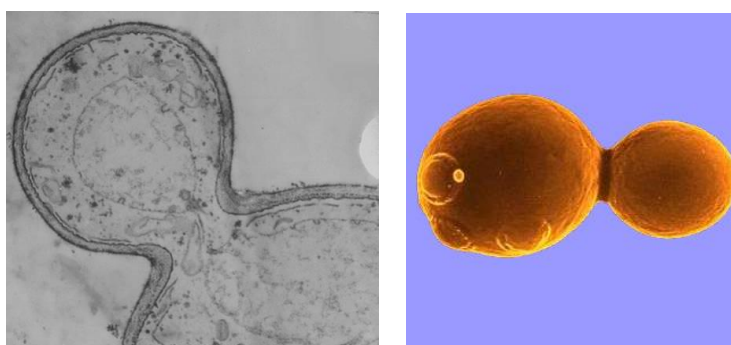


Рисунок 8.36 - Почкование дрожжей.

Размножение бактерий изучают при их культивировании в жидкой или на плотной питательных средах. В жидкой питательной среде культивирование может носить непрерывный или периодический характер. Для производства биомассы бактерий применяют культивирование в аппаратах-культиваторах (рисунок 8.37).

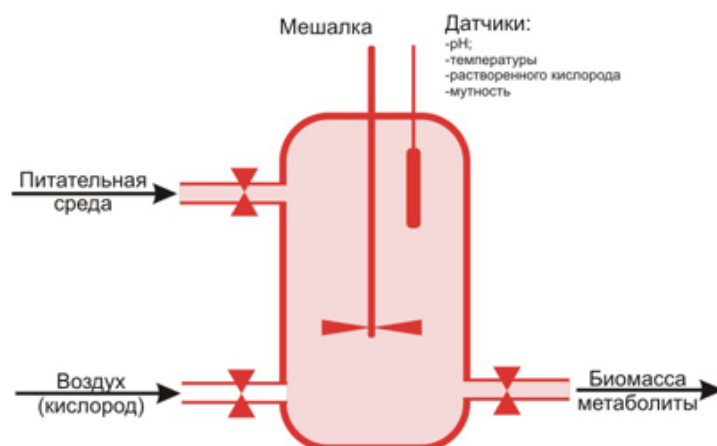


Рисунок 8.37 – Схема аппарата-культиватора.

При **непрерывном культивировании** используется открытая система с возможностью подачи свежей питательной среды и вывода из аппарата-культиватора (ферментера) накопленной биомассы или метаболитов. При



**периодическом культивировании** питательные вещества в систему дополнительно не вводятся, а продукты обмена не удаляются. В этом случае размножение бактерий в жидкой питательной среде характеризуется сменой фаз или стадий (рисунок 8.38):

- **лаг-фаза** - начальная стадия адаптации бактерий к питательной среде. В эту фазу наблюдается синтез адаптивных ферментов. Лаг-фаза представляет собой период от момента внесения (посева) бактерий в питательную среду до их роста. В этой фазе число живых бактерий не увеличивается, а может даже уменьшаться. Продолжительность этой фазы составляет 2-4 часа;

- **экспоненциальная (логарифмическая) фаза** (лог-фаза) – фаза выраженного прироста численности бактерий (увеличение количества микробных клеток в геометрической прогрессии: в конце первой генерации из одной клетки образуется две, в конце второй - четыре и так далее). В этот период скорость размножения клеток и увеличение бактериальной популяции максимальны. Период генерации, то есть период времени между двумя последовательными делениями бактерий, постоянный для данного вида микроорганизмов. Продолжительность этой фазы - 5-6 часов;

- **стационарная фаза** - фаза максимального накопления клеток и развития равновесия между размножением и гибелью клеток. Число новых бактерий почти равно числу отмерших, то есть наступает равновесие между погибшими клетками и вновь образующимися клетками. Увеличения численности микроорганизмов в эту стадию не происходит. Продолжительность этой фазы - 2 часа;

- **фаза отмирания** - уменьшение численности популяции в связи с уменьшением питательных веществ и изменением условий культивирования (изменение рН, концентрации ионов и др.). Продолжительность этой фазы - около 5 часов. Остающиеся в живых клетки переходят в состояние покоя.

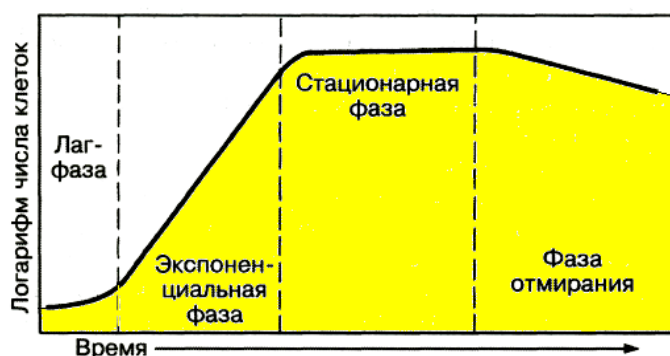


Рисунок 8.38 – Размножение бактерий в жидкой питательной среде.

Большинство микроорганизмов при благоприятных условиях делятся пополам через каждые 20-30 минут. При такой скорости деления из одного микроорганизма через 5 часов образуется  $10^{24}$  особей.

Размножение бактерий происходит на питательных средах, содержащих необходимые компоненты, в оптимальных температурных условиях, при определенном насыщении среды кислородом.

Размножение характеризуется:

- **временем генерации** - интервалом времени, за который число клеток удваивается;

- **концентрацией бактерий** - числом клеток в 1 мл.

**По температурному оптимуму** роста выделяют три основные группы микроорганизмов.

1. **Психрофилы** - растут при температурах ниже  $+20^{\circ}\text{C}$ .

2. **Мезофилы** - растут в диапазоне температур от  $+20^{\circ}\text{C}$  до  $+45^{\circ}\text{C}$  (в основном оптимальная температура составляет  $37^{\circ}\text{C}$ ).

3. **Термофилы** - растут при температурах выше  $+45^{\circ}\text{C}$ .

## 8.7. Питательные среды

Выращивание микроорганизмов производится на субстратах, называемых питательными средами. Питательные среды должны содержать достаточное количество питательных веществ в доступной для усвоения форме, иметь оптимальное значение pH, быть стерильными.

**Питательные среды классифицируются на группы.**

**По составу** выделяют простые и сложные питательные среды. К **простым** (обычным) питательным средам относятся пептонная вода, мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар. К **сложным** (богатым) питательным средам относятся кровяной агар, асцитический агар, сывороточный агар.

**По консистенции** выделяют жидкие, полужидкие и плотные среды. **Жидкие среды** представляют собой настои, отвары, бульоны, приготовленные на основе мяса, рыбы, овощей (естественные среды), а также композиции определенных концентраций химических соединений (искусственные среды). Широко распространенной жидкой питательной средой является мясо-пептонный бульон (МПБ). **Полужидкие среды** получают путем добавления к жидким средам 0,5-0,9% агара или желатина (в частности, мясо-пептонный желатин - МПЖ). К **плотным питательным средам** относят среды, содержащие 1,5-3% агара, в частности, мясо-пептонный агар - МПА (рисунок 8.39).

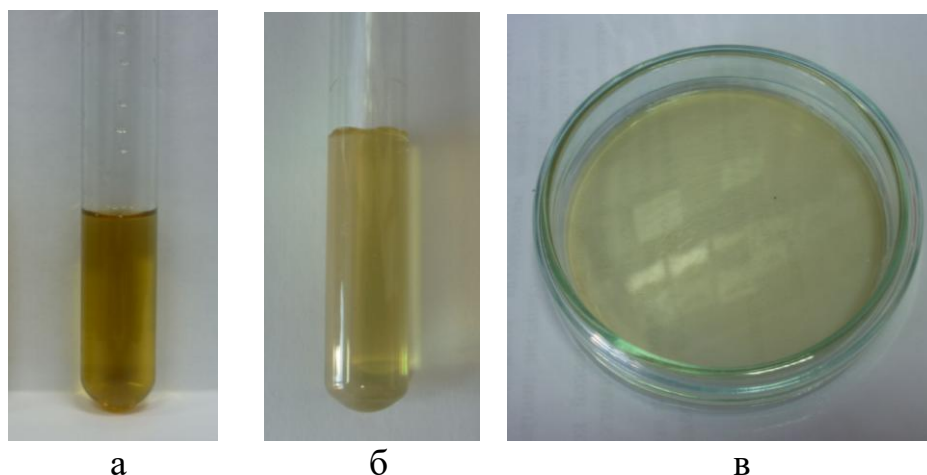


Рисунок 8.39 – Питательные среды: а – МПБ, б – МПЖ, в – МПА.

**Агар** – это полисахарид сложного состава из морских водорослей, основной

отвердитель для плотных сред.

В качестве универсального источника углерода и азота применяют пептоны (продукты расщепления белков пепсином) или различные гидролизаты (мясной, рыбный, казеиновый, дрожжевой).

**По происхождению** выделяют естественные, полусинтетические и синтетические среды. **Естественные питательные среды** - это природные органические среды непостоянного состава, которые включают продукты животного или растительного происхождения. К ним относятся пептоны, кровь, отвары и экстракты, полученные из природных субстратов (мясо, рыба, крупы).

**Полусинтетические питательные среды** кроме органических и неорганических веществ известного состава содержат продукты природного происхождения (картофельная среда с глюкозой, дрожжевая среда).

**Синтетические питательные среды** состоят из определенных количеств органических и неорганических химических соединений известного состава. Их состав всегда постоянный.

**По назначению** среды подразделяются на основные и специальные. **Основные (универсальные) среды** пригодны для роста большинства бактерий. К ним относятся мясо-пептонный агар (МПА) и мясо-пептонный бульон (МПБ).

К **специальным средам** относятся дифференциально-диагностические, элективные и накопительные питательные среды.

**Дифференциально-диагностические среды** представляют собой сложные среды, позволяющие выделять чистую культуру бактерий с одновременной их идентификацией по какому-либо биохимическому свойству. Дифференциально-диагностические среды содержат питательную основу, дифференцирующее вещество (субстрат) и индикатор. Эти среды позволяют идентифицировать бактерии по следующим признакам:

- гликолитическая активность (разложение углеводов) – среды Эндо, Гисса, Ресселя, Клиглера и др.;
- протеолитическая активность (разложение белков) – МПЖ, свернутая сыворотка, молочный агар;
- гемолитическая активность (разрушение эритроцитов) – кровяной агар (рисунок 8.40).

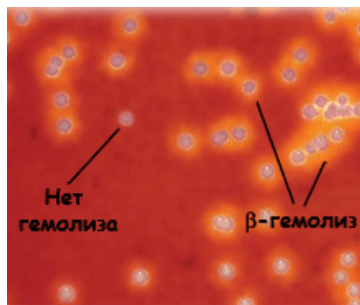


Рисунок 8.40 – Кровяной агар (содержит дефибринированную кровь, позволяет выделять бактерии, обладающие гемолитической активностью).

В частности, **среда Эндо** предназначена для выделения энтеробактерий и родственных микроорганизмов с одновременной их дифференцировкой по

способности утилизировать лактозу. Питательной основой этой среды является мясо-пептонный агар, дифференцирующим веществом – лактоза, индикатором – фуксин-сернистый реактив. На такой среде лактозопозитивные бактерии (*E. coli*) образуют темно-красные колонии с металлическим блеском, а лактозонегативные бактерии (шигеллы, сальмонеллы) – колонии серо-белого цвета (рисунок 8.41).



Рисунок 8.41 – Рост кишечной палочки на среде Эндо.

**Элективные питательные среды** содержат вещества, подавляющие рост одних бактерий, но не влияющие на рост других бактерий. Эти среды служат для выделения определенных видов бактерий из смешанных популяций. К элективным средам относятся желточно-солевой агар, селенитовая среда, среда Мюллера. Селективные среды содержат не только вещества, подавляющие рост отдельных видов бактерий, но и стимуляторы роста других бактерий. Например, солевой агар, предназначенный для выделения стафилококков, в качестве элективного фактора содержит повышенную концентрацию (10%) хлорида натрия. Желточно-солевой агар содержит не только элективный фактор (хлорид натрия), но и дифференцирующее вещество (желток), позволяющее определять наличие лецитиназы (рисунок 8.42).

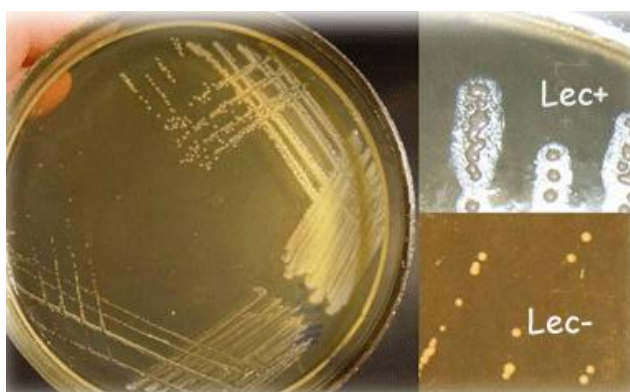


Рисунок 8.42 - Желточно-солевой агар для выделения стафилококков.

**Среда Плоскирева** предназначена для выделения патогенных энтеробактерий (шигеллы, сальмонеллы) с одновременным подавлением роста кишечной палочки. Элективным фактором этой среды являются соли желчных кислот. Так как рост кишечной палочки подавляется не полностью, для ее выявления в среду добавлена лактоза (дифференцирующее вещество). Лактозонегативные бактерии (шигеллы, сальмонеллы) образуют на этой среде

бесцветные колонии, а лактозоположительные бактерии (кишечная палочка) – темно-красные колонии (рисунок 8.43).

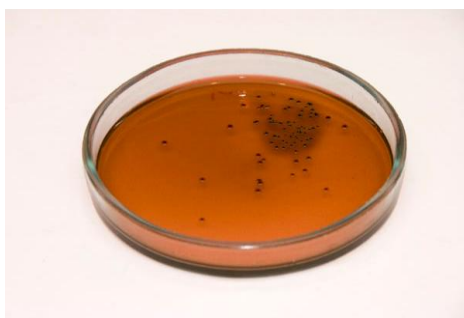


Рисунок 8.43 – Среда Плоскирева.

**Накопительные среды** (обогащительные среды, среды обогащения) - это среды, на которых определенные виды культур растут быстрее и интенсивнее сопутствующей микрофлоры. Такие среды могут содержать селективный фактор для подавления роста сопутствующей микрофлоры или факторы, способствующие росту требуемых бактерий, например, солевой бульон для стафилококков, селенитовый бульон для сальмонелл (рисунок 8.44).

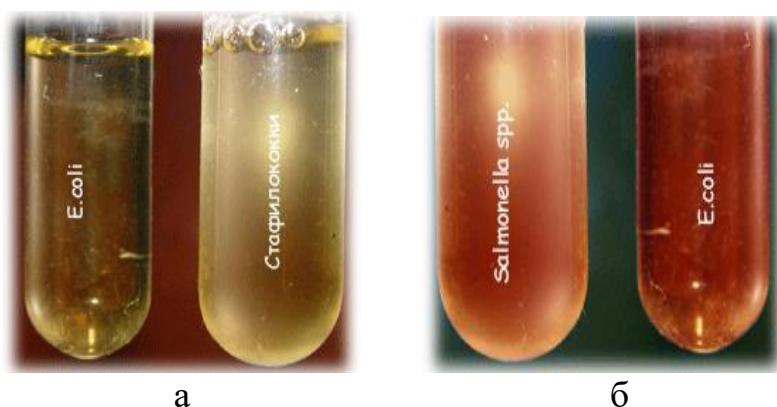


Рисунок 8.44 – Накопительные среды: а - солевой бульон, б - селенитовый бульон.

Так, солевой бульон (обогащительная среда для стафилококков) в качестве селективного фактора содержит 10% хлорида натрия, селенитовый бульон (обогащительная среда для сальмонелл) в качестве селективного фактора содержит селенит натрия, а сахарный бульон (обогащительная среда для стрептококков) содержит глюкозу в качестве ростового фактора.

Для длительного хранения микроорганизмов применяют **консервирующие среды** - с глицерином, мелом и др.

**Характер роста бактерий на питательных средах.** В жидких питательных средах при размножении бактерий наблюдают равномерное помутнение среды, поверхностный рост в виде пленок, пристеночный, придонный рост в виде осадка. На плотных питательных средах отмечается сплошной рост культуры (в виде газона) или образование изолированных колоний (рисунок 8.45).

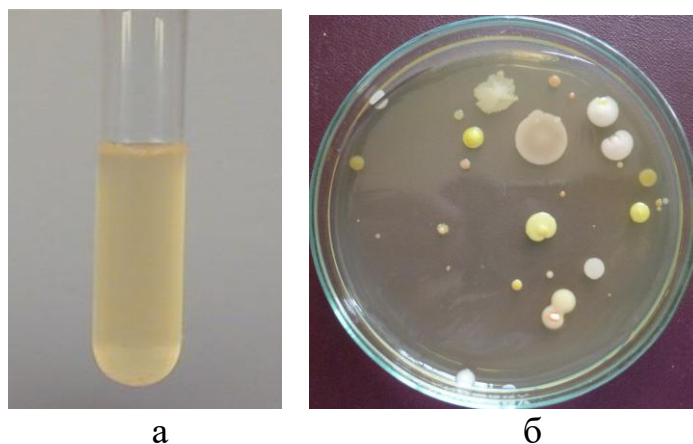


Рисунок 8.45 – Характер роста бактерий в жидких (а) и на плотных (б) питательных средах.

Колонии характеризуют по форме, размеру, цвету, очертаниям края, характеру поверхности, прозрачности, структуре, консистенции (рисунок 8.46).

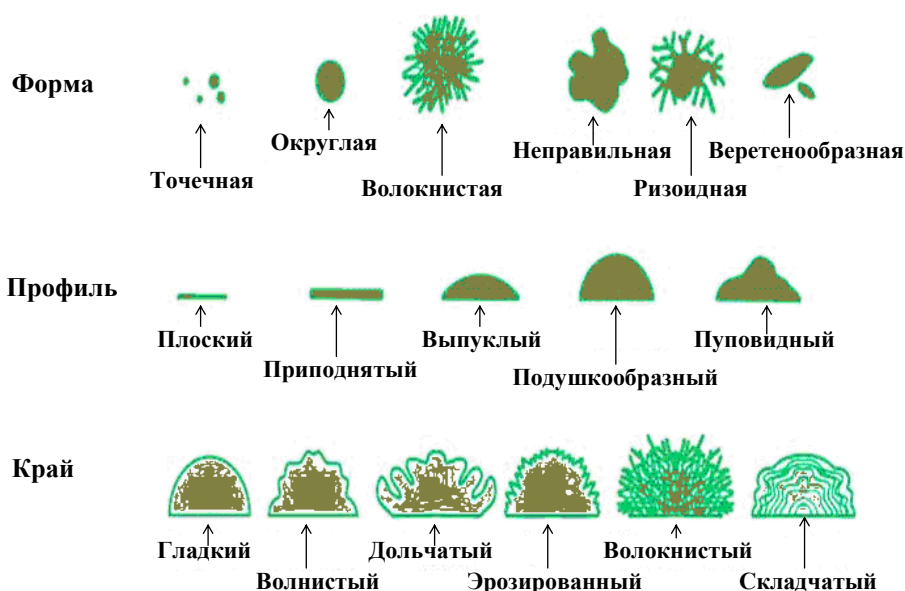


Рисунок 8.46 – Признаки колоний микроорганизмов.

Некоторые микроорганизмы имеют свои особенности размножения. Так, у **грибов** наблюдаются следующие типы размножения:

- **вегетативное размножение** (отделение от грибного мицелия частей, которые образуют новую грибницу). При этом типе размножения мицелий может фрагментироваться на артроспоры и хламидоспоры;

- **бесполое размножение** (созревшие конидии осыпаются, спорангии лопаются, споры из них высыпаются и прорастают в гифы);

- **половое размножение** (мужские и женские клетки сливаются, в результате образуется зигота с парным набором хромосом).

У **дрожжей**, в свою очередь, наблюдается вегетативное размножение (почкованием или делением) и половое размножение (слияние клеток).

## 8.8. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Охарактеризуйте химический состав микробных клеток.
2. Что такое эндо- и экзоферменты бактерий?
3. Расскажите о методах изучения ферментативной активности бактерий.
4. Охарактеризуйте механизмы транспорта веществ внутрь микробной клетки.
5. Что такое дыхание бактерий?
6. Расскажите о процессах брожения.
7. Что такое энергетический метаболизм бактерий?
8. Что такое конструктивный метаболизм бактерий?
9. Расскажите о системах секреции веществ из микробных клеток.
10. Какие способы размножения бактерий Вы знаете?
11. Как классифицируются питательные среды?
12. Что такое элективные и дифференциально-диагностические среды?

## 8.9. Тренировочные тесты

1. Для определения сахаролитических свойств используют среду:

- Клауберга
- Кита-Тароцци
- + Гисса
- Эндо
- Плоскирева

2. Фосфор необходим бактериям для синтеза:

- белка
- + нуклеиновых кислот
- полисахаридов
- углеводов
- липидов

3. Для выявления гемолизина используют среду:

- Эндо
- Плоскирева
- + кровяной агар
- МПЖ
- желточно-солевой агар

4. По типу питания выделяют следующие группы бактерий:

- психрофилы
- + гетеротрофы
- мезофиллы
- эукариоты
- + аутоотрофы

5. По оптимальным температурным условиям роста различают:

- + психрофилы
- автотрофы
- + мезофилы
- гетеротрофы
- + термофилы

6. Оптимальная температура для выращивания психрофильных бактерий:

- + менее 20<sup>0</sup>С
- 20-45<sup>0</sup>С
- 45-55<sup>0</sup>С
- 55-60<sup>0</sup>С
- выше 60<sup>0</sup>С

7. Оптимальная температура для выращивания мезофильных бактерий:

- менее 20<sup>0</sup>С
- + 20-45<sup>0</sup>С
- 45-55<sup>0</sup>С
- 55-60<sup>0</sup>С
- выше 60<sup>0</sup>С

8. Оптимальная температура для выращивания термофильных бактерий:

- 5-10<sup>0</sup>С
- 10-20<sup>0</sup>С
- 20-30<sup>0</sup>С
- 20-45<sup>0</sup>С
- + выше 45<sup>0</sup>С

9. Бактерии подразделяются на аутоотрофы и гетеротрофы по источнику усвоения:

- водорода
- кислорода
- + углерода
- азота
- фосфора

10. Основными продуктами маслянокислого брожения являются:

- этиловый спирт
- + масляная и уксусная кислоты
- молочная кислота
- молочная кислота и этиловый спирт
- метиловый спирт

11. Основными продуктами спиртового брожения являются:

- + этиловый спирт и углекислый газ
- масляная и уксусная кислоты
- молочная кислота



- молочная кислота и этиловый спирт
- метиловый спирт

12. Основными продуктами молочнокислого брожения являются:

- пропиловый спирт
- масляная и уксусная кислоты
- муравьиная кислота
- + молочная кислота, уксусная кислота и этиловый спирт
- метиловый спирт

13. У бактерий выделяют следующие типы переноса веществ внутрь клетки:

- + активный транспорт
- фагоцитоз
- + транслокация радикалов
- + простая диффузия
- + облегченная диффузия

14. Пермеазы - это:

- адгезины
- ферменты агрессии
- + транспортные белки
- группа антибиотиков
- экзоферменты

15. Перенос веществ внутрь клетки без затраты энергии происходит при:

- активном транспорте
- транслокации радикалов
- + облегченной диффузии
- + пассивной диффузии
- экзоцитозе

16. Перенос веществ внутрь клетки с затратой энергии происходит при

- + активном транспорте
- пассивной диффузии
- облегченной диффузии
- + транслокации групп
- экзоцитозе

17. В факторах роста нуждаются:

- аутотрофы
- гетеротрофы
- + ауксотрофы
- прототрофы
- фототрофы

18. К факторам роста относятся:

- + витамины
- + пурины
- + пиримидины
- + аминокислоты
- антибиотики

19. В какой фазе отсутствует прирост микробной популяции:

- лаг-фаза
- фаза экспоненциального роста
- + стационарная фаза
- + фаза ускоренного отмирания
- лог-фаза

20. В какой фазе наблюдается максимальный прирост микробной популяции:

- лаг-фаза
- + фаза экспоненциального роста
- стационарная фаза
- фаза ускоренного отмирания
- + лог-фаза

21. Не растут в присутствии кислорода:

- облигатные аэробы
- факультативные анаэробы
- + облигатные анаэробы
- микроаэрофилы
- аэротолерантные бактерии

22. Растут в присутствии кислорода:

- + облигатные аэробы
- + факультативные анаэробы
- облигатные анаэробы
- + микроаэрофилы
- + капнофилы

23. Сахаролитические свойства бактерий оценивают:

- на мясо-пептонном агаре
- в мясо-пептонном бульоне
- в столбике желатина
- + на средах Гисса
- в среде 199

24. О сахаролитической активности бактерий судят по образованию в среде:

- + кислоты
- воды
- + кислоты и газа
- сероводорода

- индола

25. “Пестрый ряд” используют для определения:

- морфологических свойств
- тинкториальных свойств
- + сахаролитических свойств
- протеолитических свойств
- липолитических свойств

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 9. Бактериологическое исследование

**Целью бактериологического исследования** является выделение чистой культуры возбудителя и его идентификация путем изучения морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических свойств. При необходимости проводят фаготипирование и серотипирование возбудителя, определение чувствительности микроба к антибактериальным препаратам и вирулентности.

Бактериологический метод исследования включает **4 этапа**:

**I этап** - посев исследуемого материала на питательные среды для получения изолированных колоний;

**II этап** – посев микробных клеток из отдельных колоний для накопления чистой культуры возбудителя;

**III этап** – проверка чистоты выделенной культуры и изучение биохимических свойств (в первую очередь - сахаролитических и протеолитических свойств) для идентификации возбудителя (определения вида бактерий);

**IV этап** - учет результатов и выдача заключения.

### 9.1. Отбор, хранение и транспортировка материала

Взятие материала для проведения бактериологического исследования, его хранение и транспортировку осуществляют с соблюдением определенных правил.

Материал для бактериологического исследования отбирается из мест локализации патологического процесса. Исследуемым материалом может служить кровь, моча, гной, мокрота, фекалии, желчь, отделяемое раны, рвотные массы, смывы с кожи и слизистых оболочек и др. Материал для исследования отбирается с соблюдением правил асептики. Для взятия крови используют вакуумные пробирки (вакуумные системы), для мочи и кала – специальные стерильные контейнеры (рисунок 9.1).



Рисунок 9.1 – Вакуумные системы для забора крови (а), контейнеры для мочи и кала (б), система для сбора и транспортировки образцов мочи на бакпосев с тампоном-губкой (в).

Для отбора биологического материала часто используют тампоны (свабы). Для этих целей выпускаются тампоны в комплекте с транспортной средой – так называемые транспортные системы (рисунок 9.2).



Рисунок 9.2 – Стерильные транспортные системы.

При исследовании крови на наличие бактерий (получение гемокультуры) материал отбирают непосредственно во флаконы, содержащие одновременно плотную и жидкую питательные среды, так называемые двухфазные системы (рисунок 9.3).



Рисунок 9.3 – Флакон с двухфазной системой.

Биологический материал для бактериологического исследования отбирается до начала антибиотикотерапии или через определенный промежуток времени, достаточный до выведения антибиотика из организма.

При отборе материала исключают попадание в него антибиотиков, антисептиков, дезинфектантов.

Транспортировку биологического материала в лабораторию проводят в максимально короткие сроки при соблюдении температурного режима. При невозможности быстрой доставки пробы в лабораторию материал погружают в транспортные среды и хранят в холодильнике при температуре плюс 4<sup>0</sup>С. Транспортировку биологического материала в лабораторию осуществляют в специальных пеналах или термоконтейнерах (рисунок 9.3).



Рисунок 9.3 – Медицинский термоконтейнер.

Материал, содержащий анаэробные бактерии, транспортируют в условиях, исключающих воздействие кислорода. Для взятия такого материала используют специальные флаконы, заполненные бескислородной газовой смесью и специальной транспортной средой (рисунок 9.5).



Рисунок 9.5 – Флаконы для культивирования анаэробов.

Материал для бактериологического исследования направляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывают фамилию, имя, отчество больного, возраст, вид материала, дата взятия, предполагаемый клинический диагноз и другие сведения.

В микробиологической лаборатории поступивший на исследование материал регистрируют в журнале, сохраняют до конца исследования, а по завершению исследования остатки материала уничтожают путем автоклавирования.

## 9.2. Посев материала на питательные среды и выделение чистой культуры аэробных бактерий

Поступивший в лабораторию материал подвергают бактериологическому исследованию в тот же день. **На первом этапе** из исследуемого материала готовят

мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют с иммерсией (определение морфологических и тинкториальных свойств возбудителя). Обязательным этапом бактериологического исследования является выделение чистой культуры микробов. С этой целью исследуемый материал высевают на плотную питательную среду и инкубируют в термостате в течение 18-24 часов при температуре 37<sup>0</sup>С. **Чистой культурой** называют популяцию микроорганизмов одного вида, полученную на питательной среде из изолированной микробной колонии. **Микробная колония** – это видимое невооруженным глазом скопление бактерий на поверхности или в толще плотной питательной среды. Колония представляет собой потомство как правило одной бактериальной клетки. Чистая культура используется для изучения морфологических, культуральных, биохимических, антигенных и других свойств, по совокупности которых проводится идентификация, то есть определяется видовая принадлежность исследуемых бактерий.

Для получения изолированных колоний предложены разные методы разобщения клеток:

- метод Пастера – последовательные разведения исследуемого материала в жидкой питательной среде (представляет исторический интерес);

- метод Коха – последовательные разведения исследуемого материала в расплавленном агаре с последующим переносом агара в чашку Петри (рисунок 9.5);

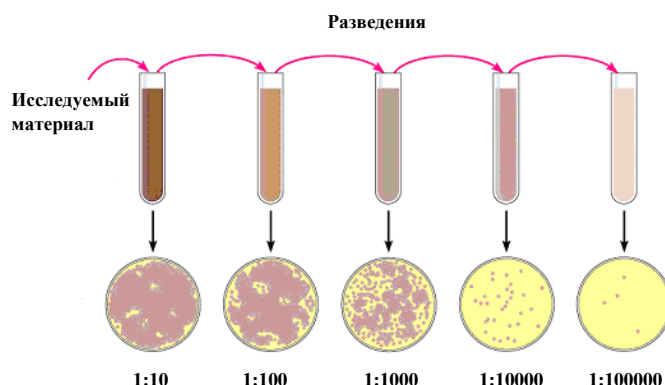


Рисунок 9.5 – Получение изолированных колоний методом Коха.

- метод Дригальского – последовательный перенос исследуемого материала с помощью шпателя из одной чашки в последующие 2-3 чашки с агаром (рисунок 9.6);

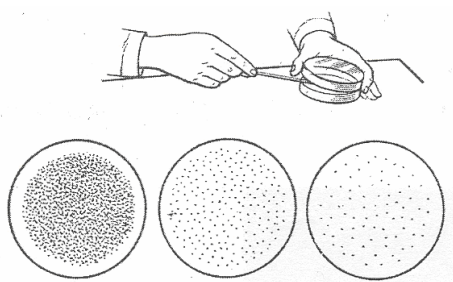


Рисунок 9.6 – Получение изолированных колоний по методу Дригальского.

- посев штрихами с помощью бактериологической петли (рисунок 9.7).

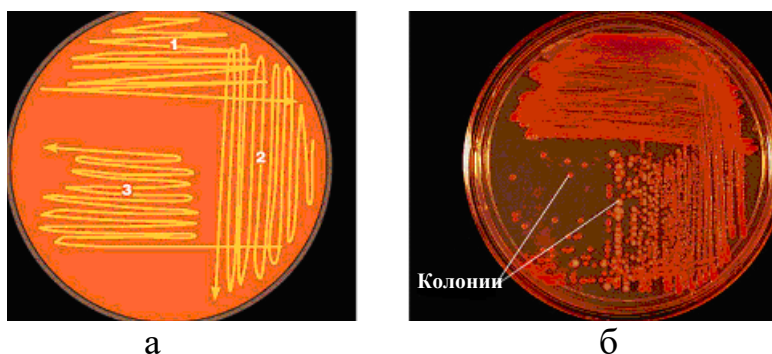


Рисунок 9.7 – Схема посева штрихами (а, цифрами указана последовательность нанесения штрихов) и результат посева (б).

При выделении чистых культур из смешанной популяции бактерий используются различные приемы, позволяющие “обогатить” исследуемый материал патогенными возбудителями. Например, при низкой концентрации патогенных бактерий в исследуемом материале, особенно загрязненном посторонней микрофлорой, применяют **биологический метод** – выделение культуры после заражения лабораторных животных.

**Химический метод** (обработка исследуемого материала химическими веществами) применяется для уничтожения сопутствующей микрофлоры (обработка материала кислотой при выделении кислотоустойчивых микобактерий туберкулеза).

**Физический метод** (прогревание исследуемого материала) используется при выделении спорообразующих бактерий.

Техника посева зависит от характера исследуемого материала и консистенции питательной среды. Жидкий материал для посева берут бактериологической петлей или стерильной пипеткой. Все манипуляции проводят вблизи пламени горелки с соблюдением правил асептики. Бактериологическую петлю перед взятием материала и по окончании посева прокалывают в пламени горелки. Пипетки после посева погружают в дезраствор.

Наибольшее распространение для выделения чистой культуры аэробных и факультативно-анаэробных бактерий получили метод посева штрихом и метод Дригальского. При посеве штрихом стерильной петлей берут каплю исследуемого материала и наносят его параллельными штрихами на поверхность агара в чашке Петри. В начале посева на петле имеется большое количество микробов, поэтому рост будет сплошным. С каждым штрихом на петле остается все меньше микробов, поэтому отмечается рост изолированных колоний. Посев штрихом имеет множество вариантов (рисунок 9.8).



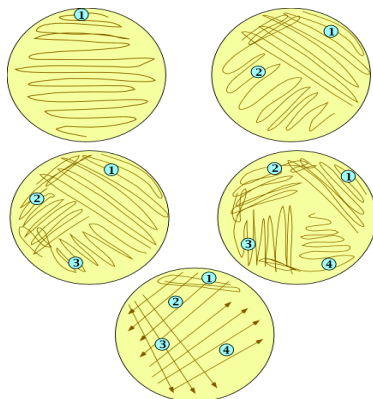


Рисунок 9.8 – Варианты посева штрихами. Цифрами обозначена последовательность нанесения штрихов.

Шпателем по методу Дригальского исследуемый материал распределяется по поверхности среды в нескольких чашках Петри. При этом вначале материал распределяют по поверхности агара в первой чашке Петри, затем этим же шпателем материал переносят на последующие чашки. На первой чашке отмечается сплошной рост культуры, а на последующих выявляются изолированные колонии.

**На втором этапе** исследования изолированные колонии описывают по форме (правильная, неправильная, округлая, розеткообразная и т.д.), величине (крупные, средние, мелкие), прозрачности (непрозрачная, полупрозрачная, прозрачная), цвету (бесцветные, пигментированные), характеру поверхности (гладкая, блестящая, влажная и др.), рельефу (выпуклые, погруженные, с валиком по краю и т.д.).

Из отдельных колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют с иммерсией. Для приготовления мазка используют часть колонии. При однородной микроскопической картине остаток колонии пересевают на скошенный агар в пробирку для накопления чистой культуры. Посевы инкубируют в термостате как правило при температуре 37<sup>0</sup>С в течение суток.

**На третьем этапе** исследования отмечают характер роста культуры на скошенном агаре, готовят мазки, окрашивают их по Граму, микроскопируют с иммерсией. По однородности роста культуры на агаре, микроскопической картине (однородность формы, размеров и окраски) судят о чистоте выделенной культуры. Затем проводят идентификацию чистой культуры путем изучения морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических и антигенных свойств. При необходимости изучают дополнительные свойства, характеризующие видовую принадлежность выделенного микроба.

**Морфологические** (размер и форма микробных клеток) и **тинкториальные** (отношение к окраске по Граму) **свойства** изучают при микроскопии окрашенных по Граму мазков.

**Культуральные свойства** изучают по характеру роста культуры на плотной и в жидкой питательной среде. При этом описывают признаки колоний, образующихся на плотной питательной среде, и особенности роста культуры в жидкой питательной среде.

Для идентификации чистой культуры изучают различные **биохимические свойства**.

**Ферментация углеводов** (сахаролитические свойства) определяется на средах Гисса, содержащих один из моно-, дисахаров (глюкозу, лактозу, сахарозу и др.), полисахаридов (крахмал, гликоген и др.), высших спиртов (глицерин, манит и др.) и индикатор. В пробирку со средой помещают поплавочек для улавливания газа. При ферментации углеводов образуется либо кислота, либо кислота и газ (углекислый газ, водород, метан). Образование кислоты выявляется изменением цвета среды, а образование газа – появлением пузырька в поплавке.

**Ферментацию белков** определяют путем посева культуры в столбик питательного желатина, на свернутую сыворотку крови, на молочный агар. При посеве в столбик желатина при положительной реакции отмечается его разжижение. На свернутой сыворотке вокруг колоний в положительном случае образуется углубление, а на молочном агаре вокруг колоний формируется зона просветления.

Расщепление белков в некоторых случаях сопровождается образованием индола (продукт расщепления триптофана), аммиака (продукт расщепления фенилаланина) или сероводорода (продукт расщепления цистина, цистеина или метионина). Для выявления этих газообразных веществ используют индикаторные бумажки или специальные реактивы. **Более подробно изучение ферментативной активности бактерий представлено в разделе 8.**

Для **определения пути расщепления глюкозы** (окислительный или бродильный) используют **ОФ-тест** (тест окисления – ферментации, окислительно-бродильная проба). Для этого исследуемую культуру засевают уколом в две пробирки, содержащие полужидкую питательную среду, глюкозу и индикатор бромтимоловый синий. В одну из пробирок вносят слой вазелинового масла для создания анаэробных условий. Разложение глюкозы сопровождается образованием кислоты и изменением цвета среды на желтый. Образование кислоты в обеих пробирках свидетельствует о ферментативном пути расщепления глюкозы. Образование кислоты только в пробирке без вазелинового масла свидетельствует об окислительном пути расщепления глюкозы. Отсутствие кислотообразования в обеих пробирках свидетельствует об отсутствии утилизации глюкозы (рисунок 9.8).

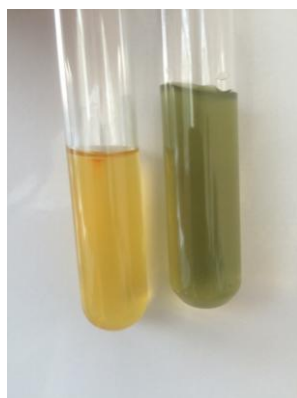


Рисунок 9.8 – Окислительный путь расщепления глюкозы (опыт - пробирка слева, контроль – пробирка справа).

В последние годы биохимические свойства бактерий изучают с использованием специальных тест-систем и микробиологических анализаторов, позволяющих не только расширить спектр изучаемых показателей, но и значительно

сократить объем проводимых исследований. Например, автоматический микробиологический анализатор Vitec II Compact (рисунок 9.9) позволяет не только идентифицировать бактерии и дрожжи, но и определять их чувствительность к антибиотикам.



Рисунок 9.9 – Автоматический микробиологический анализатор Vitec II Compact.

Видовую принадлежность выделенных культур устанавливают путем сравнения полученных результатов со свойствами бактерий известных видов.

**На четвертом этапе** учитывают результаты всех проведенных исследований и выдают заключение о возбудителе заболевания.

### 9.3. Посев материала на питательные среды и выделение чистой культуры анаэробных бактерий

При культивировании анаэробных бактерий требуется создание условий с пониженным содержанием кислорода или его отсутствием. Для создания анаэробных условий используют различные методы.

**1. Выращивание бактерий в средах под слоем вазелинового масла** (среда Китта-Тароцци). Перед применением для удаления растворенного кислорода среду кипятят в течение 15-20 минут на водяной бане, затем охлаждают (рисунок 9.10);

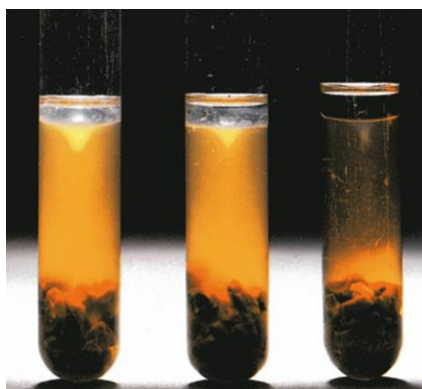


Рисунок 9.10 – Рост анаэробных бактерий в среде Китта-Тароцци (правая пробирка – контроль).

**2. Выращивание культуры в высоком столбике агара.** Питательный агар разливают в пробирки по 10 мл, прогревают на кипящей водяной бане для удаления кислорода, после чего охлаждают до температуры 45°C, вносят исследуемый

материал и тщательно перемешивают (рисунок 9.11).



Рисунок 9.11 – Рост анаэробных бактерий в высоком столбике агара.

3. Инкубирование посевов в герметически закрытых емкостях – эксикаторах, анаэростатах, системах GasPak (рисунок 9.12).

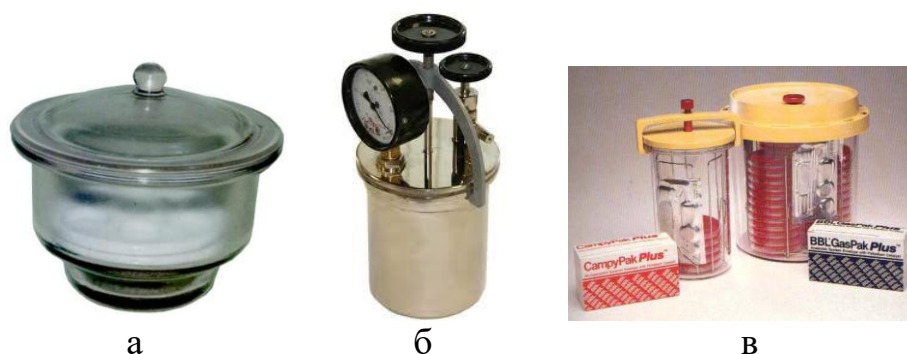


Рисунок 9.12 – Системы для выращивания анаэробных бактерий: а – эксикатор, б – анаэростат, в – система GasPak.

Для инкубирования разных микроорганизмов применяют разные типы пакетов - разные системы GasPak (таблица 9.1)

Таблица 9.1 – Атмосфера, создаваемая с помощью разных систем GasPak

Тип атмосферы	Тип пакета	Финальная концентрация газа	Культивируемые микроорганизмы
Капнофильная	GasPak	17-19% O <sub>2</sub> 5-10% CO <sub>2</sub>	Аэробные капнофилы
Микроаэрофильная	CampyPak	5-8% O <sub>2</sub> 5-10% CO <sub>2</sub>	Микроаэрофилы
Анаэробная	GasPak H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	<1,2% O <sub>2</sub> 5-10% CO <sub>2</sub>	Строгие анаэробы

Для поглощения кислорода в замкнутой воздушной среде используют растворы пирогаллола, гидросульфит натрия, для получения углекислого газа применяют смесь лимонной кислоты с бикарбонатом натрия. Для выращивания анаэробов используют также инкубаторы, в которых создается атмосфера углекислого газа - CO<sub>2</sub> – инкубаторы (рисунок 9.13).



Рисунок 9.13 - CO<sub>2</sub> – инкубатор.

Для выращивания анаэробов существует также метод Фортнера – совместное выращивание на одной чашке аэробных и анаэробных бактерий. Для этого пластинку питательного агара в чашке Петри разделяют канавкой на 2 части. На одной половине высевают штрихом аэробные бактерии, а на другой – анаэробные бактерии. Между крышкой и дном чашки заливают парафин. Вначале вырастают аэробы, которые используют кислород, а затем начинают размножаться анаэробные бактерии (рисунок 9.14).

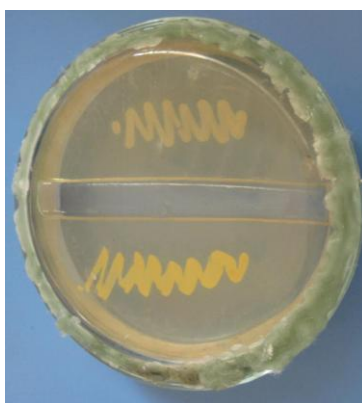


Рисунок 9.14 – Рост аэробных и анаэробных бактерий на одной чашке.

**На первом этапе** исследуемый материал высевают в жидкую среду Китта-Тароцци с вазелиновым маслом (среда накопления).

**На втором этапе** исследования в случае помутнения среды готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют с иммерсией. С целью получения изолированных колоний производят посев штрихом или по Дригальскому из среды накопления на плотную питательную среду для анаэробов (например, на кровяной агар). Посевы инкубируют в анаэроостате при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 24-72 часов. Рассев культуры штрихом по поверхности плотной питательной среды и выращивание в анаэробных условиях называется **методом Цейслера**. Существуют и другие методы получения изолированных колоний анаэробов, которые используются значительно реже. Например, **метод Вейнберга** представляет собой последовательные разведения материала в сахарном агаре (рисунок 9.15).

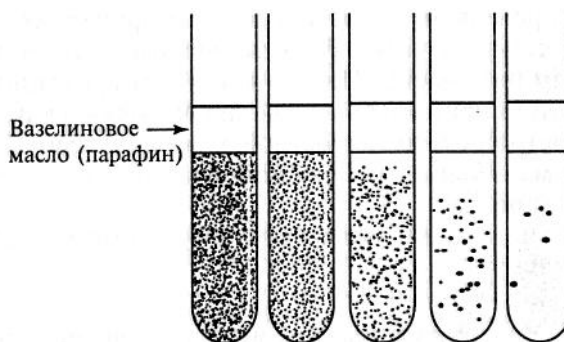


Рисунок 9.15 – Получение изолированных колоний анаэробов по методу Вейнберга.

**Метод Вейона-Виньяля** предусматривает выращивание культуры в 0,5% агаре в капиллярах пастеровских пипеток. **Метод Перетца** состоит в том, что культуру выращивают в 0,5% расплавленном агаре в чашке Петри под стеклянной пластинкой, расположенной на двух стеклянных или деревянных палочках (рисунок 9.16).

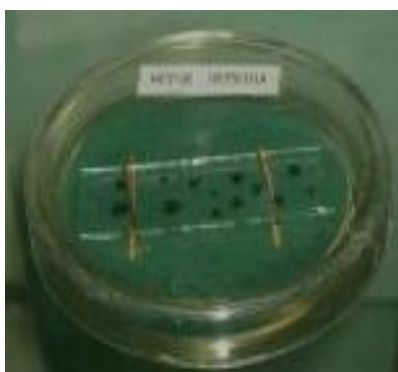


Рисунок 9.16 – Получение изолированных колоний анаэробов по методу Перетца.

**Метод “перевернутых чашек”** представляет собой выращивание культуры на поверхности толстого слоя агара, разлитого в крышку чашки Петри. Сверху в крышку помещают доньшко чашки и вдавливают его в агар. Щель между краями крышки и дном чашки Петри заливают расплавленным парафином.

**На третьем этапе** изучают изолированные колонии, готовят из них мазки, окрашивают и микроскопируют. Для накопления чистой культуры производят посев в среду Китта-Тароцци и инкубирование при температуре 37°C.

**На четвертом этапе** выросшую чистую культуру идентифицируют по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, антигенным и другим свойствам. По результатам изучения свойств чистой культуры выдают заключение о ее видовой принадлежности.

#### 9.4. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Расскажите о правилах взятия проб для микробиологического исследования.

2. Какие методы выделения чистых культур аэробов Вы знаете?
3. Охарактеризуйте методы выделения чистых культур анаэробов.
4. Какие свойства изучают у чистых культур бактерий для их идентификации?

### 9.5. Тренировочные тесты

1. Бактериоскопическим методом изучают:
  - + морфологические свойства
  - + тинкториальные свойства
  - культуральные свойства
  - биохимические свойства
  - антигенные свойства
  
2. Бактериологическим методом изучают:
  - морфологические свойства
  - тинкториальные свойства
  - + культуральные свойства
  - антигенные свойства
  - вирулентность
  
3. Цель бактериологического метода:
  - + идентификация бактерий
  - установление антигенной структуры
  - определение тинкториальных свойств
  - выявление капсулы у бактерий
  - определение подвижности бактерий
  
4. На первом этапе бактериологического исследования:
  - отбирают пробу на анализ
  - проводят идентификацию бактерий
  - + производят посев исследуемого материала
  - выделяют чистую культуру бактерий
  - выдают заключение
  
5. На втором этапе бактериологического исследования:
  - отбирают пробу на анализ
  - проводят идентификацию бактерий
  - производят посев исследуемого материала
  - + выделяют чистую культуру бактерий
  - выдают заключение
  
6. На третьем этапе бактериологического исследования:
  - отбирают пробу на анализ
  - + проводят идентификацию бактерий

- производят посев исследуемого материала
- выделяют чистую культуру бактерий
- выдают заключение

7. На четвертом этапе бактериологического исследования:

- отбирают пробу на анализ
- проводят идентификацию бактерий
- производят посев исследуемого материала
- выделяют чистую культуру бактерий
- + выдают заключение

8. Культивирование анаэробных бактерий проводят на среде:

- Эндо
- Плоскирева
- + Китта-Тароцци
- Левина
- висмут-сульфитном агаре

9. Чистую культуру анаэробов выделяют методом:

- Грама
- диффузионным
- + Перетца
- + штрихов с инкубированием посевов в анаэроостате
- штрихов с инкубированием в обычных условиях

10. Для культивирования анаэробов используют среду:

- + Китта-Тароцци
- + высокий столбик МПА
- Эндо
- Левина
- Плоскирева

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.



## 10. Генетика бактерий

### 10.1. Наследственный аппарат бактерий

**Генетика бактерий** - это раздел микробиологии, изучающий наследственность и изменчивость микроорганизмов. **Наследственность** – это способность бактерий воспроизводить одни и те же свойства из поколения в поколение благодаря передаче генов от родителей потомкам. **Изменчивость** - это изменение характерных для микроорганизмов свойств под действием физических, химических или биологических факторов. Следовательно, генетика изучает особенности передачи наследственных признаков из поколения в поколение, выясняет механизмы наследования признаков, а также определяет диапазон изменчивости микроорганизмов под влиянием физических факторов, химических агентов и в результате генетического обмена.

В 1944 г. американские биологи О. Эвери, К. Маклауд и М. Маккарти (рисунок 10.1) в опытах на пневмококках показали, что генетический материал бактерий представляет собой ДНК.



А

Б

В

Рисунок 10.1 – А - Освальд Теодор Эвери (Oswald Theodore Avery, 1877-1955 гг.), Б - Колин Маклауд (Colin MacLeod, 1909 – 1972 гг.), В - Маклин Маккарти (Maclyn McCarty, 1911-2005 гг.).

В 1953 г. американский биолог Д. Уотсон и британский биолог Ф. Крик (рисунок 10.2) предложили модель строения ДНК и механизм ее репродукции.



Рисунок 10.2 – Джеймс Дьюи Уотсон (James Dewey Watson, 1928) и Фрэнсис Крик (Francis Crick, 1916-2004 гг.).

Информация в геноме бактерий, как и других организмов, закодирована в виде последовательности нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из трех частей: азотистого основания (пуринового или пиримидинового), углевода (пятиуглеродного сахара дезоксирибозы) и остатка фосфорной кислоты (рисунок 10.3).

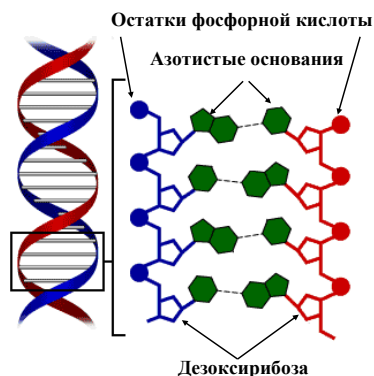


Рисунок 10.3 – Схема строения нуклеотида.

В молекуле ДНК имеются 4 вида азотистых оснований: 2 пуриновых основания и 2 пиримидиновых основания. Пуриновые основания - аденин (А) и гуанин (Г), пиримидиновые основания - тимин (Т) и цитозин (Ц). Азотистые основания одной цепи соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями. При этом двойная цепь ДНК строится по принципу **комплементарности**, то есть аденин одной цепи соединен двумя водородными связями с тимином другой цепи, а гуанин одной цепи соединен тремя водородными связями с цитозином противоположной цепи. Так формируются пары А-Т и Г-Ц. Молекула ДНК представляет собой правозакрученную спираль, состоящую из двух полинуклеотидных цепей с **антипараллельным** ходом. Это означает, что 3'-концу одной цепи соответствует 5'-конец другой цепи и наоборот (рисунок 10.4).

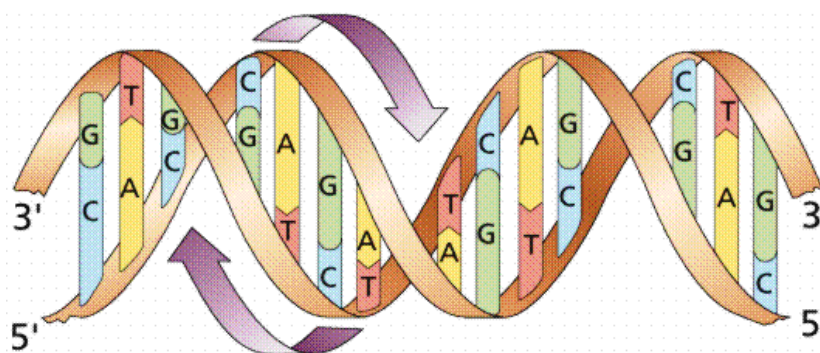


Рисунок 10.4 – Схема строения молекулы ДНК.

Во время размножения бактерий цепи ДНК раскручиваются и разделяются. Образовавшиеся одноцепочечные молекулы служат матрицами, на которых синтезируются новые двуцепочечные молекулы ДНК. В результате этого из одной молекулы образуются идентичные ей две двухцепочечные структуры, которые распределяются по дочерним клеткам (рисунок 10.5).

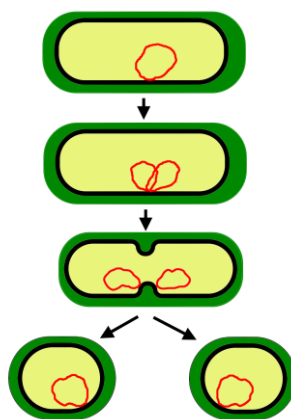


Рисунок 10.5 – Распределение ДНК между дочерними клетками.

Нуклеотиды формируют **гены** - участки ДНК, занимающие специфическое место в хромосоме и отвечающие за синтез того или иного соединения. Ген является функциональной единицей наследственности. В генах записана информация обо всех свойствах, присущих клетке. Гены объединены в **опероны**. Ген обозначают строчными буквами латинского алфавита со знаком “+”. Это обозначение соответствует названию соединения, синтез которого данный ген детерминирует. Например,  $his^+$  обозначает ген, отвечающий за синтез гистидина (гистидиновый ген). Гены, контролирующие устойчивость к лекарственным или иным препаратам, выделяют надстрочным символом *r* (*resistant* – резистентный), а чувствительность – надстрочным знаком *s*. Например, резистентность к стрептомицину обозначается как  $str^r$ , а чувствительность к стрептомицину –  $str^s$ . Схема, отражающая расположение генов на хромосоме, называется **генетической картой** хромосомы (рисунок 10.6).

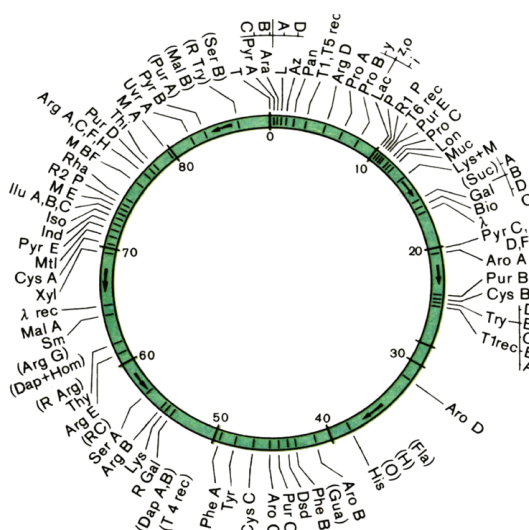


Рисунок 10.6 – Генетическая карта хромосомы кишечной палочки.

Совокупность генов называется **генотипом**. Генотип проявляется внешними признаками. Совокупность внешних признаков организма называется **фенотипом**. Понятия генотип и фенотип сформулировал в начале XX века датский генетик В.

Иогансен (рисунок 10.7).



Рисунок 10.7 – Вильгельм Людвиг Иогансен (Wilhelm Ludvig Johannsen, 1857 – 1927 гг.).

Фенотип бактерий обозначается теми же знаками, что и генотип, но заглавными буквами. Например, символы  $Str^f$  или  $Str^s$  обозначают наличие устойчивости или чувствительности к стрептомицину. Фенотип зависит не только от наличия соответствующего гена, но и от условий, способствующих его проявлению.

Сохранение информации при росте и размножении клеток происходит следующим образом. Перед делением клетки на каждой цепи ДНК происходит синтез новой цепи, комплементарной родительской. При этом каждая из двух вновь образуемых спиралей содержит родительскую цепь и вновь синтезированную цепь. Одновременно с синтезом новой молекулы ДНК синтезируется и матричная (информационная) РНК (мРНК или иРНК). Она состоит из одной цепи и напоминает цепь ДНК, только вместо тимина содержит урацил. Матричная РНК копирует нуклеотидную последовательность ДНК. Этот процесс называется транскрипцией (переписыванием информации). Порядок триплетов мРНК определяет аминокислотную последовательность белков, синтезируемых в клетке. После транскрипции у микроорганизмов сразу же происходит трансляция – синтез белковой молекулы на рибосомах. У микроорганизмов трансляция совмещена с транскрипцией и происходит ко-транскрипционно.

У бактерий выделяют следующие **основные признаки**:

- **морфологические** (размер и форма клеток, наличие жгутиков, спор и капсул);
- **тинкториальные** (способность воспринимать различные красители);
- **культуральные** (характер роста бактерий в жидких и на плотных питательных средах);
- **биохимические** (способность расщеплять углеводы, белки, липиды и другие сложные соединения);
- **антигенные** (наличие антигенов, способных индуцировать синтез антител);
- **биологические** (патогенность, тропность);
- **резистентность** к лекарственным препаратам, факторам внешней среды,

бактериофагам.

Все признаки бактерий проявляются в результате биохимических реакций, которые осуществляются при участии ферментов. В нормальных условиях у бактерий все присущие им ферменты работают, что проявляется характерными для этих бактерий свойствами. Совокупность этих признаков позволяет отличать одни виды бактерий от других. В некоторых случаях ферменты перестают работать. Например, фермент перестает работать при отсутствии условий для его нормальной работы или в случае поломки гена, кодирующего синтез данного фермента. В результате нарушения работы ферментов возникают изменения признаков, характерных для данного вида бактерий, что затрудняет идентификацию микроорганизмов.

Наследственная информация у бактерий закодирована в геноме, который представлен **нуклеоидом** (бактериальной хромосомой), а у некоторых бактерий дополнительно **плазмидами**. В состав нуклеоида и плазмид могут входить мобильные элементы генома (подвижные генетические элементы), к которым относятся IS-последовательности и транспозоны. Хромосомные и плазмидные гены, а также мобильные генетические элементы являются **функциональными единицами генома**. Кроме того, каждая генетическая структура (нуклеоид, плазида), способная к самостоятельной репликации, составляет единицу репликации или **репликон**.

Нуклеоид большинства бактерий представлен одной замкнутой кольцевой молекулой ДНК. Нуклеоид и плазмиды фиксированы в определенных точках на цитоплазматической мембране клетки. Структура генома (наследственного аппарата) бактерий представлена на рисунке 10.8.

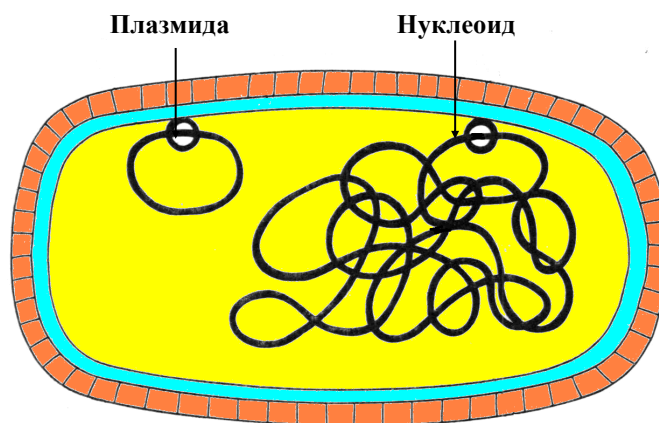


Рисунок 10.8 – Геном бактериальной клетки.

**Нуклеоид** бактерий представляет собой двухцепочечную кольцевую суперспирализованную молекулу ДНК. Длина этой молекулы достигает 1 мм (превышает длину бактериальной клетки в 1000 раз). Диаметр молекулы ДНК составляет около 2 нм. Нуклеоид большинства бактерий имеет молекулярную массу в пределах  $(1-3) \cdot 10^9$  Д. Молекулярная масса нуклеоида микоплазм составляет  $(0,4-0,8) \cdot 10^9$  Д, а нитчатых цианобактерий -  $8,5 \cdot 10^9$  Д. Нуклеоид бактерий содержит до 3-5 млн. нуклеотидных пар (н.п.), которые формируют до 4 тысяч генов. Гены бактериальной хромосомы кодируют (определяют) жизненно важные для бактерии

функции питания, дыхания, роста и размножения.

Нуклеоид бактерий, несмотря на отсутствие ядерной мембраны, четко отграничен от цитоплазмы и занимает в ней центральную область. Для выявления нуклеоида в фиксированных мазках предложена реакция Фельгена-Россенбёка. При электронной микроскопии нуклеоид выглядит в виде менее плотных участков в центральной части клетки (рисунок 10.9).

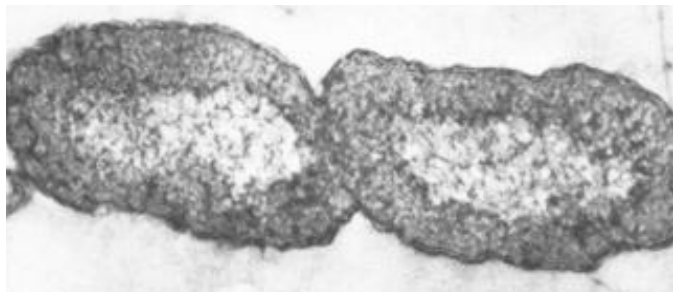


Рисунок 10.9 – Нуклеоид бактериальной клетки при электронной микроскопии.

На рисунке 10.10 представлена фотография молекулы хромосомной ДНК кишечной палочки, полученная с помощью электронной микроскопии.

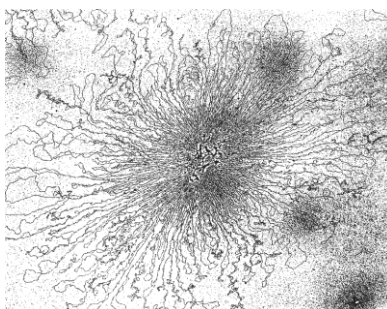


Рисунок 10.10 – ДНК кишечной палочки.

Кроме нуклеоида у некоторых бактерий в клетке могут присутствовать **плазмиды** - небольшие автономные (внехромосомные) двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. Плазмиды расположены в цитоплазме клетки и способны к самостоятельной репликации (вне зависимости от репликации хромосомы). По размерам плазмиды составляют 0,1-5% нуклеоида. Плазмиды имеют молекулярную массу порядка  $10^6$ - $10^8$  Д и содержат  $10^3$ - $10^6$  н.п., формирующих 40-50 генов (рисунок 10.11).

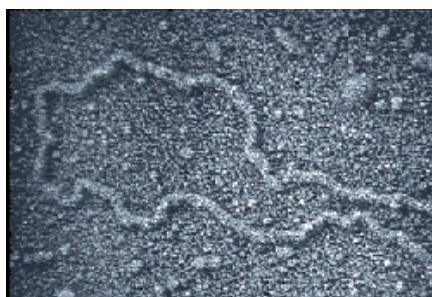


Рисунок 10.11 – Электронная микрофотография молекулы плазмидной ДНК.

Клетка, содержащая плазмиды, обладает дополнительными (селективными) преимуществами по сравнению с бесплазмидными бактериями. При утрате плазмид основные свойства клетки не изменяются.

Для выявления плазмид применяют следующие способы:

- **биофизические** способы основаны на выявлении в клетках плазмидной ДНК с помощью градиентного ультрацентрифугирования или электрофореза;
- **биологические** способы основаны на обнаружении у бактерий дополнительных признаков, не характерных для данного вида микробов.

Количество молекул плазмидной ДНК в клетке характеризуется термином “**копийность плазмид**”. По количеству молекул одного вида плазмид, присутствующих в одной клетке, плазмиды подразделяются на **однокопийные** и **многокопийные**. Мелкие плазмиды присутствуют чаще всего в клетке в большом количестве (10-30 копий на клетку), а крупные плазмиды – в количестве 1-2 копий на клетку. По способности присутствовать в одной клетке одновременно плазмид нескольких видов они подразделяются на **совместимые** и **несовместимые**. Выделяют **автономные** (не связанные с хромосомой бактерии) и **интегрированные** (встроенные в хромосому клетки) плазмиды. Плазмиды также подразделяют на **трансмиссивные** или **конъюгативные**, способные передаваться посредством конъюгации, и **нетрансмиссивные**.

В соответствии с кодируемыми признаками выделяют следующие группы плазмид:

- **F - плазмиды** (половые факторы, плазмиды фертильности);
- **R - плазмиды** (факторы множественной лекарственной устойчивости);
- **Tox - плазмиды** (плазмиды патогенности или токсигенности), объединяют Ent - плазмиды (контролируют синтез энтеротоксина) и Hly - плазмиды (контролируют синтез гемолизина);
- **Col - плазмиды** - факторы бактериоциногенности (детерминируют синтез бактериоцинов);
- **D-плазмиды** – плазмиды биodeградации.

**F-плазмиды** (англ. *fertility* – плодовитость) имеют молекулярную массу около  $60 \cdot 10^6$  Д и контролируют синтез F-пилей (половых ворсинок), способствующих непосредственному контакту бактерий-доноров (F<sup>+</sup>-клеток) с бактериями-реципиентами (F<sup>-</sup>-клетками). Такой контакт играет ведущую роль в передаче генетического материала при конъюгации бактерий (рисунок 10.12).

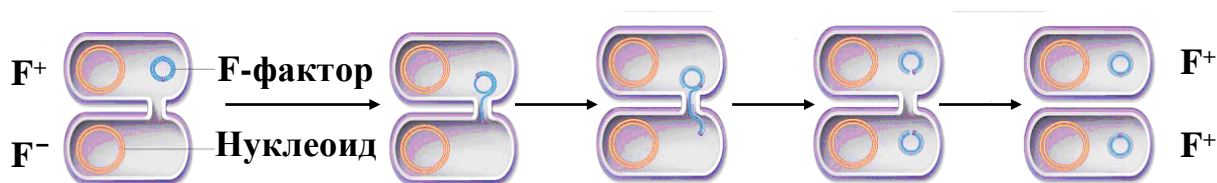


Рисунок 10.12 – Схематическое изображение процесса передачи F-плазмиды.

F-плазмиды могут быть автономными (не связанными с бактериальной хромосомой) и интегрированными (встроенными в бактериальную хромосому). Встроенная в хромосому F-плаزمид обеспечивает высокую частоту рекомбинации

бактерий, поэтому ее обозначают как **Hfr-плазмида** (англ. *high frequency of recombination* - высокая частота рекомбинаций). Перенос ДНК детерминируется тра-опероном (англ. *transfer* - перенос) F-плазмиды (рисунок 10.13).



Рисунок 10.13 – Перенос генов посредством Hfr-плазмиды.

**R-плазмиды** (от *resistance* - устойчивость) представляет собой двуспиральную молекулу ДНК, содержащую гены, детерминирующие устойчивость к антибиотикам. R-плазмиды могут передаваться от одних бактерий другим при трансформации, трансдукции и конъюгации. Передача R-плазмид от одних бактерий к другим способствует возникновению антибиотикоустойчивых штаммов патогенных и условно-патогенных бактерий, что затрудняет химиотерапию вызываемых ими заболеваний. Схематическое изображение одной из R-плазмид представлено на рисунке 10.14.

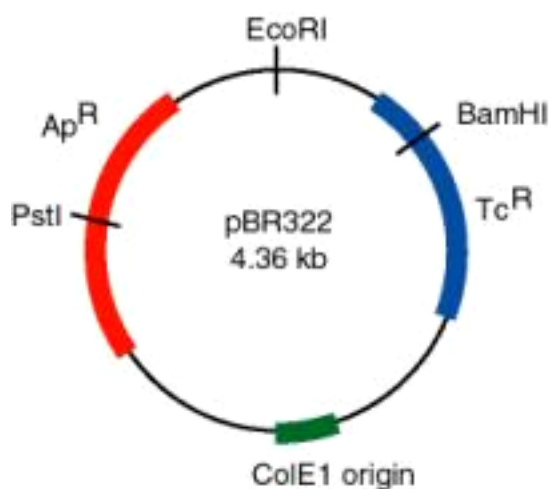


Рисунок 10.14 – Схематическое изображение плазмиды pBR322, детерминирующей устойчивость к ампициллину (Ap) и тетрациклину (Tc).

**Тох-плазмиды** (плазмиды токсигеноости) контролируют свойства



патогенности бактерий. Нередко плазмидные *tox*<sup>+</sup>-гены кодируют синтез интактных протоксинов (например, дифтерийного или ботулинического токсинов), активируемых клеточными протеазами, образование которых контролируют гены бактериальных хромосом. К плазидам патогенности относятся такие плазмиды как Ent-плазмиды, кодирующие синтез энтеротоксинов, Hly-плазмиды, детерминирующие синтез гемолизинов.

**Col-плазмиды** (англ. *colicinogeny* - колициногенность) детерминируют синтез **колицинов** (бактериоцинов), которые подавляют рост и размножение чувствительных к ним родственных бактерий. Этот феномен впервые обнаружил в 1925 г. А. Gratia у кишечной палочки и назвал его **колициногией** (рисунок 10.15).



Рисунок 10.15 – Проявление феномена колициногенности.

В дальнейшем аналогичные белковоподобные вещества были обнаружены у многих видов бактерий, поэтому их стали называть **бактериоцинами**, а феномен - **бактериоциногией**. Бактериоцины обнаружены у кишечной палочки (колицины), возбудителя чумы (пестицины), холерных вибрионов (вибриоцины), стафилококков (стафилоцины) и других бактерий. Col-факторы *E. coli* детерминируют синтез различных типов колицинов (более 25). Col-плазмиды имеют молекулярную массу 25-150·10<sup>6</sup> Д. Способность продуцировать различные типы колицинов используется для типирования бактерий с целью эпидемиологического анализа вызываемых ими заболеваний. Такое типирование осуществляется путем определения типа Col-плазмиды (**колициногенотипирование**) или типа колицина, образуемого патогенными бактериями (**колицинотипирование**), выделенными от больных, контактирующих с ними лиц, а также из окружающей среды.

**D-плазмиды** (плазмиды биодеградации) кодируют синтез ферментов деградации различных соединений (мочевины, толуола, камфоры), необходимых бактериям в качестве источников углерода или энергии. Например, кишечные палочки, выявляемые при инфекциях мочеполового тракта, содержат плазмиду биодеградации мочевины.

**Скрытые (криптические) плазмиды** не содержат генов, которые можно было бы обнаружить по их фенотипическому проявлению. Такие плазмиды выявляются с помощью биофизических методов.

В состав генома некоторых бактерий (как в состав нуклеоида, так и плазмид) входят подвижные (мигрирующие) генетические элементы – отдельные участки ДНК, способные осуществлять собственный перенос (транспозицию) внутри

генома. Транспозиция связана с тем, что подвижные элементы содержат гены, определяющие синтез специфического фермента - **транспозазы**. К мобильным элементам генома относятся вставочные или инсерционные последовательности, транспозоны, интегроны и островки патогенности.

**Вставочные инсерционные последовательности** (IS-элементы, англ. *insertion* - вставка, *sequence* - последовательность) представляют собой короткие фрагменты ДНК, способные целиком перемещаться как из одного участка репликона в другой участок того же репликона, так и между репликонами (например, между нуклеоидом и плазмидами). Их величина в среднем составляет 800-1400 н.п. IS-элементы не способны реплицироваться самостоятельно. Они не кодируют фенотипических признаков, так как не несут структурных генов, а содержат только гены, ответственные за транспозицию (способность IS-последовательностей перемещаться по хромосоме и встраиваться в различные ее участки), то есть ген транспозазы и ген репрессора (рисунок 10.16).

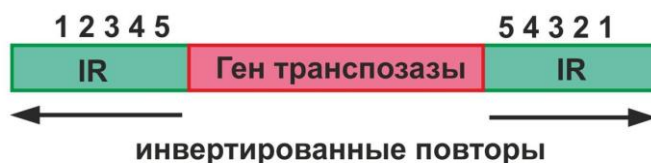


Рисунок 10.16 - Схема строения IS-элемента.

IS-элементы одинаковы у разных бактерий и выполняют следующие функции:

- обеспечение рекомбинации транспозонов, плазмид и умеренных фагов с нуклеоидом бактериальной клетки и между собой;
- инактивация генов, расположенных в области интеграции IS-элемента;
- индукция мутаций при встраивании в бактериальную хромосому.

**Транспозоны (Тп-элементы)** - это сегменты ДНК, способные как и IS-элементы к перемещению внутри репликона и между репликонами. Однако в отличие от IS-элементов транспозоны имеют более крупные размеры, так как содержат структурные гены, определяющие фенотипически проявляющиеся признаки (токсигенность, биохимические свойства, устойчивость к антибиотикам). В связи с этим транспозоны легко выявляются. Они состоят из 2000-25000 пар нуклеотидов, содержат фрагмент ДНК, несущий специфические гены, и два концевых длинных инвертированных повтора, которые могут состоять из IS-элементов (рисунок 10.17).



Рисунок 10.17 - Схема строения транспозона.

Транспозоны легко перемещаются по хромосоме. При включении в бактериальную хромосому и исключении из нее транспозоны могут вызывать различные виды мутаций (делеции, дупликации, инверсии). Транспозоны не способны к самостоятельной репликации и проявляют свои свойства только в составе другого репликона (бактериальной хромосомы или плазмиды). Транспозоны легко перемещаются с одного репликона на другой (например, с бактериальной хромосомы на плазмиду или ДНК фага). Это способствует широкому распространению транспозонов в бактериальной популяции.

**Интегроны** представляют собой генетические элементы, которые содержат ген интегразы *int*, промотор Р и специфические сайты (участки встраивания) *att* (рисунок 10.18).

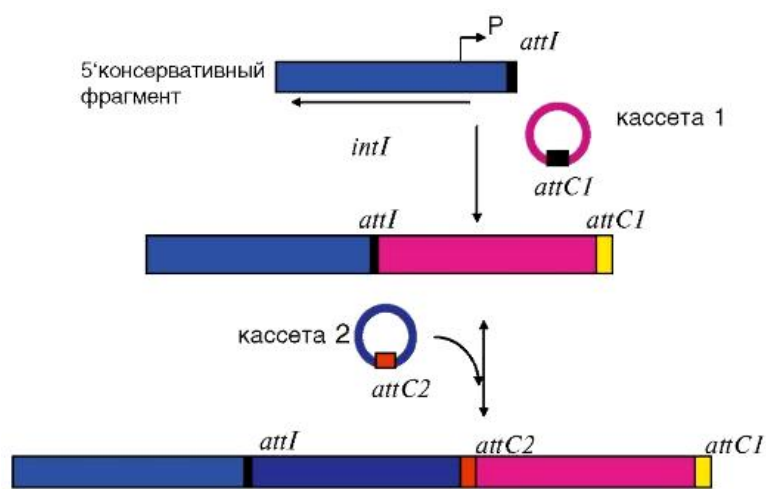


Рисунок 10.18 – Схема строения интегрона.

Такое строение придает интегронам способность захватывать и встраивать в себя небольшие элементы ДНК (мобильные генные кассеты) и экспрессировать присутствующие в их составе гены. Интегроны часто инкорпорируются в плазмиды.

**Островки патогенности** представляют собой участки ДНК размером от 10000 до 200000 п.о. Они содержат до нескольких десятков генов, детерминирующих факторы патогенности бактерий. Участки генома, схожие с островками патогенности, но лишённые генов патогенности, называются геномными или метаболическими островками. Островки патогенности по флангам имеют прямые повторы (DR) или IS-элементы, содержат гены “подвижности” (интегразы, транспозазы) и располагаются вблизи генов тРНК (рисунок 10.19).

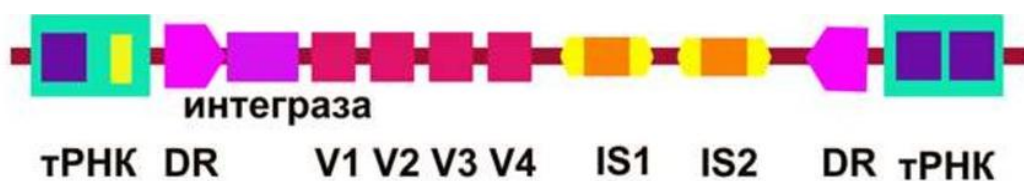


Рисунок 10.19 – Схема строения островков патогенности.

Разные участки островков патогенности приобретены бактериями в разное

время от разных хозяев в результате горизонтального переноса. Большинство островков патогенности локализовано на хромосоме бактерий (*Salmonella*), но они также могут находиться в составе плазмид (*Shigella*) и фаговых ДНК (*V. cholerae* O1, O139).

## 10.2. Изменчивость бактерий

У бактерий различают 2 вида изменчивости - фенотипическую и генотипическую. **Фенотипическая изменчивость** (ненаследственная, модификационная) - это изменение свойств бактерий под влиянием факторов внешней среды без изменения их генетического аппарата. Другими словами фенотипическая изменчивость - это приспособительные реакции бактерий на изменение условий внешней среды. Фенотипическая изменчивость возникает с высокой частотой, а фенотипически измененные бактерии часто реверсируют в исходную форму.

Характерные черты фенотипической изменчивости:

1. Сохранение исходного генотипа и отсутствие передачи по наследству.
2. Причины фенотипической изменчивости - влияние внешних факторов (биологических, химических, физических), блокирующих на время нормальную работу какого-либо фермента.
3. Реверсия к исходным признакам при восстановлении нормальных условий культивирования.

Проявления фенотипической изменчивости:

- изменение морфологических признаков (изменение формы и размера клеток, утрата капсулы, жгутиков);
- изменение культуральных свойств (диссоциация культур, образование R- и S-форм колоний);
- изменение биохимической активности.

**Изменчивость морфологических признаков.** Под влиянием физических, химических или биологических агентов у многих микроорганизмов наблюдается изменение формы и размеров клеток. Например, при добавлении стрептомицина к питательной среде клетки сальмонелл значительно удлиняются. При длительном культивировании на питательных средах кишечная палочка принимает кокковидную форму, дифтерийная палочка образует нитевидные или дрожжеподобные формы. Присутствие в питательной среде небольшой концентрации этилового спирта подавляет образование жгутиков у бактерий. Изменение морфологических свойств бактерий представлено на рисунке 10.20.



Рисунок 10.20 – Изменение размеров и формы бактерий при длительном культивировании на агаре.

**Культуральная изменчивость** проявляется в образовании колоний разной величины и формы (рисунок 10.21).

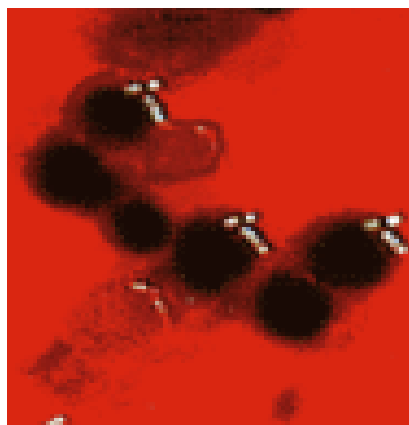


Рисунок 10.21 – Изменение формы колоний при длительном выращивании бактерий.

Одной из форм культуральной изменчивости бактерий является **диссоциация** колоний. При посеве на мясо-пептонный агар в чашки Петри микроорганизмы образуют колонии двух основных типов: **S-форма** - гладкие колонии (от англ. *smooth* - гладкий); **R-форма** - шероховатые колонии (от англ. *rough* - шероховатый). Феномен образования бактериями разных форм колоний впервые описали в 1917 г. австрийский микробиолог Эдмунд Вейль (1880-1922 гг.) и чехословацкий бактериолог Артур Феликс (1887-1956 гг.). Диссоциация сопровождается изменением биохимических, морфологических, антигенных и патогенных свойств возбудителей.

**Свойства клеток из колоний R-формы:**

Колонии шероховатые, морщинистые, края колоний изрезанные.

Жгутики отсутствуют.

Капсула (слизистый слой) отсутствует.

Биохимическая активность снижена.

Вирулентность для лабораторных животных снижена.

Антигенная структура неполноценная.

Чувствительность к фагу снижена.

Клетки полиморфные.

### **Свойства клеток из колоний S-формы:**

Колонии прозрачные, с гладкой блестящей поверхностью, круглые, с ровными краями, выпуклые.

У подвижных видов имеются жгутики.

Хорошо выражена капсула или слизистый слой.

Выраженная биохимическая активность.

Высокая вирулентность.

Антигенная полноценность.

Чувствительность к фагу выражена.

Клетки типичной формы и размеров.

Большинство патогенных микробов образует колонии S-формы. Некоторые патогенные бактерии (например, *B. anthracis*) на обычных питательных средах образуют колонии R-формы, сохраняя при этом вирулентные свойства.

**Изменчивость ферментативных (биохимических) свойств** обусловлена способностью бактерий синтезировать адаптивные ферменты. Эти ферменты вырабатываются на определенных питательных субстратах и предопределены генотипом. Например, кишечная палочка, растущая на среде без лактозы, не синтезирует разлагающий лактозу фермент, но если пересеять культуру на среду с лактозой, то она начнет вырабатывать этот фермент. Адаптивные ферменты позволяют микробам приспосабливаться к определенным условиям существования.

**Генотипическая (наследственная) изменчивость** - это изменение свойств бактерий в результате “поломок” генетического материала под влиянием различных факторов. Генотипическая изменчивость сопровождается передачей приобретенных признаков по наследству. Ей присущи низкая частота возникновения и редкая реверсия в исходную форму.

Выделяют 2 **формы генотипической изменчивости:**

- **мутации** - изменение последовательности азотистых оснований в ДНК;
- **рекомбинации** - перенос участков ДНК от бактерии-донора в бактерио-реципиент.

**Мутации** (*mutatio* - изменение) – это скачкообразные изменения свойств бактерий. Термин “мутация” предложил голландский ботаник Хуго де Фриз как “скачкообразное изменение наследственного признака” у растений. Позднее голландский микробиолог Мартин Бейеринк распространил это понятие на бактерии (рисунок 10.22).

Отечественные микробиологи Г.А. Надсон и Г.С. Филиппов установили, что после воздействия ионизирующим излучением на дрожжевые клетки возникали разнообразные расы, свойства которых воспроизводились в потомстве.

Мутация – это качественное или количественное изменение первичной структуры ДНК, в результате которого утрачивается или изменяется какой-либо признак или группа признаков. Эти изменения могут возникать под влиянием эндогенных или экзогенных факторов. Бактерии с измененными признаками называются **мутантами**.

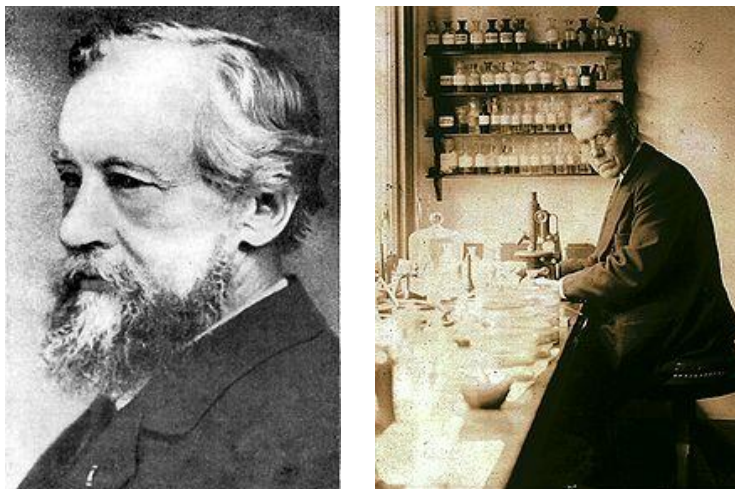


Рисунок 10.22 – А - Хуго де Фриз (Hugo de Vries, 1848 – 1935 гг.), Б - Мартин Бейеринк (Martinus Willem Beijerinck, 1851 – 1931 гг.).

### Классификация мутаций:

#### 1. По происхождению:

- спонтанные (внутренние) мутации;
- индуцированные (внешние) мутации.

#### 2. По протяженности:

- точечные мутации;
- генные мутации;
- хромосомные мутации.

#### 3. По направленности:

- прямые мутации;
- обратные мутации.

#### 4. По локализации:

- хромосомные мутации;
- плазмидные мутации.

#### 5. По функции:

- летальные мутации;
- сублетальные мутации;
- нейтральные мутации.

#### 6. По фенотипу:

- морфологические мутации;
- функциональные мутации (резистентность, ауксотрофность).

Причинами мутаций могут быть внутренние и внешние факторы. Соответственно этому выделяют спонтанные и индуцированные мутации.

**Спонтанные (самопроизвольные) мутации** возникают под влиянием внутренних (эндогенных) факторов в результате ошибок ДНК-полимеразы во время репликации ДНК или в результате недостаточности механизмов репарации, то есть исправления ошибок. Частота спонтанных мутаций достигает  $1 \cdot 10^{-5}$  -  $1 \cdot 10^{-10}$ . Наиболее распространенным типом спонтанных мутаций у бактерий является **ауксотрофность**, то есть утрата способности к синтезу какого-либо соединения. Такой мутант называют ауксотрофным по данному соединению. В норме почти все ошибки ДНК-полимеразы исправляются с помощью ферментов репараз. Однако

некоторые спонтанные мутации могут закрепиться в потомстве. Например, Л. Пастер в 1881 г. получил вакцину против сибирской язвы, выращивая возбудитель в течение длительного времени при повышенной температуре (42,5°C). А. Кальмет и Ш. Герен в 1919 г. путем длительных пассажей на питательной среде получили вакцинный штамм микобактерий туберкулеза (вакцину БЦЖ).

**Индукцированные (направленные) мутации** возникают под действием внешних химических, физических или биологических факторов. Частота возникновения индуцированных мутаций достигает  $10^{-7}$ - $10^{-4}$ , то есть во много раз выше частоты спонтанных мутаций. Физические факторы, вызывающие мутации, называются **мутагенными факторами**. К ним относятся разные виды излучений. Химические вещества, вызывающие мутации, называются **мутагенами**. К мутагенам относятся, в частности, соли азотистой кислоты и акридиновые красители. Бактерии с измененными признаками называются **мутантами**.

Мутации, приводящие к потере функции, называются **прямыми**. Восстановление исходных свойств называется **реверсией**. При реверсии исходный генотип может восстанавливаться (**обратная мутация**) или восстановления исходного генотипа не происходит (**супрессорная мутация**).

По протяженности (количеству мутировавших генов) выделяют точечные, генные и хромосомные мутации. **Точечные мутации** затрагивают чаще всего одно основание, **генные мутации** – один ген, а **хромосомная мутация** – несколько генов. При некоторых мутациях образуется бессмысленный кодон, не кодирующий ни одну из аминокислот. Такие мутации называют бессмысленными или **нонсенс-мутациями**.

**Нейтральные мутации** фенотипически не проявляются какими-либо изменениями признаков. Условно-летальные (**сублетальные**) мутации приводят к изменению функциональной активности синтезируемого фермента, но не к утрате синтетической способности. **Летальные мутации** характеризуются полной утратой способности синтезировать жизненно важные для бактериальной клетки ферменты.

Выделяют следующие **типы мутаций**.

**Делеция** - это выпадение одного или нескольких пуриновых или пиримидиновых оснований (рисунок 10.22).

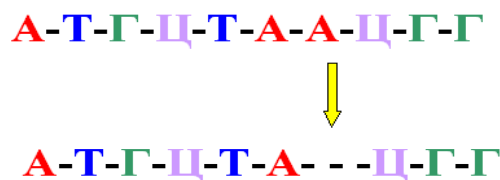


Рисунок 10.23 – Схема формирования делеций.

**Инсерция** – это вставка одного или нескольких пуриновых или пиримидиновых оснований (рисунок 10.24).



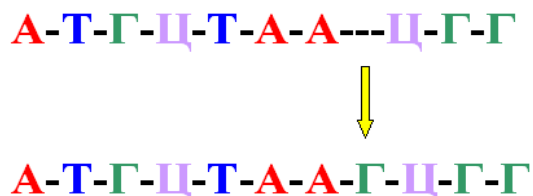


Рисунок 10.24 – Схема формирования инсерций.

**Транзиция** - это замена пурина на пурин или пиримидина на пиримидин (рисунок 10.25).

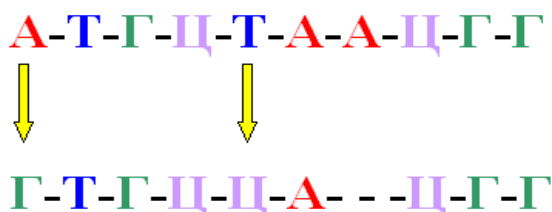


Рисунок 10.25 – Схема формирования транзиций.

**Трансверсия** - это замена пурина на пиримидин или пиримидина на пурин (рисунок 10.26).

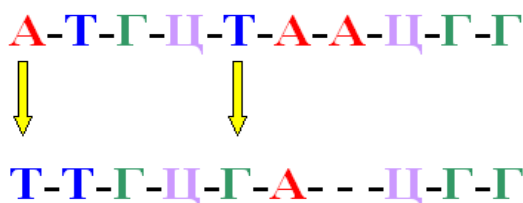


Рисунок 10.26 - Схема формирования трансверсий.

**Дупликация** – это удвоение количества пуриновых или пиримидиновых оснований (рисунок 10.27).

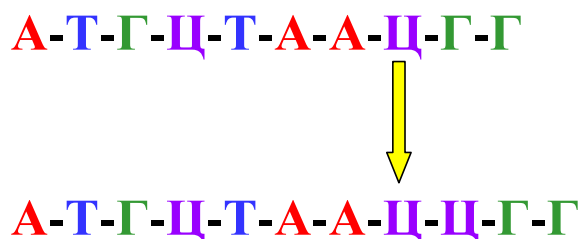


Рисунок 10.27 – Схема формирования дупликаций.

**Дислокация** (транслокация) – это перемещение пуриновых или пиримидиновых оснований (рисунок 10.28).

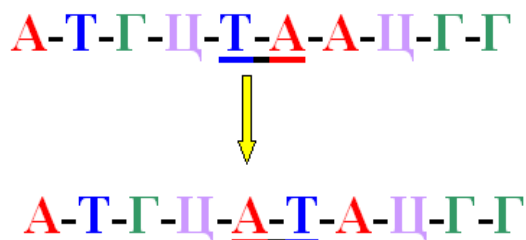


Рисунок 10.28 – Схема возникновения дислокаций.

**Инверсия** – это переворот пуриновых или пиримидиновых оснований относительно друг друга (рисунок 10.29).

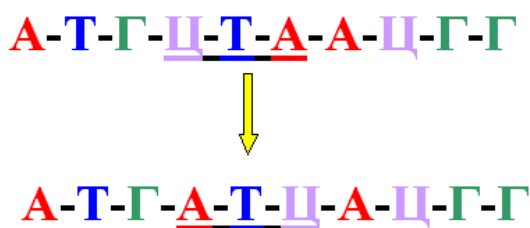


Рисунок 10.29 – Схема формирования инверсий.

Некоторые химические вещества значительно повышают частоту мутаций. В частности, **аналоги азотистых оснований** включаются в молекулу ДНК и вызывают вставку некорректного основания при репликации. Бромурацил, включаясь в ДНК, узнаётся полимеразой как цитозин, в результате чего вместо аденина включается гуанин. **Азотистая кислота** дезаминирует азотистые основания. **Интеркалирующие агенты** (акридиновые красители) внедряются между основаниями ДНК и вызывают увеличение расстояния между ними, что приводит к утрате нуклеотидов или включению дополнительной пары нуклеотидов.

В мутантных клетках существуют механизмы, способные полностью или частично восстанавливать исходную структуру ДНК. Способность исправлять повреждения в молекуле ДНК называется **репарацией**. Репарация осуществляется специальными ферментными системами клетки. Клеточные ферменты репарации выполняют строго определенные функции:

- ферменты, узнающие измененные участки ДНК и осуществляющие разрыв цепи рядом с поврежденным участком;

- ферменты, удаляющие поврежденные участки ДНК;

- ферменты, синтезирующие участок ДНК взамен удаленного;

- ферменты, восстанавливающие непрерывность цепи ДНК.

У бактерий выделяют 3 основных механизма репарации:

- **прямая репарация** (исходная структура нуклеотидов восстанавливается в одну стадию);

- **эксцизионная репарация** (удаление поврежденных оснований с последующим восстановлением исходной структуры ДНК);

- **пострепликативная репарация** (после репликации образуется ДНК, имеющая одноцепочечные бреши, которые заполняются в процессе рекомбинации).

К прямой репарации относится **световая репарация** или **фотореактивация** (исправление повреждения ДНК под действием УФ-лучей). Световая репарация осуществляется с помощью таких ферментов как фотолиаза, метилтрансфераза, инсертаза, гликозилаза. Под действием конкретного фермента безошибочно восстанавливается исходная структура ДНК.

При эксцизионной репарации место повреждения распознается эндонуклеазой, которая расщепляет ДНК вблизи дефекта. Затем поврежденный фрагмент удаляется, а в образовавшуюся брешь при помощи ДНК-полимеразы встраиваются отсутствующие нуклеотиды (ресинтез нуклеотидной цепи на основе неповрежденной матрицы). Схема репарации ДНК представлена на рисунке 10.30.

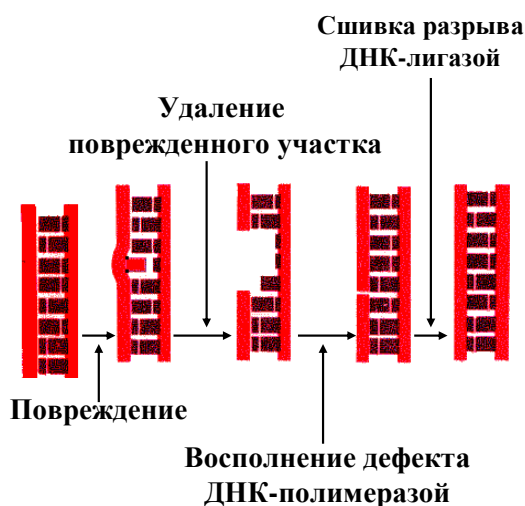


Рисунок 10.30 – Схема репарации ДНК.

**Рекомбинация** - это изменчивость, обусловленная переносом участка ДНК от бактерии-донора в бактерию-реципиент. У бактерий выделяют гомологичная и сайт-специфическую рекомбинация. **Гомологичная рекомбинация** происходит под контролем генов REC-системы (гены *recA*, *B*, *C*, *D*). Рекомбинируют ДНК с высокой степенью гомологии. **Сайт-специфическая рекомбинация** не зависит от REC-системы и гомологии ДНК. Наблюдается при встраивании плазмид и умеренных фагов в определенные участки бактериальной хромосомы за счет IS-элементов.

Рекомбинация у бактерий происходит при реализации следующих механизмов:

- трансформация;
- конъюгация;
- трансдукция.

**Трансформация** (преобразование, перестройка) - это изменение свойств бактерий в результате поступления (поглощения, искусственного введения) в клетку-реципиент свободного фрагмента ДНК, изолированного из клетки-донора. Трансформация возможна как *in vivo*, так и *in vitro*. Явление трансформации открыл в опытах на пневмококках в 1928 г. английский генетик Ф. Гриффит (рисунок 10.31).



Рисунок 10.31 – Фредерик Гриффит (Frederick Griffith, 1879 - 1941 гг.).

Эксперимент Ф. Гриффита заключался в следующем. Пневмококки на питательном агаре могут образовывать колонии S- и R-формы. Пневмококки, синтезирующие капсулу, формируют на плотной питательной среде гладкие колонии S-формы. При введении мышам капсульных пневмококков отмечается гибель животных (рисунок 10.32).

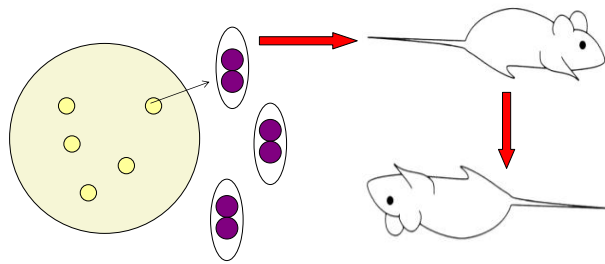


Рисунок 10.32 – Патогенность для мышей капсульных пневмококков.

Бескапсульные пневмококки на питательном агаре образуют шероховатые колонии R-формы. При введении мышам бескапсульных клеток животные остаются живыми (рисунок 10.33).

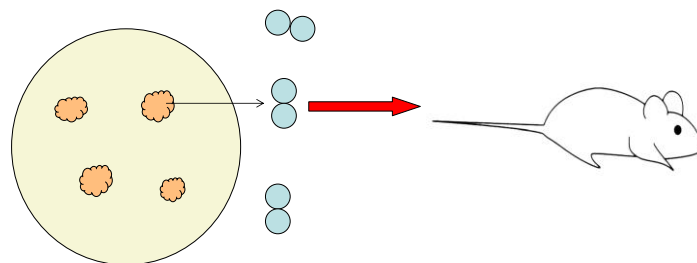


Рисунок 10.33 – Патогенность для мышей бескапсульных пневмококков.

При кипячении бактериальной суспензии капсульные клетки погибают и при введении мышам гибели животных не отмечается (рисунок 10.34).

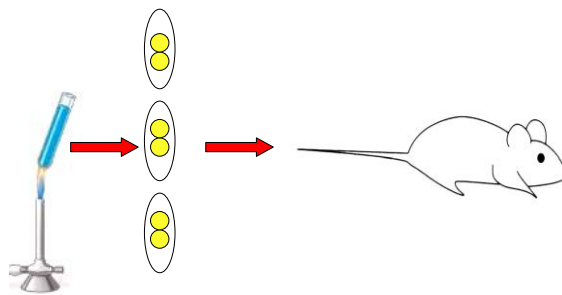


Рисунок 10.34 – Результат введения мышам убитых капсульных клеток.

Однако смесь убитых капсульных клеток и живых бескапсульных пневмококков вызывает гибель мышей. В этом случае из органов павших животных на питательном агаре высеваются капсульные пневмококки, образующие колонии S-формы (рисунок 10.35).

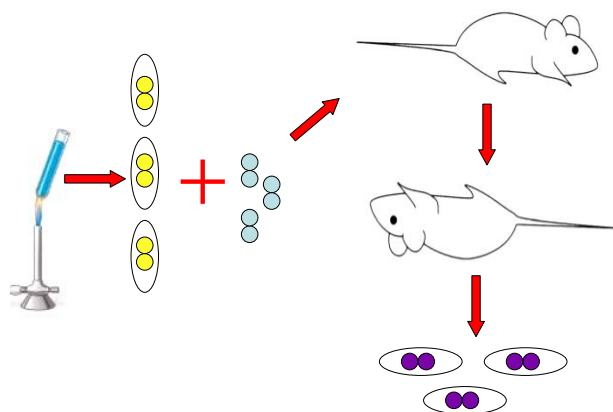


Рисунок 10.35 – Результат введения мышам смеси убитых капсульных и живых бескапсульных пневмококков.

Следовательно, в организме мышей (*in vivo*) происходит превращение (трансформация) бескапсульных клеток в капсульные клетки под воздействием какого-то фактора из убитых капсульных пневмококков. Длительное время механизм этого явления оставался неизвестным. Только в 1944 г. американские биологи О. Эвери, К. Маклауд и М. Маккарти установили причину превращения бескапсульных пневмококков в капсульные клетки. Для установления природы трансформирующего агента они выделили из убитой культуры капсульного пневмококка отдельные фракции белков, полисахаридов, РНК и ДНК. Каждую фракцию они смешивали с живой культурой бескапсульного пневмококка и вводили в организм белых мышей, отчасти повторив опыт Ф. Гриффита (рисунок 10.36):

- введение живых бескапсульных пневмококков не вызывает гибели лабораторных животных (1);
- введение живых капсульных пневмококков приводит к гибели лабораторных животных (2);
- введение ДНК капсульных клеток не вызывает гибели животных (3);
- введение смеси живых бескапсульных клеток и ДНК капсульных клеток приводит к гибели мышей (4).

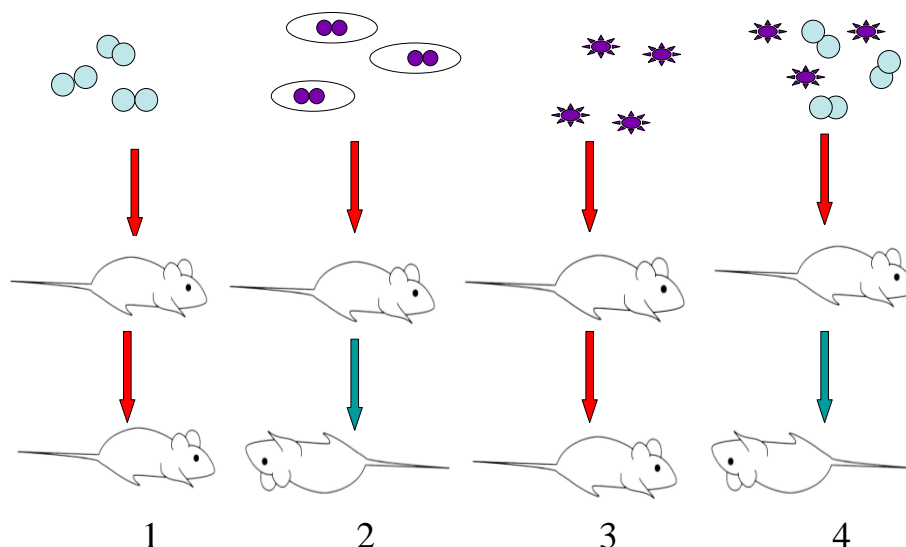


Рисунок 10.36 – Эксперимент О. Эвери, К. Маклауда и М. Маккарти (пояснения в тексте).

Этим экспериментом они установили, что изменение признаков происходит в результате поглощения бескапсульными клетками в организме животных ДНК капсульных клеток. Дальнейшее изучение этого явления показало, что к поглощению ДНК способны не все клетки, а только те, которые находятся в определенном физиологическом состоянии (состоянии компетентности). **Состояние компетентности** вызывает специальный низкомолекулярный белок (**фактор компетентности**), который бактерии синтезируют при определенных условиях выращивания. Максимальное число компетентных клеток наблюдается в конце стадии логарифмического роста бактерий. Фактор компетентности способствует синтезу аутолизина, эндонуклеазы и ДНК-связывающего белка, которые обуславливают проникновение нуклеиновой кислоты в реципиентную клетку. Трансформирующая ДНК адсорбируется на ДНК-связывающем белке, затем проникает внутрь клетки и встраивается в гомологичный участок хромосомы реципиента.

В трансформации может участвовать как хромосомная, так и плазмидная ДНК. Хромосомные гены после проникновения в реципиентную клетку встраиваются в хромосому бактерии, а плазмидные гены либо интегрируются в хромосому реципиента, либо сохраняются в автономном состоянии (рисунок 10.37).

При трансформации реципиенту могут быть перенесены различные признаки (например, синтез ферментов и капсульного полисахарида, устойчивость к антибиотикам). Феномен трансформации воспроизводится в опытах с разными патогенными и непатогенными бактериями: бациллами, стрептококками, менингококками и др. Наиболее эффективно трансформация протекает у близкородственных бактерий.

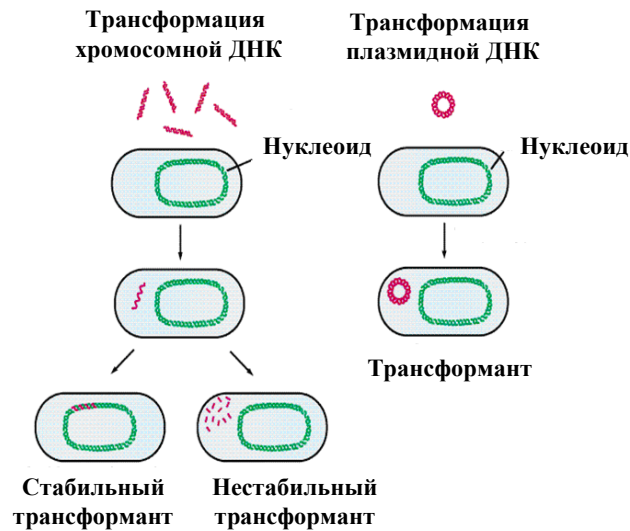
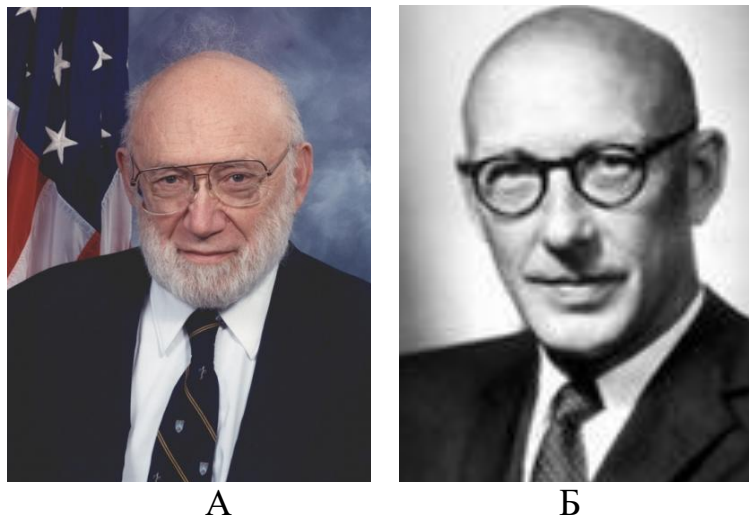


Рисунок 10.37 – Трансформация бактерий посредством хромосомной и плазмидной ДНК.

В 1946 г. американские генетики и биохимики Д. Ледерберг и Э. Тейтем (рисунок 10.38) описали другой способ переноса генетического материала от одной бактерии в другую - **конъюгацию** (лат. *conjugatio* - соединение).



А

Б

Рисунок 10.38 - А - Джошуа Ледерберг (Joshua Lederberg, 1925-2008 гг.), Б - Эдвард Тейтем (Edward Lawrie Tatum, 1909-1975 гг.).

Конъюгация - это передача генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент при их непосредственном контакте через конъюгационный мостик. Способность одной бактериальной клетки конъюгировать с другой связана с наличием F-плазмиды (англ. *fertility* - плодовитость). Бактериальные клетки, не имеющие F-плазмиды, не способны быть донорами, они обозначаются как  $F^-$ -клетки (женские клетки). Клетки, имеющие F-фактор, обозначаются как  $F^+$ -клетки (мужские клетки). Перенос информации происходит в одном направлении: от  $F^+$ -клетки к  $F^-$ -клетке. Конъюгационный мостик образуют половые ворсинки - *sex-пили* (рисунок 10.39).



Рисунок 10.39 – Конъюгационный мостик.

При контакте  $F^+$ -клетки передают реципиенту  $F$ -плазмиду в виде цельной структуры, при этом  $F^-$ -клетки превращаются в  $F^+$ -клетки и становятся способными к дальнейшей конъюгации. При наличии в клетках-донорах  $Hfr$ -плазмид при конъюгации происходит передача в клетку-реципиент фрагмента бактериальной хромосомы.

Механизм конъюгации состоит в том, что  $F$ -плазида кодирует эндонуклеазу, разрезающую одну из нитей плазмидной ДНК в определенной точке. Затем разрезанная цепь раскручивается и 5'-концом продвигается в клетку-реципиент. В самом начале поступающей в реципиентную клетку нити плазмидной ДНК расположены антирестрикционные гены, которые детерминируют синтез белков, препятствующих разрушению ДНК клеточными ферментами реципиента. В реципиентной клетке на основе поступившей нити ДНК восстанавливается двунитевая структура плазмиды. Оставшаяся в клетке донора нить ДНК является матрицей для синтеза второй нити. Весь процесс длится несколько минут (рисунок 10.40).

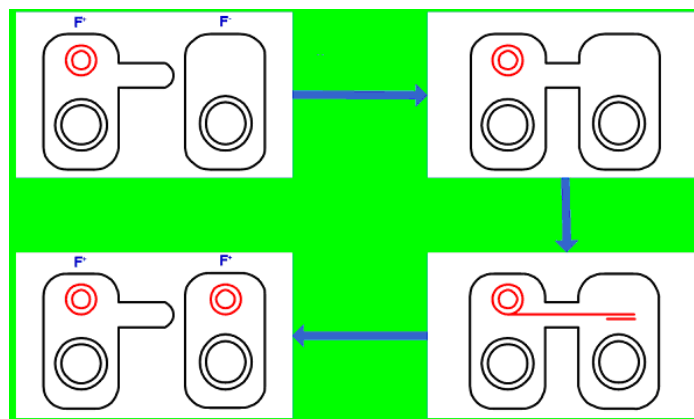


Рисунок 10.40 – Процесс конъюгации.

Перенос с помощью  $F$ -плазмид хромосомных генов возможно только в случае интеграции плазмиды в бактериальную хромосому ( $Hfr^+$ -клетки). В этом случае перенос ДНК начинается с разрыва одной из нитей ДНК в месте включения  $F$ -фактора. Затем одна цепь ДНК переносится в реципиентную клетку, а другая цепь остается в клетке-доноре. При таком переносе с высокой частотой передаются хромосомные гены, расположенные вблизи начала переноса. После переноса в



клетке-реципиенте происходит гомологичная рекомбинация между привнесенной донорской ДНК и собственной ДНК реципиента.

В 1952 г. Джошуа Ледерберг и Нортон Циндер в опытах на сальмонеллах открыли еще один вид генетического обмена – трансдукцию. **Трансдукция** - это процесс передачи ДНК от клетки-донора в клетку-реципиент при участии бактериофагов. Трансдуцирующими свойствами обладают только **умеренные** фаги. Размножаясь в клетке-доноре, фаги включают в состав своего генома часть бактериальной ДНК. В дальнейшем, проникая в реципиентную клетку, они передают ей ДНК донора. Образующийся в результате трансдукции рекомбинант называется **трансдуктантом** (рисунок 10.41).

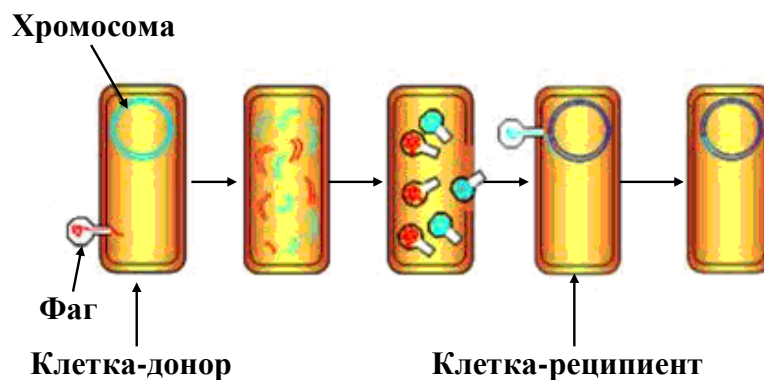


Рисунок 10.41 – Процесс трансдукции.

Различают **3 типа трансдукции**:

- неспецифическая (общая) трансдукция;
- специфическая трансдукция;
- abortивная трансдукция.

**Неспецифическая трансдукция** – это процесс, при котором ДНК фага встраивается в различные участки хромосомы бактерии и переносит случайные гены. При этом фаг выступает в качестве “пассивного” переносчика генетического материала бактерий. При неспецифической трансдукции в реципиентные клетки могут быть перенесены гены, определяющие синтез ферментов, аминокислот, пуринов, пиримидинов, гены резистентности к антибиотикам и др. При неспецифической трансдукции фаг может утратить часть своего генома и стать дефектным. Привнесенный фагом фрагмент ДНК клетки-донора способен включаться в гомологическую область ДНК клетки-реципиента.

**Специфическая трансдукция** – это процесс, при котором бактериофаг встраивается в строго определенный участок генома бактерии и переносит только определенные гены. Например, ДНК умеренного бактериофага  $\lambda$  кишечной палочки всегда встраивается между генами *gal* и *bio*. При активации такой фаг захватывает только рядом расположенную строго определенную область хромосомы и передает ее реципиентной клетке - либо ген *gal*, либо ген *bio* (рисунок 10.42).

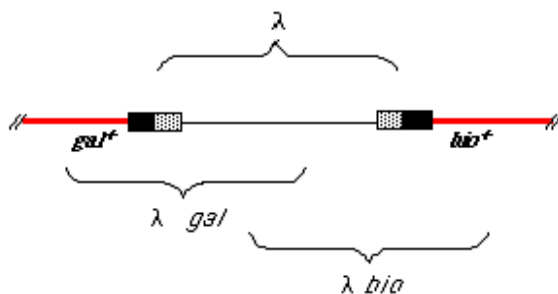


Рисунок 10.42 – Схема специфической трансдукции.

**Абортивная трансдукция** – это перенос фагом из одной клетки в другую участка ДНК, который не включается в геном реципиента. При таком переносе проявления нового признака не наблюдается. При абортивной трансдукции привнесенный фрагмент ДНК передается только одной из двух дочерних клеток (рисунок 10.43).

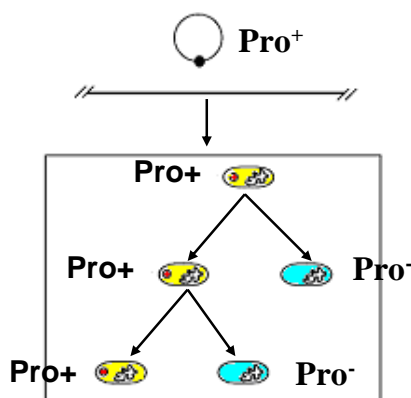


Рисунок 10.43 – Схема абортивной трансдукции.

При трансдукции возможен перенос генов, контролирующих питательные потребности бактерий, их устойчивость к лекарственным препаратам, подвижность и другие свойства. Приобретение бактериями новых свойств с помощью трансдуцирующих фагов называется **лизогенией**.

В 1958 г. Д. Ледерберг, Дж. Бидл и Э. Тейтем были удостоены Нобелевской премии за фундаментальные исследования организации генетического материала у бактерий.

### 10.3. Понятие о генной инженерии

Микроорганизмы широко используются в производстве антибиотиков, аминокислот, ферментов и других соединений. В качестве продуцентов применяют бактерии, селекционированные по уровню синтеза целевых продуктов. Для селекции продуцентов применяют как традиционные методы (отбор по продуктивности, искусственный мутагенез), так и генную инженерию.

**Генная (генетическая) инженерия** - это раздел молекулярной биологии, исследующий возможность создания лабораторным путем новых генетических

структур и наследственно измененных организмов. Такие исследования обозначают также как **технология рекомбинантных ДНК** или **молекулярное клонирование**. В основе генетической инженерии лежит целенаправленное манипулирование с фрагментами нуклеиновых кислот. В 1970 г. швейцарский микробиолог В. Арбер и американские микробиологи Д. Натанс и О.С. Хамилтон (рисунок 10.44) открыли рестрикционные ферменты.



А

Б

В

Рисунок 10.44 - А - Вернер Арбер (Werner Arber, родился в 1929 г.), Б - Даниел Натанс (Daniel Nathans, 1928 – 1999 гг.), В - Отанел Смит Хамилтон (Othanel Smith Hamilton, родился в 1931 г.).

Учеными было установлено, что в клетках бактерий синтезируются два вида ферментов. Одни из них (**эндонуклеазы**) расщепляют чужеродную ДНК, проникшую в клетку. Другие ферменты (**метилазы**) модифицируют проникшую ДНК, делая ее устойчивой к воздействию эндонуклеаз. Эти исследования привели к открытию широкого круга ферментов рестрикции, позволяющих разрезать молекулы ДНК на фрагменты в строго определенных участках. В 1978 г. В. Арбер, Д. Натанс и С. Хамилтон были удостоены Нобелевской премии в области медицины и физиологии.

В 1972 г. американский биохимик П. Берг (рисунок 10.45) получил первую рекомбинантную молекулу ДНК на основе фага лямбда и галактозного оперона кишечной палочки.



Рисунок 10.45 – Пол Наим Берг (Paul Naim Berg, родился в 1926 г.).

В 1973 г. английский биохимик Ф. Сенгер (рисунок 10.46) показал, что после ферментативного расщепления молекулы ДНК возможно реконструировать ее двухцепочечную структуру по шаблону одинарной цепи. Этот метод позволяет устанавливать нуклеотидную последовательность ДНК.



Рисунок 10.46 – Фредерик Сенгер (Frederick Sanger, родился в 1918 г.).

В 1977 г. американские ученые У. Гилберт (рисунок 10.47) и А. Мексем разработали процедуру установления нуклеотидной последовательности ДНК – метод секвенирования.



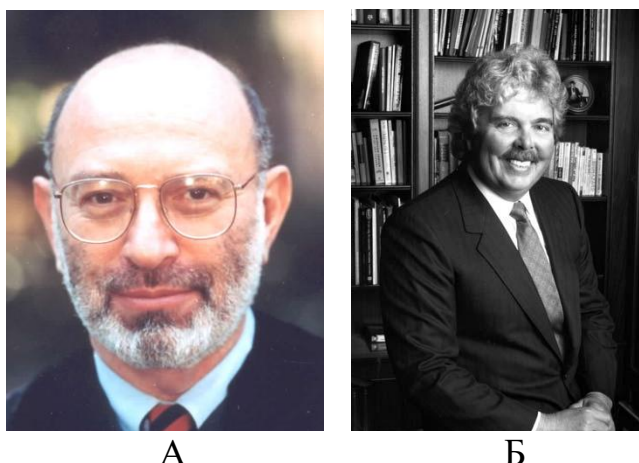
Рисунок 10.47 – Уолтер Гилберт (Walter Gilbert, родился в 1932 г.).

В 1980 г. Ф. Сенгер, У. Гилберт и П. Берг были удостоены Нобелевской премии за фундаментальные исследования нуклеиновых кислот.

В 1973 г. американские ученые С. Коэн и Г. Бойер (рисунок 10.48) в плазмиду одной бактерии встроили фрагмент плазмиды другой бактерии и показали возможность функционирования химерной (искусственно созданной) молекулы ДНК в клетках *E. coli*.

С тех пор генетически измененные (модифицированные) организмы получают либо путем введения нужного гена из генома одного организма в геном другого организма, либо путем встраивания в геном бактерии искусственно синтезированного гена. С помощью методов генетической инженерии возможно увеличить количество вырабатываемого микроорганизмами необходимого продукта (аминокислот, ферментов, полисахаридов); осуществлять перенос генов млекопитающих в клетки микроорганизмов (бактерии, дрожжи) для получения

гормонов, интерферонов, ферментов, иммуноглобулинов; генетически изменять соматические клетки человека, страдающего наследственными заболеваниями.



А

Б

Рисунок 10.48 – А - Стэнли Коэн (Stanley Cohen, родился в 1935 г.), Б - Герберт Бойер (Herbert Boyer, родился в 1936 г.).

Для создания генетически измененных организмов подбирают **вектор** - молекулу ДНК, способную к самостоятельной репликации в клетке-реципиенте. Затем выделяют требуемый для клонирования ген, соединяют его с вектором и полученную рекомбинантную молекулу ДНК вводят в подходящую клетку-реципиент. Таким образом, при конструировании рекомбинантной молекулы ДНК можно выделить следующие этапы:

1. Подбор вектора – молекулы ДНК, способной к репликации в клетке.
2. Выделение интересующих генов из ДНК клетки - донора.
3. Создание рекомбинантной генетической конструкции:
  - 3.1. Разрезание (рестрикция) ДНК донора и ДНК вектора специфическими ферментами – рестриктазами (генетическими ножницами).
  - 3.2. Соединение (лигирование) ДНК донора и ДНК вектора с помощью специфических ферментов - лигаз.
4. Введение полученной рекомбинантной молекулы ДНК в реципиентную клетку.
5. Отбор и идентификация клеток, экспрессирующих введенный ген.

В качестве вектора используют плазмиды, фаги или вирусы. Вектор должен содержать маркерные гены, которые придают клетке – реципиенту новые свойства, позволяющие отличить эту бактериальную клетку от исходных клеток. Чаще всего в качестве вектора применяют R-плазмиды, так как они позволяют проводить селекцию гибридных клонов по признаку устойчивости к антибиотикам. Схема клонирования чужеродного гена в бактериальной клетке представлена на рисунке 10.49.

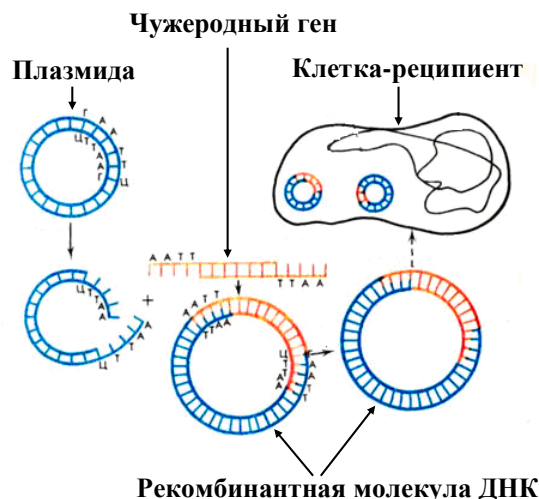


Рисунок 10.49 - Схема получения рекомбинантной молекулы ДНК.

При конструировании рекомбинантной ДНК используют специфические ферменты – рестриктазы и лигазы. **Рестриксционные эндонуклеазы или рестриктазы** узнают и расщепляют определенные последовательности ДНК, специфические для каждого фермента по длине и структуре (рисунок 10.50).

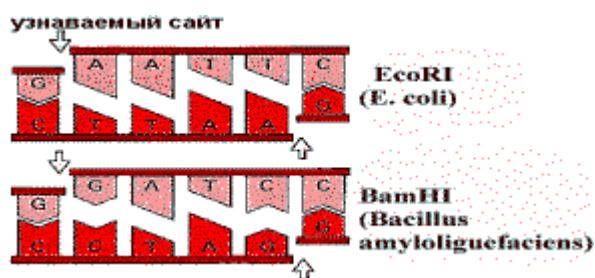


Рисунок 10.50 – Схема расщепления ДНК рестриктазами EcoRI и BamHI.

К настоящему времени из различных микроорганизмов выделено более тысячи рестриктаз. В генетической инженерии наиболее широко используется около 200 рестриктаз. Одни рестриктазы разрезают ДНК по оси симметрии узнаваемой последовательности, а другие - со сдвигом, с образованием “ступеньки”. В первом случае образуются так называемые “тупые” концы ДНК, а во втором – “липкие” концы, то есть фрагменты ДНК имеют на своих концах однонитевые взаимно комплементарные участки.

**ДНК-лигазы** – это ферменты, соединяющие (сшивающие) фрагменты ДНК путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами. Этот процесс называется лигированием. Сшивание фрагментов ДНК осуществляется по “липким” концам или с помощью искусственно достроенных “липких” концов. Сшивание фрагментов ДНК по “липким” концам происходит в результате спаривания оснований за счет образования водородных связей между однонитевыми участками комплементарных нуклеотидов. При отсутствии комплементарных “липких” концов у сшиваемых фрагментов их достраивают, используя так называемые **линкеры** (переходники) - короткие участки ДНК, имеющие разные “липкие” концы. Возможно сшивание фрагментов и по “тупым”

концам, когда концы фрагментов двунитевые.

Отделение бактерий, получивших рекомбинантную ДНК, от общей массы клеток называется **клонированием**. Для клонирования бактериальную суспензию высевают на плотную питательную среду с селективным агентом - например, с антибиотиком (рисунок 10.51).

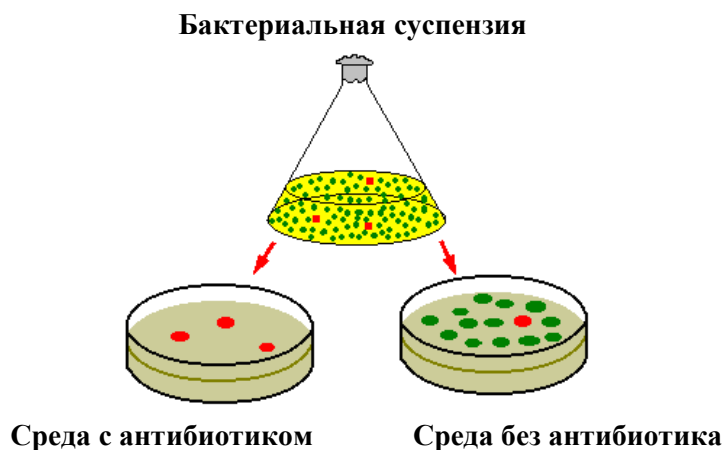


Рисунок 10.51 - Клонирование рекомбинантных клеток.

Рекомбинантные клетки можно идентифицировать также по синтезируемому ими продукту. Для этого в питательную среду вносят вещества, реагирующие с синтезируемым продуктом и проявляющие видимую реакцию (например, преципитирующую сыворотку).

Используя приемы генетической инженерии, возможно переносить гены как между родственными бактериями, так и между бактериями разных видов и родов. Генная инженерия позволяет получать новые препараты медицинского назначения. Так, в практике широко используется генно-инженерная вакцина против гепатита В, в состав которой входит антиген вируса гепатита В, синтезированный в клетках дрожжей. налажен выпуск генно-инженерного инсулина, производимого с помощью дрожжевых клеток или клеток кишечной палочки. В медицине применяются полученные генно-инженерными методами интерлейкины-1, 2, 3, 6, фактор некроза опухолей, пептиды тимуса, миелопептиды и другие препараты. Организмы, полученные с помощью генной инженерии, называются генно-модифицированными или трансгенными организмами (ГМО или ТГО). Технология, основанная на использовании генетически модифицированных организмов, называется **ГМО-технологией**.

Достижения генной инженерии широко использует биотехнология для получения антибиотиков, витаминов, аминокислот, вакцин, моноклональных антител, диагностикумов и других продуктов. Производство этих препаратов с использованием микробиологического синтеза более выгодно, чем химическим путем. Например, одна микробная клетка синтезирует около ста тысяч молекул белка в минуту. Органический синтез не обладает такой высокой производительностью.

#### 10.4. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Дайте определение генетике бактерий.
2. Что представляет собой геном бактериальной клетки?
3. Что такое плазмиды?
4. Какие плазмиды Вы знаете?
5. Охарактеризуйте IS-элементы и транспозоны.
6. Расскажите о строении ДНК.
7. Что такое генотип и фенотип?
8. Расскажите о фенотипической изменчивости.
9. Назовите формы генотипической изменчивости.
10. Расскажите о мутациях бактерий и их проявлениях.
11. Назовите виды рекомбинаций.
12. Расскажите о трансформации у бактерий.
13. Что такое трансдукция?
14. Виды трансдукции.
15. Расскажите о конъюгации у бактерий.
16. Расскажите о принципах генной инженерии.

#### 10.5. Тренировочные тесты

1. Наука о наследственности и изменчивости организмов называется:
  - иммунологией
  - физиологией
  - морфологией
  - + генетикой
  - экологией
2. Геном бактерий включает:
  - + нуклеоид
  - цитоплазматическую мембрану
  - + плазмиды
  - + мобильные элементы
  - рибосомы
3. Совокупность генов бактериальной клетки называется:
  - плазмидой
  - транспозоном
  - + генотипом
  - фенотипом
  - мобильными элементами
4. Генетический материал в бактериальной клетке содержится:
  - в цитоплазматической мембране
  - в клеточной стенке



- + в плаزمидах
- + в геноме
- в капсулах

5. К внехромосомным факторам наследственности бактерий относятся:

- митохондрии
- + плазмиды
- рибосомы
- мезосомы
- включения

6. Плазмиды могут определять следующие свойства бактерий:

- + выработка бактериоцинов
- выработка конститутивных ферментов
- + множественная лекарственная устойчивость
- + способность к конъюгации
- спорообразование

7. F-плазмиды обуславливают:

- трансформацию
- + образование половых пилей
- синтез энтеротоксинов
- устойчивость к антибиотикам
- синтез колицинов

8. R-плазмиды обуславливают:

- образование половых пилей
- синтез энтеротоксинов
- + устойчивость к антибиотикам
- синтез колицинов
- спорообразование

9. Ent-плазмиды обуславливают:

- синтез гемолизина
- образование половых пилей
- + синтез энтеротоксинов
- устойчивость к антибиотикам
- синтез колицинов

10. Col-плазмиды обуславливают:

- утилизацию глюкозы
- синтез гемолизина
- синтез энтеротоксинов
- устойчивость к антибиотикам
- + синтез колицинов

11. Шyu- плазмиды обуславливают:

- синтез энтеротоксинов
- + синтез гемолизинов
- устойчивость к антибиотикам
- синтез бактериоцинов
- синтез половых ворсинок

12. Совокупность внешних признаков бактериальной клетки в конкретных условиях внешней среды называется:

- диссоциацией
- + фенотипом
- хромосомой
- генотипом
- мутацией

13. Виды изменчивости бактерий:

- морфологическая
- + фенотипическая
- + генотипическая
- физиологическая
- биохимическая

14. Изменчивость, при которой изменение фенотипического признака связано со структурными изменениями в ДНК, называется:

- ненаследственной
- + наследственной
- + генотипической
- фенотипической
- модификационной

15. Стойкое наследственное изменение свойств бактерий в результате изменения первичной структуры ДНК называется:

- адаптацией
- диссоциацией
- репарацией
- + мутацией
- рекомбинацией

16. Виды мутаций у бактерий:

- + спонтанные
- + индуцированные
- генетические
- фенотипические
- модификационные

17. Возможные механизмы формирования мутаций у бактерий:

- трансформация
- + дупликация
- + инверсия
- трансдукция
- + транслокация

18. В качестве мутагенов могут выступать:

- бактериофаги
- + УФЛ
- + ионизирующее излучение
- физиологический раствор
- + химические вещества

19. Формы генотипической изменчивости бактерий:

- диссоциация
- + мутации
- + рекомбинации
- полиморфизм
- адаптация

20. Конъюгация – это передача:

- изолированного фрагмента ДНК от клетки-донора клетке-реципиенту
- + ДНК от клетки-донора в клетку-реципиент через конъюгационный мостик
- ДНК от одних бактерий другим посредством фага
- ДНК с помощью R-плазмид
- R-плазмид от донора реципиенту

21. Способность к конъюгации связана с наличием на поверхности бактерий:

- гемагглютинина
- жгутиков
- капсулы
- пилей общего типа
- + секс-пилей (пилей 2-го порядка)

22. Трансформация – это передача:

- + изолированного фрагмента ДНК от клетки-донора клетке-реципиенту
- ДНК от клетки-донора в клетку-реципиент через конъюгационный мостик
- ДНК от одних бактерий другим посредством умеренного фага
- ДНК от одних бактерий другим посредством вирулентного фага
- изолированной плазмидной ДНК от клетки-донора в клетку-реципиент\*

23. Трансдукция - это передача:

- изолированной плазмидной ДНК от клетки-донора клетке-реципиенту
- изолированной хромосомной ДНК от клетки-донора клетке-реципиенту
- ДНК от клетки-донора клетке-реципиенту через конъюгационный мостик
- + ДНК от одних бактерий другим посредством умеренного фага

- ДНК от одних бактерий другим с помощью R-плазмид

24. Виды трансдукции:

- адаптивная
- + абортивная
- фенотипическая
- + неспецифическая
- + специфическая

25. Проявлением фенотипической изменчивости бактерий является:

- бактериоциногеня
- спорообразование
- транзиция
- + адаптация
- подвижность

26. Виды репараций:

- спонтанные
- индуцированные
- + темновая
- + световая
- рекомбинантная

27. Мутации бывают:

- + генные
- + хромосомные
- + точковые
- + обратные
- темновые

28. Мутации в зависимости от вызываемых в клетке последствий делятся на:

- неспецифические
- + нейтральные
- специфические
- + условно-летальные
- + летальные

29. Транзиция – это:

- замена пурина на пиримидин
- замена пиримидина на пурин
- + замена пиримидина на пиримидин
- + замена пурина на пурин
- перенос ДНК из одной клетки в другую с помощью фагов

30. Трансверсия – это:

- + замена пурина на пиримидин

- замена пиримидина на пиримидин
- замена пурина на пурин
- перенос ДНК из одной клетки в другую с помощью фагов
- перенос ДНК из одной клетку в другую с помощью F-плазмид

31. Процесс восстановления поврежденной клеточной ДНК называется:

- конъюгацией
- + репарацией
- трансформацией
- трансдукцией
- мутацией

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 11. Экология микробов

### 11.1. Распространение и роль микробов в природе

В природе микробы распространены повсеместно. Взаимоотношения микроорганизмов между собой и с окружающей средой изучает **экология** (греч. *oikos* – жилище, *logos* – понятие, учение). Этот термин предложил в 1866 году Э. Геккель. Основной единицей в экологии является **экосистема**. В нее входят как биологические, так и абиотические компоненты (рисунок 11.1).



Рисунок 11.1 – Строение экосистемы.

**Биологические компоненты** составляют сообщество организмов или **биоценоз** той ли иной системы. Под **абиотическими компонентами** следует понимать физические и химические условия экосистемы, в которой живут организмы. Размеры микробных экосистем очень разнообразны. В качестве микробных экосистем могут выступать организм человека или животных, пруд, озеро, корневая система дерева. Возможны и такие экосистемы, как ротовая полость или участок кишечника.

Естественными средами обитания большинства микроорганизмов являются почва, вода и воздух. Применительно к человеку средами обитания микробов является организм человека в целом или его отдельные системы (зоны обитания) – пищеварительная, дыхательная, мочеполовая системы. В этих зонах обитания микроорганизмы образуют микробные сообщества или **микробиоценозы**. Каждое микробное сообщество в конкретном биоценозе образуют специфичные **аутохтонные микроорганизмы** (греч. *autos* – свой, *chthon* – страна), которые обычно в них встречаются. В природных биоценозах (почва, вода, воздух) выживают и размножаются лишь те микроорганизмы, которым благоприятствуют условия окружающей среды (температура, влажность, кислотность и другие факторы).

Между микробами и высшими организмами в микробиоценозах сложились сложные взаимоотношения. Тесное сожительство различных организмов, в том числе микроорганизма с макроорганизмом, называют **симбиозом**. Участники

симбиоза называются **симбионтами**. Симбиоз характеризуется различными типами взаимоотношений по отношению к организму хозяина и друг к другу. Выделяют такие формы симбиоза как мутуализм, комменсализм, паразитизм, антагонизм.

**Мутуализм** (англ. *mutual* - взаимный) - это такая форма сожительства, когда оба симбионта (хозяин и микроб) получают взаимную выгоду. При мутуализме создаются благоприятные условия для обоих партнеров, то есть мутуализм является взаимовыгодным симбиозом. Примером мутуализма служит сожительство растений с клубеньковыми бактериями, которые питаются веществами из соков растения (например, бобовых - гороха, вики), а растения, в свою очередь, используют в качестве питательных веществ азотистые соединения, синтезированные клубеньковыми бактериями.

**Комменсализм** (лат. *com* - с, *mensa* - стол; сотрапезничество, за одним столом) - это такая форма сожительства, когда один из симбионтов (в данном случае микроб) живет за счет хозяина, пользуется его защитой, но не причиняет хозяину никакого вреда. При комменсализме партнерство может быть выгодно одному из организмов без оказания вредного воздействия на другого. Микробы-комменсалы (стафилококки, стрептококки) населяют в качестве нормальной микрофлоры кожные покровы и слизистые оболочки человека и животных. Однако при комменсализме представители условно-патогенной микрофлоры при определенных условиях могут вызывать тяжелые заболевания.

Мутуализм и комменсализм характерны для нормальной микрофлоры организма здорового человека и животных.

**Паразитизм** (греч. *parasitos* – нахлебник) - это такая форма сожительства, когда микроорганизмы-паразиты питаются за счет тканей хозяина, при этом причиняют ему вред, вызывая инфекционную болезнь. Микробы – паразиты не могут существовать без организма хозяина. Такие микроорганизмы называются патогенными. Следовательно, средой обитания паразита является организм хозяина, к которому паразит адаптируется в процессе эволюции. В процессе эволюции патогенные микробы приобрели способность паразитировать в определенных тканях, например, сальмонеллы паразитируют в слизистой тонкого кишечника. В таких случаях говорят о **тропизме** паразитов, то есть способности избирательно поражать преимущественно те или иные органы и ткани (например, нейротропные, эпителиотропные, пневмотропные бактерии).

Многие микроорганизмы, попадая в организм человека, никак не влияют друг на друга, то есть между ними нет взаимодействия, такая ситуация называется **нейтрализмом**. При нейтрализме партнеры (микроорганизм и макроорганизм) могут не оказывать друг на друга никакого влияния.

**Антагонизм** - это взаимное противодействие организмов. Антагонизм микробов - это такие взаимоотношения, когда при совместном развитии популяций бактерии одного вида или представители одного и того же вида угнетают развитие других видов, а иногда полностью их уничтожают. На явлении антагонизма микробов основано лечебно-профилактическое действие антибиотиков и пробиотиков.

**Синергизм** - это одинаковые физиологические процессы различных микробных ассоциаций, в результате которых происходит увеличение конечных

продуктов.

**Сателлизм** - это стимуляция роста одного микроорганизма продуктами жизнедеятельности другого, который затем становится его спутником.

Различными могут быть и пространственные отношения между симбионтами. Если один симбионт находится вне клеток другого, то говорят об **эктосимбиозе**, а если внутри клеток - об **эндосимбиозе**. Более крупного из симбионтов называют хозяином.

В природе микроорганизмы участвуют в первую очередь в круговороте веществ. Так, роль микроорганизмов **в круговороте углерода** заключается в разложении тканей отмерших растений и животных в аэробных условиях до углекислого газа и воды, а в анаэробных условиях – до кислот, спиртов и углекислого газа. **В круговороте азота** роль микробов заключается в том, что микроорганизмы могут связывать атмосферный азот (азотфиксация) или превращать органические вещества в аммонийные соединения. Процесс образования аммиака при разрушении белка микроорганизмами называется **аммонификацией**. Процесс образования нитритов и нитратов при распаде органических веществ в процессе окисления аммиака до азотистой и азотной кислот называется **нитрификацией**. Процесс восстановления нитратов с выделением свободного азота называется **денитрификацией**.

## 11.2. Микрофлора почвы

Почва представляет собой смесь неорганических веществ и органических соединений, образующихся в результате гибели и разложения живых организмов. Неорганические частицы почвы – это минеральные вещества, окруженные пленкой коллоидных веществ органической или неорганической природы. Почвенные живые организмы в совокупности составляют **почвенный биоценоз**. Содержащиеся в почве живые организмы (в том числе микроорганизмы) составляют **живую фазу почвы**. В нее входят макроорганизмы и микроорганизмы, как животного, так и растительного происхождения.

**Макроорганизмы** живой фазы почвы включают:

- **макрофауну** (грызуны, насекомые, клещи, брюхоногие моллюски, многоножки, пауки и кольчатые черви);
- **макрофлору** (корни растений).

**Микроорганизмы** живой фазы почвы включают:

- **микрофауну** (нематоды, простейшие, коловратки);
- **микрофлору** (водоросли, грибы, бактерии).

Находящиеся в почве микроорганизмы подразделяются на два вида:

- **аутохтонные микроорганизмы (резидентные микроорганизмы, резидентная микрофлора)**, то есть микробы, которые присущи только конкретному типу почвы;

- **аллохтонные микробы (транзиторная микрофлора)**, то есть те микроорганизмы, которые в обычных условиях в почве не встречаются.

Микроорганизмы в почве развиваются в водных и коллоидных пленках, покрывающих твердые частицы, и особенно в капиллярной и гравитационной воде,



заполняющей поры между минеральными частицами почвы и содержащей растворенные органические и неорганические вещества.

В почве обитают водоросли, грибы, бактерии.

**Водоросли** распространены повсеместно, особенно в поверхностных слоях почвы. Наиболее важным экологическим фактором, регулирующим распространение водорослей, является влажность, хотя они способны выдерживать длительные периоды засухи. Морфологическое разнообразие водорослей очень велико, но все они имеют микроскопические размеры, нитевидную форму и состоят из одной клетки. Наиболее многочисленные сине-зеленые и зеленые водоросли. Количество их в 1 г почвы может достигать 100 тыс.

**Грибы**, обитающие в почве, включают дрожжи, дрожжеподобные грибы и плесени. Дрожжи и дрожжеподобные грибы мало распространены в обычных почвах, и поэтому роль и значение их в жизни почвы невелики. Плесени более многочисленны. Число грибов в поверхностном слое почвы может достигать 1 млн. особей в 1 г, а биомасса - от 1000 до 1500 кг/га. Наиболее благоприятная реакция среды для грибов - кислая (рН 4,0).

Некоторые грибы, например грибы из рода *Fusarium*, попадая на злаковые растения, в процессе своего развития вырабатывают токсические вещества. При употреблении хлеба, выпеченного из зерна, пораженного грибом *Fusarium sporotrichiella*, у человека возникает токсикоз, известный под названием отравления "пьяным хлебом". Грибы из рода *Aspergillus* (*Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*), паразитирующие на зерновых культурах и кормах, могут образовывать афлатоксин. При употреблении в пищу продуктов, зараженных афлатоксином, возникает тяжелое отравление, которое характеризуется некротическим поражением печени, почек, геморрагическим воспалением пищеварительного тракта.

**Бактерии** почвы представлены спорообразующими бактериями, спирохетами, микобактериями, псевдомонадами, азотфиксирующими и нитрифицирующими бактериями. В окультуренных почвах бактерии превосходят все другие группы микроорганизмов, как по численности, так и по своему разнообразию. Количество бактерий в 1 г почвы может достигать 10 млрд. В плодородной почве общая масса бактерий достигает 500 кг/га и более. Наибольшее значение в почве имеют азотфиксирующие бактерии, способные усваивать молекулярный азот, и спорообразующие палочки родов *Bacillus* и *Clostridium*. К типичным почвенным бактериям относятся *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megatherium*, а также термофильные бактерии и другие микроорганизмы, составляющие иногда 80-90% всей микрофлоры почвы.

Почвенные микроорганизмы принимают участие в процессах почвообразования, самоочищения почвы, кругооборота в природе азота, углерода и других элементов. В почве имеются все условия для развития микроорганизмов: достаточное количество органических и минеральных веществ для их питания, подходящие влажность и реакция среды, защита от прямых солнечных лучей, наличие кислорода.

Почвенные микроорганизмы по их функции подразделяются на следующие физиологические группы.

**Бактерии аммонификаторы** (вызывают гниение трупов животных, остатков растений, разложение мочевины с образованием аммиака и других

продуктов): аэробные бактерии - *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Serratia marcescens*; бактерии рода *Proteus*; грибы рода *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*; анаэробы - *C. sporogenes*, *C. putrificum*; уробактерии (расщепляют мочевины) - *Urobacillus pasteurii*, *Sarcina urea*.

**Нитрифицирующие бактерии:** *Nitrobacter* (превращают азотистую кислоту в азотную и нитраты) и *Nitrosomonas* (окисляют аммиак до азотистой кислоты, образуя нитриты).

**Денитрифицирующие бактерии** восстанавливают нитраты до молекулярного азота. Схему преобразования азота в ходе денитрификации можно представить следующим образом:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ . К ним относятся псевдомонады, бациллы, микрококки и другие бактерии.

**Азотфиксирующие бактерии** (усваивают из воздуха свободный кислород и в процессе своей жизнедеятельности из молекулярного азота синтезируют белки и другие органические соединения азота, используемые растениями). К ним относятся клубеньковые бактерии, азотобактер, клубоциды, бейеринкия и другие бактерии.

**Бактерии, участвующие в круговороте** серы, железа, фосфора и других элементов - серобактерии, железобактерии и т. д.

**Бактерии, расщепляющие клетчатку**, вызывающие брожение (молочнокислые, спиртовые, маслянокислые, уксусные, пропионовые и др.).

**Количественный и видовой состав** микроорганизмов в почве обусловлен содержанием в ней органических веществ, влаги, pH, температурой, климатическими условиями, способом обработки и многими другими причинами. С увеличением количества органических веществ в почве, как правило, возрастает и количество микроорганизмов, так как органические вещества являются питательной средой для большинства почвенных бактерий. Общий запас органических веществ почвы достигает 400 т на 1 га, из них большая часть находится в поверхностном слое (до 30 см) почвы. Главная составная часть органических веществ почвы - останки животных и растительных тканей. Наиболее богаты микроорганизмами черноземные, каштановые почвы, сероземы и специально обработанные почвы. Количество бактерий в 1 г таких почв иногда достигает нескольких десятков миллиардов. Бедны микрофлорой песчаные, горные и лишённые растительности почвы. Но даже в песках пустынь количество бактерий может достигать 10-100 тыс. в 1 г.

Наиболее многочисленны микроорганизмы в верхнем 5-15-сантиметровом слое, меньше их на глубине 20-30 см и минимальное количество на глубине 30-40 см (рисунок 11.2).

Однако некоторые бактерии обнаруживаются в почве даже на глубине 5 м. Уменьшение количества микробов в глубоких слоях почвы объясняется тем, что по мере углубления уменьшается содержание органических веществ, а также кислорода, необходимого для жизнедеятельности бактерий.

Почвы, богатые бактериями, биологически более активны. Между плодородием почвы и содержанием в ней микроорганизмов имеется определенная зависимость. Подсчеты показали, что на каждый гектар малоплодородной почвы приходится 2,5-3 т микробной массы, высокоплодородной - до 16 т. Количество микроорганизмов в 1 г почвы может колебаться от  $1-3 \cdot 10^6$  до  $20-25 \cdot 10^9$ .



Рисунок 11.2 – Распределение микроорганизмов в почве.

Численность микроорганизмов в почве увеличивается по направлению с севера на юг, причем весной количество микробов значительно возрастает, достигая максимума в летнее и осеннее время; зимой количество микробов резко уменьшается.

Почва населенных мест загрязняется твердыми и жидкими отходами, выделениями людей и животных, их трупами, остатками растений, хозяйственно-бытовыми и промышленными сточными водами. Вместе с органическими загрязнениями в почву попадает большое количество микроорганизмов. Особенно опасны в эпидемиологическом отношении сточные воды перерабатывающих пищевых предприятий (например, мясокомбинатов), предприятий по переработке кожи и шерсти. В связи с этим почва может загрязняться патогенными бактериями и служить фактором передачи возбудителей инфекционных заболеваний. Через почву может происходить загрязнение болезнетворными микробами сырья, пищевых продуктов, кормов. Поэтому отбросы, поступающие в почву, должны подвергаться очистке и обезвреживанию. Длительность сохранения в почве патогенных бактерий зависит от их биологических свойств и условий среды обитания. Наиболее длительно (десятилетия) сохраняются спорообразующие микробы – возбудители столбняка, ботулизма, сибирской язвы. Представители семейства кишечных бактерий, попав в почву с фекалиями, постепенно отмирают. Так, возбудители дизентерии сохраняются в почве от 10 дней до 9 месяцев; холерные вибрионы - от 10 дней до 4 месяцев; бактерии брюшного тифа - от 14 дней до 10 месяцев; бактерии туляремии - от 10 дней до 2,5 месяцев; микобактерии туберкулеза - от 3 до 7 месяцев и более; бруцеллы - от 2 до 3 месяцев. Выживаемости в почве неспорообразующих микробов способствует попадание вместе с возбудителем достаточного количества питательных веществ (кал, мокрота, гной и т. д.), наличие благоприятных физико-химических условий среды, отсутствие микробов-антагонистов.

**Микробиологическое исследование** почвы проводят для ее санитарной оценки, изучения процессов обезвреживания отбросов и самоочищения почвы, при определении пригодности участков для строительства, а также при эпидемиологических и эпизоотологических обследованиях с целью выяснения путей заражения почвы и продолжительности сохранения в ней патогенных микробов.

**Цели санитарно-микробиологического исследования почвы:**

- санитарная оценка почвы населенных пунктов и новых участков для заселения и размещения зданий;
- решение вопросов водоснабжения, канализации и очистки населенных пунктов;
- санитарная оценка почвы, загрязненной химическими веществами;
- контроль процессов самоочищения почвы, подвергшейся биологическому загрязнению;
- эпидемиологическое обследование почвы для выяснения путей ее заражения.

В зависимости от поставленной задачи применяют краткий или полный санитарно-микробиологический анализ почвы.

**Краткий санитарно-микробиологический анализ** почвы предусматривает определение общего микробного числа (ОМЧ), количества бактерий группы кишечной палочки (БГКП), энтерококков, *Clostridium perfringens*, термофильных бактерий, нитрифицирующих бактерий. Полученные результаты позволяют оценить наличие и степень фекального загрязнения почвы. Краткий анализ почвы осуществляют при проведении текущего санитарного надзора за состоянием почвы.

**Полный санитарно-микробиологический анализ** почвы включает определение всех показателей краткого анализа, а также общей численности сапрофитов, общего числа споровых микроорганизмов, количества актиномицетов и грибов, количества аэробных бактерий, разрушающих клетчатку, и бактерий-аммонификаторов. Полный анализ проводят при осуществлении предупредительного санитарного надзора и при первичном обследовании почвы с целью выбора территории для размещения отдельных объектов (оздоровительных лагерей, детских учреждений и т. д.).

Обнаружение патогенных микробов в почве проводят только при расследовании вспышек инфекционных заболеваний. В качестве косвенных показателей возможного загрязнения окружающих объектов (в том числе и почвы) патогенными микроорганизмами служат санитарно-показательные микроорганизмы (СПМ). Основными характеристиками санитарно-показательных микроорганизмов являются следующие:

- СПМ должны постоянно обитать в организме человека или животных и постоянно выделяться во внешнюю среду;
- СПМ не должны размножаться на объектах окружающей среды;
- длительность выживания СПМ во внешней среде должна соответствовать длительности выживания патогенных микроорганизмов;
- методы идентификации и дифференциации СПМ должны быть простыми и надежными.

Количество СПМ выражают в титрах и индексах.

**Титр СПМ** – это наименьший объём (в мл) или весовое количество (в г) исследуемого материала, в котором еще присутствует хотя бы одна особь СПМ.

**Индекс СПМ** – это количество клеток СПМ, обнаруженное в определённом объёме или весовом количестве исследуемого материала.

Для выявления общей микробной обсемененности определяют **общее микробное число (ОМЧ)** путем подсчета всех колоний микроорганизмов,

выросших на питательной среде при посеве 1 г или 1 мл исследуемого материала.

При санитарно-микробиологической оценке почвы ориентируются на следующие **руководящие документы**:

- МУ 2.1.7.730-99 “Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест”;
- СанПиН 2.1.7.1287-03 “Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы”.

Показатели чистоты почв по санитарно-показательным микроорганизмам представлены в таблице 11.1.

Таблица 11.1 – Показатели чистоты почв по СПМ

Категория почвы	Коли-титр	Перфрингенс-титр	Количество термофильных бактерий в 1 г
Чистая	1,0 и выше	0,01 и выше	$10^2$ - $10^3$
Загрязненная	0,9-0,01	0,009-0,0001	$10^3$ - $10^5$
Сильно загрязненная	0,009 и ниже	0,00009 и ниже	От $10^5$ до $4 \times 10^6$

Наличие в почве бактерий группы кишечной палочки свидетельствует о ее свежем фекальном загрязнении. На свежее фекальное загрязнение почвы указывают не только высокие титры БГКП, но и низкие титры нитрификаторов, и термофилов, а также относительно высокое содержание вегетативных форм *Cl. perfringens*. Появление нитрифицирующих бактерий указывает на развитие процесса самоочищения, так как они завершают цикл разложения азотсодержащих соединений, превращая аммиак в азот. При свежем фекальном загрязнении нитрификаторов не будет, поскольку субстрат для их развития отсутствует. В ходе жизнедеятельности микроорганизмов, разлагающих органические вещества, образуется аммиак, что приводит к накоплению нитрификаторов. Через 4-5 месяцев после фекального загрязнения БГКП в почве уже не обнаруживаются, а *Cl. perfringens* еще обнаруживается в титре 0,01. Следовательно, *Cl. perfringens* свидетельствует о давнем фекальном загрязнении. Выявление в почве бактерий рода *Proteus* свидетельствует о загрязнении ее органическими веществами животного происхождения или фекалиями людей.

Термофильные микроорганизмы попадают в почву с перепревшим навозом или компостом. В чистых почвах термофилов не обнаруживают. Термофильные бактерии целесообразно выявлять для выяснения характера и давности загрязнения почвы органическими веществами. Свежий навоз, сточные воды обычно содержат много БГКП, но мало термофильных бактерий. По мере разложения органических веществ количество термофилов увеличивается.

Результаты, полученные при санитарно-микробиологическом анализе почвы, позволяют оценить также степень ее эпидемической опасности (таблица 11.2).

Таблица 11.2 – Оценка степени эпидемической опасности почвы

Категория загрязнения почвы	Индекс БГКП	Индекс энтерококков	Патогенные бактерии, в том числе сальмонеллы
Чистая	1-10	1-10	0
Умеренно опасная	10-100	10-100	0
Опасная	100-1000	100-1000	0
Чрезвычайно опасная	1000 и выше	1000 и выше	0

Для оценки активности почвенной микрофлоры используют показатель биологической активности почвы. **Биологическую активность почвы** определяют следующими способами:

- подсчетом общего количества почвенных микроорганизмов;
- определением количества отдельных физиологических групп микробов, например, нитрифицирующих или целлюлозоразлагающих бактерий;
- определением выделяемого почвой диоксида углерода - основной биохимический способ определения биологической активности почвы. Чем интенсивнее выделяется углекислый газ из почвы, тем активнее происходят в ней биологические процессы.

Выделение углекислого газа из почвы в приземный слой атмосферы называют **дыханием почвы**. Интенсивность дыхания почвы зависит от ее свойств, гидротермических условий, характера растительности, агротехнических мероприятий. Выделение углекислого газа почвой усиливается при ее окультуренности. Уменьшение выделения углекислого газа почвой свидетельствует об ухудшении поступления кислорода в почву и способствует образованию токсичных веществ.

**Отбор проб** почвы производят с квадратного участка (не менее 5х5 м) из 5 точек - из каждого угла и центра квадрата (“метод конверта”). Образцы почвы отбирают в условиях асептики с глубины 20-30 см. Общий объем отобранной пробы составляет 1 кг (рисунок 11.3).

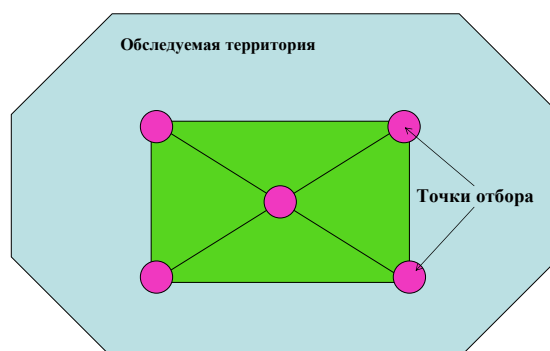


Рисунок 11.3 – Схема отбора проб почвы.

Доставленную в лабораторию почву освобождают от включений (камней, корней и др.). Навеску почвы заливают стерильной водопроводной водой в

соотношении 1:10. Полученную суспензию встряхивают, отстаивают и готовят 10-кратные разведения от 1:10 до 1:100 при исследовании чистых почв или до 1:10000 при исследовании сильно загрязненных почв. Посевы разведений почвенной суспензии производят на МПА в чашки Петри. Посевы инкубируют при температуре 28-30<sup>o</sup>C в течение 72 часов, а затем подсчитывают число выросших колоний. Общее количество микроорганизмов в 1 г почвы (микробное число почвы) определяют с учетом разведений.

Для определения жизнеспособных *E. coli* проводят посев разведений почвенной суспензии на среду Эндо. При низкой фекальной загрязненности почв используют метод мембранных фильтров или титрационный метод. При положительном результате на среде Эндо вырастают колонии темно-красного цвета с металлическим блеском.

Для определения *C. perfringens* производят посев прогретой почвенной суспензии в среду Вильсона-Блера. При положительном результате в толще агара наблюдаются образование круглых колоний черного цвета.

Определение термофильных бактерий производят на МПА в чашках Петри. Посев делают из разведений 1:10, 1:100, 1:1000. Выращивание проводят при температуре около 60<sup>o</sup>C.

Периодичность санитарно-микробиологического контроля почвы зависит от контролируемых объектов, но не реже 1 раза в год. При изучении динамики самоочищения почвы на загрязненных территориях пробы берут в течение первого месяца после загрязнения еженедельно, в последующие месяцы - 1 раз в месяц в течение вегетационного периода до завершения активной фазы самоочищения.

### 11.3. Микрофлора воды

В морях, реках, озерах и других водоемах, а также в грунтовых водах содержится большое количество разных видов микроорганизмов. Совокупность всех микроорганизмов, населяющих водоёмы, обозначают термином “микробный планктон” (рисунок 11.4).



Рисунок 11.4 – Водный планктон.

Микрофлора природных вод в значительной степени зависит от их

происхождения. Вода является естественной средой обитания микробов, основная масса которых поступает из почвы, воздуха, со стоками населенных пунктов. Особенно много микроорганизмов в открытых водоемах и реках, в илистых отложениях океанов, морей, болот, минеральных водах. Их находят как в поверхностных слоях, так и на глубине до 10 тыс. метров. Обитают микроорганизмы и в горячих источниках. Процесс фотосинтеза у них происходит при температуре 75<sup>0</sup>С, а в щелочных водах бактерии выживают при температуре 100<sup>0</sup>С. Качественный состав обитающих в воде микроорганизмов зависит в основном от свойств самой воды, поступления в нее сточных и промышленных отходов. Глубокие почвенные воды, ключевая, артезианская вода почти свободны от микроорганизмов. К постоянно живущим в воде микроорганизмам относятся *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Spirillum* и др.

Микрофлору водоемов образуют две группы микроорганизмов.

**Аутохтонная микрофлора** (собственно водная) представляет собой совокупность микроорганизмов, постоянно живущих и размножающихся в воде. Микробный состав воды напоминает микрофлору почвы, с которой вода соприкасается (придонные и прибрежные почвы). К аутохтонной микрофлоре относятся как аэробные (*Micrococcus candidans*, *Micrococcus roseus*, *Sarcina lutea*, *Bacterium aquaticus communis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus spp.*, *Leptospira spp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* и др.), так и анаэробные (*Chromobacterium violaceum*, *Clostridium spp.* и др.) микроорганизмы.

**Аллохтонная микрофлора** – это совокупность микроорганизмов, случайно попавших в воду и сохраняющихся в ней сравнительно короткое время.

Количественные соотношения микроорганизмов в открытых водоемах варьируют в широких пределах, что зависит от типа водоема, степени его загрязнения, смены метеорологических условий, времени года. Источником микробного загрязнения воды в реках чаще всего служат бытовые и промышленные стоки. В открытые водоемы большая часть микробов попадает из почвы. Поэтому в озерах, прудах, реках наивысшее содержание микрофлоры отмечается в прибрежной зоне.

В воде обитают все известные группы микроорганизмов, но наиболее чаще всего встречаются бактерии. Они потребляют питательные вещества, присутствующие в воде в низких концентрациях (1-5 мг/г). Микробы окисляют до минеральных соединений органические вещества, попадающие в водоемы в больших количествах со сточными водами. Вместе со сточными водами водоемы могут загрязняться болезнетворными микроорганизмами. Вода является фактором передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний. В открытых водоемах, особенно находящихся на неблагоприятных по инфекционным болезням территориях, обнаруживают возбудителей кишечных инфекций (брюшного тифа, паратифов, дизентерии, энтеровирусных инфекций). Некоторые возбудители могут размножаться в воде (холерный вибрион, легионеллы). В донных отложениях прудов и озер нередко обитают возбудители ботулизма. Патогенные микроорганизмы водоемов могут включаться в пищевые цепи и по ним передаваться разным группам животных, птиц, рыб и человеку. Поэтому любой водный источник подвергают санитарно-микробиологической оценке.

Регулярному санитарно-микробиологическому надзору подвергают в первую



очередь воду питьевую централизованного и местного водоснабжения с забором воды из открытых водоёмов (реки, водохранилища) или из подземных источников (скважины, родники, колодцы).

Санитарно-микробиологические исследования воды регламентируются соответствующие нормативные документы.

**Основания для санитарно-микробиологического исследования воды** следующие:

- выбор источника централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения и периодический контроль над ним;
- контроль эффективности обеззараживания питьевой воды централизованного водоснабжения;
- наблюдение за подземными источниками централизованного водоснабжения (артезианские скважины, почвенные воды и т.д.);
- определение состояния и степени пригодности воды источников индивидуального водопользования (колодцев, родников и т.д.);
- наблюдение за санитарно-эпидемиологическим состоянием воды открытых водоёмов;
- проверка качества и степени очистки сточных вод;
- расследование водных вспышек инфекционных болезней.

**Самоочищение водоемов** от микробов протекает в результате влияния следующих факторов:

- течение воды, уменьшающее концентрацию бактерий;
- бактерицидное действие инсоляции;
- минерализация органических соединений микробами;
- наличие пищевой цепи: бактерия – простейшее – насекомое – рыба, животное – человек;
- адсорбция микробов твердыми частицами ила;
- адсорбция микробов на поверхности растений;
- действие фитонцидов растений.

Степень загрязнения водоема определяется термином **сапробность**. По загрязненности выделяют следующие **зоны водоемов**.

**Полисапробные зоны** (зоны сильного загрязнения) содержат большое количество легко разлагающихся органических веществ и почти полностью лишены кислорода. Количество бактерий в 1 мл воды равно миллиону и выше.

**Мезосапробные зоны** (зоны умеренного загрязнения) характеризуются доминированием окислительного и нитрификационных процессов. Общее количество бактерий в этих зонах составляет сотни тысяч в 1 мл.

**Олигосапробные зоны** (зоны чистой воды) характеризуются небольшим содержанием органических соединений. Количество бактерий составляет от 10 до 1000 в 1 мл.

При санитарно-микробиологической оценке воды ориентируются на следующие **руководящие документы**:

- ГОСТ Р 51593-2000 “Вода питьевая. Отбор проб”;
- МУК 4.2.1884-04 “Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов”;
- МУК 4.2.1018-01 “Методические указания по санитарно-

микробиологическому анализу питьевой воды”;

- СанПиН 2.1.4.1074-01 “Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества”;

- СанПиН 2.1.4.1175-02 “Микробиологические нормативы качества воды нецентрализованного водоснабжения (колодцев, скважин, родников)”.

В соответствии с действующими нормативными документами особое внимание отводится санитарно-микробиологическому контролю питьевой воды (центрального и местного водоснабжения), воды открытых водоёмов и сточных вод. Санитарно-микробиологическая оценка воды осуществляется в плане предупредительного или текущего санитарного надзора.

**Предупредительный надзор** осуществляют при решении вопросов водоснабжения и канализации населенных территорий, а также при санитарной оценке бассейнов, пляжей, мест коллективного отдыха.

**Текущий санитарный надзор** осуществляют при оценке качества питьевого водоснабжения населенных мест; при оценке санитарного состояния поверхностных вод для установления степени влияния биологического загрязнения на способность воды к самоочищению; при контроле над обеззараживанием сточных вод; по эпидемическим показаниям для выявления возможного пути передачи инфекционных заболеваний.

Отбор проб воды из систем централизованного водоснабжения производится следующим образом. Предварительно обжигают кран пламенем горящего тампона, смоченного спиртом. Затем пропускают воду при полностью открытом кране в течение 10-15 минут. Соблюдая правила асептики, открывают пробку стерильного флакона и наполняют флакон водой.

**Показатели санитарно-микробиологического состояния питьевой воды:**

- общее микробное число (ОМЧ);
- бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантные колиформные бактерии;
- споры сульфитредуцирующих клостридий;
- колифаги;
- патогенные бактерии кишечной группы.

**ОМЧ при оценке качества питьевой воды** позволяет оценить уровень не только фекального загрязнения, но и загрязнения из других источников (например, промышленные сбросы). Неожиданное увеличение ОМЧ (даже в пределах норматива), выявленное повторно, служит сигналом для поиска причины загрязнения. Этот показатель незаменим также для срочного обнаружения в питьевой воде массивного микробного загрязнения неизвестной природы. Из каждой анализируемой пробы должен быть сделан посев не менее чем на две чашки Петри объёмом 1 мл. Через 24 часа проводят подсчёт выросших колоний на обеих чашках, результаты суммируют и делят на два. Окончательный результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды. В 1мл питьевой воды должно быть не более 50 КОЕ.

**Определение количества энтеробактерий.** При проведении исследований не ограничиваются обнаружением БГКП (бактерий группы кишечных палочек), но используют более широкое понятие - бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и

термотолерантные колиформные бактерии. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* включают грамотрицательные, оксидазаотрицательные, споронеобразующие палочки, растущие на средах с лактозой (например, Эндо) и ферментирующие глюкозу до кислоты и газа при температуре 37°C в течение 24 часов. Обнаружение в питьевой воде бактерий семейства *Enterobacteriaceae* указывает на потенциальную эпидемическую опасность водопользования. Показатель “бактерии семейства *Enterobacteriaceae*” - основной нормируемый показатель, обеспечивающий наиболее надёжный контроль присутствия в воде практически всех представителей кишечных бактерий.

**Термотолерантные колиформные бактерии** обладают всеми признаками бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, и, кроме того, ферментируют лактозу с образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 44°C в течение 24 часов. Термотолерантность быстро утрачивается, поэтому обнаружение бактерий с таким свойством свидетельствует о недавнем попадании в воду кишечных бактерий (свежее фекальное загрязнение). Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантные бактерии должны отсутствовать в 300 мл питьевой воды.

**Выявление спор сульфитредуцирующих клостридий.** Споры сульфитредуцирующих клостридий более устойчивы к обеззараживанию и действию неблагоприятных факторов окружающей среды, чем другие индикаторные бактерии. На основании этого свойства показатель рекомендован для оценки эффективности технологических процессов очистки воды. Особое значение этот показатель имеет при оценке первичного хлорирования, так как оно инактивирует практически все индикаторные бактерии. Обнаружение клостридий в воде перед поступлением в распределительную сеть указывает на недостаточную очистку и на то, что устойчивые к обеззараживанию патогенные микроорганизмы, вероятно, не погибли при очистке. Споры сульфитредуцирующих клостридий должны отсутствовать в 20 мл исследуемой питьевой воды.

**Определение количества колифагов.** Наиболее часто содержание колифагов в питьевой воде определяют титрационным методом, включающим предварительное подращивание их в среде обогащения (культура *E. coli* на питательном агаре) с последующим выявлением бляшек колифага на газоне *E. coli*. В 100 мл исследуемой воды должны отсутствовать БОЕ колифагов.

Для определения микроорганизмов в воде используют приборы вакуумного фильтрования (рисунок 11.5), снабженные мембранными фильтрами. После фильтрования фильтры извлекают и инкубируют на плотной питательной среде.



Рисунок 11.5 – Прибор вакуумного фильтрования.

Принцип метода мембранных фильтров представлен на рисунке 11.6.

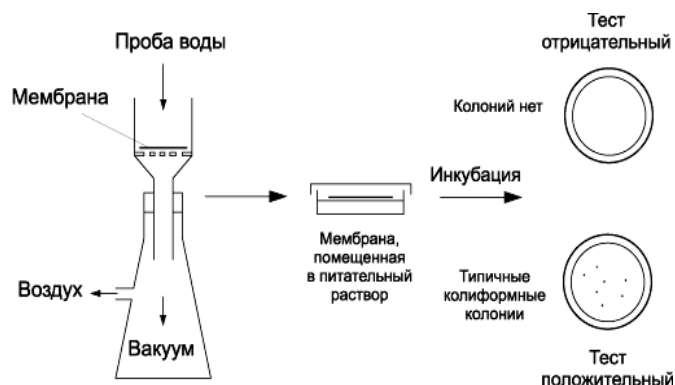


Рисунок 11.6 – Принцип метода мембранных фильтров.

Требования к воде централизованных систем водоснабжения представлены в таблице 11.3.

Таблица 11.3 – Требования к питьевой воде

Наименование объекта контроля	Определяемые показатели	Требование	Нормативный документ
Вода централизованных систем питьевого водоснабжения	1. Общее микробное число (КОЕ/мл)	Не более 50	СанПиН 2.1.4.1074-01
	2. Термотолерантные колиформные бактерии (в 100 мл воды)	Отсутствие	
	3. Общие колиформные бактерии (в 100 мл воды)	Отсутствие	
	4. Коли-фаги (БОЕ в 100 мл воды)	Отсутствие	
	5. Споры сульфит-редуцирующих клостридий (в 20 мл воды)	Отсутствие	

Требования к воде открытых источников, плавательных бассейнов, сточным водам также регламентированы соответствующими нормативными документами.

#### 11.4. Микрофлора воздуха

Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды, откуда микробы вместе с пылью и капельками влаги увлекаются в атмосферу. Кроме того, значительное количество микробов попадает в воздух с выделениями человека и животных (выдыхаемый воздух, слущивающийся эпителий и др.). Воздух является

неблагоприятной средой для размножения микроорганизмов, так как в нем отсутствуют питательных веществ, а солнечные лучи и высыхание капелек жидкости вызывают быструю гибель микроорганизмов. Поэтому в атмосферном воздухе постоянно происходят процессы самоочищения.

Микрофлора воздуха представлена пигментными сапрофитными бактериями (микрококки, сарцины), почвенными споровыми бактериями (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mesentericus* и др.), актиномицетами, плесневыми и дрожжевыми грибами (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др.) и другими микробами. Наибольшее количество микроорганизмов содержит воздух крупных городов. Воздух же лесов, парков, лугов, воздух над водоемами, в удалении от населенных пунктов отличается сравнительной чистотой. Здесь обнаруживаются кокковидные и палочковидные бактерии, актиномицеты, грибы. Значительные изменения претерпевает микрофлора воздуха в зависимости от времени года. Максимальное количество микробов обнаруживают в воздухе в летнее время, а минимальное – в зимнее время.

Микрофлора воздуха закрытых помещений более разнообразна и относительно стабильна. При этом среди микроорганизмов преобладают представители нормальной микрофлоры носоглотки человека. В воздухе закрытых помещений могут присутствовать и патогенные бактерии, попадающие в воздух при кашле, чихании или разговоре. Основными источниками загрязнения воздуха помещений патогенными бактериями являются больные люди и бактерионосители. Уровень микробного загрязнения воздуха помещений зависит от количества людей, санитарного состояния помещения, наличия вентиляции, частоты проветривания, способа уборки, степени освещенности и многих других факторов. Воздух служит фактором передачи респираторных инфекций, при которых возбудитель может передаваться воздушно-капельным или воздушно-пылевым путем.

Микроорганизмы в воздухе находятся в состоянии аэрозоля. **Микробный аэрозоль** представляет собой коллоидную систему, состоящая из воздуха, капелек жидкости или твердых частиц и микроорганизмов. Размер аэрозольных частиц варьируется от 10 до 2000 нм. При чихании может образовываться до 40000 капель. Выделяют три основные фазы микробного аэрозоля: капельная фаза, мелкодоядерная фаза и фаза “бактериальной пыли”.

**Капельная (крупноядерная) фаза** состоит из бактериальных клеток, окруженных водно-солевой оболочкой. Диаметр частиц этой фазы составляет более 0,1 мм, а длительность пребывания в воздухе - несколько секунд.

**Мелкодоядерная фаза** образуется при высыхании частиц капельной фазы. В этой фазе частицы имеют маленькие размеры (диаметр частиц не более 0,05 мм), легко перемещаются потоками воздуха и длительно находятся во взвешенном состоянии. В этой фазе большинство возбудителей воздушно-капельных инфекций распространяется на значительные расстояния.

**Фаза “бактериальной пыли”** состоит из частиц диаметром от 0,01 до 1 мм. Такие частицы способны проникать в глубокие отделы дыхательных путей.

Воздух может выступать в качестве фактора передачи инфекционных заболеваний человека. Патогенные и условно-патогенные микробы попадают в воздух с каплями слюны человека или животных, при кашле, разговоре, чихании (рисунок 11.7).



Рисунок 11.7 - Распространение аэрозоля при кашле.

Через воздух передаются возбудители бактериальных (туберкулеза, дифтерии и др.), вирусных (гриппа, ветряной оспы и др.) и грибковых (например, аспергиллеза) инфекций.

Санитарно-показательными микроорганизмами воздуха являются стафилококки, альфа- и бета-гемолитические стрептококки, для хирургических клиник и родильных домов – также синегнойная палочка, для аптек – плесневые грибы. Наличие спорообразующих палочек в воздухе свидетельствует о запыленности и отсутствии влажной уборки, наличие плесневых грибов – о повышенной влажности.

Санитарно-микробиологические показатели воздуха нормируются только для закрытых помещений в зависимости от их типа и назначения. В таблице 11.4 представлены критерии оценки воздуха жилых помещений.

Таблица 11.4 – Критерии оценки воздуха жилых помещений

Оценка воздуха	Общее количество бактерий в 1 м <sup>3</sup>	Количество стрептококков в 1 м <sup>3</sup>
Лето:		
чистый	до 1500	до 16
загрязненный	до 2500	до 36
Зима:		
чистый	до 4500	до 36
загрязненный	до 7000	до 124

Исследование воздуха на наличие микроорганизмов осуществляют седиментационным или фильтрационным методами.

**Седиментационный метод Коха** предусматривает использование чашек Петри с питательной средой. Открытую чашку помещают на горизонтальную поверхность на уровне стола на определенное время. Затем чашку закрывают и инкубируют в термостате. Ориентировочно по количеству выросших колоний судят о чистоте воздуха. Воздух оценивается чистым при количестве колоний менее 250, средне загрязненный – при количестве 250-500 колоний и загрязненный – при числе колоний более 500. Для выявления стафилококков используют желточно-солевой агар (ЖСА), стрептококков – кровяной агар (КА), грибов – среду Сабуро.

С помощью седиментационного метода Коха можно определить количество микроорганизмов в  $1 \text{ м}^3$  воздуха. Для этого используют перерасчет по В.Л. Омелянскому: за 5 минут на площади  $100 \text{ см}^2$  оседает такое количество бактерий, которое находится в  $10 \text{ л}$  воздуха. Перерасчет производят с помощью формулы:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{75 \text{ см}^2}$$

X – количество микроорганизмов в  $1 \text{ м}^3$  воздуха;

A – количество колоний на агаре в чашке Петри;

$75 \text{ см}^2$  – площадь стандартной чашки Петри;

100 – коэффициенты перевода на  $100 \text{ см}^2$  и  $1 \text{ м}^3$ .

**Аспирационный метод** основан на принудительном осаждении микроорганизмов на поверхности плотной питательной среды или в улавливающей жидкости. С этой целью используют аппарат Кротова, бактериоулавнитель Речменского, прибор ПОВ-1 и другие приборы-аспираторы.

Принцип работы аппарата Кротова для бактериологического исследования воздуха и его аналога пробоотборника бактериологического Тайфун-Р40 (М) (рисунок 11.8) основан на просасывании воздуха через клиновидную щель в крышке аппарата. Микроорганизмы, находящиеся в воздухе, попадают внутрь камеры и прилипают к плотной питательной среде в открытой чашке Петри, находящейся под крышкой аппарата.

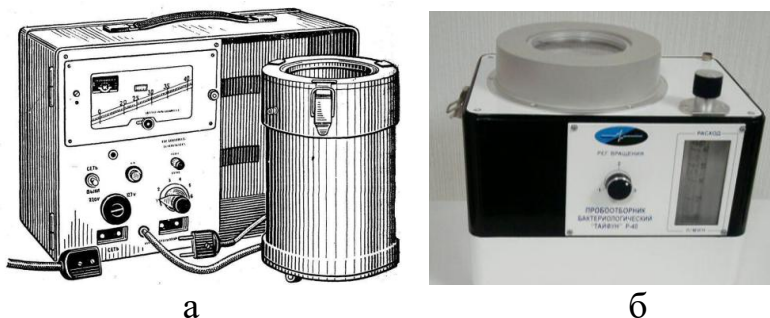


Рисунок 11.8 – Аппарат Кротова (а) и пробоотборник Тайфун-Р40М (б).

Аппарат Кротова позволяет контролировать объем отбираемой пробы. Обычно отбор проб производят со скоростью  $20\text{-}25 \text{ л/мин}$  в течение 5 минут. После отбора воздуха чашки закрывают крышкой и помещают в термостат.

В некоторых приборах отбираемый воздух фильтруют через жидкость (рисунок 11.9).

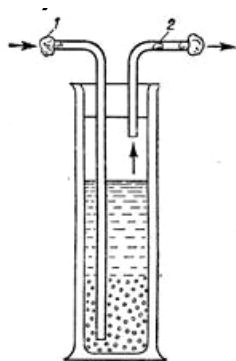


Рисунок 11.9 – Фильтрация воздуха через жидкость (прибор Дьяконова): 1 – трубка для поступления воздуха; 2 – трубка, выводящая воздух..

По окончании отбора воздуха с использованием таких приборов производят посев жидкости на плотную питательную среду. В этом случае можно применять элективные питательные среды и проводить специальные бактериологические исследования.

Современные пробоотборники воздуха (Bio Sas Super, Mas 100 и др.) отличаются компактностью, дизайном, удобством в работе и другими преимуществами (рисунок 11.10).



а

б

в

Рисунок 11.10 – Пробоотборники воздуха: а - Bio Sas Super, б - Mas 100, в – Sampl Air Lite.

Для помещений разного функционального предназначения установлены определенные требования к уровням бактериальной обсемененности. В частности, СанПиН 2.1.3.1375-03 регламентирует уровни бактериальной обсемененности воздуха лечебных учреждений в зависимости от их функционального назначения и класса чистоты (таблица 11.5).

Таблица 11.5 – Допустимые уровни бактериальной обсемененности воздушной среды помещений лечебных учреждений в зависимости от их функционального назначения и класса чистоты

№№ пп	Класс чистоты	Название помещения	Санитарно-микробиологические показатели		
			Общее количество микроорганизмов	Количество колоний <i>S. aureus</i> в 1 м <sup>3</sup> воздуха	Количество плесневых и дрожжевых



			в 1 м <sup>3</sup> воздуха (КОЕ/м <sup>3</sup> )		(КОЕ/м <sup>3</sup> )		грибов в 1 дм <sup>3</sup> воздуха	
			до начала работы	во время работы	до начала работы	во время работы	до начала работы	во время работы
1.	Особо чистые (А)	Операционные, родильные залы, асептические боксы для гематологических, ожоговых пациентов, палаты для недоношенных детей, асептический блок аптек, стерилизационная (чистая половина), боксы бактериологических лабораторий	Не более 200	Не более 500	Не должно быть	Не должно быть	Не должно быть	Не должно быть
2.	Чистые (Б)	Процедурные, перевязочные, предоперационные, палаты и залы реанимации, детские палаты, комнаты сбора и пастеризации грудного молока, ассистентские и фасовочные аптек, помещения бактериологических и клинических лабораторий, предназначенные для проведения исследований	Не более 500	Не более 750	Не должно быть	Не должно быть	Не должно быть	Не должно быть
3.	Условно чистые (В)	Палаты хирургических отделений, коридоры, примыкающие к операционным, родильным залам, смотровые, боксы и палаты инфекционных отделений, ординаторские, материальные, кладовые чистого белья	Не более 750	Не более 1000	Не должно быть	Не более 2	Не должно быть	Не должно быть
4.	Грязные	Коридоры и	Не нормируется		Не нормируется		Не нормируется	

	(Г)	помещения административных зданий, лестничные марши лечебно-диагностических корпусов, санитарные комнаты, туалеты, комнаты для грязного белья и временного хранения отходов			
--	-----	---	--	--	--

Обеззараживание воздуха закрытых помещений проводят разными способами, в том числе с использованием газов, аэрозолей или УФЛ-аэроионизаторов.

### 11.5. Микрофлора организма человека

Организм человека заселен примерно 500 видами микроорганизмов, составляющими его нормальную микрофлору. На каждую клетку организма человека приходится 10 бактериальных клеток. По подсчетам ученых, каждый взрослый человек имеет в организме от 1,5 до 3 кг микробов. Около 60% всех бактерий находится в кишечнике. Обитающие в организме человека микроорганизмы образуют сообщество, ассоциацию или **микробиоценоз**. При этом представители нормальной микрофлоры находятся в состоянии равновесия друг с другом и с организмом человека. Такое состояние называется **эубиозом**. Микрофлора неравномерно заселяет отдельные органы и системы организма человека. Относительно однородный по структуре участок организма человека, занятый определенным биоценозом, называется **биотопом** (полость рта, конъюнктив и т.д.). В сложившихся биотопах количественный и качественный состав микробного сообщества специфичен, стационарен и обладает способностью к аутостабилизации. Бактерии обладают способностью чувствовать плотность популяции и быстро отвечать на нее индукцией определенных генов. Этот тип регуляции получил название **Quorum sensing (QS)** – чувство кворума. Это свойство основано на действии низкомолекулярных сигнальных молекул различной природы, синтезируемых бактериями.

Основные биотопы организма человека представлены на рисунке 11.11. Открытыми биотопами, сообщающимися с внешней средой, являются кожа, расположенные до голосовой щели отделы респираторного тракта, ротовая полость, желудочно-кишечный тракт, слизистые оболочки глаз, носа, передней уретры, вагина. В норме **от микробов свободными** являются кровь, ликвор, синовиальная жидкость, костный мозг, брюшная полость, плевральная полость, матка, простата, почки, мочевой пузырь.

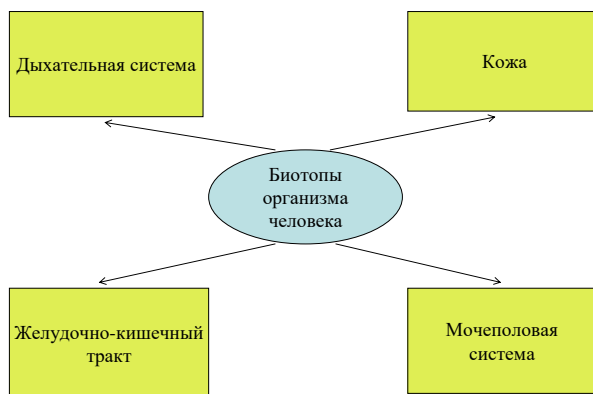


Рисунок 11.11 – Основные биотопы организма человека.

В организме человека естественная микрофлора любых отделов подразделяется на постоянную и транзиторную микрофлору (рисунок 11.12).

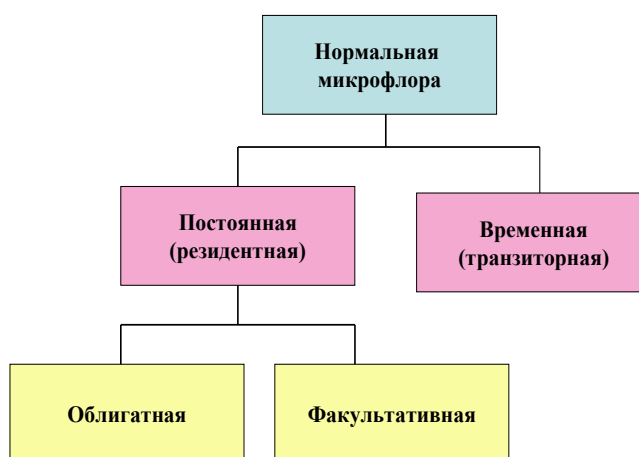


Рисунок 11.12 – Виды нормальной микрофлоры организма человека.

**Постоянная** (резидентная, индигенная или аутохтонная) микрофлора представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в том или ином биотопе организма. Она относительно стабильна по составу. **Транзиторная** (непостоянная, случайная или аллохтонная) микрофлора не способна к длительному существованию в организме, она состоит из особей, занесенных извне.

Постоянную микрофлору в свою очередь подразделяют на облигатную и факультативную. **Облигатная микрофлора** является основой микробиоценоза, она противодействует заселению биотопа посторонними микроорганизмами, выполняет защитные функции. Доля облигатной микрофлоры в составе биоценоза в несколько раз выше, чем доля факультативной составляющей. **Факультативная микрофлора** составляет меньшую часть микробиоценоза.

Количество микроорганизмов у взрослого человека составляет около  $10^{14}$  особей. Разные участки тела человека заселены микроорганизмами по-разному (рисунок 11.13).

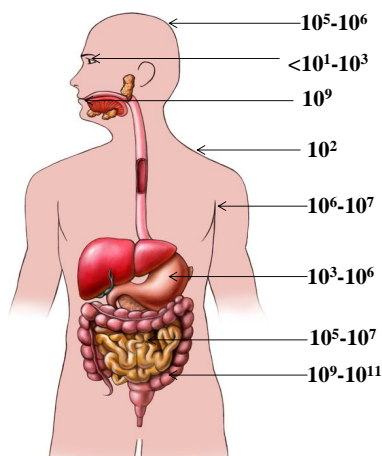


Рисунок 11.13 – Распределение микрофлоры в организме человека.

На слизистых оболочках микроорганизмы, составляющие нормальную микрофлору, заключены в высокогидратированный экзополисахаридно-муциновый матрикс, образуя биологическую пленку, устойчивую к различным неблагоприятным воздействиям (рисунок 11.14).

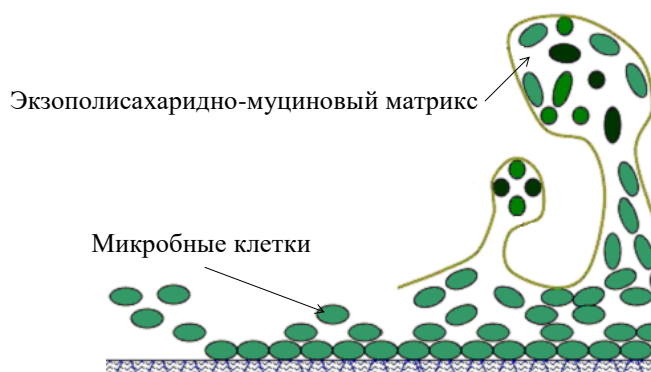


Рисунок 11.14 – Формирование биопленки.

Микроорганизмы, обитающие в кишечнике, подразделяются на пристеночные (адгезированные на стенке кишечника) и полостные (просветные, свободно располагающиеся в просвете кишечника). В здоровом организме качественный состав пристеночной микрофлоры стабильный. Биопленку формирует пристеночная микрофлора. Биопленка представляет собой не просто скопление бактерий, а своеобразный многоклеточный организм, в котором каждая разновидность бактерий выполняет свою “работу”. Кооперация между отдельными микроорганизмами осуществляется именно с помощью упомянутой особой системы общения (Quorum Sensing). Для этого бактерии пользуются специфическими сигнальными молекулами, напоминающими гормоны многоклеточных организмов.

**Межбактериальный матрикс** составляет основу биопленки, его объем составляет до 80% биопленки. Он состоит из веществ, выделяемых самими бактериями (экзополисахаридов), и муцина, продуцируемого клетками слизистой оболочки. Матрикс пронизан каналами, по которым циркулируют питательные вещества, продукты жизнедеятельности, ферменты, метаболиты и кислород.

Нормальная микрофлора организма человека является своеобразным “экстракорпоральным органом”. Она выполняет следующие функции:

- колонизационная резистентность слизистых оболочек (сопротивляемость, устойчивость к заселению слизистых оболочек и кожи посторонней микрофлорой, межмикробный антагонизм, активация иммунной системы);

- детоксикационная функция (гидролиз экзогенных и эндогенных продуктов метаболизма белков, липидов, углеводов, трансформация лекарственных препаратов, нейтрализация веществ, индуцирующих канцерогенез);

- синтетическая функция (образование витаминов группы В, К, никотиновой и фолиевой кислот, антибиотикоподобных веществ, аминокислот, пептидов, органических кислот, бактериоцинов, ферментов, расщепляющих сложные соединения);

- пищеварительная функция (влияние на структуру слизистой оболочки кишечника, поддержание морфологического и функционального состояния эпителиальных клеток и желез пищеварительного тракта, улучшение пищеварения и усиление перистальтики кишечника).

**Колонизационная резистентность** обеспечивается способностью нормальной микрофлоры адгезироваться на эпителии слизистой оболочки, образуя на ней пристеночный слой и тем самым препятствуя прикреплению к слизистой патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (приэпителиальный слизистый барьер). Кроме того, нормальная микрофлора синтезирует ряд веществ (органических кислот, перекиси водорода, других биологически активных субстанций), подавляющих рост и размножение патогенов. Наконец, колонизационная резистентность обусловлена конкуренцией нормальной микрофлоры с патогенными микроорганизмами за источники питания (рисунок 11.15).

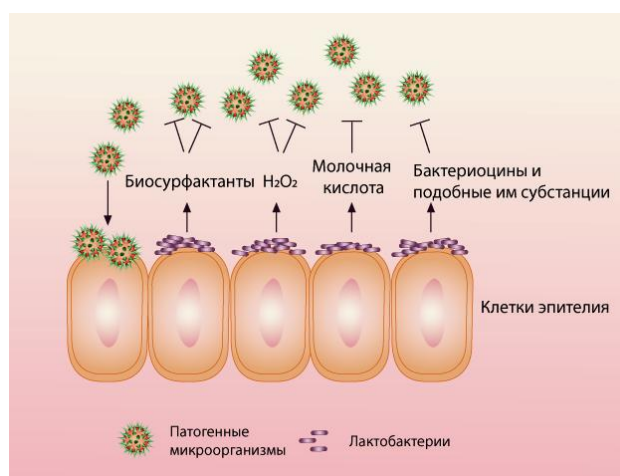


Рисунок 11.15 – Колонизационная резистентность слизистых оболочек.

**Антагонистическая активность** нормальной микрофлоры реализуется путем образования кислых продуктов, подавляющих рост микроорганизмов-конкурентов (молочная и уксусная кислоты), биосинтеза веществ, обладающих антибиотикоподобными свойствами, конкуренции бактерий за пищевые субстраты и за площадь адгезии на клетках эпителия.

Обеспечение этих функций позволяет считать нормальную микрофлору одним из факторов неспецифической резистентности организма. В свою очередь, состав нормальной микрофлоры контролируется следующими факторами макроорганизма:

- механические факторы (десквамация эпителия, удаление микробов секретами, перистальтикой кишечника, гидродинамической силой мочи и др.);
- химические факторы (соляная кислота желудка, желчные кислоты тонкого кишечника, щелочной секрет кишечника и др.);
- бактерицидные секреты слизистых оболочек и кожи;
- иммунные механизмы (подавление адгезии микробов на слизистых оболочках антителами класса IgA).

**Микрофлора кожи** зависит от особенностей ее строения (рисунок 11.16).

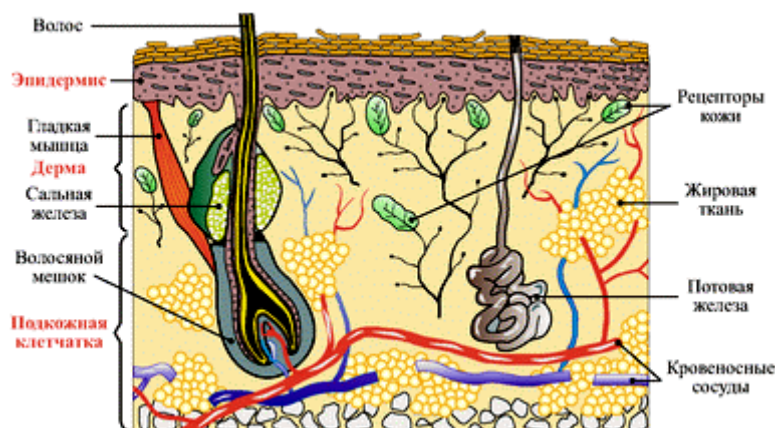


Рисунок 11.16 – Строение кожи.

На коже присутствуют как аэробные, так и анаэробные бактерии. В волосяных мешочках, протоках сальных и потовых желез в 2-10 раз больше анаэробных микроорганизмов, чем аэробных. Анаэробные бактерии *Propionibacterium acnes* часто обнаруживаются в протоках сальных желез на крыльях носа, головы, спины. В подростковом периоде на фоне гормональной перестройки организма они являются причиной возникновения юношеских угрей – *acne vulgaris* (рисунок 11.17).



Рисунок 11.17 – Юношеские угри.

Кожу колонизируют грамположительные бактерии (пропионибактерии, коринеформные бактерии, эпидермальный стафилококк, микрококки, пептострептококки, стрептококки, *Dermabacter hominis*), дрожжеподобные грибы рода *Pityrosporum* (новое название - *Malassezia*), реже встречаются *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* и другие бактерии. При ослаблении организма на коже возрастает количество грамотрицательных бактерий.

**Резидентная микрофлора кожи** представлена в основном сапрофитными грамположительными бактериями (непатогенными коринебактериями, эпидермальным и сапрофитным стафилококками, микрококками, бациллами), грибами рода *Malassezia*. **Транзиторная микрофлора кожи** включает сарцины, грибы рода *Candida*, плесневые грибы.

В норме на 1 см<sup>2</sup> кожи обнаруживается до 80000 микроорганизмов. На микрофлору оказывают влияние бактерицидные факторы кожи. Например, пот содержит иммуноглобулины классов А и G, трансферрин, лизоцим, органические кислоты и другие противомикробные вещества. Низкий уровень рН (5,5), низкая температура кожи также ограничивают размножение микроорганизмов. Наибольшее количество микроорганизмов встречается на увлажненных участках кожи (10<sup>6</sup> бактерий на 1 см<sup>2</sup>), например, в паховых складках, межпальцевых промежутках, подмышечных впадинах. Усиленный рост микроорганизмов происходит при загрязнении кожи. Размножающиеся на коже микроорганизмы определяют запах тела.

**Микрофлора конъюнктивы.** На конъюнктиве глаза имеется небольшое количество коринеформных бактерий (рисунок 11.18) и стафилококков. Незначительное количество микробов на конъюнктиве обусловлено в основном бактерицидным действием лизоцима, содержащегося в слезной жидкости.

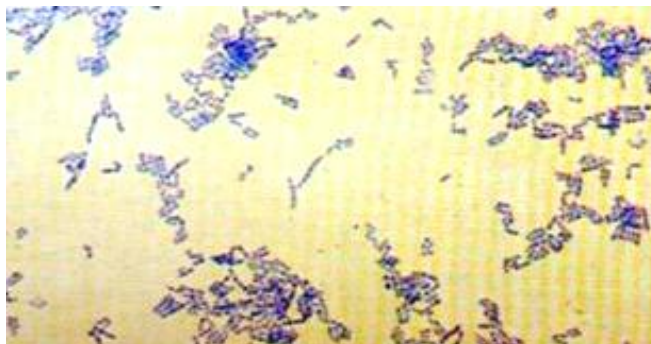


Рисунок 11.18 – *Corynebacterium xerosis*, мазок с конъюнктивы глаза.

**Микрофлора дыхательных путей.** В верхние дыхательные пути с вдыхаемым воздухом попадают пылевые частицы, содержащие микроорганизмы, большая часть которых задерживается и выводится с выдыхаемым воздухом или погибает в носоглотке и ротоглотке. В верхних дыхательных путях обнаруживаются бактериоиды, коринеформные бактерии, гемофильные палочки, лактобактерии, стафилококки, стрептококки, непатогенные нейссерии, пептококки, пептострептококки и другие микроорганизмы. Больше всего микроорганизмов находится в носоглотке. Гортаны, трахея, бронхи и альвеолы обычно стерильны (рисунок 11.19).

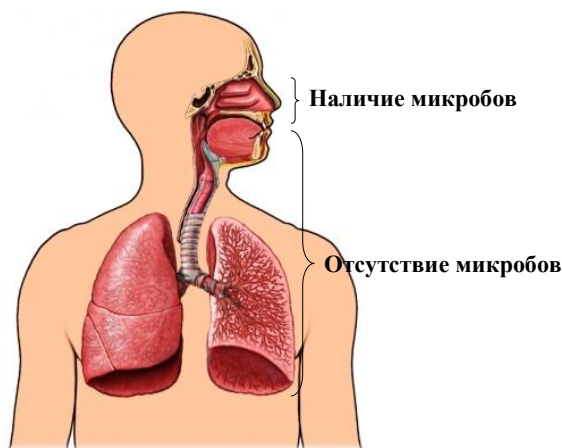


Рисунок 11.19 – Распространение микроорганизмов в дыхательных путях.

Выведение попавших в дыхательные пути частиц, в том числе микроорганизмов, происходит с помощью мукоцилиарного транспорта. Основная роль в этом механизме принадлежит мерцательному эпителию и слизи, вырабатываемой специальными железами (рисунок 11.20).

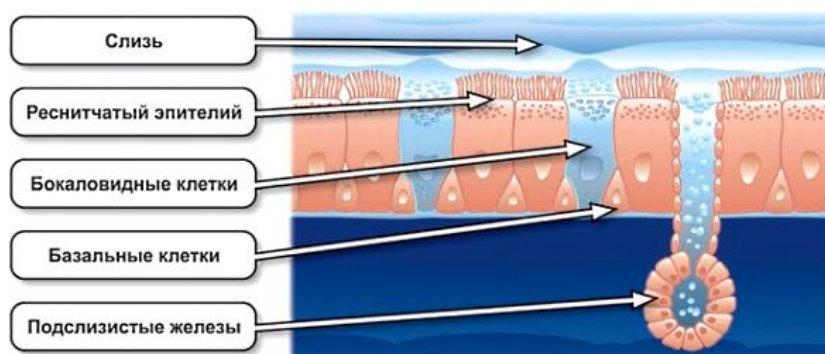


Рисунок 11.20 – Строение эпителия дыхательных путей.

**Микрофлора желудочно-кишечного тракта** является наиболее представительной по своему качественному и количественному составу. Микроорганизмы обитают как в полости пищеварительного тракта, так и на поверхности слизистых оболочек в виде биопленки.

**Ротовая полость.** В полости рта обитают многочисленные микроорганизмы. В 1 мл слюны обнаруживается до  $10^8$  бактерий. Наличие большого количества бактерий в ротовой полости способствуют ее анатомические особенности: десневые карманы, складки слизистой оболочки, межзубные промежутки, обилие питательных веществ, благоприятная температура ( $37^\circ\text{C}$ ) и щелочная реакция среды. Среди микроорганизмов ротовой полости преобладают анаэробные бактерии. В полости рта обитают бактероиды, превотеллы, порфиромонады, бифидобактерии, фузобактерии, лактобактерии, актиномицеты, лептотрихии, непатогенные нейссерии, непатогенные спирохеты, стрептококки, стафилококки, пептококки, пептострептококки, вейлонеллы, грибы рода *Candida* и простейшие - *Entamoeba gingivalis*, *Trichomonas tenax* (рисунок 11.21).



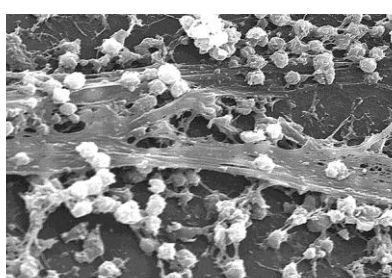


Рисунок 11.21 – Микробиоценоз полости рта.

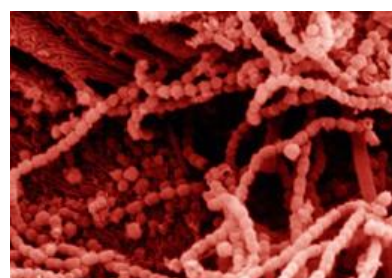
Различные виды бактерий в ротовой полости имеют определенное топографическое распространение. Так, из числа стрептококков на эпителии щек обнаруживаются *S. mitis*; на сосочках языка и в слюне – *S. salivarius*; на зубах - *S. mutans*. Актиномицеты присутствуют в больших количествах на языке, в десневых карманах, на зубных бляшках и в слюне. Представители микрофлоры полости рта представлены на рисунке 11.22.



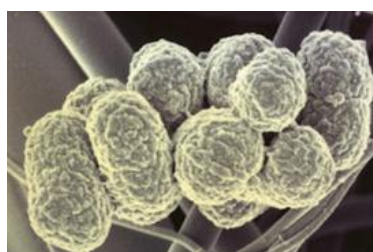
*Streptococcus salivarius*



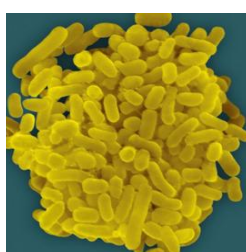
*Streptococcus sanguis*



*Streptococcus mitis*



Вейллонеллы



*Porphyromonas gingivalis*



*Fusobacterium nucleatum*

Рисунок 11.22 – Представители микрофлоры ротовой полости.

Состав микрофлоры полости рта регулируется механическим действием слюны и языка; микроорганизмы смываются слюной со слизистой оболочки и зубов (человек проглатывает в день около литра слюны). Лизоцим и секреторный IgA подавляют адгезию микробов к эпителиоцитам. Однако некоторые бактерии (*S. sanguis* и *S. mutans*) образуют полисахариды, участвующие в адгезии к зубной поверхности.

**Пищевод** практически не содержит постоянной микрофлоры. Микробиоценоз пищевода непостоянный и зависит от характера пищи. В просвете пищевода могут встречаться микроорганизмы, попавшие из ротовой полости.

**Желудок.** Концентрация микроорганизмов в желудке составляет менее  $10^3$  КОЕ/мл, что объясняется низким значением рН желудочного сока. Кислая среда желудка является неблагоприятной для жизни многих микроорганизмов. Микрофлора желудка представлена лактобациллами и дрожжами, единичными кокками и грамотрицательными бактериями. При гастритах, язвенной болезни в желудке присутствует *Helicobacter pylori* - этиологический фактор гастрита, язвы, рака желудка.

**Тонкий кишечник.** В тонком кишечнике содержится до  $10^9$  КОЕ в 1 мл содержимого. Среди представителей нормальной микрофлоры тонкого кишечника присутствуют бифидобактерии, лактобактерии, клостридии, энтерококки, порфиромонады, превотеллы и анаэробные кокки.

**Толстый кишечник.** В толстом кишечнике содержится наибольшее количество микроорганизмов. В 1 г фекалий обнаруживается до  $10^{12}$  микробных клеток. Микрофлора толстого кишечника представлена как анаэробными, так и аэробными микроорганизмами (таблица 11.6).

Таблица 11.6 – Представители нормальной микрофлоры толстого кишечника

Вид микрофлоры	Представители
Анаэробная микрофлора (90-95%)	Бактероиды, бифидобактерии, лактобактерии, вейлонеллы, пептострептококки, клостридии
Аэробная микрофлора (5-10%)	Кишечная палочка, протей, энтеробактер, цитробактер, энтерококки, стрептококки, дрожжеподобные грибы

Основными представителями микрофлоры толстой кишки являются грамположительные анаэробные палочки (бифидобактерии, лактобациллы); грамположительные спорообразующие анаэробные палочки (клостридии); энтерококки; грамотрицательные анаэробные палочки (бактероиды); грамотрицательные факультативно-анаэробные палочки (кишечные палочки, цитробактер, энтеробактер, клебсиеллы, протей и др.); анаэробные грамположительные кокки (пептострептококки, пептококки). В меньших количествах в толстом кишечнике обнаруживаются фузобактерии, порфиромонады, превотеллы, пропионибактерии, вейлонеллы, стафилококки, дрожжеподобные грибы рода *Candida*, простейшие (*Blastocystis hominis*, *Entamoeba polecki*, *Trichomonas hominis* и др.).

По количественному составу облигатная микрофлора толстой кишки распределяется следующим образом:

- бифидобактерии –  $10^{12}$  КОЕ/г;
- бактероиды –  $10^{11}$  КОЕ/г;
- лактобактерии –  $10^8$  КОЕ/г;
- кишечная палочка –  $10^7$  КОЕ/г.

Бифидобактерии и бактероиды (основная микрофлора) составляют 90-98% всей микрофлоры толстого кишечника, лактобактерии, пропионибактерии, кишечная палочка и энтерококки (сопутствующая микрофлора) – 1-9%, стафилококки, стрептококки, клостридии, клебсиеллы, вейлонеллы, цитробактер, энтеробактер и другие микробы (остаточная флора) – 1%.

Рост посторонней микрофлоры задерживается в результате антагонистических свойств нормальной микрофлоры толстого кишечника и антимикробного действия секреторного IgA.

Распределение нормальной микрофлоры в отделах желудочно-кишечного тракта представлено на рисунке 11.23.

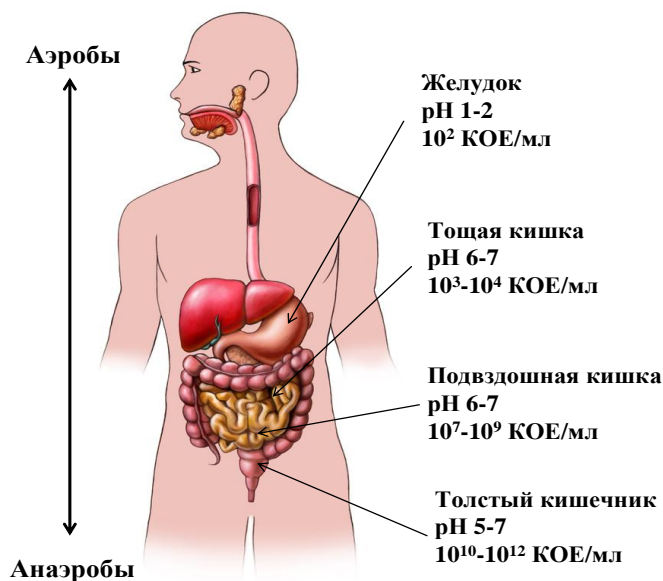


Рисунок 11.23 – Распределение микрофлоры по отделам желудочно-кишечного тракта.

**Микрофлора мочеполового тракта.** В норме почки, мочеточники, мочевого пузыря, матка и простата являются стерильными. Микрофлора наружных гениталий представлена эпидермальным стафилококком, коринеформными бактериями, зелеными стрептококками, сапрофитными микобактериями (*Mycobacterium smegmatis*), грибами рода *Candida* и другими бактериями. На слизистой оболочке передней уретры в норме обнаруживаются стафилококки, непатогенные нейссерии, коринеформные бактерии, сапрофитные трепонемы и др.

Нормальная микрофлора влагалища представлена лактобактериями, бифидобактериями, бактероидами, пропионибактериями, пептострептококками, коринеформными бактериями и др. Среди них преобладают анаэробные бактерии. В репродуктивный период жизни преобладают грамположительные бактерии, а в период менопаузы они заменяется грамотрицательными бактериями.

Эстрогены обуславливают накопление в вагинальном эпителии гликогена. Лактобактерии расщепляют гликоген слизистой оболочки влагалища с образованием молочной кислоты. В результате этого вагинальный секрет имеет кислую реакцию (рН 4-4,6), что подавляет рост посторонней микрофлоры.

**Возрастные изменения в составе микрофлоры организма человека.** При

внутриутробном развитии плод свободен от микробов. Во время родов происходит первая встреча организма ребенка с микрофлорой: попадание микроорганизмов на кожу и слизистые оболочки. В дальнейшем происходит формирование нормальной микрофлоры организма за счет микроорганизмов окружающей среды и микрофлоры организма матери. Нормальная микрофлора организма ребенка становится устойчивой к 1-3 месяцам жизни. В сформированном микробиоценозе кишечника преобладают бифидобактерии и лактобактерии.

При грудном вскармливании основой микрофлоры кишечника являются бифидобактерии ( $10^9$ - $10^{11}$  в 1 г кала). При искусственном вскармливании у недоношенных и слабых детей нарушается размножение бифидобактерий, увеличивается количество транзитной микрофлоры, грамотрицательных бактерий (энтеробактерий и др.), а также кокков.

При различных заболеваниях, под влиянием факторов окружающей среды, стрессовых воздействий, широкого и бесконтрольного применения антимикробных препаратов и в результате других причин нарушается количественное и качественное соотношение представителей нормальной микрофлоры, что способствует размножению патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В этом случае развивается патологический процесс, называемый **дисбактериозом (дисбиозом)**. Следовательно, дисбактериоз - это количественное и качественное изменение состава нормальной микрофлоры, приводящее к развитию или усугублению патологического процесса.

#### **Причины развития дисбактериоза:**

- заболевания желудочно-кишечного тракта инфекционной или неинфекционной природы;
- нерациональное применение антибиотиков и химиопрепаратов;
- неполноценное (несбалансированное) питание (особенно у детей первого года жизни);
- стрессовые ситуации;
- злокачественные новообразования;
- хирургические вмешательства;
- гормональные нарушения;
- иммунодефицитные состояния.

Таким образом, дисбактериоз - это не самостоятельное заболевание, а клинико-лабораторный синдром, который может наблюдаться при самых разных заболеваниях. Например, при снижении резистентности слизистой оболочки часто развивается кандидоз ротовой полости (рисунок 11.24).



Рисунок 11.24 – Кандидоз полости рта.

### **Микробиологические показатели дисбактериоза:**

- снижение численности одного или нескольких постоянных видов;
- потеря бактериями тех или иных признаков или приобретение новых свойств;
- повышение численности транзиторных видов;
- появление новых, несвойственных данному биотопу видов;
- ослабление антагонистической активности нормальной микрофлоры.

### **Стадии дисбактериоза:**

**I стадия** – компенсированная (латентная, субклиническая). В эту стадию происходит уменьшение количества одного из представителей постоянной микрофлоры без количественного изменения других представителей. Клинических симптомов в компенсированную стадию не выявляется. Рекомендуются диета.

**II стадия** – субкомпенсированная. В эту стадию наблюдается снижение количества или полная элиминация нескольких представителей постоянной микрофлоры и увеличение содержания транзиторной условно-патогенной микрофлоры. Клинически эта стадия проявляется дисфункцией кишечника, местными воспалительными процессами, стоматитом. Рекомендуются диета, функциональное питание, пробиотики, пребиотики и синбиотики.

**III стадия** – декомпенсированная. В эту стадию превалирует условно-патогенная микрофлора. Отдельные представители распространяются за пределы биотопа и появляются в тех органах и тканях, в которых они обычно не встречаются. Клинически эта стадия характеризуется выраженной дисфункцией кишечника, воспалительными процессами в тех или иных органах, вплоть до септических форм. Для коррекции дисбактериоза в эту стадию проводят **селективную деконтаминацию** (назначение антибиотиков – фторхинолонов, монобактамов, аминогликозидов) и длительную коррекцию нормальной микрофлоры с помощью пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков.

**Пробиотики** представляют собой препараты, содержащие живые микроорганизмы (представителей нормальной микрофлоры кишечника или выделенных из организма животных, объектов внешней среды), обладающие антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре и оказывающие позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина путем стабилизации и оптимизации функций его нормальной микрофлоры.

### **Состав пробиотиков:**

1. Содержащие бифидобактерии (монокомпонентные – бифидумбактерин, поликомпонентные – бифифор, бификол, комбинированные – бифилиз, бифидумбактерин форте, пробифор).

2. Содержащие лактобактерии (монокомпонентные – лактобактерин, биобактон, гастрофарм, поликомпонентные – ацилакт, комбинированные – кипацид, аципол).

3. Содержащие кишечную палочку (монокомпонентные – колибактерин, поликомпонентные – бификол, комбинированные – биофлор).

4. На основе других видов бактерий (монокомпонентные – споробактерин, бактисубтил, поликомпонентные – биоспорин, комбинированные – хилак форте).

Некоторые пробиотики представлены на рисунке 11.25.



Рисунок 11.25 – Пробиотики.

**Пребиотики** - это препараты немикробного происхождения, вещества, стимулирующие рост или активность нормальной микрофлоры кишечника (пищевые волокна, лактулоза, витамины, микроэлементы, олигосахариды и др.). Они не перевариваются и не усваиваются в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, но ферментируются микрофлорой толстого кишечника и стимулируют ее рост и жизнедеятельность. К числу пребиотиков относятся лактулоза (дюфалак, лактусан), ПАМБА (парааминометилбензойная кислота), лизоцим, пантотенат кальция (рисунок 11.26).



Рисунок 11.26 – Пребиотик – лактусан.

**Синбиотики** представляют собой препараты, состоящие из пробиотиков и пребиотиков. К их числу относятся биовестин-лакто, мальтодофилюс, бифидобак, бифидумбактерин мульти-1, 2, 3, ламинолакт, максилак (рисунок 11.27).



Рисунок 11.27 – Синбиотик максилак.

Таким образом, приемы коррекции дисбактериоза направлены на устранение причин и восстановление нормального биоценоза.

### 11.6. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Что такое микробиоценоз?
2. Охарактеризуйте формы симбиоза.
3. Охарактеризуйте микрофлору почвы.
4. Порядок проведения микробиологического исследования почвы.
5. Оценка санитарно-микробиологического состояния почвы.
6. Охарактеризуйте микрофлору воды.
7. Методика оценки микробиологического состояния воды.
8. Оценка санитарно-микробиологического состояния воды.
9. Охарактеризуйте микрофлору воздуха.
10. Расскажите о методах микробиологического исследования воздуха.
11. Назовите основные биотопы организма человека.
12. Функции нормальной микрофлоры организма человека.
13. Микрофлора кожи человека.
14. Микрофлора дыхательных путей.
15. Микрофлора пищеварительного канала.
16. Микрофлора мочеполовой системы.
17. Что такое дисбактериоз?
18. Каковы принципы коррекции дисбактериоза?

### 11.7. Тренировочные тесты

1. Методы отбора проб воздуха:
  - респираторный
  - + седиментационный
  - + аспирационный
  - парентеральный
  - воздушно-капельный
  
2. В толстой кишке человека преобладают:
  - облигатные аэробы
  - + облигатные анаэробы
  - факультативные анаэробы
  - микроаэрофилы
  - грибы
  
3. Санитарно-показательные микроорганизмы - это:
  - микроорганизмы, выделенные в лечебных учреждениях
  - + представители нормальной микрофлоры тела человека
  - патогенные микроорганизмы

- + индикаторы загрязнения внешней среды выделениями человека
- микроорганизмы санитарно-защитной зоны водоемов

4. В полости рта обитают преимущественно:

- облигатные аэробы
- факультативные анаэробы
- + облигатные анаэробы
- микроаэрофилы
- извитые формы

5. Представители нормальной микрофлоры тела человека:

- являются патогенными
- + препятствуют размножению патогенных микробов
- + могут вызвать заболевание при определенных условиях
- + используются для лечения дисбактериоза
- не растут на питательных средах

6. В составе нормальной микрофлоры толстой кишки преобладают:

- грибы рода *Candida*
- стафилококки
- клостридии
- стрептококки
- + бифидумбактерии

7. В составе нормальной микрофлоры влагалища преобладают:

- + лактобактерии
- герпесвирусы
- простейшие
- стафилококки
- стрептококки

8. Бифидумбактерин:

- добавляется в питательную среду для культивирования микробов
- + используется для лечения дисбактериоза
- + изготовлен из бактерий, обитающих в кишечнике человека
- является диагностическим препаратом
- вводится пациентам внутривенно

9. Кожа здорового человека заселена преимущественно:

- + грамположительными бактериями
- грибами рода *Candida*
- энтеробактериями
- бактероидами
- + дифтероидами

10. В состав биопрепаратов, применяемых для коррекции микрофлоры кишечника,



входят:

- сальмонеллы
- + лактобактерии
- стафилококки
- стрептококки
- + бифидобактерии

11. Дисбактериоз - это:

- внутрибольничная инфекция
- инфекция ЖКТ
- + нарушение количественного и качественного состава микрофлоры
- инфекционное заболевание кожи
- передается по наследству

12. Дисбактериоз кишечника выявляют:

- + бактериологическим методом
- серологическим методом
- при аллергологическом обследовании
- биологическим методом
- микроскопическим методом

13. В состав биопрепаратов, применяемых для коррекции микрофлоры кишечника, входят:

- + бифидобактерии
- + лактобактерии
- стафилококки
- сальмонеллы
- + эшерихии

14. Пробиотики - это:

- вакцины
- аллергены
- витамины
- + препараты из представителей нормофлоры
- бактериофаги

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 12. Уничтожение микробов в окружающей среде

### 12.1. Асептика

В микробиологических лабораториях для изучения свойств бактерий, определения вида возбудителя, приготовления защитных препаратов необходимо выделять микробы в виде монокультуры, содержащей особей одного вида. Такие культуры называют **чистыми культурами**, то есть культурами, не содержащими микробов других видов. Для поддержания культур в однородном состоянии необходимо принимать специальные меры, так как все окружающие объекты содержат множество микробов разных видов и могут загрязнить чистую культуру.

С другой стороны, используемой в работе микробной культурой можно загрязнить окружающие объекты и тем самым вызвать заболевание людей. Поэтому при работе с микроорганизмами в лаборатории необходимо преследовать двойную цель - защитить чистую культуру от загрязнения посторонней микрофлорой и защитить персонал от используемых в работе микроорганизмов. Система приемов по предотвращению поражения микробами различных объектов называется **асептикой** (*a* - отрицание, *sepsis* - гниение, заражение).

Термин “асептика” введен в медицинскую практику в 80-х годах XIX века немецким хирургом Э. Бергманом (рисунок 12.1) и его учеником К. Шимельбушем (K. Schimmelbusch, 1860-1895 гг.).



Рисунок 12.1 – Эрнст Бергман (Ernst von Bergmann, 1836-1907 гг.).

Э. Бергман предложил использовать в хирургической практике такие физические методы обеззараживания инструментов и принадлежностей как кипячение и обжигание. Однако основоположником асептики как науки является английский хирург Д. Листер (рисунок 12.2).

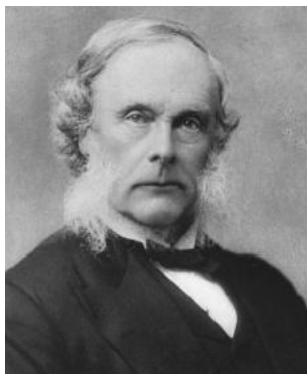


Рисунок 12.2 – Джозеф Листер (Joseph Lister, 1827-1912 гг.).

В то время под асептикой понимали приемы работы, направленные на предотвращение заражения раны возбудителями инфекций. Поэтому асептика достигалась посредством обеззараживания физическими и химическими способами всех соприкасающихся с раной предметов (инструментов, повязок, рук медицинского персонала и т. д.). В настоящее время под **асептикой** понимают систему профилактических мероприятий, направленных на предотвращение попадания микроорганизмов на любые объекты (в рану, лекарственные препараты, окружающую среду, питательные среды и т. д.). Основой асептики является стерилизация и дезинфекция.

Предотвращение заражения микробами людей, объектов внешней среды, а также чистых культур и биопрепаратов посторонними микробами возможно при соблюдении следующих основных принципов:

- **локализация** микроорганизмов - использование для работы с микробами минимально необходимого пространства (объема, площади);
- **изоляция** микроорганизмов - разобщение, обособление, ограничение места работы с микробами (применение боксов, защитных экранов, очков и других средств изоляции);
- **стерилизация** - полное обеспложивание объекта (освобождение от микробов) с помощью микробоцидных физических или химических факторов;
- **дезинфекция** - частичное или полное освобождение объектов от потенциально патогенных микроорганизмов (обезвреживание или обеззараживание объекта).

Для соблюдения асептических условий работы выполняются разнообразные мероприятия, обеспечивающие сохранение чистоты культуры используемых микроорганизмов и окружающих предметов. К таким мероприятиям относятся стерилизация используемых в работе принадлежностей, посуды, оборудования, материалов, питательных сред и растворов; приемы асептической работы с микроорганизмами (использование специальной одежды, масок, перчаток; работа в боксированных помещениях; влажная уборка с применением дезинфицирующих средств; использование бактерицидных облучателей и т. д.); обеспечение герметичности коммуникаций и оборудования и другие мероприятия. Асептические условия обеспечиваются также последовательностью выполнения дезинфекционных и стерилизационных мероприятий (рисунок 12.3).

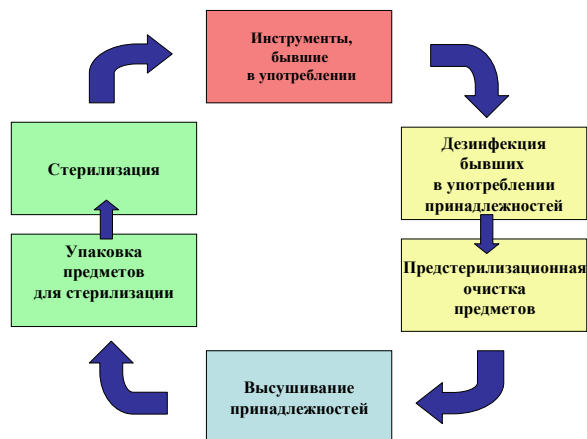


Рисунок 12.3 – Последовательность выполнения дезинфекционных и стерилизационных мероприятий.

Посуду перед стерилизацией моют и высушивают. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками и помещают в бикс или заворачивают в бумагу. Горловины колб обертывают бумагой. Пипетки помещают в пенал или заворачивают в бумагу по 5-10 штук. Чашки Петри помещают в контейнер (бикс) или заворачивают в бумагу. Шпатели Дригальского обертывают бумагой. Посуду и материалы стерилизуют в специальных цилиндрических решетчатых корзинах или в стерилизационных коробках - биксах (рисунок 12.4).



Рисунок 12.4 – Стерилизационная коробка – бикс.

Питательные среды и растворы стерилизуют в пробирках, флаконах, колбах. Для стерилизации материалов и инструментов используют крафт-пакеты или бумагу крепированную для стерилизации (рисунок 12.5).



Рисунок 12.5 – Крафт-пакеты (а) и бумага крепированная для стерилизации “Стерит” (б).

Перед началом работы с микроорганизмами персонал одевает защитную одежду (колпак, халат, маску, перчатки). В помещениях микробиологической лаборатории проводят ежедневную влажную уборку с использованием дезинфицирующих средств. Воздух лабораторий очищают от микробов облучением ультрафиолетовыми лучами или аэрозолем дезинфектанта. Для предотвращения заражения микробным аэрозолем работать необходимо вблизи пламени горелки, в боксах, с использованием кювет с ковриком, смоченным дезраствором.

Асептическое извлечение микробов из пробирок, флаконов или другой посуды осуществляют с помощью бактериологической иглы, бактериологической петли и пипеток разного объема. Бактериологическая игла предназначена для извлечения и инокуляции культуры объемом менее одной капли. Бактериологическая петля предназначена для извлечения и инокуляции культур объемом в каплю. Бактериологические иглы и петли стерилизуют фламбированием (прокаливанием в пламени спиртовки). В настоящее время выпускаются стерильные одноразовые пластиковые бактериологические иглы и петли, причем петли калиброваны на определенный объем жидкости (рисунок 12.6).

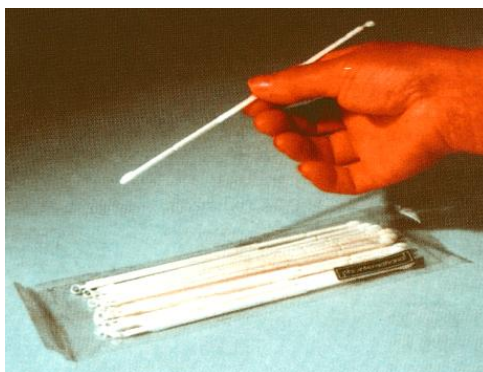


Рисунок 12.6 – Пластиковые бактериологические петли.

Питательную среду из флаконов разливают в чашки Петри рядом с зажженной спиртовкой.

Работу с микробными культурами проводят в боксах – изолированных помещениях (рисунок 12.7).



Рисунок 12.7 – Микробиологический бокс.

В последние годы для работы с микробными культурами широко

используют ламинарные шкафы, оснащенные системой направленной циркуляции и очистки воздуха (рисунок 12.8).

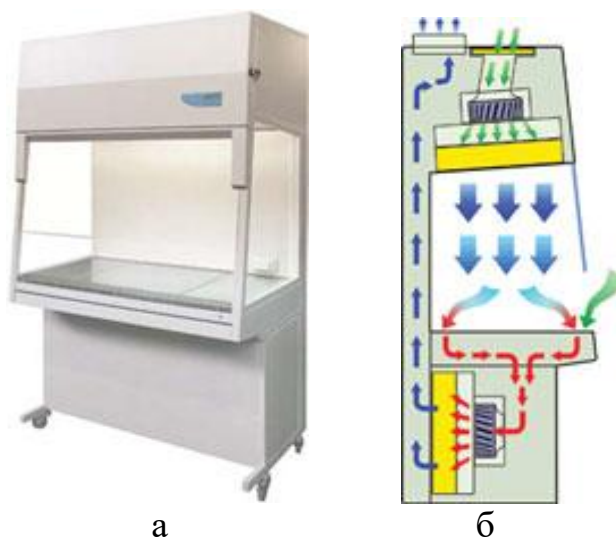


Рисунок 12.8 – Ламинарный шкаф (а) и схема циркуляции в нем воздуха (б).

Отводимый из лабораторных и производственных помещений воздух подвергают очистке от присутствующих в нем микроорганизмов. Для этих целей применяют специальные фильтры, изготовленные из волокнистых (бумага, картон) или пористых (полимеры, металлы, керамика) фильтрующих материалов. Стоки, образующиеся в микробиологических лабораторных или производственных помещениях, обеззараживают высокой температурой с использованием установок непрерывной ссериализации стоков (УНОС) или станций тепловой обработки стоков (СТОС).

## 12.2. Антисептика

**Антисептика** – это комплекс профилактических мероприятий, направленных на торможение роста, подавление размножения и уничтожение микробов в ране, патологическом очаге, на коже. Целью антисептики является предупреждение инфекционного процесса. Антисептика служит для обработки биологических тканей, в частности кожных покровов (руки медперсонала, операционное или инъекционное поля пациента).

Антисептические средства для профилактики и лечения гнойных ран использовались в древних времен. Еще Гиппократ и Парацельс использовали для этих целей винный и яблочный уксус, различные бальзамические мази. Термин “антисептика” (*anti* – против, *sepsis* – гниение) впервые применил английский ученый И. Прингл в 1750 г. для обозначения противогнилостного действия кислот. Методы антисептики внедряли в практику такие ученые как И.Ф. Земмельвайс, Н.И. Пирогов, Д. Листер. В частности, венгерский врач-акушер И.Ф. Земмельвайс (рисунок 12.9) предложил применять для обеззараживания рук хлорную известь.

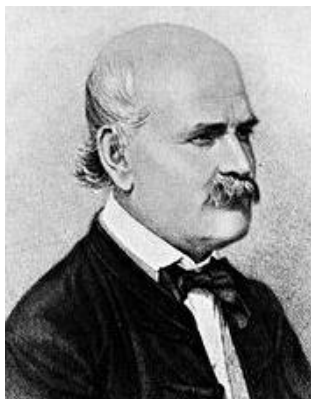


Рисунок 12.9 – Игнац Филипп Земмельвайс (Ignaz Philipp Semmelweis, 1818 – 1865 гг.).

Русский хирург Н.И. Пирогов (рисунок 12.10) использовал для обработки ран растворы азотнокислого серебра, йода, этиловый спирт.



Рисунок 12.10 – Николай Иванович Пирогов (1810 – 1881 гг.).

Д. Листер с целью обеззараживания воздуха предложил распылять в операционных раствор карболовой кислоты, а руки хирурга и операционное поле – обрабатывать 2-5 % растворами карболовой кислоты. По определению Д. Листера, антисептика – это мероприятия по уничтожению с помощью химических веществ возбудителей гнойных заболеваний в ранах и на объектах внешней среды, соприкасающихся с раной. В настоящее время антисептиками считаются средства, оказывающие антимикробное действие на микроорганизмы, находящиеся на кожных покровах и слизистых оболочках, а противомикробные средства, обеззараживающие объекты внешней среды, называются дезинфектантами.

Различают следующие методы антисептики:

- **механическая антисептика** (удаление из раны инфицированных и нежизнеспособных тканей);
- **физическая антисептика** (наложение гигроскопических повязок, применение гипертонических растворов, способствующих оттоку раневого отделяемого в повязку, сухого тепла, УФО, лазера);
- **химическая антисептика** (применение химических веществ, обладающих бактерицидным или бактериостатическим действием);
- **биологическая антисептика** (применение антибиотиков, бактериофагов).

Наибольшее распространение получила химическая антисептика. Химические антисептики вызывают гибель или подавляют рост и размножение микроорганизмов. Основными антисептическими препаратами являются спирты, йодсодержащие препараты, хлорсодержащие препараты, окислители, соединения тяжелых металлов, красители, кислоты (рисунок 12.11).



Рисунок 12.11 – Основные группы антисептиков.

**Йодсодержащие препараты** (2-10 % спиртовые растворы йода, раствор Люголя, йодиол, йодонат, йодовидон) оказывают микробицидное действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Действуют на споровые формы бактерий, грибы, вирусы. Механизм действия этих препаратов связан с коагуляцией белков микроорганизмов. Эти препараты используются как антисептики для обработки операционного поля, порезов, ссадин, лечения гнойных ран, трофических язв, ожогов. В соединении с ПАВ йод более активен и обладает дезинфицирующим эффектом. Недостатками этих препаратов являются раздражающее действие на кожу и способность вызывать аллергические реакции.

Широкое распространение получили **йодофоры** – комплексные соединения йода с поверхностно-активными веществами (ПАВ) или полимерами. Йодофоры активны в отношении бактерий, дрожжеподобных грибов, вирусов. По сравнению с йодом обладают меньшим раздражающим действием на кожу, сохраняют высокую бактерицидную активность в присутствии органических веществ (белка, крови, гноя). К йодофорам относятся йодонат, йодопирон, сульйодопирон, йодовидон. Эти препараты широко применяются для обработки операционного поля и рук хирурга.

**Спирты** обладают выраженным бактерицидным действием в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий, оказывают влияние на некоторые виды грибов, многие вирусы, но не обладают спороцидным действием. Спирты осаждают белки и вымывают из клеточной стенки липиды. Они используются в виде 60-70% водных растворов для обработки рук, инъекционного поля. Недостатками спиртов является быстрое снижение концентрации за счет испарения и способность к фиксации органических загрязнений. Этих недостатков лишены комбинированные препараты на основе спиртов – стериллиум, октенидерм, октенисепт, сагросепт и др.



**Хлорсодержащими антисептиками** являются хлоргексидин и хлорксилен. **Хлоргексидин** (дихлорсодержащее производное бигуанида) обладает широким спектром активности в отношении грамположительных бактерий. В отношении грамотрицательных бактерий он менее активен. Действует на некоторые грибы. Обладает выраженным пролонгированным эффектом. Механизм действия заключается во взаимодействии с фосфатными группами на поверхности микробной клетки, в результате чего отмечается нарушение целостности и гибель клетки. Препарат обладает стабильностью, сохраняет активность в присутствии крови и гноя. Используется для обработки операционного поля и рук медперсонала.

**Хлорксилен** (хлорксиленол) является хлорсодержащим производным фенола, обладает выраженной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, некоторых грибов и вирусов. На споры не действует.

**Окислители** объединяют препараты перекиси водорода и перманганат калия. Они вызывают разрушение клеточной мембраны бактерий. Основным недостатком перекиси водорода является нестабильность водных растворов и кратковременность действия. В практике используются комплексные препараты, например, первомур (смесь перекиси водорода и надмуравьиной кислоты) для обработки операционного поля, рук хирурга. Перманганат калия применяют для лечения ран, ожогов, эрозий, спринцеваний и промываний в гинекологической и урологической практике.

**Соединения тяжелых металлов** (ртути, меди, серебра, висмута, цинка) вызывают гибель микробов путем ингибирования жизненно важных ферментов внутри клеток (блокирование сульфгидрильных групп). Недостаток соединений тяжелых металлов – токсическое действие. В частности, по этой причине в настоящее время не используются препараты ртути.

Препараты серебра (протаргол, колларгол, нитрат серебра) применяются в качестве антисептиков. Эти препараты кроме выраженного бактерицидного действия стимулируют регенерацию тканей и не имеют побочного действия. Нитрат серебра в концентрации 1:10000 задерживает рост бактерий, при увеличении концентрации до 10% он обладает бактерицидной активностью. Активен в отношении гонококка, поэтому 1% раствор нитрата серебра закапывают в глаза новорожденным для профилактики офтальмии.

Сульфат цинка и сульфат меди являются слабыми антисептиками, используются при конъюнктивитах, уретритах, вагинитах.

Препараты висмута (ксероформ, дерматол и др.) обладают антисептическим, вяжущим и подсушивающим действием, входят в состав различных мазей и присыпок.

**Красители** (генциановый фиолетовый, бриллиантовый зеленый, фуксин, профлавин) используют в виде 0,5% водных или спиртовых растворов для обработки мелких ран, поверхностных бактериальных или грибковых поражений кожи. Действуют на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Антисептический эффект обусловлен сродством красителей к фосфорнокислым группам нуклеопротеидов микробных клеток.

**Кислоты** применяются в качестве антисептических и кератолитических средств (салициловая кислота), противомикробных и фунгицидных средств (бензойная кислота), антисептиков для санации полости рта, зева, для промывания

глаз, спринцеваний (борная кислота).

### 12.3. Дезинфекция

**Дезинфекция** (*des* - отрицание, *infectio* – инфекция, заражение) – это комплекс мероприятий по уничтожению в окружающей среде (на объектах или поверхностях) патогенных и условно-патогенных микробов. Она проводится с целью предотвращения возникновения инфекционного заболевания. Ее применяют тогда, когда невозможно применить стерилизацию (большие объемы, поверхности, стационарное оборудование, точные приборы). После дезинфекции могут сохраняться непатогенные микробы или их споры.

**Методы дезинфекции:**

1. **Химический метод** дезинфекции (использование химических веществ).
2. **Физические методы** дезинфекции: применение высоких температур (кипячение, применение водяного пара, сухого или влажного горячего воздуха), использование лучистой энергии (ультрафиолетовых лучей, ионизирующего излучения, ультразвука).
3. **Биологические методы** дезинфекции (биологическая очистка сточных вод, компостирование).

В медицинской практике чаще всего используют **химический метод** дезинфекции. Основные группы дезинфицирующих веществ по химическому составу представлены на рисунке 12.12.

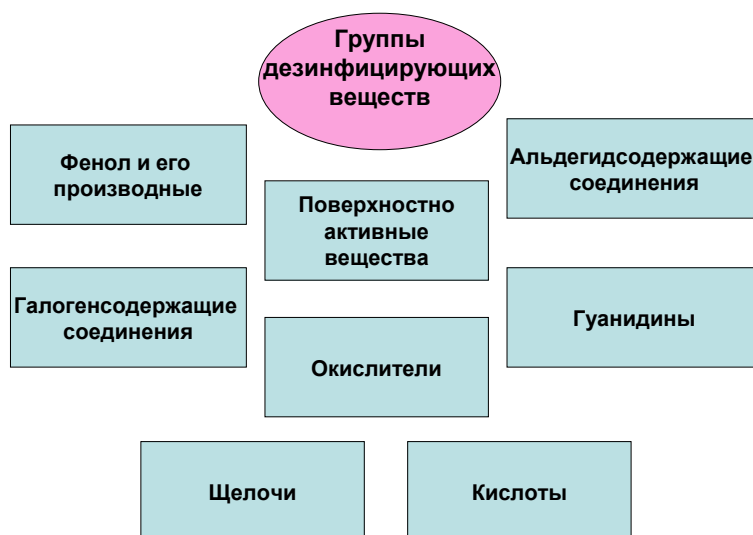


Рисунок 12.12 – Основные группы дезинфицирующих веществ по химическому составу.

**Галогенсодержащие соединения** имеют в своем составе хлор, бром или йод. **Хлор** - один из наиболее эффективных и широко используемых дезинфектантов. Наиболее распространенными хлорсодержащими препаратами являются гипохлориты кальция, хлорная известь и хлорамин. Они вызывают гибель

бактерий, грибов и вирусов. Недостатками этих препаратов являются токсичность для человека, коррозионная активность в отношении металлов и относительная нестабильность. Соединения хлора используются для дезинфекции питьевой воды, воды бассейнов и обеззараживания сточных вод.

Современные хлорсодержащие дезинфектанты (хлорсепт, стерина, неохла и др.) не обладают раздражающим действием на кожу и резким запахом, поэтому используются для различных методов дезинфекции.

**Окислители** объединяют перекись водорода, надкислоты (средства на основе надмуравьиной и надуксусной кислот) и их комбинированные препараты. Они являются мощными антимикробными веществами. Экологически безопасны. Механизм антимикробной активности окислителей связан с повреждением ферментных систем микроорганизмов, денатурацией микробных белков. Надмуравьиная кислота входит в состав препарата Первомур (перекись водорода с муравьиной кислотой). Надуксусная кислота составляет основу препарата Дезоксон, применяемого для дезинфекции медицинских инструментов. Недостатком перекиси водорода является низкая стабильность при хранении: препарат быстро разлагается на свету, при взаимодействии с металлами и органическими веществами. Перекись водорода используется для дезинфекции в виде 6% растворов, в более высокой концентрации – для химической стерилизации. Дезинфицирующий эффект достигается за счет свободного кислорода.

**Поверхностно-активные вещества.** Антимикробный эффект этих препаратов связан с изменением проницаемости цитоплазматической мембраны. Широкое распространение в качестве дезинфектантов получили четвертичные аммониевые соединения (ЧАС). Преимуществами этих препаратов являются отсутствие резкого запаха, низкая токсичность, хорошие моющие свойства, щадящее действие на обрабатываемые объекты. Недостатками ПАВ являются избирательность антимикробного действия (низкая активность в отношении грибов, спор, микобактерий), раздражающее действие. Наиболее распространенными препаратами на основе ЧАС являются Велтосепт, Катамин, Септустин, Септабик и другие.

Для обеззараживания помещений, белья, сантехники, медицинского оборудования из стекла, металла и пластмассы используют такие дезинфектанты из группы ЧАС как микробак-форте, био-клин, гексакуарт, септодор и др. Они обладают высокой бактерицидной активностью, хорошими моющими свойствами, низкой токсичностью, отсутствием резкого запаха, не обесцвечивают ткани, не вызывают коррозию. Недостатками этих препаратов являются низкая противовирусная активность и отсутствие спороцидного эффекта. Для расширения спектра действия к ним добавляют спирты, альдегиды и другие компоненты. К таким комбинированным препаратам относятся санифект, терралин, сентабик и др.

**Щелочи** обладают бактерицидной, вирулицидной и спороцидной активностью. Они вызывают гидролиз белков и расщепляют углеводы микробной клетки. Недостатком щелочей является порча обрабатываемых объектов. В результате этого щелочи не имеют широкого применения в дезинфекционной практике.

**Кислоты** обладают выраженным бактерицидным действием. Неорганические кислоты (азотная, соляная, серная) не используются в целях

дезинфекции, так как обладают агрессивным действием на обрабатываемые объекты. Некоторые органические кислоты (уксусная, бензойная, молочная) обладают выраженным бактериостатическим действием, поэтому используются при консервировании пищевых продуктов. Вместе с тем, органические кислоты также не нашли широкого применения в дезинфекционной практике. Муравьиная и уксусная кислоты входят в состав таких комбинированных препаратов как Первомур, Дезоксон-О, Одоксон, Дивозан-форте. Эти препараты обладают выраженным бактерицидным, спороцидным, фунгицидным и вирулицидным действием. Недостатками этих препаратов являются резкий запах и коррозионные свойства.

К числу **альдегидсодержащих соединений** относятся препараты, содержащие глутаральдегид, формальдегид, янтарный альдегид. Альдегиды необратимо связывают белки и нуклеиновые кислоты. Альдегиды имеют высокую токсичность и выраженную способность фиксировать на объектах органические загрязнения. Поэтому обрабатываемые объекты предварительно необходимо отмывать от органических загрязнений (кровь, гной и др.). Раствор формальдегида применяют для дезинфекции инструментов. В дополнении к дезинфицирующим свойствам, формальдегид уничтожает запахи и сохраняет ткани. Он вызывает гибель неспорообразующих патогенных бактерий. Используется в специальных камерах для стерилизации предметов, не выдерживающих сухого жара. Формальдегид в виде 40% водного раствора используют для стерилизации термолабильных предметов медицинского назначения (катетеров, эндоскопов и др.) в газовых стерилизаторах, для обеззараживания вещей (белья, матрасов и др.) в паро-формалиновых камерах. Смесь формалина со спиртом и гексахлорофеном является стерилизующим препаратом, уничтожающим многие бактерии, в том числе спорообразующие и микобактерии, вирусы.

Глутаральдегид в комбинации со щелочью и изопропиловым спиртом обладает бактерицидным, спороцидным и вирулицидным действием при короткой экспозиции. Используется при обработке оборудования для анестезии, аппаратов искусственного дыхания и инструментов с оптическими линзами. На основе глутарового альдегида разработаны препараты Лиоформин, Сайдекс, Стераниос и др.

**Фенол и его производные** взаимодействуют с белками микробной клетки и вызывают ее гибель. Растворы фенола обладают выраженным бактерицидным, фунгицидным и вирулицидным действием. На бактериальные споры не действуют. Фенол (карболовая кислота) уже в концентрации 0,2% ингибирует рост бактерий. Добавление к фенолу 5-10% соляной кислоты повышает его эффективность, даже в присутствии органических веществ. Поэтому этот препарат используется при дезинфекции фекалий, крови, мокроты, мочи и содержащих белок материалов. Не повреждает металл, ткань и окрашенные поверхности. При дезинфекции используют 3-5% растворы. Недостатки – стойкий запах и высокая токсичность. Фенолы входят в состав таких комбинированных дезсредств как Санифреш, Амоцид, Лизетол и др. В медицинских учреждениях используются редко.

Крезол более активен, чем фенол и менее токсичен. Мыльный раствор крезола (лизол) в виде 2,5% раствора используется для дезинфекции мокроты и фекалий. Успешно используется для дезинфекции объектов внешней среды, особенно контаминированных туберкулезными бактериями, а также экскретов

больных туберкулезом.

**Гуанидины** являются сложными органическими соединениями, активными в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Путем сочетания гуанидинов с ПАВ разработаны препараты Демос, Катасепт, Лизоформин и другие. Они предназначены для дезинфекции инструментов, посуды и других принадлежностей.

**Физические методы дезинфекции** просты и безопасны для персонала. К физическим методам дезинфекции относятся:

- **механические методы** (вытряхивание, проветривание, влажная уборка, стирка с моющим средством, фильтрация, вентиляция);
- **действие высоких температур** (проглаживание утюгом, кипячение, пастеризация, применение водяного пара, сухого или влажного горячего воздуха);
- **действие лучистой энергии** (ультрафиолетовые лучи, ионизирующее излучение, ультразвук).

**Механические методы** дезинфекции обеспечивают удаление, снижение концентрации микробов, а не уничтожение микроорганизмов. Использование пылесосов, фильтров, вентиляция, проветривание помещений, влажная уборка способствуют лишь снижению концентрации микрофлоры в воздухе помещений. Поэтому механические методы не являются основными в дезинфекции.

**Действие высоких температур** обеспечивает гибель микроорганизмов в результате коагуляции белка. Для температурного воздействия используют кипящую воду, сухой или влажный горячий воздух, водяной пар.

**Кипячение** в дистиллированной воде используют для дезинфекции изделий из стекла и металла, термостойких полимеров и резин. При этом вегетативные формы возбудителей погибают уже при температуре воды выше 60<sup>0</sup>С. Экспозицию (не менее 30 минут) выдерживают, начиная с момента закипания воды при полном погружении изделий, а при кипячении в воде с 2% бикарбоната натрия (содой) время экспозиции составляет не менее 15 минут. Однако кипячение не уничтожает споры и некоторые вирусы.

**Сухой горячий воздух** вызывает обезвоживание и гибель микроорганизмов. Он применяется в воздушных камерах для дезинфекции вещей.

**Влажный горячий воздух** обладает большей бактерицидностью за счет водяного пара. Поэтому влажный горячий воздух прогревает вещи быстрее и глубже, чем сухой.

**Водяной пар** является наиболее эффективным обеззараживающим средством, так как проникает вглубь обрабатываемого объекта. Водяной пар коагулирует белки микробной клетки и вызывает ее гибель. Водяной пар используется в дезинфекционных камерах (камерная дезинфекция) и паровых стерилизаторах. Камерной дезинфекции подвергаются вещи, которые не могут быть обеззаражены кипячением, замачиванием в химических дезсредствах или другим способом (верхняя одежда, постельные принадлежности). На рисунке 12.13 представлен внешний вид дезинфекционных камер.



Рисунок 12.13 – Дезинфекционные камеры разных типов.

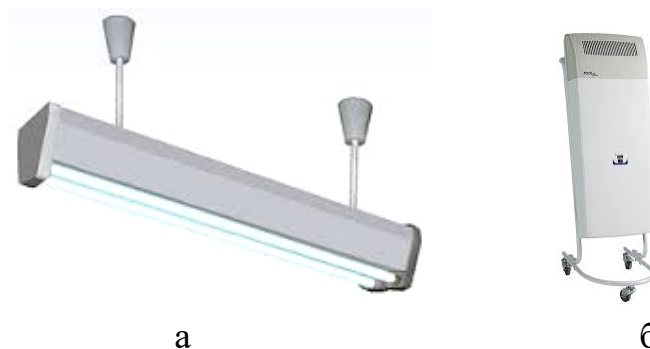
**Пастеризация** - это кратковременное прогревание продукта при температуре ниже  $100^{\circ}\text{C}$  с последующим быстрым охлаждением. Прогревание проводят при температуре  $65-95^{\circ}\text{C}$  от 30 секунд до 2 минут, что ведет к частичному обеспложиванию объектов. Как и кипячение, пастеризация не является методом стерилизации. После пастеризации сохраняются живыми споры и часть вегетативных форм. Пастеризацию широко применяют в производстве пищевых продуктов. В частности, при производстве молока применяют три вида пастеризации:

- **длительная пастеризация** производится при температуре  $63-65^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут;

- **кратковременная пастеризация** производится при температуре от  $72$  до  $75^{\circ}\text{C}$  с выдержкой 15-20 секунд;

- **моментальная пастеризация** молока требует высокой температуры ( $85-90^{\circ}\text{C}$ ) без выдержки или с кратковременной выдержкой. После пастеризации молоко нужно быстро охладить, так как медленное охлаждение создает условия для быстрого размножения оставшейся микрофлоры.

**Действие лучистой энергии** (ультрафиолетовые лучи, ионизирующее излучение, ультразвук) находит широкое распространение в медицинской практике. Наиболее распространены ультрафиолетовые бактерицидные облучатели (рисунок 12.14).



а

б

Рисунок 12.14 – Ультрафиолетовые бактерицидные облучатели: а – настенный, б – облучатель – рециркулятор.

Облучение ультрафиолетом используют для обработки воздуха и поверхностей в лечебных и лабораторных помещениях. Расчет необходимого количества бактерицидных облучателей и времени экспозиции проводят, исходя из объема помещения и характера микробной контаминации.

Дезинфекцию проводят как в процессе работы (**текущая дезинфекция**), так и после окончания работы (**заключительная дезинфекция**). Дезинфекцию лабораторных и производственных микробиологических помещений и находящегося в них оборудования проводят путем орошения дезинфицирующими растворами из гидропульта, автомакса, ручных распылителей или распылителей, соединенных с централизованным источником сжатого воздуха. На рисунках 12.15 и 12.16 представлен общий вид наиболее распространенных распылителей - гидропульта и автомакса.

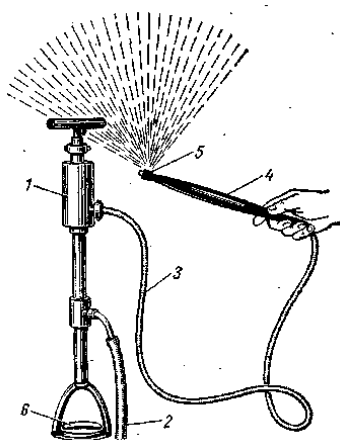


Рисунок 12.15 – Гидропульт: 1 – корпус; 2 – всасывающий шланг; 3 – нагнетающий шланг; 4 – штанга; 5 – форсунка; 6 – опора.

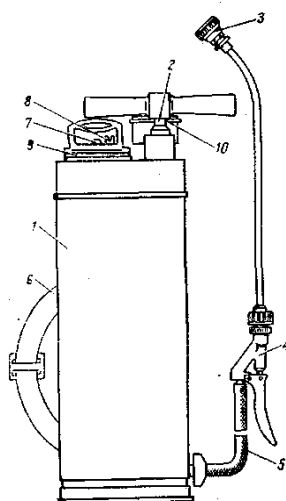


Рисунок 12.16 – Автомакс: 1 – корпус; 2 – насос; 3 – форсунка; 4 – пусковой механизм; 5 – шланг; 6 – плечевые ремни; 7 – спускной клапан; 8 – вентиль; 9 – крышка; 10 – манометр.

В настоящее время пользуются распылителями более современной конструкции (рисунок 12.17).



Рисунок 12.17 – Распылитель для дезсредств.

Альтернативным методом обработки поверхностей и воздуха является **парогазовый метод дезинфекции**. Этот метод предусматривает использование смеси, состоящей из нейтрального гипохлорита кальция, водного раствора этиленгликоля и хлорида аммония. Смесь готовится непосредственно в обрабатываемом помещении. В результате смешивания компонентов образуется парогазовое облако, заполняющее обрабатываемый объем. Эффективная обработка обеспечивается при температуре от минус 30<sup>o</sup>C до плюс 40<sup>o</sup>C в течение 30-минутной экспозиции.

**Контроль эффективности дезинфекции** осуществляют путем изучения наличия на обрабатываемом объекте возбудителей заболевания. При эффективной дезинфекции возбудитель должен отсутствовать в исследуемых пробах.

Для контроля работы дезинфекционных камер используют культуры бактерий. Например, при обработке вещей из очагов инфекций, вызванных непорообразующими микроорганизмами, используют культуру стафилококка, при обработке вещей из очагов инфекций, вызванных спорообразующими микробами, применяют культуру антракоидной палочки.

О **качестве проведенной дезинфекции** изделий медицинского назначения судят по отсутствию золотистого стафилококка, синегнойной палочки и бактерий группы кишечной палочки (БГКП). Для этого производят смывы с обрабатываемых изделий и посев на желточно-солевой агар, кровяной агар и среду Эндо. Дезинфекцию считают эффективной, если через 48 часов на чашках отсутствуют колонии указанных микроорганизмов.

Дезинфекцию и последующее отмывание остатков дезинфицирующих средств проточной водой используют перед **предстерилизационной очисткой** изделий медицинского назначения. Если дезсредство одновременно обладает моющим и антимикробным действием, допускается совмещение в одном процессе дезинфекции и предстерилизационной очистки. Для очистки используют различные химические вещества, кипячение, замачивание, ершевание и другие способы. После очистки изделия ополаскивают и высушивают.

Качество очистки оценивают путем постановки **амидопиридиновой (азопирамовой) пробы** на остаточные количества крови и **фенолфталеиновой пробы** на остатки щелочных компонентов моющих средств. При положительном результате той или иной пробы всю группу изделий подвергают повторной очистке



до получения отрицательного результата.

## 12.5. Стерилизация

**Стерилизация** (*sterilis* - бесплодный) – это полное удаление микробов (обеспложивание объектов), при котором уничтожаются и вегетативные, и споровые формы микроорганизмов. Цель стерилизации - полное освобождение объекта от всех микробов без изменения свойств самого объекта.

Перед стерилизацией изделия подвергают дезинфекции и предстерилизационной очистке. Подготовленные к стерилизации предметы упаковывают. Для упаковки стерилизуемых изделий применяют специальные виды бумаги, стерилизационные коробки (биксы), двойную мягкую упаковку из бязи и другие средства. Срок хранения стерильного изделия зависит от вида упаковки: в коробках без фильтра и двойной мягкой упаковке - 3 суток, в пергаменте или коробке с фильтром - 20 суток.

**Эффективность стерилизации** оценивают по отсутствию или снижению содержания живых микробов в стерилизуемых объектах. Содержание живых клеток определяют посредством высева проб жидких объектов или смывов с твердых объектов до и после стерилизации.

В зависимости от применяемого фактора выделяют следующие методы стерилизации:

### 1. Физические методы:

#### 1.1. Тепловая стерилизация (термическая, горячая);

- стерилизация в пламени (прожигание, прокаливание, фламбирование);
- стерилизация жаром (горячим воздухом, сухожаровая стерилизация, воздушная стерилизация);
- стерилизация перегретым паром под давлением (автоклавирование);
- дробная стерилизация (тиндализация).

#### 1.2. Излучение или холодная стерилизация (СВЧ, ультрафиолетовое излучение, УВЧ, радиационное излучение, инфракрасное излучение).

#### 1.3. Фильтрование.

### 2. Химические методы:

2.1. Стерилизация с использованием химических веществ в газообразном состоянии - газовый метод (пары раствора формальдегида в этиловом спирте, смесь ОБ – смесь окиси этилена с бромистым метилом);

2.2. Стерилизация с использованием растворов химических веществ – стерилиантов (дезоксона, 6% раствора перекиси водорода, 2,5% раствора глутарового альдегида).

**Фламбирование** (*flamme* - пламя) - стерилизация объекта посредством обжигания в пламени горелки (спиртовки). Распределение тепловых полей в пламени представлено на рисунке 12.18.

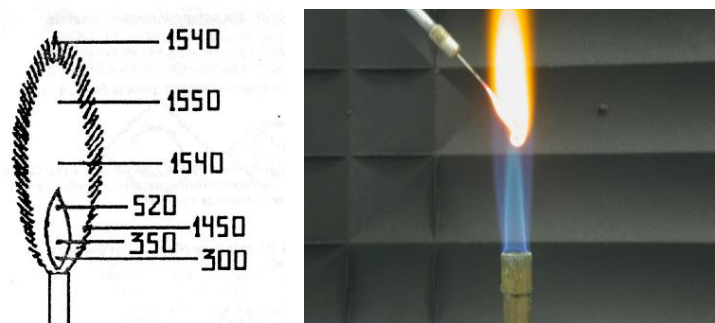


Рисунок 12.18 – Пламя горелки с различными зонами нагрева (цифры – градусы Цельсия) и фламбирование бактериологической петли.

Как следует из рисунка, стерилизация фламбированием осуществляется при температуре 1500°C. В этих условиях микробы сгорают в течение секунд. Этим способом стерилизуют устойчивые к нагреванию объекты: металлические предметы (бактериологические петли, иглы, пинцеты), стеклянные предметы (стекла предметные).

Вблизи от пламени создается стерильная зона диаметром 10-15 см. В этой зоне осуществляют различные манипуляции с микробами, предотвращая загрязнение внешней среды. Мелкий инструментарий (петли, иглы и др.) стерилизуют непосредственно в пламени горелки; более крупный инструментарий (шпатели, пинцеты) - после смачивания спиртом.

**Стерилизация горячим воздухом (сухим жаром, воздушная стерилизация).** Материалы, которые не устойчивы к фламбированию, стерилизуют горячим воздухом. Стерилизацию осуществляют в специальных сухожаровых шкафах (воздушных стерилизаторах) с электронагревом (рисунок 12.19).



Рисунок 12.19 – Сухожаровой шкаф.

Используются следующие режимы воздушной стерилизации: 200° – 30 минут, 180° – 40 минут, 160° – 120-150 минут. Материал должен занимать не более 2/3 объема шкафа. Сухим жаром стерилизуют изделия из стекла, металлические инструменты. Этот метод позволяет уничтожить не только вегетативные клетки, но и споры микроорганизмов. Для предотвращения обсеменения простерилизованных предметов микробами при хранении перед стерилизацией их помещают в контейнеры (пеналы для пипеток, емкости для чашек Петри и т. д.). Для контроля эффективности стерилизации сухим жаром используют биологические индикаторы -

термотесты (рисунок 12.20).



Рисунок 12.20 – Биологический индикатор для воздушной стерилизации.

**Автоклавирование** – это способ стерилизации с использованием горячего (перегретого) пара под высоким давлением. При автоклавировании термоустойчивые споры микроорганизмов погибают в течение 15 минут. На практике применяют автоклавы с горизонтальной или вертикальной загрузкой разных объемов. Текущий пар нельзя применять для стерилизации сред, содержащих углеводы, молоко и желатин. Автоклавированием стерилизуют стеклянную посуду, перевязочный материал, белье, вату, марлю, водные растворы различных веществ и питательные среды, устойчивые к воздействию горячего пара. Чаще всего используют следующие режимы автоклавирования:  $132^{\circ}$  – 2 атм – 20 минут;  $120^{\circ}$  – 1,1 атм – 45 минут. При выборе режима автоклавирования учитывают зависимость температуры от избыточного (выше атмосферного) давления пара (таблица 12.1).

Таблица 12.1 - Зависимость температуры от давления пара

Превышение давления пара над атмосферным, атм.	Температура, градусы Цельсия
0	100
0,1	102
0,2	105
0,4	109
0,5	112
0,7	115
0,9	119
1,0	121
1,33	126
1,5	128
2,0	134
2,1	135

Аппарат, предназначенный для стерилизации паром под давлением, называют автоклавом. Он представляет собой цилиндрический толстостенный горизонтальный или вертикальный сосуд, выдерживающий давление. Схема вертикального автоклава представлена на рисунке 12.21.

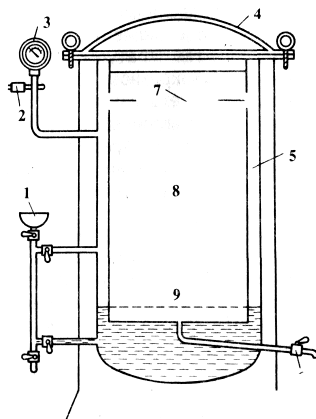


Рисунок 12.21 – Схема вертикального автоклава; 1 - воронка, через которую автоклав заправляют водой; 2 - предохранительный клапан; 3 - манометр; 4 - крышка автоклава; 5 - водопаровая камера; 6 - кран для выпуска воздуха; 7 - отверстие, через которое пар поступает в стерилизационную камеру; 8 - стерилизационная камера; 9 - подставка для размещения стерилизуемых материалов

Автоклав является работающим под давлением аппаратом повышенной опасности, поэтому к работе на нем допускаются лишь лица, сдавшие экзамен, получившие удостоверение, ежегодно подтверждающие право работы на нем. По конструкции различают шкафные автоклавы и цилиндрические (вертикальные и горизонтальные). Внешний вид цилиндрических автоклавов представлен на рисунке 12.22.

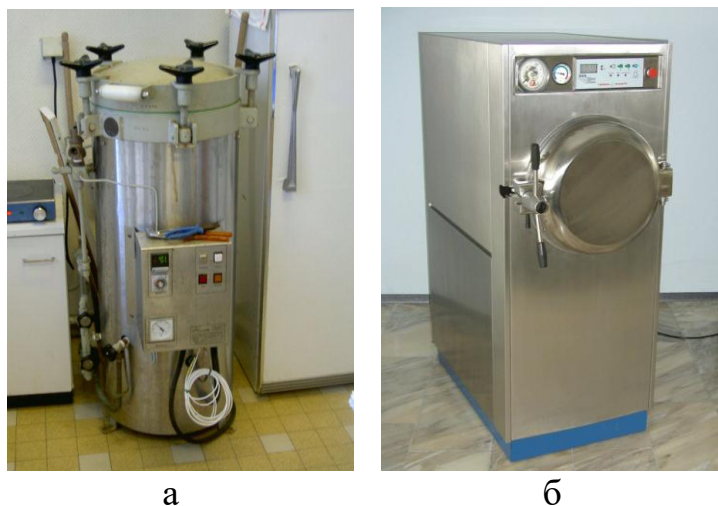


Рисунок 12.22 – Автоклавы цилиндрические: а – вертикальный, б – горизонтальный.

Материал, подвергаемый автоклавированию, помещают в крафт-пакеты, или биксы (рисунок 12.23).



Рисунок 12.23 – Биксы без антибактериального фильтра (а) и с антибактериальным фильтром (б).

Режим автоклавирования контролируется по термометру, таймеру и с помощью химического или биологического индикаторов - термотестов (рисунок 12.24).



Рисунок 12.24 - Индикаторы паровой стерилизации: а – химический, б – биологический.

#### **Сроки хранения стерильного материала после автоклавирования:**

- бикс простой – 3 суток;
- бикс с бактериальным фильтром – 20 суток;
- крафт-пакет, заклеенный с двух сторон – 20 суток;
- бязевая упаковка – 3 суток.

**Стерилизация паром при атмосферном давлении (стерилизация горячим водяным паром, стерилизация текучим паром).** Объекты, повреждаемые паром под давлением, стерилизуют при менее жестком режиме - текучим паром при атмосферном давлении (100°C). Для стерилизации текучим паром при атмосферном давлении используют автоклав с открытым краном выпуска пара. При этом внутренняя полость автоклава соединена с внешней средой (крышка не завинчена). При таком режиме стерилизации погибают вегетативные формы микробов и не погибают споровые формы. При таком методе стерилизации процесс можно проводить в течение нескольких дней подряд по 15-30 минут. При первом сеансе погибают вегетативные формы микробов, а оставшиеся споры прорастают при хранении стерилизуемого объекта в условиях комнатной температуры. Последующие сеансы обеспечивают стерилизацию объекта.

**Тиндаллизация** - это способ дробной стерилизации, предложенный английским физиком Д. Тиндалем (рисунок 12.25).

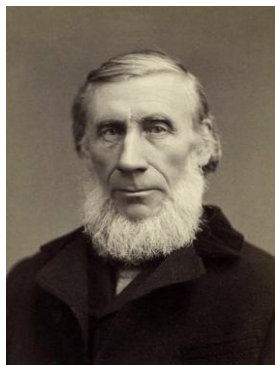


Рисунок 12.25 – Джон Тиндаль (John Tyndall, 1820-1893 гг.).

Тиндализация заключается в ежедневном прогревании стерилизуемого продукта при низких температурах (56-58°C) в течение 1 часа от 3 до 5 раз с промежутками между прогревами в 24 часа. Вегетативные клетки погибают при первичном прогревании, а оставшиеся в живых споры постепенно прорастают и погибают при последующих циклах прогревания. Основным недостатком тиндализации - невозможность полной элиминации микроорганизмов, так как некоторые споры не успевают прорасти по времени между циклами прогревания, а некоторые вегетативные клетки успевают образовать термостабильные споры. Метод тиндализации применяют для стерилизации сыворотки крови, асцитической жидкости и некоторых питательных сред (растворов сахаров).

Основные режимы тепловой стерилизации приведены в таблице 12.2.

Таблица 12.2 – Режимы тепловой стерилизации

Метод	Аппаратура	Режим (температура, время, избыточное давление)	Стерилизуемый материал
<b>Однократная стерилизация</b>			
Прокаливание (фламбирование)	Спиртовка, газовая горелка	До красного каления	Бактериологические петли, мелкие металлические инструменты
Горячим воздухом (воздушная стерилизация)	Воздушный стерилизатор	180°C - 60 минут; 160°C - 150 минут	Стеклянная посуда, пипетки, тальк, вазелиновое масло, металлические инструменты
Паром под давлением (автоклавирование)	Паровой стерилизатор (автоклав)	120°C - 45 минут - 1 атм.; 132°C - 20 минут, 2 атм.	Питательные среды, инфицированный материал, изделия из стекла, металла, резины, халаты, белье, перевязочный и

			шовный материал, некоторые лекарства и др.
<b>Дробная стерилизация (тиндализация)</b>			
Текучим паром	Паровой стерилизатор с открытым выпускным краном	100 <sup>0</sup> С, 3 дня по 1 часу в день	Молоко, среды и лекарства с углеводами, некоторые лекарства
Щадящее прогревание	Водяная баня с терморегулятором	56-58 <sup>0</sup> С, 5 дней: 1 день 2 часа, остальные дни по 1 часу	Белковые жидкости (питательные среды, содержащие белок, сыворотка крови, асцитическая жидкость)

На практике используются также другие методы тепловой стерилизации. Например, в стоматологических клиниках используют стерилизацию в среде нагретых стеклянных шариков диаметром 3 мм при температуре 250<sup>0</sup>С в течение 15-20 секунд - гласперленовый или шариковый метод стерилизации (рисунок 12.26).



Рисунок 12.26 – Прибор для гласперленового метода стерилизации.

**Контроль тепловой стерилизации** осуществляют следующими методами:

- по показаниям приборов (мановакуумметров, термометров, таймеров);
- с использованием физико-химических тестов (вместе со стерилизуемым материалом в автоклав закладывают ампулы с кристаллами веществ или специальные бумажные термохимические индикаторы; при нужной температуре вещества расплавляются, а индикаторы меняют цвет);

- биологические тесты - в аппарат помещают флакончики со взвесью термостойкого спорообразующего микроба (*B. stearotherophilus* для контроля автоклавов или *B. licheniformis* для контроля воздушных стерилизаторов). После стерилизации их инкубируют в термостате. При гибели спор во время автоклавирования среда после инкубирования остается прозрачной.

**Стерилизация лучами (холодная стерилизация).** Объекты, повреждаемые

при повышенных температурах, стерилизуют излучением (СВЧ, ультрафиолетовое излучение, УВЧ, радиационное излучение, инфракрасное излучение). Для предупреждения последующего обсеменения стерилизуемые предметы помещают и полиэтиленовые пакеты. Этот способ стерилизации используется в промышленных условиях для обезвреживания больничных принадлежностей, антибиотиков, витаминов, гормонов, разовых медицинских изделий (шприцы, чашки Петри и т.д.).

Эффективным методом физического удаления микроорганизмов из жидкостей и газов является **фильтрование**. Фильтрование применяется для удаления из фильтруемого материала (жидкости) крупных частиц (рисунок 12.27).



Рисунок 12.27 – Зависимость метода фильтрации от размера частиц.

Для удаления микробов из жидкостей обычно применяют мембранные фильтры с диаметром пор менее 0,2 мкм (**микрофильтрация и ультрафильтрация или стерилизующая фильтрация**). Фильтрацию применяют для стерилизации жидкостей, чувствительных к температурным воздействиям. Для этих целей используют пористые керамические свечи из глины (свечи Шамберлана), стерилизующие асбестовые пластины (фильтры Зейтца) и целлюлозные мембранные фильтры (рисунок 12.28).

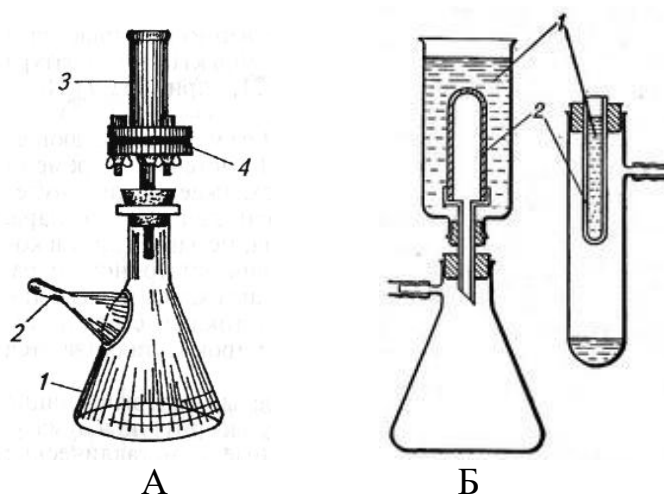


Рисунок 12.28 – А - Фильтр Зейтца: 1 – стеклянная колба Бунзена; 2 – канюля для отсасывания воздуха; 3 – металлический держатель; 4 – фильтр. Б - Монтаж свечи Шамберлана: 1 – фильтруемая жидкость; 2 – фильтровальная свеча.



Так как поры таких фильтров очень малы, фильтрация осуществляется посредством “проталкивания” через них жидкостей под давлением или с помощью вакуума (разрежения). Методы фильтрации широко применяются в биотехнологическом производстве при изготовлении антибиотиков, бактериофагов и других препаратов, не выдерживающих тепловых методов стерилизации. С помощью мембранных фильтров возможно удаление из жидкостей не только бактерий и вирусов, но и крупных молекул.

**Химическая стерилизация** (стерилизация с помощью химических веществ). Этот метод является вспомогательным, так как невозможно подвергнуть стерилизации упакованные изделия. Кроме того, по окончании стерилизации химическими веществами изделия необходимо промыть стерильной жидкостью, что может привести к вторичному обсеменению изделий. Химические методы применяют для стерилизации тех предметов, которые нельзя стерилизовать другими методами, например, оптических приборов, изделий из полимеров, стекла, металлов.

Химическую стерилизацию проводят с помощью веществ в газообразном состоянии (пары раствора формальдегида в этиловом спирте,  $\beta$ -пропиолактон, смесь ОБ – смесь окиси этилена с бромистым метилом) или с помощью растворов химических веществ – стерилиантов (дезоксон, 6% перекись водорода, 2,5% глутаровый альдегид). Смесью ОБ наполняют стационарные или портативные газовые стерилизаторы. Для упаковки стерилизуемых изделий используют полиэтиленовую пленку или специальный упаковочный материал. Стерилизацию проводят в течение нескольких часов. После стерилизации изделия выдерживают в течение нескольких суток в вентилируемом помещении. Контроль эффективности химической стерилизации проводят с помощью биотестов.

При использовании стерилиантов используют следующие режимы стерилизации:

- 6% раствор перекиси водорода, экспозиция 6 часов (изделия из полимерных материалов, стекла, металлов);
- 4,8% раствор первомура, экспозиция 15 минут (лигатурный шовный материал).

Обязательными условиями являются: полное погружение изделия в раствор и температура раствора не менее 18°C. Если изделия используют не сразу после стерилизации, то их помещают в стерильную коробку и хранят не более 3 суток.

**Контроль стерильности изделий медицинского назначения.** Контроль изделий, простерилизованных в лечебном учреждении, проводят в специально оборудованных боксах с предбоксниками, соблюдая асептические условия, исключая возможность вторичной контаминации изделий микробами. В боксах используют бактерицидные облучатели, поверхности обрабатывают моющими и дезинфицирующими средствами, воздух подают в бокс через бактериальные фильтры. Перед входом в бокс сотрудники лаборатории тщательно моют руки, надевают в предбокснике стерильную спецодежду (халаты, бахилы, шапочки, перчатки, маски). В процессе работы в боксе проверяют обсемененность воздуха: на рабочем столе на 15 минут открывают две чашки с питательным агаром, которые затем инкубируют 48 часов при 32°C (допускается рост не более трех колоний неспорообразующих сапрофитов). Контроль стерильности проводят путем прямого посева (погружения) изделий в питательные среды (мелкие изделия или детали

разъемных изделий - целиком, шовный или перевязочный материал - фрагменты). Стерильность крупных изделий контролируют методом смывов. Отобранным материалом засевают обязательно две среды - тиогликолевую (для роста бактерий) и среду Сабуро (для роста грибов). Посевы на тиогликолевой среде выдерживают при 32°C, на среде Сабуро - при 22°C в течение 7 суток (для изделий после тепловой стерилизации). При отсутствии роста во всех пробирках (флаконах) делают заключение о стерильности изделий.

### 12.5. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Что такое асептика?
2. Что такое антисептика?
3. Что такое дезинфекция?
4. Охарактеризуйте методы дезинфекции.
5. Назовите основные антисептические и дезинфекционные средства.
6. Что такое стерилизация?
7. Охарактеризуйте методы стерилизации.

### 12.6. Тренировочные тесты

1. Асептика – это:

- уничтожение микробов с помощью сухого жара
- + предупреждение заноса в рабочую зону посторонних микроорганизмов
- уничтожение патогенных бактерий
- уничтожение спор
- фламбирование

2. Антисептика – это:

- дезинфекция поверхностей
- + подавление размножения микробов в ране
- автоклавирование
- обработка сухим жаром
- стерилизация

3. Дезинфекция – это:

- предупреждение заноса в рабочую зону посторонних микроорганизмов
- подавление размножения микробов в ране
- автоклавирование
- обработка сухим жаром
- + уничтожение патогенных микробов

4. Стерилизация – это:

- предупреждение заноса в рабочую зону посторонних микроорганизмов
- подавление размножения микробов в ране

- + полное уничтожение микробов в объектах
- обработка объекта дезсредствами
- обработка рук спиртом

5. Фламбирование – это:

- обработка объекта дезсредствами
- обработка рук спиртом
- обработка сухим жаром
- + прокаливание в пламени
- обработка поверхности формалином

6. Автоклавирование – это:

- обработка сухим жаром
- + обработка паром под давлением
- прожигание
- прокаливание
- выдерживание в сухожаровом шкафу

7. Пастеризация – это:

- + прогревание при температуре ниже  $100^{\circ}\text{C}$
- обработка в автоклаве
- обработка в сухожаровом шкафу
- кипячение
- метод стерилизации

8. Тиндализация – это:

- + метод дробной стерилизации
- метод дезинфекции
- прокаливание
- метод асептики
- метод антисептики

9. Автоклав – это:

- сухожаровой шкаф
- воздушный стерилизатор
- + аппарат для стерилизации паром под давлением
- прибор для дезинфекции
- прибор для дезинсекции

10. К дезинфектантам относятся:

- дистиллированная вода
- + щелочи
- + хлорсодержащие препараты
- физраствор
- + спирты

11. Воздушная стерилизация – это:

- стерилизация в автоклаве
- + стерилизация горячим воздухом
- фламбирование
- прокаливание на открытом воздухе
- тиндализация

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 13. Антимикробные химиотерапевтические препараты

### 13.1. История антибиотикотерапии

Издавна было известно, что одни микробы по отношению к другим проявляют антагонистические свойства. **Антагонизм** – это взаимоотношения, при которых продукты жизнедеятельности одного микроба губительно действуют на других представителей в данном биоценозе. Явление антагонизма у микробов в 1887 г. подробно описал французский ученый Л. Пастер (рисунок 13.1).



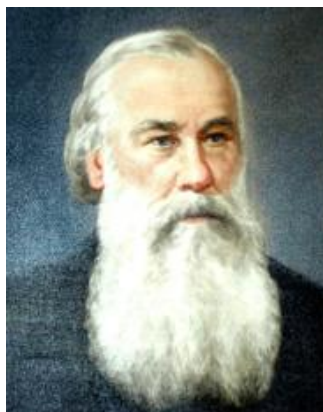
Рисунок 13.1 – Луи Пастер (Louis Pasteur, 1822-1895 гг.).

Однако с практической целью микробный антагонизм впервые использовал И.И. Мечников (рисунок 13.2), который предложил употреблять продукты, содержащие молочнокислые бактерии, для подавления гнилостной микрофлоры кишечника.



Рисунок 13.2 – Илья Ильич Мечников (1845-1916 гг.).

В 1871-1872 гг. русские ученые В.А. Манассеин и А.Г. Полотебнов (рисунок 13.3) наблюдали выраженный терапевтический эффект от лечения инфицированных ран с помощью зеленой плесени (зеленого кистевика или плесневого гриба рода *Penicillium*).



А

Б

Рисунок 13.3 – А - Вячеслав Авксентьевич Манассеин (1841-1901 гг.); Б - Алексей Герасимович Полотебнов (1838-1907 гг.).

Именно на явлениях микробного антагонизма основывается широко используемая в настоящее время терапия инфекционных заболеваний с помощью антибиотиков и химиопрепаратов. Лечение инфекционных, паразитарных или иных заболеваний с помощью химиотерапевтических средств получило название **химиотерапия**. **Химиотерапевтическими препаратами** называют лекарственные средства, которые в организме больного избирательно подавляют размножение возбудителей инфекций и инвазий или угнетают пролиферацию опухолевых клеток. Лекарственные средства, избирательно действующие на возбудителей инфекционных заболеваний, называются **антимикробными препаратами**. К числу антимикробных препаратов относятся **антибиотики**. Использование антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний называется **антибиотикотерапией**.

Основателем химиотерапии с полным правом можно считать немецкого средневекового алхимика Парацельса (рисунок 13.4), который первым начал использовать для лечения больных людей неорганические вещества (соли ртути и мышьяка).



Рисунок 13.4 – Парацельс (Paracelsus, 1493-1541 гг.).

Понятие “**химиотерапия**” ввел в употребление немецкий химик, иммунолог и бактериолог П. Эрлих (рисунок 13.5).



Рисунок 13.5 – Пауль Эрлих (Paul Ehrlich, 1854-1915 гг.).

В 1908 г. он синтезировал мышьяковистое соединение (препарат 606), которое получило название **сальварсан** (спасающий). Этот препарат длительное время использовался для лечения сифилиса. В последующем П. Эрлих синтезировал другое производное мышьяка – **неосальварсан** (новарсенол). В результате изучения антимикробных свойств различных соединений П. Эрлих сформулировал **три основные требования**, которым должен отвечать любое химиотерапевтическое средство:

- максимальная терапевтическая эффективность;
- минимальная токсичность для макроорганизма;
- специфичность действия (этиотропность).

Согласно этим требованиям, химиопрепараты при введении в организм должны губительно действовать на возбудителей инфекционных заболеваний, но при этом быть нетоксичными для макроорганизма. Кроме того, во внутренней среде организма химиопрепарат должен оставаться стабильным, но не иметь кумулятивного эффекта. Эти принципы до сих пор учитываются при разработке антибактериальных препаратов.

В 1935 г. немецкий бактериолог Г. Домагк (рисунок 13.6) ввел в практику первый сульфаниламидный препарат - стрептозан (пронтозил или **красный стрептоцид**), что явилось началом эры производства сульфаниламидов и лечения с их помощью инфекционных заболеваний.



Рисунок 13.6 – Герхард Домагк (Gerhard Johannes Paul Domagk, 1895-1964 гг.).

В 1939 г. Г. Домагк стал лауреатом Нобелевской премии за открытие и обоснование антибактериального эффекта пронтозила.

В последующем французскими исследователями из группы Э. Фурно (рисунок 13.7) был синтезирован **белый стрептоцид**.



Рисунок 13.7 – Эрнест Фурно (Ernest Fourneau, 1872-1949 гг.).

Красный и белый стрептоцид явились первыми сульфаниламидами, получившими широкое распространение в химиотерапии бактериальных инфекций.

Основоположником учения об антибиотиках является английский ученый А. Флеминг (рисунок 13.8), который в 1929 г. показал, что фильтрат бульонной культуры плесневого гриба *Penicillium notatum* обладает антибактериальными свойствами в отношении стафилококков и некоторых других грамположительных микроорганизмов. Это открытие было сделано случайно - в открытую чашку Петри с культурой стафилококка попала плесень *P. notatum*, образовавшая вокруг себя зону отсутствия роста стафилококка. А. Флеминг назвал синтезируемое плесенью вещество **пенициллином**.



Рисунок 13.8 – Александр Флеминг (Alexander Fleming, 1881-1955 гг.).

Извлечь активное вещество из культуральной жидкости плесневого гриба *P. notatum* и получить стабильный препарат пенициллина удалось лишь в 1940 г. группе английских химиков – Э. Чейну, Х. Флори и Э. Эбрахему. Промышленное производство пенициллина в чистом виде было организовано Х. Флори и Э. Чейном в Америке. В 1945 г. А. Флеминг, Э. Чейн и Х. Флори стали лауреатами Нобелевской премии за открытие пенициллина и исследование его лечебного



эффекта при инфекционных заболеваниях (рисунок 13.9).

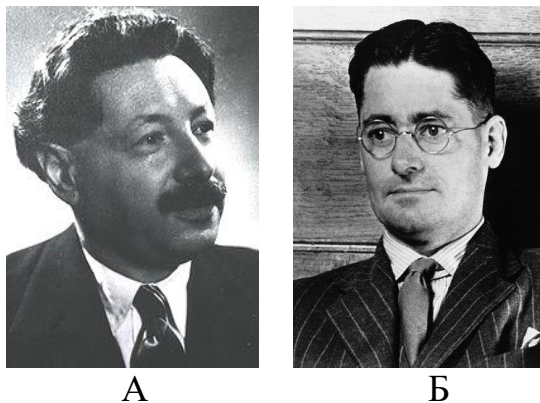


Рисунок 13.9 – А - Эрнст Чейн (Ernst Boris Chain, 1906-1979 гг.); Б - Хоуард Флори (Howard Walter Florey, 1898-1968 гг.).

В СССР пенициллин (под названием **крустозин**) был получен З.В. Ермольевой (рисунок 13.10) в 1942 г. из плесени *Penicillium crustosum*. В 1944 г. отечественный пенициллин был произведен в необходимых для испытания количествах и успешно применен для лечения раненых на фронте.



Рисунок 13.10 – Зинаида Виссарионовна Ермольева (1898-1974 гг.).

В 1942 г. появился термин “**антибиотики**”. Этот термин предложил американский микробиолог С.А. Ваксман (рисунок 13.11).



Рисунок 13.11 – Селман Абрахам Ваксман (Selman Abraham Waksman, 1888-1973 гг.).

Термином “антибиотики” обозначали природные вещества, продуцируемые микроорганизмами и в низких концентрациях препятствующие росту других бактерий. В 1942 г. группе ученых в США под руководством С. Ваксмана удалось выделить соединение (**стрептомицин**), подавляющее жизнедеятельность грамотрицательных и некоторых грамположительных микроорганизмов, в частности, микобактерий туберкулеза. В 1949 г. в США и других странах было налажено производство стрептомицина как эффективного противотуберкулезного средства. В 1952 г. С. Ваксман стал лауреатом Нобелевской премии за открытие стрептомицина – первого эффективного противотуберкулезного препарата.

Дальнейшие исследования многих ученых привели к выделению новых антибиотиков. В частности, в 1945 г. был выделен хлортетрациклин, в 1947 г. – хлорамфеникол, в 1949 г. – окситетрациклин, в 1952 г. – эритромицин. В 60-70-е годы XX века были разработаны цефалоспорины и рифамицины. В настоящее время насчитывается более 6000 антибиотиков, выделенных из различных источников. Из этого количества в медицинской практике используется более ста препаратов.

### 13.2. Классификация антимикробных препаратов

В настоящее время препараты, которые применяются для этиотропного лечения инфекционных заболеваний, называют **антимикробными лекарственными средствами**. К ним относятся:

- **синтетические химиотерапевтические препараты;**
- **антибиотики.**

В свою очередь, антимикробные синтетические химиотерапевтические препараты подразделяются на следующие группы:

1. Сульфаниламиды.
2. Хинолоны и фторхинолоны.
3. Производные нитроимидазола.
4. Производные нитрофурана.
5. Производные ГИНК (гидразида изоникотиновой кислоты).
6. Производные ПАСК (пара-аминосалициловой кислоты).

**По объекту воздействия** выделяют следующие группы антимикробных препаратов:

- антибактериальные препараты;
- противотуберкулезные препараты;
- противогрибковые препараты;
- противопротозойные препараты;
- противовирусные препараты.

**По типу действия** различают:

- **микробицидные** (бактерицидные, фунгицидные) препараты – это препараты, вызывающие гибель возбудителей инфекционных заболеваний;
- **микростатические** (бактериостатические, фунгистатические) препараты – это препараты, ингибирующие рост и размножение микробов.

**Антибиотики** (от греч. *anti* - против, *bios* - жизнь) - это вещества

природного, полусинтетического или синтетического происхождения, подавляющие рост или вызывающие гибель бактерий, грибов или простейших. Антибиотики не действуют на вирусы, поэтому не используются для лечения вирусных инфекций. Первые выделенные антибиотики – это природные соединения, образуемые актиномицетами или бактериями. После установления структуры природных антибиотиков появилась возможность их модификации и получения полусинтетических или синтетических препаратов. Таким образом, в настоящее время термин “антибиотики” используется для обозначения препаратов биологического (микробного) происхождения, их полусинтетических производных или синтетических аналогов.

Эффективные антибиотики должны отвечать следующим **требованиям**:

- в низкой концентрации обладать микробоцидным или микростатическим действием;
- быть безвредным для макроорганизма и не снижать свою активность в тканях организма;
- подавлять рост или размножение микробов, не нарушая физиологического состояния макроорганизма.

**По молекулярной структуре** (химическому составу) выделяют несколько групп антибиотиков (таблица 13.1).

Таблица 13.1 – Классификация антибиотиков по молекулярной структуре

Особенности молекулярной структуры	Основные представители
Препараты, содержащие бета-лактамное кольцо (бета-лактамные антибиотики)	Пенициллины (бензилпенициллин, метициллин, оксациллин, ампициллин, карбенициллин и др.)
	Цефалоспорины (цефалоридин, цефалексин, цефамандол, цефурексим, кефзол и др.)
	Карбапенемы
	Монобактамы
Гликопептиды, содержащие замещенные пептидные соединения	Ванкомицин Тейкопланин
Препараты, содержащие аминоксахара, соединенные гликозидной связью с остальной частью молекулы (аминогликозиды)	I поколение – стрептомицин, канамицин и др. II поколение – гентамицин III поколение – тобрамицин, сизомицин и др.
Препараты, содержащие четыре конденсированных шестичленных цикла (тетрациклины)	Природные тетрациклины (тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин). Полусинтетические тетрациклины (доксициклин, морфоциклин, метациклин и др.).
Препараты, содержащие в молекуле макроциклическое лактонное кольцо, связанное с одним или несколькими	Эритромицин Олеандомицин Азитромицин Кларитромицин

углеводными остатками (макролиды и азалиды)	
Линкозамиды, содержащие в молекуле два циклических соединения	Линкомицин Клиндамицин
Производные диоксиаминофенилпропана	Амфениколы (хлорамфеникол или левомецетин)
Ансамицины (рифамицины)	Рифамицин Рифампицин
Полипептиды, содержащие в молекуле остатки полипептидных соединений	Полимиксины
Полиены	Амфотерицин В Нистатин Леворин
Разные антибиотики	Фузидиевая кислота

Представители каждой группы имеют не только свои особенности молекулярной структуры, но и спектр возбудителей, в отношении которых они проявляют наибольшую активность.

Все бета-лактамы антибиотики в свою очередь в соответствии с их структурой подразделяются на несколько групп (таблица 13.2).

Таблица 13.2 – Основные группы бета-лактамов антибиотиков

Группа	Особенности структуры ядра бета-лактама
Пенициллины (пенамы)	Сопряженная бета-лактам-тиазолидиновая система колец
Цефалоспорины (цефемы)	Сопряженная бета-лактам-дигидротиазиновая система колец
Цефамицины	Сопряженная бета-лактам-дигидротиазиновая система колец, содержащая 7- $\alpha$ -метоксигруппу
Оксацефемы	Сопряженная бета-лактам-дигидрооксазиновая система колец
Пенемы	Сопряженная бета-лактам-дигидротиазонозная система колец
Клавуланаты (клавулановая кислота)	Сопряженная бета-лактам-оксазолидиновая система колец
Карбапенемы (тиенамицин)	Сопряженная бета-лактам-дигидропирроловая система колец
Нокардицины	Моноциклические бета-лактамы
Монобактамы	Моноциклические бета-лактамы сульфаминовой кислоты

**По спектру антимикробного действия** выделяют:

- препараты с узким спектром действия;
- препараты с широким спектром действия.

В свою очередь, антибиотики узкого спектра действия разделяют на

препараты с преимущественным действием на грамположительные бактерии (пенициллины, макролиды, линкозамиды) и препараты с преимущественным действием на грамотрицательные микроорганизмы (монобактамы, полипептиды).

**Спектр действия** антибиотиков - это число видов возбудителей, на которые антибиотик оказывает бактерицидное или бактериостатическое действие. **Препараты узкого спектра действия** активны в отношении только небольшого количества грамположительных или грамотрицательных бактерий. **Препараты широкого спектра действия** активны против большого количества как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Пенициллины и аминогликозиды действуют на грамотрицательные и частично на грамположительные микроорганизмы. Тетрациклины, макролиды, хлорамфеникол относятся к антибиотикам широкого спектра действия (действуют на грамположительные и грамотрицательные виды бактерий).

**По способу получения** антибиотики подразделяются на 3 группы:

1. **Биосинтетические (природные)** антибиотики являются продуктами метаболизма специально селекционированных штаммов микроорганизмов. Эти антибиотики получают биологическим синтезом с последующей очисткой от балластных примесей. Например, природными антибиотиками являются пенициллин, стрептомицин. Основными продуцентами природных антибиотиков являются бактерии, актиномицеты, плесневые грибы.

2. **Полусинтетические** антибиотики на первом этапе получают биосинтезом, а затем подвергают химической модификации. При этом к природному антибиотику присоединяют различные химические радикалы для повышения активности препарата. Полусинтетическими антибиотиками являются, например, метициллин и оксациллин.

3. **Синтетические** антибиотики изначально получают химическим синтезом. Примером синтетических антибиотиков являются фторхинолоновые препараты; левомицетин.

**По механизму действия** все антибиотики распределяют на группы в зависимости от “мишени”, на которую они действуют (рисунок 13.12):

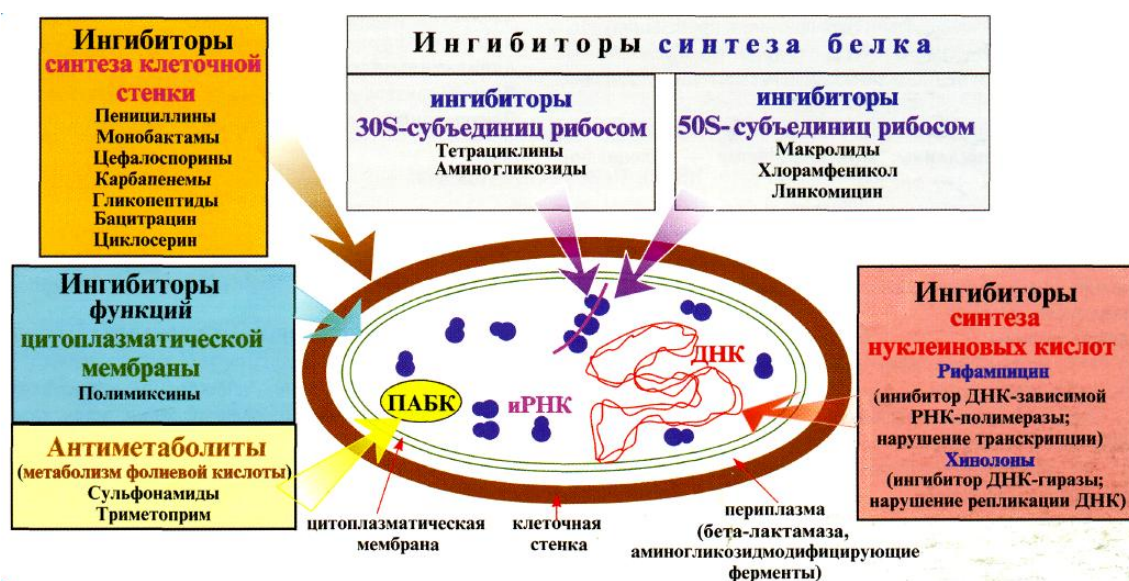


Рисунок 13.12 – Механизмы действия антибиотиков на бактериальную клетку.

**1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки** (пенициллины, цефалоспорины, гликопептиды). Они нарушают синтез пептидогликана (муреина). Антибиотики этой группы действуют на разных этапах формирования клеточной стенки. Синтез предшественников пептидогликана начинается в цитоплазме бактерий. Затем предшественники транспортируются через цитоплазматическую мембрану и объединяются в пептидогликановые цепи. Эту стадию ингибируют гликопептиды. На внешней поверхности цитоплазматической мембраны образование полноценного пептидогликана происходит при участии белков-ферментов. Эти ферменты являются мишенью для бета-лактамовых антибиотиков.

**2. Ингибиторы функций цитоплазматической мембраны** (полимиксины, грамицидины, полиены, имидазолы). Полимиксины нарушают проницаемость цитоплазматической мембраны, блокируя фосфолипидные компоненты, что ведет к выходу в окружающую среду водорастворимых компонентов цитоплазмы. Грамицидины вызывают нарушение целостности цитоплазматической мембраны. Механизм действия полиеновых антибиотиков (нистатина, леворина, амфотерицина В) основан на связывании эргостерола цитоплазматической мембраны с последующим выходом низкомолекулярных соединений из клетки. Действие азолов (флуконазол, вориконазол, интраконазол, кетоконазол) заключается в ингибировании фермента, катализирующего превращение ланостерола в эргостерол - основной структурный компонент мембраны клетки грибов; при этом проявляется выраженный противогрибковый эффект.

### **3. Ингибиторы синтеза белка:**

- ингибиторы 30S-субъединиц рибосом (аминогликозиды, тетрациклины). Аминогликозиды препятствуют присоединению тРНК к рибосомам, а тетрациклины тормозят перемещение тРНК, то есть блокируют процесс до начала синтеза белка;

- ингибиторы 50S-субъединиц рибосом (макролиды, хлорамфеникол, линкомицин). Например, эритромицин действует на процесс транслокации, что препятствует удлинению пептидных цепей.

### **4. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот:**

- ингибиторы синтеза предшественников пуриновых и пиримидиновых оснований (сульфаниламиды, триметоприм);

- ингибиторы РНК-полимеразы (рифампицин);

- ингибиторы синтеза ДНК (фторхинолоны, нитрофураны, нитроимидазолы).

**5. Антиметаболиты** - ингибиторы метаболизма фолиевой кислоты (сульфонамиды, триметоприм). Действие сульфаниламидных препаратов связано с тем, что они нарушают образование микробными клетками фолиевой и дегидрофолиевой кислот, в молекулу которых входит пара-аминобензойная кислота (ПАБК). Сульфаниламиды по химическому строению схожи с ПАБК, поэтому они захватываются микробной клеткой вместо ПАБК. В результате этого в бактериальной клетке нарушаются процессы биосинтеза.

В обобщенном виде распределение антимикробных препаратов на группы по механизму действия представлено в таблице 13.3.

Таблица 13.3 – Классификация антимикробных химиопрепаратов по механизму действия

Механизм действия	Антимикробные препараты
Ингибирование синтеза клеточной стенки	Бета-лактамы Гликопептиды
Ингибирование синтеза белка	Аминогликозиды Тетрациклины Хлорамфеникол Линкозамиды Макролиды Фузидиевая кислота
Ингибирование синтеза нуклеиновых кислот	Ингибиторы синтеза предшественников нуклеиновых кислот (сульфаниламиды, триметоприм)
	Ингибиторы репликации ДНК (хинолоны, нитроимидазолы, нитрофураны)
	Ингибиторы РНК-полимеразы (рифамицины)
Ингибирование функции цитоплазматической мембраны	Полимиксины Полиены Имидазолы

Таким образом, антибиотики, проникнув в микробную клетку, вызывают в ней нарушение метаболических процессов разного уровня и разной продолжительности. Каждая группа антибиотиков или даже отдельные антибиотики одной группы обладают специфичностью действия на отдельные звенья метаболических реакций. Сочетание нескольких антибиотиков, вызывающих нарушения разных метаболических процессов в микробной клетке, приводит к повышению эффективности схем лечения.

### 13.3. Продуценты антибиотиков

Природные антибиотики обнаруживаются в основном среди метаболитов почвенных микроорганизмов, синтезирующих их в качестве средств выживания в условиях микробного окружения. Животные и растительные клетки также могут вырабатывать антибиотикоподобные вещества, обладающие антимикробной активностью, но широкого распространения в лечебной практике такие соединения не нашли.

**По происхождению (продуценту) антибиотики подразделяются на 3 группы:**

**1. Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками.** Так, из культуральной жидкости *Penicillium notatum* первоначально был выделен **пенициллин** (рисунок 13.13), *Cephalosporium acremonium* - **цефалоспорин**, *Aspergillus fumigatus* - **фумигаллин**, *Penicillium urticae* - **гризеофульвин**, *Trichothecium roseum* - **трихотецин**. Лишайники продуцируют усниновую кислоту, обладающую сильным антибиотическим действием. К натриевой соли усниновой кислоты особенно чувствительны дифтерийные палочки.



Рисунок 13.13 – *Penicillium crustosum* (а) и *Penicillium notatum* (б), продуценты пенициллина.

**2. Антибиотики, образуемые актиномицетами.** Актиномицеты, особенно представители рода стрептомицетов (рисунок 13.14), продуцируют большое количество антибиотиков: *Streptomyces greseus* - **стрептомицин**, *Str. fradiae* - **неомицин**, *Str. canamyceticus* - **канамицин**, *Micromonospora purpurea* - **гентамицин**, *Str. aureofaciens* - **хлортетрациклин**, *Str. venezuelae* - **хлорамфеникол**, *Str. erythreus* - **эритромицин**, *Str. fradiae* - **тилозин**, *Str. bevoris* - **леворин**, *Str. spheroides* - **новобиоцин**, *Str. mediterranei* - **рифамицин**, *Str. neursei* - **нистатин**. Многие из этих антибиотиков обладают широким спектром действия.



Рисунок 13.14 – Стрептомицеты, окраска по Граму.

**3. Антибиотики, выделенные из бактерий.** Группа антибиотиков бактериального происхождения менее обширна и имеет меньшее практическое значение, так как их эффективность значительно ниже, чем у антибиотиков, синтезируемых грибами или актиномицетами. Бактерии-продуценты антибиотиков синтезируют **граммицидин**, **колицин**, **пиоцианин**, **субтилин**, **полимиксин** и другие антимикробные вещества (рисунок 13.15).



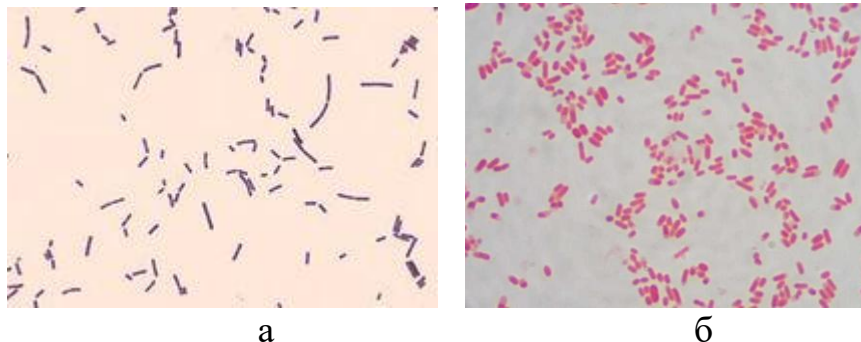


Рисунок 13.15 – Бактерии – продуценты антибиотиков: а - *Bacillus brevis*; б – *Escherichia coli*.

**Грамицидин** выделен в 1939 г. Р.Ж. Дюбо из почвенного микроба *B. brevis*. В нашей стране грамицидин С получен в 1942 г. Г.Ф. Гаузе и М.Г. Бражниковой. По химическому строению он представляет собой циклический пептид, в который входит пять аминокислот. В 1956 г. осуществлен синтез этого антибиотика.

**Колицин** - антибактериальный белок, продуцируемый некоторыми штаммами кишечной палочки и подавляющий жизнеспособность других штаммов *Escherichia coli*.

**Пиоцианин** – антибиотическое вещество, получаемое из бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*. Он активен против большинства грамположительных бактерий.

**Субтилилин** – продукт метаболизма сенной палочки (*B. subtilis*). Всего из разных штаммов сенной палочки выделено более 70 антибиотиков. Субтилилин малотоксичен. Хорошо сохраняется в водных растворах.

**Полимиксины** - это группа соединений, обладающих узким спектром активности против грамотрицательных микроорганизмов. По химической структуре они представляют собой полипептидные соединения. В обычных дозах обладают бактериостатическим действием, а в высоких концентрациях - бактерицидным действием.

#### 13.4. Принципы получения антибиотиков

Существуют 3 основных способа получения антибиотиков:

- **биологический синтез** (культивирование продуцентов в оптимальных условиях в жидкой питательной среде с последующей очисткой);
- **биосинтез с последующей химической модификацией** (получение полусинтетических антибиотиков);
- **химический синтез** препаратов без участия микроба-продуцента.

**Биологический синтез антибиотиков** – это технологический процесс выращивания микроба-продуцента в аппаратах-культиваторах при оптимальных температурных условиях в течение определенного времени в специальной жидкой питательной среде, выделение целевого продукта и его очистка от балластных примесей.

Этапы технологического процесса:

1. Выделение из внешней среды или селекция микроорганизмов - активных

продуцентов антибиотиков. Для выделения высоко продуктивных штаммов применяют мутагенез, конструирование суперпродуцентов методами генетической инженерии.

2. Приготовление питательной среды для глубинного выращивания конкретного продуцента антибиотика.

3. Культивирование продуцента глубинным способом с аэрацией или без аэрации с использованием специально разработанных питательных сред в аппаратах-культиваторах (рисунок 13.16). При необходимости (особенно в случае образования микроорганизмом нескольких антибиотиков) обменные процессы направляют в сторону биосинтеза одного определенного антибиотика, изменяя условия культивирования (состава питательной среды, кислотности среды и других параметров).



Рисунок 13.16 – Аппараты (ферментеры) для культивирования продуцентов глубинным способом.

4. Выделение и очистка антибиотиков из культуральной жидкости методами осаждения или кристаллизации из водной среды, экстракции, сорбции на ионно-обменных материалах, перекристаллизации. После ферментации и выделения антибиотиков из культуральной жидкости они подвергаются очистке от балластных примесей.

5. Высушивание готового продукта с помощью лиофилизации или распылительной сушки. Стандартизация готового препарата по содержанию антибиотика.

6. При производстве пероральных препаратов осуществляется таблетирование с последующей расфасовкой в емкостную тару или путем запрессовывания в упаковочный материал.

7. При производстве антибиотиков в жидком виде для парентерального применения производится фасовка препарата в асептических условиях в ампулы или флаконы. При необходимости производится высушивание препарата в сублимационных установках.

8. Эtiquетирование готового продукта.

**Биосинтез с последующей химической модификацией** используется при получении полусинтетических антибиотиков. У полусинтетических препаратов сохраняется основное ядро исходной молекулы антибиотика, а некоторые радикалы удаляются или заменяются. Особенно большие успехи были достигнуты в

получении полусинтетических пенициллинов. Ядром молекулы пенициллина является 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК), состоящая из  $\beta$ -лактамного и тиозолидинового колец. 6-АПК обладает низкой антибактериальной активностью. При присоединении к молекуле 6-АПК бензильной группы получают бензилпенициллин, который отличается высокой антимикробной активностью. Замена бензильного остатка в молекуле бензилпенициллина на другие органические соединения позволила получить такие антибиотики как метициллин, оксациллин, ампициллин.

**Химический синтез** антибиотиков предусматривает создание препаратов синтетическим путем без использования природных предшественников. В частности, фторхинолоны были синтезированы на основе налидиксовой кислоты (производное нафтиридина) и оксолиниевой кислоты (производное хинолона). Фторхинолоны дополнительно содержали атом фтора и пиперазиновое кольцо. В результате этого фторхинолоны обладают выраженной противомикробной активностью и широким спектром действия.

#### **Перспективные биотехнологические разработки получения антибиотиков:**

- методы иммобилизации антибиотиков;
- модификация молекул естественных антибиотиков химическими методами;
- применение генно-модифицированных продуцентов антибиотиков.

#### **Причины поиска и разработки новых антибиотиков:**

- малая чувствительность некоторых патогенных микроорганизмов к применяемым антибиотикам;
- формирование резистентных форм микроорганизмов при длительном применении антибиотиков;
- расширение сферы применения антибиотиков.

### **13.5. Требования, предъявляемые к антимикробным препаратам**

К антимикробным препаратам предъявляются определенные требования:

1. Отсутствие токсического действия на организм человека (**безвредность препарата**). Безвредность устанавливается с помощью **химиотерапевтического индекса** - отношения максимально переносимой дозы к минимальной терапевтической дозе или минимальной терапевтической дозы к максимально переносимой дозе. При индексе соответственно больше 3 или меньше 1 препарат может быть использован для лечения инфекционного заболевания, поскольку его терапевтическая доза будет меньше переносимой дозы. Величина химиотерапевтического индекса может быть определена по формуле:

$$T = \text{МИК}/K,$$

где T – терапевтический индекс; МИК – минимальная ингибирующая концентрация (мкг/мл); K - концентрация антибиотика (мкг/мл) в очаге инфекции (или в крови) при введении терапевтических доз препарата (таблица 13.4).

Таблица 13.4 – Концентрация антибиотиков в крови (К) после введения среднетерапевтических доз препарата

Антибиотик	К, мкг/мл
Ампициллин	15 - 25
Бензилпенициллин	0,52 (ЕД/мл)
Ванкомицин	10 – 15
Гентамицин	6 – 8
Канамицин	15 – 20
Линкомицин	10 – 15
Метициллин	10 – 15
Оксациллин	4 – 6
Олеандомицин	3 – 5
Полимиксин В	10 – 15
Рифампицин	15 – 25
Стрептомицин	20 – 25
Тетрациклин	3 – 5
Тобрамицин	6 – 8
Фузидиевая кислота	10 – 20
Хлорамфеникол	5 – 10
Цефалексин	15 – 25
Эритромицин	3 - 5

2. Выраженное **избирательное действие** на микроорганизмы, определяемое **антимикробным спектром** - преимущественным действием на те или иные бактерии (грамположительные или грамотрицательные).

3. **Бактериостатическое или бактерицидное действие** (микробостатическое или микробоцидное действие) - полное или частичное подавление роста и размножения бактерий или их гибель.

4. Отсутствие у бактерий способности к **формированию лекарственно-устойчивых форм**.

**Критерии активности антибактериального препарата:**

- **минимальная ингибирующая концентрация (МИК)** - наименьшая концентрация препарата, тормозящая рост тест-культуры микробов;
- **минимальная бактерицидная концентрация (МБК)** - наименьшая концентрация препарата, вызывающая бактерицидный эффект.

При клиническом использовании **антибиотики дозируются** из расчета на 1 кг веса или на всю массу тела человека. В обоих случаях дозы варьируют в зависимости от пути введения, возраста и состояния больного, тяжести болезни, состояния органов выделения, степени чувствительности бактерий к антибиотику и свойств препарата. Например, при введении препарата через рот доза его в 2-4 раза больше, чем при внутримышечном ведении; при сепсисе вводят максимальное количество препарата и по возможности внутривенно; ослабленным больным вводят половину обычной дозы.

Различают следующие **дозы антибиотиков:**

- **лечебная доза** - доза, оказывающая выраженный терапевтический эффект

при определенном способе введения;

- профилактическая доза - доза, оказывающая профилактический эффект при принятом способе введения препарата;

- стимулирующая доза - доза антибиотика, оказывающая стимулирующий эффект при введении с другими препаратами;

- токсическая доза - доза препарата, оказывающая токсический эффект при принятом способе введения;

- смертельная (летальная) доза - доза антибиотика, вызывающая летальный эффект при однократном введении в организм.

Изучением процессов поступления антибиотиков в организм и распределения его в тканях организма занимается фармакокинетика и фармакодинамика. Под **фармакокинетикой** понимают процесс изменения концентрации препарата в организме в течение времени. Фармакокинетика изучает такие вопросы как всасывание препарата, распределение его по органам и тканям (тканевая диффузия), метаболизм антибиотика (расщепление препарата в организме) и его экскреция. С учетом фармакокинетики определяют интервал между введениями антибиотика и способ его введения. Терапевтически эффективным считается уровень препарата, который в течение длительного времени при минимальной концентрации оказывает тормозящий эффект на возбудителя.

Под **фармакодинамикой** понимают специфическое действие препарата на макроорганизм и возбудитель, находящийся в организме. Фармакодинамика изучает также механизмы действия антибиотика, выявляет связь между концентрацией препарата и достигнутым эффектом. Антибиотик лишь воздействует на возбудителя заболевания - окончательная ликвидация инфекционного процесса происходит в результате мобилизации защитных механизмов макроорганизма.

Прежде чем назначать тот или иной антибиотик, необходимо знать его свойства, способ введения, спектр и механизм противомикробного действия, срок сохранения в организме и пути выведения из организма, а также показания к применению. Нельзя использовать антибиотикотерапию в течение длительного времени, так как продолжительный прием антибиотиков приводит к угнетению нормальной микрофлоры организма. Одновременно с этим размножается нечувствительная к антибиотикам микрофлора, обуславливающая дисбактериозы, сопровождающиеся гастроэнтеритом, колитом, кандидозом и другими заболеваниями.

Выбор антибиотиков обязательно должен проводиться по фармакологическим критериям (в зависимости от концентрации в очаге инфекции). Так, высокую концентрацию в моче создают пенициллин, ампициллин, аминогликозиды, тетрациклины; в костной ткани – аминогликозиды, маролиды, линкомицин, тетрациклины; в желчи – ампициллин, тетрациклины, макролиды, левомицетин; в легочной ткани – тетрациклины, макролиды; проходящие через гемато-энцефалический барьер – пенициллины, ампициллин.

### 13.6. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам

При использовании антибиотиков выраженный лечебный эффект достигается

в случае применения тех препаратов, к которым возбудитель наиболее чувствителен. Определение чувствительности возбудителя к антибиотикам проводится перед началом лечения и периодически – в ходе лечения. В настоящее время на практике используются следующие методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

1. **Метод серийных разведений в жидких средах.** В жидкие среды с серийными разведениями антибиотиков вносят исследуемую культуру, инкубируют посевы 10-18 часов при 37°C, и учитывают результаты визуально или нефелометрически. Иногда в среду добавляют глюкозу и индикатор, что позволяет учитывать результаты по изменению окраски среды. Этот метод позволяет установить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) или минимальную подавляющую концентрацию (МПК) препарата для конкретного возбудителя. Исследование можно выполнять в различных объемах питательной среды - от 1 до 10 мл; в качестве питательной среды обычно используют МПБ или любую другую среду, соответствующую питательным потребностям возбудителя. В пробирках с питательной средой готовят серию двойных разведений антимикробного препарата. В качестве контроля используют пробирку с питательной средой без антибиотика. В каждую пробирку (с антибиотиком и контрольную) вносят суспензию бактерий с концентрацией  $10^6$  микробных клеток/мл. Пробирки инкубируют 10-18 часов при 37°C (или до появления бактериального роста в контрольной пробирке). По истечении указанного срока учитывают результаты. МПК соответствует наибольшему разведению препарата, тормозящему рост тест-культуры (рисунок 13.17).

Концентрация антибиотика, мкг/мл



Рисунок 13.17 – Определение МПК методом разведения в жидкой питательной среде.

2. **Метод серийных разведений в плотных средах.** Метод аналогичен предыдущей процедуре, но проводится на плотных питательных средах. При использовании этого метода готовят серийные разведения антимикробного препарата, затем вносят каждое разведение в пробирки, содержащие охлажденную агаровую среду. Содержимое пробирки после перемешивания быстро переносят в чашки Петри либо пробирки “скашивают” до застывания агара. Затем агар засевают исследуемой культурой (петлей или специальным дозатором). Посевы инкубируют 18-20 часов при 37°C. После инкубирования посевов определяют МИК по отсутствию роста на чашках или в пробирках, содержащих наименьшие концентрации препарата.

3. **Диффузионные методы.** Эти методы менее чувствительны, чем методы

стандартных разведений, но проще по выполнению. На практике их применяют чаще. Эти методы позволяют определять чувствительность бактерий к нескольким антибиотикам одновременно.

**Классический метод.** В чашки Петри вносят тонкий слой (4-5 мм) плотной питательной среды. После застывания на поверхность агара наносят микробную взвесь ( $10^5$  клеток/мл) и равномерно распределяют по поверхности агара. Излишки суспензии удаляют, а чашки подсушивают в термостате. Затем в агаре пробивают лунки и в каждую вносят по 0,1 мл раствора исследуемого антибиотика, после чего чашки помещают в термостат. После инкубирования в оптимальных условиях измеряют диаметр зоны подавления роста вокруг лунки для каждого препарата (рисунок 13.18).



Рисунок 13.18 – Результат классического диффузионного метода определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

**Метод дисков** (диско-диффузионный метод). Для определения чувствительности бактерий с помощью этого метода на агар высевают исследуемую культуру (суспензия, содержащая  $10^9$  клеток/мл). После этого на поверхность агара помещают диски из фильтровальной бумаги, пропитанные антибиотиками. Для этого используют коммерческие диски, содержащие определенные концентрации антибиотиков (рисунок 13.19).



а



б

Рисунок 13.19 – Диски с антибиотиками (а) и диспенсеры (апликаторы) для одновременного нанесения 6-12 дисков (б).

Посевы инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение времени, необходимого для роста конкретного возбудителя. Вокруг дисков в зависимости от активности и концентрации антибиотика образуются разной величины зоны задержки роста исследуемого микроба (рисунок 13.20).

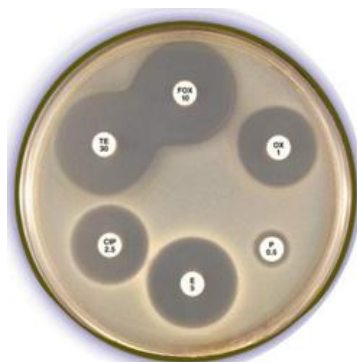


Рисунок 13.20 – Результаты диско-диффузионного метода определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

За рубежом выпускаются гексадиски (6 объединенных дисков) и октодиски (8 объединенных дисков), позволяющие определять чувствительность бактерий одновременно к 6 или 8 антибиотикам (рисунок 13.21).

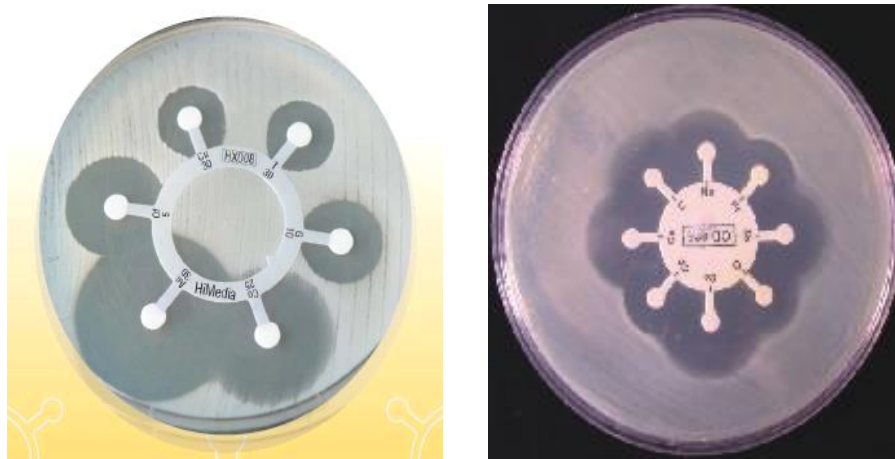


Рисунок 13.21 - Гексадиски и октодиски для определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

Зоны задержки роста культур измеряют с помощью линейки. Полученные размеры зон сравнивают с величинами зон задержки роста, указанными в инструкции, после чего микроорганизмы относят к той или иной группе (чувствительным, умеренно чувствительным или резистентным). Показатели активности основных антибиотиков, определяемые методом стандартных индикаторных дисков, представлены в таблице 13.5.

Таблица 13.5 – Показатели активности основных антибиотиков, определенные методом стандартных индикаторных дисков

№№ ПП	Антибиотики	Код диска (лат.)	Содержание антибиотика в диске, мкг	Диаметр зоны отсутствия роста, мм		
				устойчивые	умеренно устойчивые	чувстви- тельные
1.	Азтреонам	АТМ (Ао)	30	≤15	16-21	≥22



2.	Амоксициклин (амоксиклав)	АКК (Ac)	10	$\leq 10$	11-12	$\geq 13$
3.	Ампициллин	АМП (A)	10	$\leq 9$	10-13	$\geq 14$
4.	Бензилпенициллин	ПЕН (P)	6	$\leq 11$	12-21	$\geq 22$
5.	Ванкомицин	ВА (Va)	30	$\leq 14$	15-16	$\geq 17$
6.	Гентамицин	ГЕН (G)	10	$\leq 13$	-	$\geq 14$
7.	Доксициклин	ДОК (Do)	10	$\leq 12$	13-19	$\geq 20$
8.	Канамицин	КАН (K)	30	$\leq 14$	15-18	$\geq 19$
9.	Карбенициллин	КАР (Cb)	25	$\leq 14$	15-18	$\geq 19$
10.	Клиндамицин	КЛ (Cd)	2	$\leq 14$	15-20	$\geq 21$
11.	Левомецетин	ЛЕВ	30	$\leq 14$	15-18	$\geq 19$
12.	Линкомицин	ЛИН (L)	15	$\leq 19$	20-23	$\geq 24$
13.	Линезолид	(Lz)	30	$\leq 20$	21-22	$\geq 23$
14.	Меропенем	МПН (Mr)	25	$\leq 13$	14-15	$\geq 16$
15.	Метициллин	МЕТ (M)	10	$\leq 13$	14-17	$\geq 18$
16.	Мономицин	МОН	30	$\leq 13$	14-17	$\geq 18$
17.	Неомицин	НЕО (N)	30	$\leq 13$	14-17	$\geq 18$
18.	Нетилмицин	НИЦ (Nt)	30	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
19.	Нитрофурантоин	(Nf)	300	$\leq 14$	15-16	$\geq 17$
20.	Оксациллин	ОКС (Ox)	10	$\leq 19$	20-23	$\geq 24$
21.	Олеандомицин	ОЛЕ (Ol)	15	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$
22.	Офлоксацин	(Of)	5	$\leq 12$	13-16	$\geq 17$
23.	Полимиксин - В	ПОЛ (Pb)	300 ЕД	$\leq 8$	9-12	$\geq 13$
24.	Ристомицин	РИС	30	$\leq 9$	10-11	$\geq 12$
25.	Рифампицин	РИФ (R)	5	$\leq 9$	10-12	$\geq 13$
26.	Стрептомицин	СТР (S)	30	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$
27.	Тетрациклин	ТЕТ	30	$\leq 15$	16-19	$\geq 20$

		(Т)				
28.	Триметоприм	ТМ (Nr)	25	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$
29.	Триметоприм / сульфаметоксазол	ТС	1,25 / 23,75	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$
30.	Фузидин	ФУЗ (Fc)	10	$\leq 12$	13-19	$\geq 20$
31.	Фуродонин	ФД (Fr)	300	$\leq 14$	15-16	$\geq 17$
32.	Цефазолин	ЦЗ (Cz)	30	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$
33.	Цефалексин	ЦФЛ	30	$\leq 11$	12-16	$\geq 17$
34.	Цефоперазон	ЦПН (Cs)	75	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$
35.	Цефоперазон / сульбактам	ЦПС (Cfs)	75 / 30	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$
36.	Цефтазидим / клавулановая кислота	(Cac)	30 / 10	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$
37.	Эритромицин	ЭРИ (E)	15	$\leq 14$	15-18	$\geq 19$

В случае, когда используются антибиотики, не указанные в таблице 13.5, используют универсальную оценочную шкалу (таблица 13.6).

Таблица 13.6 – Ориентировочная (универсальная) шкала оценки чувствительности микроорганизмов к антибиотикам при использовании диско-диффузионного метода

Диаметр зоны торможения роста (в мм)	Чувствительность микроорганизмов
$\leq 10$	нечувствительны
10 – 15	слабо чувствительны
15 – 20	чувствительны
$\geq 20 - 25$	высокочувствительны

Таким образом, если зона задержки роста составляет 15-25 мм, то микробы считают чувствительными к антибиотикам, до 15 мм - малочувствительными, а отсутствие зоны указывает на резистентность бактериальной культуры к данному антибиотику. Этот метод используется только для “быстрорастущих” микроорганизмов, образующих сплошной рост на плотной питательной среде (в виде “газона”) через 18-20 часов экспозиции.

**Е-тест** представляет собой модификацию метода дисков. В этом тесте вместо дисков используется полоска, содержащая разные концентрации антибиотика на разных участках. Каждая зона полоски имеет соответствующую маркировку. Полоска помещается на поверхность агара с бактериальной культурой. Зона задержки роста культуры в этом тесте также имеет эллипсовидную форму.

Минимальной ингибирующей концентрации антибиотика соответствует тот участок полоски, где ее пересекает зона задержки роста исследуемой культуры (рисунок 13.22).

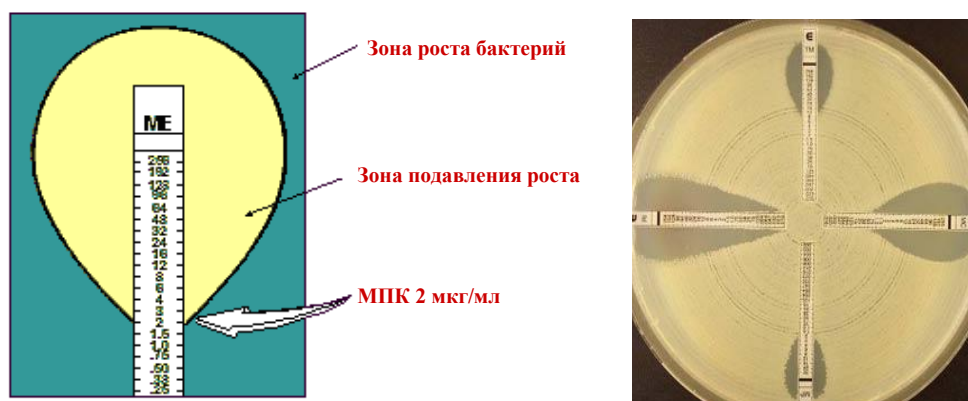


Рисунок 13.22 – Схема интерпретации результатов опыта и определение МПК с помощью E-теста.

**Автоматические системы учета результатов** метода серийных разведений представляют собой инкубационные системы со встроенными фотометрами, регистрирующими рост бактерий в лунках микропанелей, содержащих антибиотики. Например, устройство ВИТЕК 2 позволяет получать результаты уже через 4-10 часов, при этом определяет минимальную ингибирующую концентрацию более 100 антимикробных препаратов (рисунок 13.23).



Рисунок 13.23 – Устройство ВИТЕК 2 для автоматической идентификации и определения чувствительности бактерий к антимикробным препаратам.

На практике величина МПК позволяет отнести исследуемый штамм микроорганизма к одной из трех общепринятых категорий:

- чувствительный микроб;
- умеренно-устойчивый микроб;
- устойчивый микроб.

Микроорганизм считается **чувствительным**, если у него нет устойчивости к данному лекарственному средству, и при лечении стандартными дозами этого препарата отмечается хорошая терапевтическая эффективность.

**Устойчивым** к антимикробному средству считают микроорганизм, если он

имеет механизмы резистентности к данному препарату и при лечении инфекций, вызванных этим микроорганизмом, нет клинического эффекта даже при использовании максимальных терапевтических доз этого препарата.

Микроорганизмы относятся к **умеренно-устойчивым**, если по своей чувствительности они занимают промежуточное значение между чувствительными и устойчивыми штаммами и при лечении инфекций, вызванных данными возбудителями, клинический эффект наблюдается только при использовании высоких терапевтических доз препарата.

### 13.7. Антибиотикорезистентность микроорганизмов

Антибиотикорезистентность – это устойчивость микробов к антимикробным препаратам. Микробы считаются резистентными в том случае, когда они не обезвреживаются такими концентрациями антибиотиков, которые создаются в организме при введении принятых доз. Таким образом, бактерии являются резистентными к препарату, если он в терапевтической концентрации не подавляет размножения этого микроорганизма. В этом случае минимальная подавляющая концентрация *in vitro* выше, чем в тканях или в сыворотке крови. Целый ряд микробов под влиянием антибиотиков, особенно при неправильном их применении, утрачивает чувствительность к ним и образует антибиотикорезистентные формы. В настоящее время число лекарственно-устойчивых форм бактерий повсеместно возрастает. Так, частота обнаружения пенициллиноустойчивых стафилококков доходит до 90-98%, стрептомициноустойчивых – до 60-70% и выше, резистентность шигелл к ампициллину достигает 90% и более. Устойчивость к антибиотикам чаще возникает у бактерий, реже – у спирохет, риккетсий, хламидий, микоплазм, дрожжеподобных грибов. Устойчивость к антибиотикам возникает в результате изменения различных структур бактериальной клетки (цитоплазматической мембраны, клеточной стенки и др.).

Основные механизмы резистентности микробов к антибиотикам:

- способность к синтезу ферментов, инактивирующих антибактериальный препарат;
- модификация бактериальных структур, с которыми взаимодействует антибиотик.

Различают следующие **виды резистентности микроорганизмов**:

1. **Естественная резистентность** (первичная резистентность, природная устойчивость) - генетически обусловленная резистентность данного вида бактерий в отношении какого-либо химиотерапевтического препарата (отсутствие мишени для воздействия антибиотика). Например, микоплазмы не имеют пептидогликана в составе клеточной стенки, поэтому не чувствительны к бета-лактамам антибиотикам.

2. **Приобретенная резистентность**:

- **первично приобретенная резистентность** - резистентность бактериального штамма к химиотерапевтическому препарату без предварительного контакта с антибиотиком;
- **вторично приобретенная резистентность** – резистентность микроба,

развивающаяся после контакта с химиотерапевтическим препаратом.

### **Генетические основы приобретенной резистентности:**

1. Мутации в бактериальной хромосоме с последующей селекцией мутантов. Такой путь приобретения устойчивости наблюдается в присутствии антибиотиков, так как в этом случае мутанты приобретают селективные преимущества.

2. Перенос хромосомных генов антибиотикорезистентности от устойчивых клеток к чувствительным.

3. Перенос R-плазмид (плазмид резистентности). При этом плазмиды могут кодировать устойчивость сразу к нескольким антибиотикам (множественная устойчивость).

4. Перенос транспозонов (мигрирующих генетических последовательностей), несущих гены резистентности к антибиотикам (r-гены). Транспозоны способны мигрировать с хромосомы на плазмиду и обратно, что увеличивает вероятность возникновения антибиотикорезистентных бактерий.

Резистентность, обусловленная мутациями, связана с изменением в структуре гена, кодирующего чувствительность к антибиотику. При этом возникают как спонтанные, так и индуцированные мутации. Спонтанные мутации, наблюдаемые с частотой от  $10^{-7}$  до  $10^{-12}$ , играют очень незначительную роль в формировании резистентности. На фоне применения антибактериального средства часто возникают индуцированные мутации. В этом случае имеет место естественная селекция антибиотикоустойчивых штаммов. Подобным путем у штаммов *Staphylococcus aureus* выработалась устойчивость к метициллину.

Мутации могут быть единичными, при которых возникают бактерии, устойчивые к одному какому-нибудь антибиотику, а также множественными, при которых возникает потомство, обладающее устойчивостью к нескольким антибиотикам.

Наиболее часто резистентность к антибиотикам обусловлена переносом плазмид. Плазмиды резистентности (R-плазмиды) - внехромосомные молекулы ДНК. Они способны к автономной репродукции и кодируют антибиотикоустойчивость у различных бактерий. Плазмиды могут включать один и более генов, кодирующих синтез ферментов, обуславливающих инактивацию или модификацию лекарственных препаратов (например,  $\beta$ -лактамазы, инактивирующие пенициллины и цефалоспорины, или ацетилтрансферазы, нарушающие структуру хлорамфеникола), а также опосредующих быструю элиминацию препаратов (например, тетрациклинов) из клетки. Гены множественной устойчивости могут кодировать транспозоны, которые у одних бактерий интегрируются в плазмиды, а у других микробов встраиваются в бактериальную хромосому. R-плазмиды способны к широкому распространению в популяциях бактерий в результате генетического переноса (конъюгации, трансдукции, трансформации).

**Механизмы формирования резистентности микроорганизмов к антибиотикам (рисунок 13.24):**

1. Превращение активной формы антибиотика в неактивную форму путем ферментативной инактивации (разрушения). Например, многие бактерии продуцируют фермент  $\beta$ -лактамазу, разрушающую  $\beta$ -лактамы антибиотиков (пенициллины и цефалоспорины).

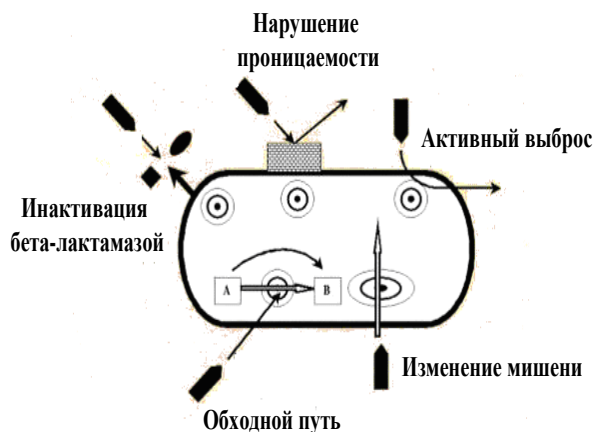


Рисунок 13.24 – Основные механизмы резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

2. Изменение проницаемости клеточной стенки бактерий для определенного антибиотика. Транспорт антимикробных препаратов в клетку происходит через пориновые каналы клеточной стенки. Нарушение их проницаемости препятствует поступлению антибиотиков внутрь клетки. Например, клеточная стенка грамотрицательных бактерий слабо проницаема для пенициллина.

3. Нарушения в системе специфического транспорта антимикробного препарата в бактериальную клетку, то есть активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс). Этот механизм характерен для тетрациклиновых антибиотиков (рисунок 13.25).

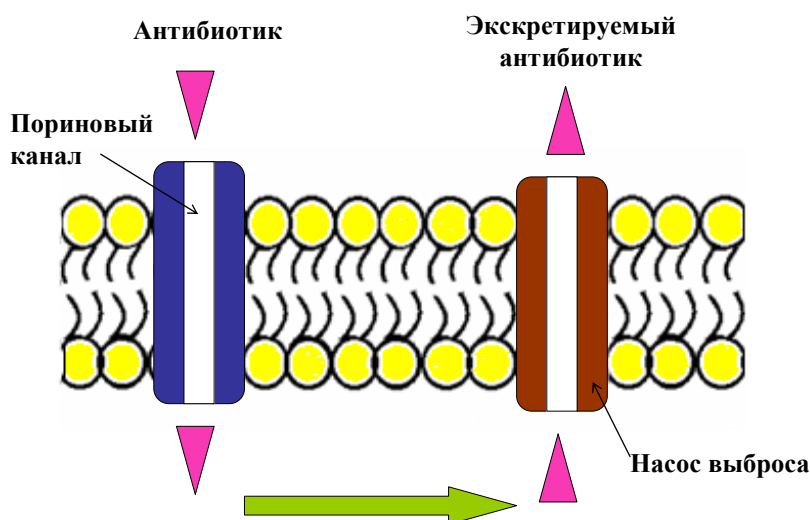


Рисунок 13.25 – Механизм эффлюкса антибиотиков.

4. Модификация мишени действия антибиотиков. Например, у микоплазм и L-форм бактерий отсутствует клеточная стенка, поэтому они не чувствительны к пенициллинам.

5. Возникновение у микроорганизма альтернативного пути образования жизненно важного метаболита, заменяющего основной путь, блокированный препаратом, то есть формирование метаболического “шунта” (“обходного” пути

метаболизма). Например, такой механизм резистентности характерен для сульфаниламидных препаратов.

#### **Пути борьбы с антибиотикоустойчивыми бактериями:**

- систематическое получение новых антимикробных препаратов (обновление рынка антибиотиков);
- химическая модификация известных антибиотиков с защищенными активными группами, устойчивыми к бактериальным ферментам;
- изыскание ингибиторов, подавляющих активность бактериальных ферментов, а также препаратов, препятствующих адгезии бактерий на клетках макроорганизма;
- систематическое изучение типов лекарственной устойчивости патогенных и условно-патогенных бактерий, циркулирующих в пределах отдельных регионов;
- своевременная информация врачей о циркулирующих в регионе лекарственно-устойчивых бактериях;
- определение чувствительности выделенных бактерий к антибиотикам.

С целью предотвращения возникновения резистентных микроорганизмов при лечении необходимо комбинировать антибиотики или использовать их в сочетании с другими химиотерапевтическими средствами (сульфаниламидами, нитрофуранами, производными оксихинолина) и применять препараты, повышающие иммунологическую реактивность организма.

### **13.8. Характеристика антимикробных препаратов**

В настоящее время все антимикробные препараты с учетом комплекса характеристик подразделяются на следующие группы:

#### **А. Антибактериальные препараты:**

##### **1. Пенициллины:**

##### **1.1. Природные пенициллины (пенициллин).**

##### **1.2. Полусинтетические пенициллины:**

- устойчивые к пенициллиназам - клоксациллин, оксациллин, метициллин;
- карбоксипенициллины - карбенициллин, тикарциллин;
- уреидопенициллины (антисинегнойные препараты) – мезлоциллин, азлоциллин, пиперациллин;
- аминопенициллины - ампициллин, амоксициллин;
- амидопенициллины – мециллам;
- комбинированные препараты, содержащие ингибиторы бета-лактамаз – амоксициллин + клавулановая кислота, ампициллин + сульбактам, пиперациллин + тазобактам, тикарциллин + клавулановая кислота.

Общая структура и готовая лекарственная форма одного из пенициллинов представлены на рисунке 13.26.

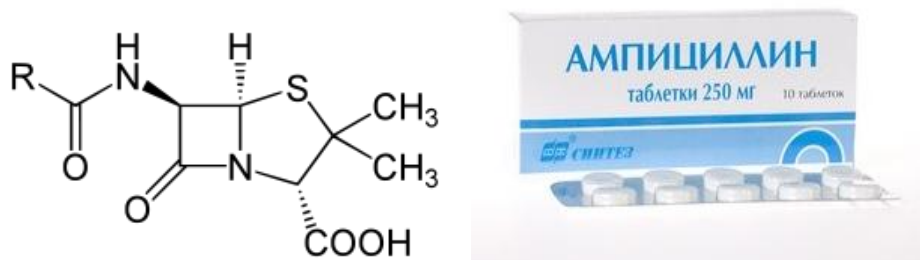


Рисунок 13.26 - Общая структура пенициллинов и готовая лекарственная форма ампициллина.

**Пенициллин** – это продукт жизнедеятельности грибов *P. notatum*, *P. crustosum*, *P. chrysogenum* и др. Пенициллин - кристаллический порошок белого цвета. Применяется в виде солей (калиевой, натриевой). Пенициллин эффективно действует на грамположительные микроорганизмы. Хорошо растворяется в воде, изотоническом растворе хлорида натрия, растворах глюкозы и новокаина. В растворах антибиотик нестойк. Антибиотик практически нетоксичен. Человеку можно вводить до 100 млн. ед. пенициллина ежедневно. Применяется внутримышечно и реже внутривенно (при тяжелых септических заболеваниях). Недостаток пенициллина - быстрое выведение его из организма через почки. Слабо всасывается из желудочно-кишечного тракта, разрушается желудочным соком, поэтому применять его перорально нецелесообразно. Однако имеются кислотоустойчивые препараты (**феноксиметилпенициллин**), которые назначают внутрь. При внутримышечном введении антибиотик задерживается в организме до 4 часов. Для более длительной циркуляции активно действующего вещества в организме разработаны специальные препараты пролонгированного действия. К ним относятся **новоциллин**, **экмоновоциллин**, **бициллины 1, 2, 3, 4, 5** и др.

Среди пенициллинов выделяют препараты I, II, III и IV поколений, препараты узкого и широкого спектра действия. К **I поколению** относятся препараты, устойчивые к действию пенициллиназы (метициллин, оксациллин), а также аминокпенициллины широкого спектра действия (ампициллин). **Препаратами II и III поколений** являются карбоксипенициллины (в частности, карбенициллин). К **пенициллинам IV поколения** относятся уреидопенициллины и амидопенициллины.

**Препараты узкого спектра действия** (метициллин, оксациллин) активны в отношении грамположительных микроорганизмов, включая штаммы, продуцирующие пенициллиназу ( $\beta$ -лактамазу). **Препараты широкого спектра действия** - аминокпенициллины - активны в отношении грамположительных кокков, грамотрицательных аэробов (кокков, бактерий), но неактивны в отношении пенициллиназообразующих штаммов. Карбоксипенициллины (карбенициллины), уреидопенициллины действуют на грамположительных и грамотрицательных аэробов и анаэробов, особенно родов *Pseudomonas* и *Proteus*.

## 2. Цефалоспорины.

Цефалоспорины продуцируются плесневым грибом *Cephalosporium acremonium*. Цефалоспорины не инактивируются пенициллиназой, поэтому они эффективны против грамположительных микробов, устойчивых к пенициллину. Эти



антибиотики применяются для лечения пневмонии, сепсиса, менингита и других инфекций. Цефалоспорины подразделяются на 5 групп, отличающихся между собой по спектру антимикробного действия:

- **цефалоспорины первого поколения:** цефалотин, цефазолин, цефалексин, цефаклор, цефадроксил;
- **цефалоспорины второго поколения:** цефуроксим, цефаклор, цефметазол, цефотиам, цефамандол, цефокситин;
- **цефалоспорины третьего поколения:** цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим, цефтизоксим, цефиксим;
- **цефалоспорины четвертого поколения:** цефпиром, цефепим;
- **цефалоспорины пятого поколения** – цефтобипрол, цеftarолин.

Общая структура и один из цефалоспоринов представлены на рисунке 13.27.



Рисунок 13.27 - Общая структура цефалоспоринов и готовая лекарственная форма цефотаксима.

Цефалоспорины **I поколения** проявляют активность преимущественно в отношении грамположительных микроорганизмов: *Streptococcus spp.* и метициллиночувствительных *Staphylococcus spp.* Обладают невысокой активностью в отношении грамотрицательных бактерий. К цефалоспорином I поколения чувствительны большинство анаэробов, за исключением *B. fragilis*. Эти антибиотики применяют преимущественно для лечения инфекций кожи и мягких тканей легкой и средней степени тяжести.

Цефалоспорины **II поколения** несколько уступают препаратам I поколения по активности в отношении грамположительных кокков, но превосходят в отношении грамотрицательных микроорганизмов. К препаратам II поколения чувствительны *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter diversus*.

Цефалоспорины **III поколения** проявляют высокую устойчивость к  $\beta$ -лактамазам грамотрицательных микроорганизмов. Они активны в отношении менингококков, гонококков, *H. influenzae* и *M. catarrhalis*, а также всех представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Цефотаксим, цефтриаксон и цефтазидим хорошо проникают через гематоэнцефалический барьер, обеспечивая терапевтические концентрации в ликворе.

Цефалоспорины **IV поколения** близки к цефалоспорином III поколения. Однако они лучше проникают через цитоплазматическую мембрану грамотрицательных бактерий и обладают высокой устойчивостью к гидролизу

хромосомными  $\beta$ -лактамазами. В результате этого они могут проявлять активность в отношении *P. aeruginosa* и неферментирующих грамотрицательных бактерий, резистентных к цефтазидиму. Цефепим также активен в отношении *Enterobacter spp.*, *Citrobacterfreundii*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii* и др. Препарат показан для лечения тяжелых заболеваний разной локализации, вызванных полирезистентной микрофлорой, а также инфекций на фоне иммунодефицитных состояний.

**3. Монобактамы (азтреонам).** Из-за узкого спектра антибактериальной активности его используют в качестве препарата резерва для лечения поражений, вызванных аэробной грамотрицательной флорой, в том числе микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* и *P. aeruginosa*, включая штаммы, устойчивые к аминогликозидам, уреидопеницилинам и цефалоспорином (рисунок 13.28).



Рисунок 13.28 – Препарат азтреабол, содержащий азтреонам.

**4. Карбапенемы (меропенем или меронем, имипинем)** обладают широким спектром антибактериальной активности и высокой устойчивостью к бактериальным  $\beta$ -лактамазам. Они высокоэффективны при полимикробных, в том числе аэробно-анаэробных инфекциях. Карбапенемы применяются при тяжелых поражениях различной локализации преимущественно в качестве препаратов резерва. Общая структура и примеры карбапенемов представлены на рисунке 13.29.

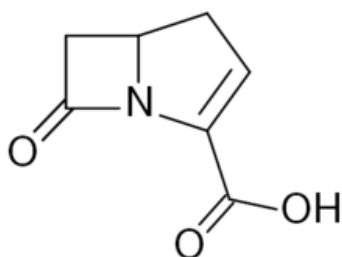


Рисунок 13.29 - Общая структура и готовые лекарственные формы карбапенемов.

**5. Гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин)** обладают относительно узким спектром действия на грамположительные аэробные и анаэробные микроорганизмы: стафилококки (в том числе метициллинрезистентные), стрептококки, пневмококки, энтерококки, пептострептококки, коринебактерии, клостридии. В отношении большинства микроорганизмов они оказывают бактерицидный эффект, связанный с нарушением синтеза клеточной стенки. На энтерококки, некоторые стрептококки и коагулазонегативные стафилококки действуют бактериостатически. Гликопептиды -

это препараты выбора при инфекциях, вызванных метициллинрезистентными стафилококками, энтерококками, устойчивыми к ампициллину и аминогликозидам. Ванкомицин обладает ото- и нефротоксичностью. Общая структура и пример гликопептидов представлены на рисунке 13.30.

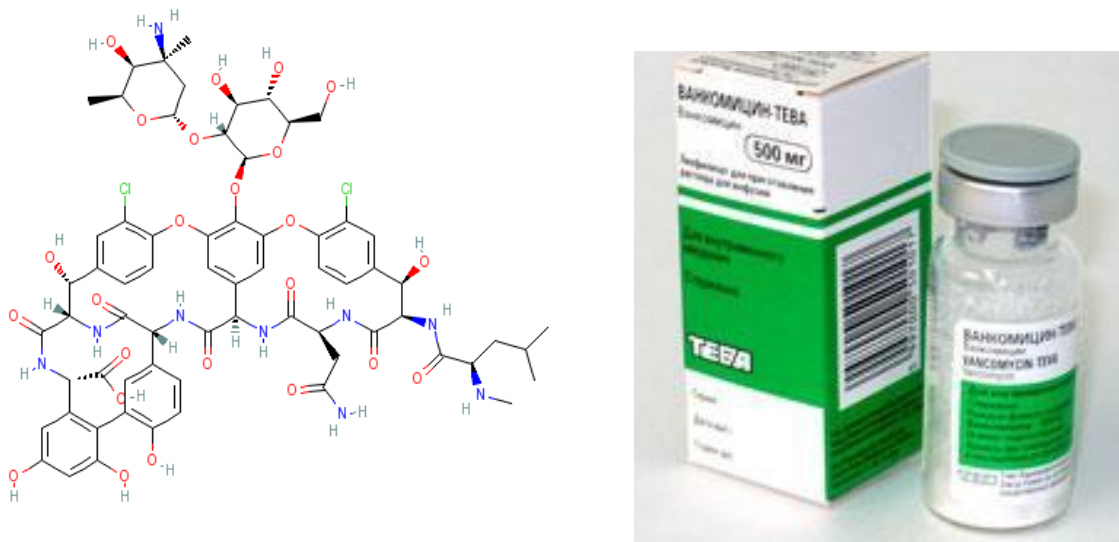


Рисунок 13.30 – Общая структура и готовая лекарственная форма ванкомицина.

**6. Полипептиды** (грамицидин, бацитрацин, ристомидин, полимиксины). **Грамицидин** - это полипептид, продуцируемый *B. brevis*. Этот антибиотик обладает активностью в отношении стафилококков, стрептококков, сальмонелл, кишечной палочки, бацилл, клостридий и других бактерий. **Бацитрацин** – это антибиотик, продуцируемый *B. subtilis*. Наибольшую активность он проявляет по отношению к грамположительным бактериям. Используется при лечении инфицированных ран. Оказывает токсическое действие на почки. **Ристомидин** – антибиотик, продуцируемый *Proactinomyces fructiveri*. Подавляет развитие стафилококков, стрептококков, листерий, бацилл, клостридий. **Полимиксины** (полимиксин В, полимиксин Е или колистин, полимиксин М) – группа антибиотиков, образуемых некоторыми штаммами *B. polymyxa*. Антибиотики этой группы проявляют активность в отношении грамотрицательных бактерий (синегнойной палочки, кишечной палочки, сальмонелл, пастерелл и других бактерий). К полимиксинам резистентны кокки, микобактерии, протей. В обычно применяемых дозах антибиотики этой группы оказывают бактериостатическое действие, а в высоких концентрациях только бактерицидное. Полимиксины токсичны, поэтому чаще всего применяются местно.

**7. Макролиды** (эритромицин, азитромицин, кларитромицин, спирамицин, рокситромицин и другие) - антибиотики, обладающие бактериостатическим действием и преимущественной активностью в отношении грамположительных кокков (кроме энтерококков) и внутриклеточных возбудителей (хламидии, микоплазмы, кампилобактеры). Макролиды относятся к числу наименее токсичных антибиотиков. Их назначают при инфекциях дыхательных путей, кожи, мягких тканей и мочеполовой системы. На рисунке 13.31 представлена основа химической структуры и пример макролидов.

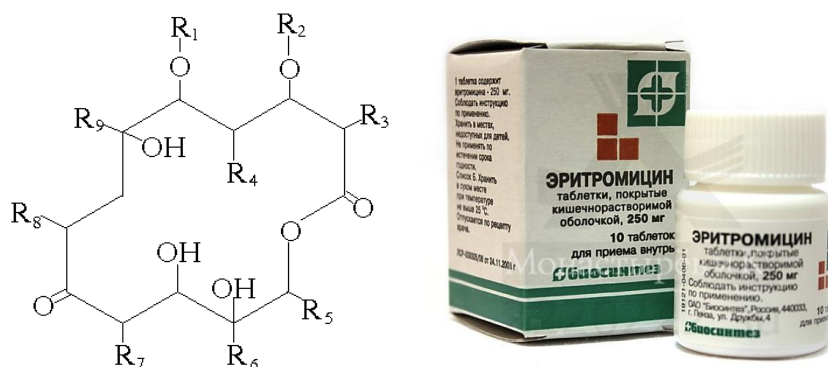


Рисунок 13.31 - Основа макролидов – макроциклическое лактамовое кольцо и готовая лекарственная форма эритромицина.

**8. Тетрациклины** - группа антибиотиков широкого спектра действия. Они активны в отношении кокков, клостридий, кишечной палочки, трепонем, бактероидов, микоплазм, риккетсий, хламидий, бруцелл. Тетрациклины подразделяют на **природные** (хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин) и **полусинтетические** (доксициклин, метациклин, морфоциклин). Все тетрациклины имеют одинаковый спектр активности. У микроорганизмов тетрациклины подавляют синтез белка. **Хлортетрациклин** (биомицин) выделен из *Act. aureofaciens*. Антибиотик применяют при сальмонеллезах, бруцеллезе и других инфекциях. **Тетрациклин** вначале был получен химическим путем из хлортетрациклина путем удаления из его молекулы атома хлора. Позже этот антибиотик был получен путем биосинтеза из актиномицета. Препарат вызывает меньше побочных явлений, чем хлортетрациклин. **Окситетрациклин** (террамицин) образуется *Act. rimosus*. По своим свойствам он близок к хлортетрациклину. В отличие от хлортетрациклина в его формуле атом хлора заменен гидроксильной группой (ОН). **Морфоциклин** - синтетический препарат, полученный из тетрациклина, в котором один атом водорода в карбоксильной группе замещен группой метилморфина. Этот антибиотик действует на те же микробы, что и тетрациклин, но более активен в отношении микоплазм. Его токсичность ниже других тетрациклинов. Разрушается в кислой и щелочной средах, поэтому не применяется перорально.

Тетрациклины вызывают нарушения функций желудочно-кишечного тракта и аллергические реакции, обладают гепатотоксичностью. Основу тетрациклинов составляет четырехциклическая система (рисунок 13.32).

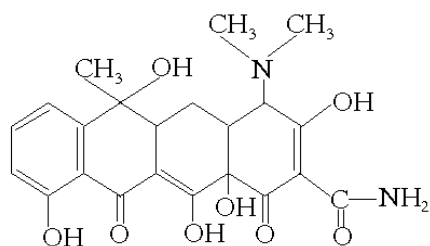


Рисунок 13.32 - Основа тетрациклинов – четырехциклическая система и готовые лекарственные формы тетрациклинов.

**9. Аминогликозиды** (стрептомицин, гентамицин, амикацин, тобрамицин, канамицин) - это группа антибиотиков широкого спектра действия. Они подразделяются на три поколения.

Аминогликозиды **I поколения** (стрептомицин, неомицин и канамицин) в настоящее время имеют ограниченное применение. **Стрептомицин** синтезируется *Act. streptomycini*. Он подавляет рост грамположительных и грамотрицательных микробов (стафилококков, стрептококков, салмонелл, шигелл, возбудителя туберкулеза). Антибиотик действует на микробы бактерицидно. Стрептомицин не подавляет рост анаэробных бактерий, грибов, риккетсий. К стрептомицину быстро вырабатывается резистентность, поэтому он применяется часто в сочетании с другими антибиотиками. При длительном парентеральном применении стрептомицина отмечается поражение органа слуха. Стрептомицин обладает общим нейротоксическим действием: угнетает дыхание, нарушает выделительную функцию почек.

**Неомицин** - антибиотик, продуцируемый *Act. fradiae*. Его антибактериальная активность выше, чем у стрептомицина, но он более токсичен. Вызывает потерю слуха и поражение почек, в связи с чем используют редко.

**Канамицин** выделен из культуральной жидкости *Act. kanamyceticus*. По биологическим свойствам он сходен со стрептомицином и неомицином.

Аминогликозиды **II поколения** (гентамицин) и **III поколения** (сизомицин, тобрамицин, амикацин, нетилмицин) активны в отношении микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, неферментирующих грамотрицательных бактерий (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*), стафилококков. Аминогликозиды обладают ототоксичностью и нефротоксичностью. Представители аминогликозидов представлены на рисунке 13.33.



Рисунок 13.33 – Готовые лекарственные формы аминогликозидов.

**10. Ансамицины** (рифамицин, рифампицин, рифабутин). **Рифампицин** обладает широким спектром антимикробной активности. Действует бактерицидно. Рифампицин является противотуберкулезным препаратом. Применяют для лечения стафилококковых инфекций, атипичных микобактериозов, бруцеллеза. К

рифампицину у бактерий быстро развивается резистентность. Наиболее частым побочным эффектом являются гепатотоксические реакции. Химическая структура и представитель ансамицинов представлены на рисунке 13.34.

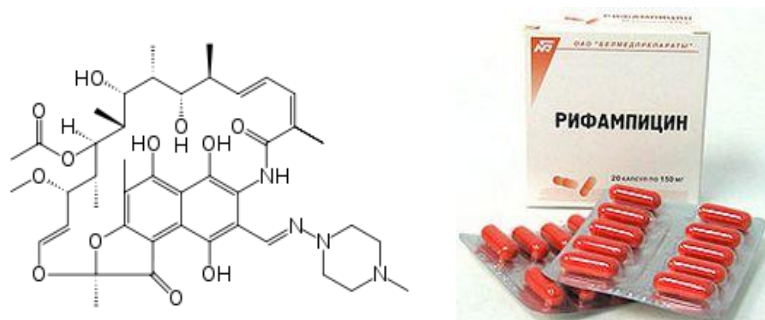


Рисунок 13.34 – Химическая структура и готовая лекарственная форма рифампицина.

**11. Хинолоны и фторхинолоны** являются производными хинолин-карболовой кислоты. Среди хинолонов выделяют нефторированные препараты (налидиксовая кислота, оксолиновая кислота, пипемидиевая кислота) и фторированные препараты. Клиническое применение нефторированных хинолонов ограничивается лечением инфекций мочевыводящих путей и кишечника, что обусловлено их узким спектром активности. Эти препараты ингибируют активность ДНК-гиразы, что препятствует спирализации молекулы ДНК. В группе фторхинолонов выделяют 3 поколения препаратов:

- **I поколение** - ципрофлоксацин, энрофлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин, норфлоксацин, ломефлоксацин;
- **II поколение** - левофлоксацин;
- **III поколение** - моксифлоксацин.

Структура хинолонов и фторхинолонов представлена на рисунке 13.35.

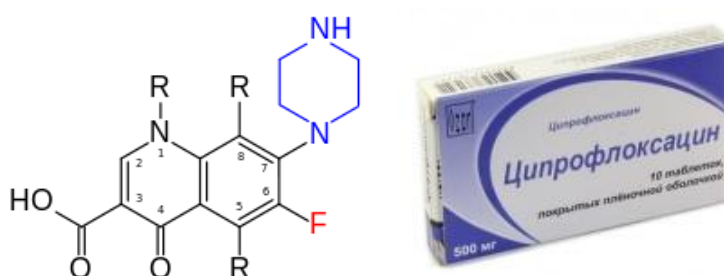


Рисунок 13.35 – Структура хинолонов и фторхинолонов и готовая лекарственная форма ципрофлоксацина.

Фторированные хинолоны отличаются широким спектром антимикробного действия, высокой бактерицидной активностью и хорошей фармакокинетикой, что позволяет применять их для лечения инфекций различной локализации. Для фторхинолонов разработаны лекарственные формы для внутривенного введения. Фторхинолоны активны в отношении большинства штаммов грамотрицательных и ряда грамположительных аэробных бактерий. Наиболее распространенные

побочные реакции при использовании фторхинолонов - расстройства со стороны желудочно-кишечного тракта, аллергические реакции, нарушения со стороны центральной нервной системы. Фторхинолоны хорошо сочетаются с другими антибиотиками (аминогликозидами, пенициллинами, цефалоспоридами и др.)

**12. Линкозамиды** - группа антибиотиков, включающая линкомицин и клиндамицин (рисунок 13.36). Они обладают узким спектром антимикробной активности: оказывают бактериостатическое действие на стафилококки, стрептококки, пневмококки и неспорообразующие анаэробы. К ним быстро развивается резистентность, особенно у стафилококков. При их применении развиваются тромбоцитопения и аллергические реакции.



Рисунок 13.36 – Линкозамиды.

**13. Амфениколы** (хлорамфеникол или левомецетин). Хлорамфеникол выделен из актиномицета (*Act. venezuelae*). Он является антибиотиком широкого спектра действия. Обладает активностью в отношении большинства грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. После установления химического состава антибиотик был получен синтетическим путем. Синтетическим аналогом хлорамфеникола является левомецетин (рисунок 13.37).

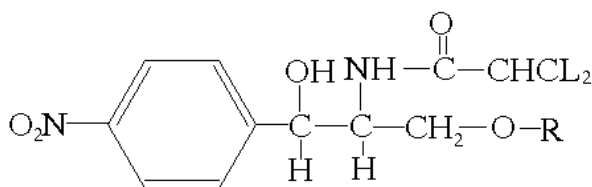


Рисунок 13.37 – химическая структура и готовая лекарственная форма левомецетина.

**14. Сульфаниламиды** (сульфадимезин, сульфадиметоксин, сульфаметоксазол) – это группа химических веществ, производных парааминобензолсульфамида. Сульфаниламиды по структуре схожи с парааминобензойной кислотой (ПАБК), необходимой для синтеза фолиевой кислоты. В процессе развития вместо ПАБК бактерии включают в метаболизм сульфаниламидные препараты, в результате чего вместо фолиевой кислоты синтезируются ее нефункциональные аналоги. Они оказывают бактериостатическое действие. Спектр активности сульфаниламидов включает грамположительные (стрептококки, стафилококки) и грамотрицательные микроорганизмы

(энтеробактерии), а также грибы. Сульфаниламиды обладают высокой токсичностью, вызывают нарушение функций ЦНС, почек, печени.

**15. Нитрофурановые препараты** (фурагин, фуразолидон, нитрофурантоин) – это антимикробные препараты, производные фурана (пятичленного гетероциклического соединения), у которого атом водорода замещен нитрогруппой. Они тормозят дыхание микробной клетки, одновременно блокируя несколько ферментных систем. Оказывают бактерицидное действие. Используются для лечения ран, острых неосложненных инфекций мочевыводящих путей (нитрофурантоин, фуразидин) и кишечных инфекций (фуразолидон). Они обладают токсичностью: могут нарушать функции желудочно-кишечного тракта, печени, нервной системы, вызывать аллергические реакции.

**16. Нитроимидазолы** (метронидазол, тинидазол, орнидазол, секнидазол) – группа синтетических антимикробных препаратов. Проявляют бактерицидный эффект в отношении грамотрицательных анаэробных бактерий. Механизм действия заключается в нарушении репликации ДНК и синтеза белка.

**17. Производные хиноксалина** (диоксидин, хиноксидин) – это группа синтетических противомикробных препаратов, оказывающих бактерицидное действие в результате нарушения синтеза ДНК. Эти соединения обладают активностью в отношении вульгарного протей, синегнойной палочки, кишечной палочки, сальмонелл, стафилококков, стрептококков и других бактерий. Применяются при лечении тяжелых гнойных воспалительных процессов.

**18. Пиримидины** (триметоприм, пириметамин) – химические антибактериальные препараты, механизм действия которых связан с ингибированием синтеза фолиевой кислоты. Это приводит к нарушению синтеза нуклеиновых кислот и белка в бактериальной клетке. Эти препараты обладают активностью против грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий. Их применяют при инфекциях желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. Комбинация триметоприма с сульфаметоксазолом (бисептол) оказывает бактерицидное действие, хотя оба компонента - бактериостатики.

**19. Оксазолидиноны.** Единственный представитель группы оксазолидинонов - линезолид. Он ингибирует биосинтез белка на этапе связывания тРНК с бактериальной рибосомой. Линезолид проявляет высокую активность к большинству грамположительных бактерий. Используется для лечения инфекционных заболеваний кожи, мягких тканей, пневмонии.

**20. Группа защищенных антибиотиков.** В связи с увеличением числа бактерий, продуцирующих  $\beta$ -лактамазу, и возрастанием их роли в патологии человека были разработаны препараты, состоящие из двух компонентов: бета-лактамного антибиотика и ингибитора бета-лактамаз. Первоначально такие препараты назывались **потенцированными пенициллинами**, в настоящее время их объединяют в группу защищенных антибиотиков. Ингибиторы – это вещества бета-лактамной природы, которые обладают низкой антибактериальной активностью. Однако, связываясь с бета-лактамазами они ингибируют их активность. Таким способом ингибиторы защищают антибиотик от гидролиза. В качестве ингибиторов используются клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам. В группу защищенных антибиотиков включены комбинация ампициллина с сульбактамом, амоксициллина с клавулановой кислотой (панклав).



## **Б. Противотуберкулезные препараты:**

- **1 группа** (группа А) - препараты высокой эффективности: изониазид, рифампицин;
- **2 группа** (группа В) - препараты средней эффективности: стрептомицин, канамицин, флоримицин, циклосерин, этамбутол, этионамид, протионамид;
- **3 группа** (группа С) - препараты низкой эффективности: ПАСК, тиоацетазон.

Изониазид, метаизид, фтивазид, салюзид являются производными гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК).

Механизм действия таких препаратов заключается в замене никотиновой кислоты на изоникотиновую при синтезе НАД (никотинамид-аденин-динуклеотида), образование перекисных соединений, нарушение синтеза воска клеточной стенки микобактерий.

Механизм действия натриевой или кальциевой солей парааминосалициловой кислоты (ПАСК) – антагонизм с парааминобензойной кислотой (ПАБК), которая является фактором роста микобактерий. ПАСК действует на микобактерии, находящиеся в состоянии активного размножения, но не действует на микобактерии в стадии покоя.

## **В. Противогрибковые препараты:**

1. **Полиеновые** антибиотики (нистатин, амфотерицин В, леворин).

**Нистатин** выделен из *Streptomyces noursei*. Обладает высокой активностью в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Препарат встраивается в мембрану клетки и образует каналы, через которые в внутрь поступают электролиты, вызывающие гибель клетки.

**Амфотерицин В** продуцируется *Streptomyces nodosus*. Препарат связывается с эргостеролами клеточной мембраны, формируя каналы, через которые внутриклеточные компоненты выходят во внеклеточное пространство. В результате этого наступает лизис клетки. Он активен в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.* и других грибов.

**Леворин** - антибиотик, выделенный из продуктов жизнедеятельности *Actinomyces levoris*. Он активен в отношении дрожжеподобных грибов и некоторых простейших.

2. **Азолы** (клотримазол, кетоконазол, миконазол, флуконазол). Препараты группы имидазолов обладают высокой активностью против дерматофитов, дрожжевых и плесневых грибов, некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий. Их действие связано с нарушением биосинтеза эргостерина, триглицеридов и фосфолипидов, необходимых для образования клеточной стенки грибов.

3. **Аллиламины** (тербинафин или ламизил) изменяют биосинтез стеролов клеточной стенки грибов, что приводит к гибели клетки. Используются для лечения трихофитии, микроспории, эпидермофитии.

4. **Другие** препараты (гризеофульвин, флуцитозин или фторцитозин).

**Гризеофульвин** - антибиотик, продуцируемый грибом *Penicillium nigricans*. Подавляет синтез белка, нарушает формирование клеточной стенки грибов.

**Флуцитозин** (фторцитозин) представляет собой препарат, подавляющий синтез нуклеиновых кислот. Используется для лечения системных микозов.

### **Г. Противовирусные препараты:**

- аномальные нуклеозиды (азидотимидин, ацикловир, ганцикловир, видарабин, идоксуридин, рибавирин, трифлюридин, цитарабин);
- производные адамантана (адапромин, амантадин, дейтифорин, ремантадин, тромантадин);
- синтетические аминокислоты (амбен, аминокапроновая кислота);
- аналоги пирофосфата (фоскарнет);
- производные тиосемикарбазона (марборан, метисазон);
- вирулицидные препараты (оксолин, теброфен, флюреналь);
- прочие препараты (пандовир, хельпин, арбидол).

### **Д. Противопротозойные препараты:**

1. Ингибиторы уникальных ферментов простейших (сульфаниламиды, метронидазол и др.).
2. Ингибиторы незаменимых ферментов простейших (сурамин и др.).
3. Препараты для лечения и профилактики малярии.
4. Препараты для лечения амебиаза.
5. Препараты для лечения лямблиоза, лейшманиоза, трипаносомоза.

## **13.9. Осложнения и побочные действия антимикробной терапии**

Антимикробные препараты влияют не только на возбудителей заболеваний, но и на макроорганизм. Осложнениями и побочными действиями антимикробной терапии являются:

### 1. Осложнения со стороны макроорганизма:

- токсическое действие препаратов;
- дисбиоз (дисбактериоз);
- отрицательное воздействие на иммунную систему;
- эндотоксический шок (терапевтический);
- аллергические реакции.

### 2. Побочные действия на микроорганизмы:

- формирование атипичных и персистирующих форм микробов;
- формирование антибиотикозависимости и антибиотикостойчивости.

**Токсическое действие препаратов на макроорганизм.** Чаще всего токсические реакции проявляются при длительном применении антибиотиков, особенно у детей, беременных женщин, пациентов с нарушенными функциями печени и почек. Среди токсических реакций отмечаются поражения паренхимы печени (тетрациклины), поражения почек (амфотерицин В, линкомицин, аминогликозиды), поражения органов кроветворения (левомецетин). Токсическое действие антибиотиков проявляется в виде нейротоксических, ототоксических, нефротоксических, общетоксических, тератогенных реакций.

**Дисбактериозы** (дисбиозы) возникают в результате воздействия антибиотиков (особенно широкого спектра действия) на нормальную микрофлору организма. Чаще поражается микрофлора желудочно-кишечного тракта. В результате этого нарушаются функции органов и систем, возникает авитаминоз, развивается вторичная инфекция.

**Иммунодепрессивные эффекты** возникают в результате воздействия антибиотиков на органы и клетки иммунной системы.

**Эндотоксический шок** развивается при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. При введении антибиотиков наступает гибель возбудителя и высвобождается большое количество эндотоксина. Клинически эндотоксический шок проявляется кратковременным ухудшением состояния больного (падение давления, слабость).

**Аллергические реакции на антибиотики** клинически проявляются анафилаксией, сывороточноподобным синдромом, лекарственной лихорадкой, эритемами.

**Анафилаксия** – острая реакция, развивающаяся в течение 5-30 минут после применения антибиотика. Для нее характерны диффузная эритема, кожный зуд, бронхоспазм, отек гортани, гипотензия, аритмия и другие симптомы. Наиболее частой причиной развития анафилаксии является пенициллин.

**Сывороточноподобный синдром** вызывают  $\beta$ -лактамы, сульфаниламиды и стрептомицин. Этот синдром обычно развивается на 7-21 сутки от начала применения антибиотика. Если пациент получал антибиотик ранее, первые проявления могут возникнуть через несколько часов. Клинические проявления - лихорадка, крапивница, артралгия, лимфаденопатия. Сывороточноподобный синдром часто разрешается самостоятельно после отмены антибиотика.

**Лекарственная лихорадка** может быть единственным проявлением аллергии, ее чаще всего вызывают  $\beta$ -лактамы, сульфаниламиды, стрептомицин, ванкомицин, хлорамфеникол. Как правило, лекарственная лихорадка развивается на 6-8 сутки от начала терапии и почти всегда разрешается спустя 48-72 часа после отмены антибиотика. Нередко лекарственная лихорадка сопровождается эозинофилией, лейкоцитозом, ускорением СОЭ, тромбоцитопенией, зудящими высыпаниями.

**Многоформная экссудативная эритема** характеризуется развитием полиморфных эритематозных высыпаний, нередко спустя 10-14 дней после начала применения антибиотика. Сыпь, обычно симметричная, локализуется на дистальных участках конечностей, реже имеет распространенный характер, представлена множественными округлыми папулами (реже пузырьками), которые образуют кольцевидные высыпания.

**Контактный аллергический дерматит** - типичное проявление аллергических реакций замедленного типа при нанесении антибиотиков на кожу. Характерно развитие эритемы, везикулезных высыпаний, зуда или жжения, а в случае хронического течения - инфильтрации и лихенизации кожи в местах контакта с антибиотиком. Сенсибилизация обычно развивается в течение 5-7 дней, но если препараты применялись у больного ранее, то контактный аллергический дерматит может развиваться через 24 часа. Наиболее частой причиной развития является неомидин, входящий в состав многих мазей. Терапия заключается в отмене антибиотика и назначении мазей с глюкокортикоидами.

**Диагностика аллергических реакций** заключается в сборе тщательного аллергологического анамнеза, проведении кожных аллергопроб и провокационных проб. **Кожные аллергопробы** проводятся с помощью скарификационного, подкожного или аппликационного теста. Для их постановки используют аллергены, созданные на основе метаболитов антибиотиков. Например, для определения аллергии

к пенициллину применяют пенициллоил, пенициллоат, пеницилламин. Для других групп антибиотиков аллергены для постановки кожных проб разрабатываются.

**Провокационные пробы** проводятся в тех случаях, когда невозможна замена антибиотика. Для их постановки используют дозу антибиотика, равную 1% разовой терапевтической дозы. При отсутствии проявлений аллергии назначают антибиотик, каждый раз увеличивая дозу в 10 раз, пока она не достигнет терапевтической дозы. Если у пациента в течение последнего года наблюдались тяжёлые анафилактические реакции, процедуру постановки провокационных проб начинают с 0,1% разовой терапевтической дозы.

### 13.10. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Что такое химиотерапия?
2. Кто впервые выделил антибиотики?
3. Кто впервые выделил первый отечественный антибиотик?
4. На какие группы подразделяются антибиотики по происхождению?
5. Как подразделяются антибиотики по спектру действия?
6. Как подразделяются антибиотики по способу получения?
7. Как подразделяются химиотерапевтические препараты по типу действия?
8. Какие классы антибиотиков по химической структуре выделяют?
9. На какие группы подразделяются антибиотики по механизму действия на бактерии?
10. Назовите механизмы действия антибиотиков.
11. Назовите основные мишени действия антибиотиков в бактериальной клетке.
12. Как антибиотики ингибируют синтез клеточной стенки?
13. Приведите примеры антибиотиков – ингибиторов синтеза клеточной стенки.
14. Как антибиотики ингибируют проницаемость клеточной мембраны?
15. Приведите примеры антибиотиков, нарушающих проницаемость клеточной мембраны.
16. Как антибиотики ингибируют синтез белка?
17. Приведите примеры антибиотиков – ингибиторов синтеза белка.
18. Каким образом антибиотики ингибируют синтез нуклеиновых кислот?
19. Приведите примеры антибиотиков – ингибиторов синтеза нуклеиновых кислот.
20. Назовите методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.
21. Назовите проявления побочного действия антибиотиков на организм человека.
22. Что такое химиотерапевтический индекс?
23. Что такое МПК (МИК) антибиотика?
24. Что такое бактерицидная активность?
25. Что такое бактериостатическая активность?
26. Что такое R-плазмиды?

27. Приведите примеры антибиотиков из группы аминогликозидов.
28. Назовите антибиотики из группы фторхинолонов.
29. Приведите примеры антибиотиков - макролидов.
30. Назовите антибиотики из группы пенициллинов.
31. Назовите антибиотики из группы цефалоспоринов.
32. Что такое защищенные антибиотики?
33. Приведите примеры защищенных антибактериальных препаратов.

### 13.11. Тренировочные тесты

1. Кто впервые синтезировал химиопрепараты для лечения сифилиса?

- Л. Пастер
- + П. Эрлих
- Д.И. Ивановский
- Р. Кох
- И.И. Мечников

2. Кто впервые выделил пенициллин?

- Л. Пастер
- П. Эрлих
- + А. Флеминг
- Р. Кох
- Д.И. Ивановский

3. Кто впервые получил отечественный пенициллин?

- Л. Пастер
- И.И Мечников
- + З.В. Ермольева
- Р. Кох
- Д.И. Ивановский

4. Кто впервые получил стрептомицин?

- Л. Пастер
- + З. Ваксман
- А. Флеминг
- Р. Кох
- З.В. Ермольева

5. Метод стандартных дисков используется для определения:

- минимальной ингибирующей концентрации антибиотика
- уровня антибиотика в крови
- максимальной токсической дозы антибиотика
- + чувствительности микроорганизма к антибиотику
- минимальной терапевтической дозы антибиотика

6. Антибиотики, блокирующие синтез белка у бактерий:

- пенициллины
- + аминогликозиды
- + макролиды
- + тетрациклины
- цефалоспорины

7. Сульфаниламиды:

- + обладают бактериостатическим действием
- являются антибиотиками направленного действия
- + блокируют синтез фолиевой кислоты
- являются ферментами бактерий
- блокируют синтез клеточной стенки

8. Бета-лактамаза - это:

- фермент, вырабатываемый лактобактериями
- фермент, разрушающий лактоферрин
- фермент, блокирующий синтез пептидогликана
- + фермент, расщепляющий пенициллин
- фермент, расщепляющий лактозу

9. К антибиотикам относятся:

- + продукты метаболизма актиномицетов
- + продукты метаболизма грибов
- нитрофураны
- сульфаниламиды
- соединения мышьяка

10. Стрептомицин в микробной клетке взаимодействует с:

- клеточной стенкой
- цитоплазматической мембраной
- + рибосомами
- нуклеоидом
- мезосомами

11. Сульфаниламиды:

- вызывают гибель только патогенных микробов
- относятся к антибиотикам
- вызывают гибель только спирохет
- + блокируют синтез фолиевой кислоты
- обладают узким спектром действия

12. Аминогликозиды:

- содержат бета-лактамное кольцо
- блокируют синтез клеточной стенки
- + блокируют синтез белка

- вызывают усиленное размножение бактерий
- блокируют синтез ДНК

### 13. Пенициллин:

- нарушает синтез нуклеиновых кислот
- нарушает функции цитоплазматической мембраны
- + блокирует синтез пептидогликана клеточной стенки
- блокирует синтез белка
- блокирует синтез фолиевой кислоты

### 14. Цефалоспорины:

- блокируют синтез нуклеиновых кислот
- + нарушают синтез пептидогликана
- блокируют работу рибосом
- нарушают синтез фолиевой кислоты
- блокируют синтез белка

### 15. Механизм антимикробного действия хинолонов связан с нарушением:

- синтеза клеточной стенки
- синтеза белка на уровне 50S субъединицы рибосомы
- синтеза белка на уровне 30S субъединицы рибосомы
- + синтеза ДНК
- функционирования цитоплазматической мембраны

### 16. Ингибирование синтеза клеточной стенки характерно для:

- + пенициллинов
- + цефалоспоринов
- аминогликозидов
- макролидов
- тетрациклинов

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 14. Основы инфектологии и эпидемиологии

### 14.1. Инфекция, инфекционный процесс, инфекционная болезнь

В процессе эволюции сложились три основные формы взаимоотношений макроорганизма с микробами:

- **мутуализм** - это форма симбиоза, при которой макроорганизм и микроб оказывают друг другу взаимную пользу. Примером мутуализма является взаимоотношение нормальной микрофлоры кишечника и организма человека. Представители нормальной микрофлоры питаются остатками поступающей в кишечник пищи, а продуцируемые ими вещества используются макроорганизмом для биокаталитических реакций;

- **комменсализм** - это форма отношений, при которых наблюдается нейтральное сожительство макроорганизма и микробов (нет ни вреда, ни пользы). В качестве микроорганизмов-комменсалов также могут выступать представители нормальной микрофлоры организма человека;

- **паразитизм** - это форма взаимоотношений, при которой микроб использует макроорганизм в качестве среды обитания и наносит ему вред. При паразитизме микроб использует макроорганизм как источник питания и место постоянного или временного обитания.

В настоящее время выделяют три **категории паразитов**:

- **облигатные паразиты** (паразиты, никогда не попадающие в окружающую среду, которая для них губительна, например, возбудитель гонореи);

- **факультативные паразиты** (паразиты, попадающие в процессе циркуляции во внешнюю среду, например, возбудитель сибирской язвы);

- **случайные паразиты** (паразиты, внешняя среда для которых является нормальной средой обитания, например, возбудитель столбняка).

Проявлением паразитизма является инфекция. Впервые термин **инфекция** (заражение болезнью) ввел немецкий врач-терапевт К.В. Гуфеланд (рисунок 14.1).



Рисунок 14.1 – Кристоф Вильгельм Гуфеланд (Christoph Wilhelm Hufeland, 1762-1836 гг.).

В настоящее время термин “инфекция” претерпел первоначальное значение и



обозначает совокупность структурных и функциональных реакций, которыми макроорганизм отвечает на внедрение возбудителя.

Наука, которая изучает инфекционный процесс и инфекционную патологию, течение инфекционных заболеваний, процесс распространения патогенов среди населения, разрабатывает методы диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней, называется **инфектологией**.

**Инфекционный процесс** – это динамически развивающийся процесс взаимодействия патогенного или условно-патогенного микроорганизма и макроорганизма. Инфекционный процесс характеризует ответную реакцию организма на внедрение и циркуляцию в нем микробов. Инфекционный процесс протекает по **стадиям**, которые во многом обуславливают патогенез инфекционного заболевания (рисунок 14.2).

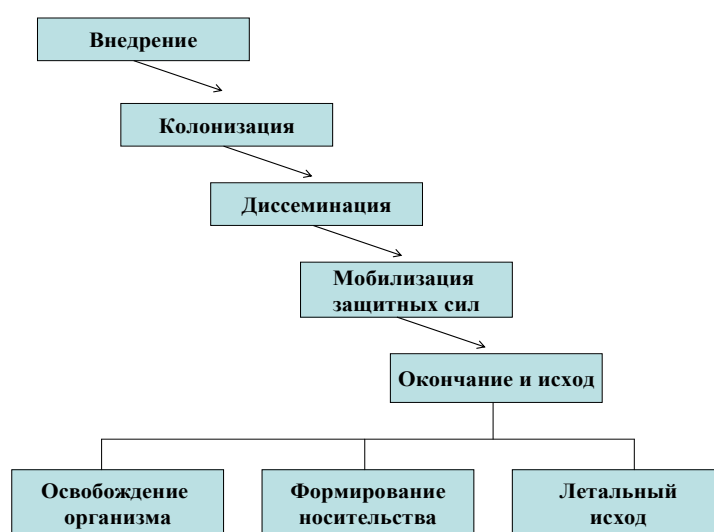


Рисунок 14.2 – Стадии инфекционного процесса.

1. **Внедрение** патогенного микроба в макроорганизм и его **адаптация** (приспособление) в месте входных ворот инфекции. В эту стадию происходит **инфицирование** макроорганизма (проникновение патогенного микроба в организм человека через входные ворота инфекции) и его **адгезия** (прилипание, прикрепление) к рецепторам клетки. **Входные ворота** - это ткани и органы, через которые микробы попадают в организм (кожные покровы, слизистые оболочки).

2. **Колонизация** - заселение входных ворот инфекции. При этом распространение микробов происходит не только горизонтально (по поверхности тканей), но и вертикально (в глубину тканей и внутрь клеток макроорганизма). Способность микробов проникать внутрь клеток макроорганизма называется **инвазией (пенетрацией)**.

3. **Диссеминация** - распространение микробов за пределы первичного очага (генерализация инфекционного процесса). Распространение микробов по организму происходит лимфогенным, гематогенным, бронхогенным, периневральным путями. При этом происходит размножение микробов, высвобождение продуктов их метаболизма, ферментов и токсинов, а также образование токсических продуктов распада клеток макроорганизма. При диссеминации возможна **генерализация** – то

есть размножение возбудителя в местах вторичной репродукции.

4. **Мобилизация защитных факторов** макроорганизма. При этом вначале происходит мобилизация неспецифических факторов защиты организма, а затем - специфических факторов – факторов иммунной системы (**иммуногенез**).

5. **Окончание и исход** инфекционного процесса. В большинстве случаев наступает санация макроорганизма - полное освобождение макроорганизма от микроба и формирование иммунитета (**элиминация** возбудителя). В ряде случаев инфекционный процесс заканчивается летальным исходом. В некоторых случаях наблюдается формирование микробоносительства.

Крайним проявлением инфекционного процесса является **инфекционная болезнь**, при которой отмечаются клинические признаки заболевания.

**Инфекционная болезнь имеет следующие отличия от неинфекционного заболевания:**

- наличие строго определенного инфекционного агента;
- заразительность (способность к передаче инфекции от больного организма здоровому);
- специфичность (наличие специфических симптомов заболевания);
- наличие инкубационного (скрытого) периода;
- цикличность течения (наличие периодов заболевания);
- формирование иммунитета.

Инфекционная болезнь протекает циклически, со сменой характерных периодов заболевания (рисунок 14.3).

Симптомы			
Отсутствуют	Неспецифические	Специфические	Исчезают
Инкубационный	Продромальный	Разгара болезни	Выздоровления
Периоды			

Рисунок 14.3 – Периоды инфекционной болезни.

1. **Инкубационный период** – период с момента проникновения возбудителя в организм до клинического проявления (неспецифических) симптомов заболевания. В этот период возбудитель локализуется во входных воротах инфекции или в лимфоузлах. Длительность этого периода различна. При одних заболеваниях (грипп, ботулизм) он исчисляется часами, при других (бешенство, вирусный гепатит В) – неделями и даже месяцами, при медленных инфекциях – месяцами и годами. Для большинства инфекционных болезней длительность инкубационного периода составляет 1-3 недели. Инкубационный период тем короче, чем выше вирулентность

и больше доза возбудителя. Однако главная роль принадлежит реактивности макроорганизма, от которой зависят интенсивность инфекции и темпы ее развития.

**2. Продромальный период** (период предвестников) начинается с появлением первых неспецифических клинических признаков болезни. В этом периоде наблюдаются недомогание, головная боль, разбитость, расстройство сна, озноб, снижение аппетита, иногда небольшое повышение температуры тела. Возбудитель в этот период проникает в кровь, лимфу, происходит секреция токсинов. Длительность этого периода обычно не превышает 2-4 дней.

**3. Период разгара заболевания**, период развития клинических симптомов, характерных для данного заболевания. Возбудитель локализуется в тканях, к которым он обладает тропизмом. Этот период имеет различную продолжительность - от нескольких дней (при кори, гриппе) до нескольких недель (при брюшном тифе, вирусных гепатитах, бруцеллезе). В период разгара наиболее ярко проявляются характерные для данной инфекционной формы симптомы. В этот период можно выделить стадию нарастания симптомов, стадию расцвета болезни и стадию угасания симптомов.

**4. Исход заболевания** (реконвалесценция, переход в хроническую форму, формирование бактерионосительства, летальный исход). Длительность периода выздоровления (реконвалесценции) широко варьирует и находится в зависимости от формы болезни, тяжести течения, эффективности терапии и многих других причин. Выздоровление может быть полным, когда все нарушенные в результате заболевания функции восстанавливаются, или неполным, если сохраняются остаточные явления. Выздоровление может быть быстрым (кризис) и медленным (лизис).

**По происхождению** инфекции подразделяются на эндогенные и экзогенные.

**Эндогенными** называют инфекции, вызванные микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме. Эти инфекции развиваются при угнетении защитных сил организма, или при возрастании вирулентности микроорганизма.

**Экзогенные** – это те инфекции, при которых возбудитель попадает в организм извне через входные ворота.

**По количеству возбудителей** выделяют моноинфекции и смешанные инфекции. **Моноинфекция** обусловлена одним возбудителем. **Смешанная инфекция** (микст-инфекция, полиинфекция) обусловлена присутствием нескольких возбудителей.

**Формы инфекции по этиологическому принципу:**

1. Бактериальные (дизентерия, дифтерия, туберкулез и др.).
2. Вирусные (грипп, бешенство, ВИЧ-инфекция и др.).
3. Грибковые (кандидоз, трихофития и др.).
4. Протозойные (малярия, лямблиоз и др.).
5. Прионные (куру, скрепи и др.).

**Формы инфекции по клиническим проявлениям:**

1. Манифестные формы (с клиническими проявлениями).
2. Бессимптомные формы (без клинических проявлений).

**Формы инфекции по течению:**

1. Острое, подострое и хроническое течение.

2. Типичное и атипичное течение.

3. Легкое течение, средней тяжести и тяжелое течение.

Некоторые инфекционные болезни протекают только остро (чума, натуральная оспа, корь, скарлатина); другие - остро, подостро (затяжное течение) и хронически (бруцеллез, гепатит В, дизентерия).

**Носительство** - это бессимптомно протекающий инфекционный процесс.

**Латентная форма** – это длительное бессимптомное взаимодействие макро- и микроорганизма. Возбудители при латентной инфекции локализуются, как правило, внутриклеточно. При воздействии неблагоприятных факторов возбудитель приобретает свои обычные свойства (реактивируется), и инфекция переходит в острую форму. Возбудитель вирусной инфекции при латентном течении находится в дефектной или интегрированной с геномом клетки хозяина форме (например, герпесвирусы).

**Вторичная инфекция** (присоединение второго возбудителя). Например, постгриппозная бактериальная пневмония.

**Реинфекция** - повторное заражение тем же возбудителем после выздоровления.

**Суперинфекция** - заражение на фоне еще текущего инфекционного процесса тем же возбудителем.

**Рецидив** - возврат заболевания за счет возбудителя, который сохранился в организме после перенесенного заболевания (например, болезнь Брилля - Цинссера – рецидив сыпного тифа).

По степени распространения в тканях выделяют местную и генерализованную формы инфекции. При **местной (очаговой) инфекции** возбудитель локализуется в определенном органе и не распространяется по организму (например, ангина, фурункул). При **генерализованной инфекции** возбудитель распространяется по организму.

**Бактериемия (вирусемия)** – циркуляция бактерий (вирусов) в течение некоторого времени в кровяном русле без размножения, проникновение в определенные ткани и органы, где могут вызвать патологический процесс (сальмонеллез, тиф и паратифы);

**Пиемия** (гноекровие) – циркуляция бактерий в кровяном русле, занос возбудителя в различные органы и ткани, образование вторичных гнойных очагов, повторное поступление возбудителя в кровяное русло.

При бактериемии и пиемии размножения микробов в крови не происходит. Бактерии, оставшиеся в крови, погибают.

**Септицемия, сепсис** (гнилокровие) - возбудители циркулируют в крови и размножаются в ней (стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, некоторые разновидности кишечной палочки).

**Септикопиемия** - сочетание сепсиса и пиемии. Характеризуется размножением гноеродных бактерий в крови и формированием гнойных метастатических очагов в органах и тканях.

**Токсинемия** - патогенный микроб остается и размножается в месте входных ворот. При этом он выделяет экзотоксины, которые проникают в кровь, разносятся по организму, обуславливая развитие заболевания (дифтерия, столбняк).

## 14.2. Эпидемический процесс

**Эпидемический процесс** – это процесс возникновения и распространения специфических инфекционных состояний (от бессимптомного носительства до манифестных заболеваний) на видовом и популяционном уровнях, то есть процесс взаимодействия двух популяций – популяции паразита и популяции хозяина (популяции людей). На эпидемический процесс большое влияние оказывают социальные условия жизни населения и природные факторы.

Наука, изучающая закономерности возникновения и распространения заболеваний различной этиологии среди населения с целью разработки профилактических мероприятий, называется **эпидемиологией**.

Эпидемический процесс имеет разное проявление:

- **спорадическая заболеваемость** – это низкий уровень заболеваемости данной инфекцией на данной территории в данный период (сезон) времени (единичные случаи заболеваний или групповые вспышки, не связанные между собой);

- **эпидемия** – это такой уровень заболеваемости данной инфекцией на данной территории в конкретный отрезок времени, который в несколько раз превышает уровень спорадической заболеваемости, прогрессирует по времени и имеет тенденцию к пространственному распространению;

- **пандемия** – это такой уровень заболеваемости данной инфекцией в конкретный отрезок времени, который не только резко превышает уровень обычных эпидемий, но и распространяется на территорию всей страны, территорию сопредельных государств, а иногда и многих стран.

В эпидемическом процессе выделяют следующие **элементы**: источник инфекции, резервуар возбудителя инфекции, механизмы, пути и факторы передачи инфекции, восприимчивый организм.

**Источник инфекции** – это организм человека или животного, в котором происходит размножение возбудителя, и от которого в дальнейшем заражается здоровый человек. От источника инфекции возбудитель проникает в организм здорового человека либо при непосредственном контакте, минуя фазу нахождения микроба во внешней среде, либо через объекты внешней среды и окружающие предметы. Основными источниками инфекции являются больной человек, больное животное, бактерионосители (люди, животные).

**Резервуар возбудителя инфекции** – это объекты внешней среды, которые являются естественной средой обитания некоторых возбудителей заболеваний человека (возбудители столбняка, легионеллеза) и в которых возбудитель находит благоприятные условия для своего роста и размножения (накопления). Основными резервуарами инфекции являются почва и вода. При некоторых заболеваниях природным резервуаром возбудителя инфекции называют источник инфекции, обеспечивающий сохранение в природе возбудителя как вида. Например, для чумы суслики, сурки, песчанки являются не только источником инфекции, но и природным резервуаром возбудителя.

Основные источники и резервуары инфекции представлены на рисунке 14.4.

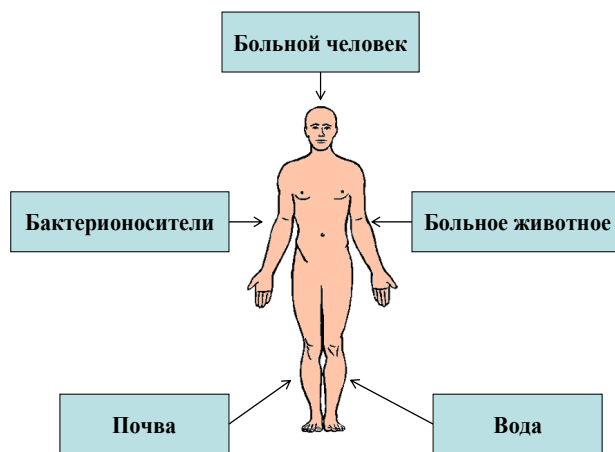


Рисунок 14.4 – Основные источники и резервуары инфекции.

В зависимости от источника и резервуара выделяют несколько **ВИДОВ инфекций**.

**Антропонозные инфекции** – это такие инфекции, при которых источником служит только человек (например, дизентерия, дифтерия, гепатит В). Животные этими инфекциями в природе не болеют.

**Зоонозные инфекции** – инфекции, при которых источником служат больные животные (например, сибирская язва, клещевой энцефалит).

**Зооантропонозные инфекции** – инфекции, при которых источником может быть как человек, так и животное (например, чума).

**Сапронозные инфекции** – инфекции, при которых резервуаром возбудителя являются объекты внешней среды, в частности, почва (например, для возбудителя столбняка) или вода (например, для возбудителя легионеллеза). Таким образом, при сапронозах отсутствует источник инфекции.

**Механизм передачи** – это эволюционно сложившаяся способность к перемещению возбудителя от источника инфекции (из организма хозяина) или резервуара возбудителя (из почвы, воды) в восприимчивый организм.

Выделяют следующие механизмы передачи:

**Горизонтальная передача:**

- фекально-оральный механизм;
- аэрогенный (респираторный) механизм;
- трансмиссивный (векторный) механизм;
- парентеральный механизм;
- контактный механизм.

**Вертикальная передача** – это передача возбудителя от матери к плоду (трансплацентарно).

Механизмы передачи инфекции подразделяют также на **естественные** (фекально-оральный, аэрогенный, трансмиссивный, контактный, вертикальный), и **искусственные** (парентеральный и энтеральный).

**Факторы передачи** – это элементы внешней среды, обеспечивающие передачу или способствующие передаче возбудителей инфекционных болезней от больного человека здоровому (вода, пищевые продукты, воздух, почва, бытовые предметы и др.).

**Путь передачи** – это последовательность переноса возбудителя от источника инфекции в восприимчивый организм с помощью конкретных элементов внешней среды (факторов передачи).

**Фекально-оральный механизм** реализуется следующими путями передачи (рисунок 14.5):

- пищевой (алиментарный) путь (фактор передачи – инфицированная пища);
- водный путь (фактор передачи – загрязненная вода);
- контактно-бытовой путь (фактор передачи – предметы быта, загрязненные испражнениями больного).

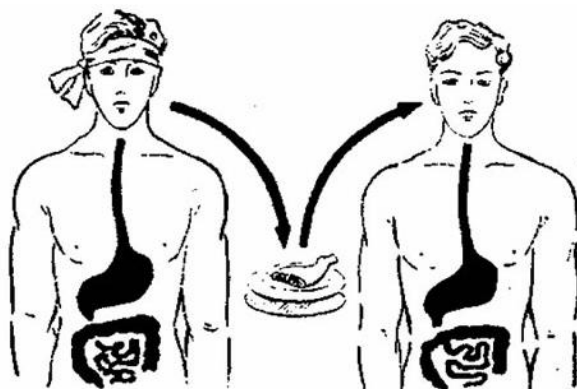


Рисунок 14.5 – Фекально-оральный механизм передачи инфекции.

**Аэрогенный механизм** реализуется следующими путями (рисунок 14.6):

- воздушно-капельный путь (например, при менингококковой инфекции, время существования аэрозоля – минуты);
- воздушно-пылевой путь (например, при туберкулезе, время существования аэрозоля – более суток).

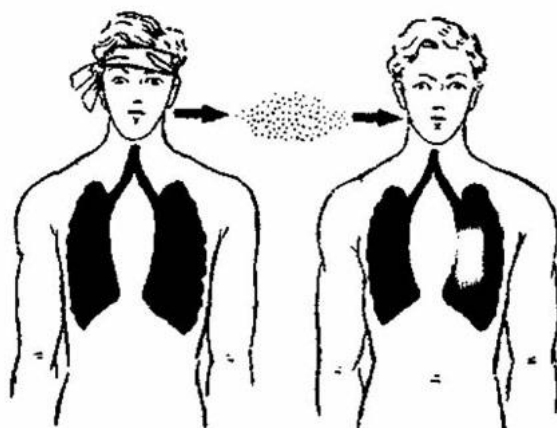


Рисунок 14.6 – Аэрогенный механизм передачи инфекции.

**Трансмиссивный механизм** реализуется через укусы насекомых – переносчиков (рисунок 14.7).

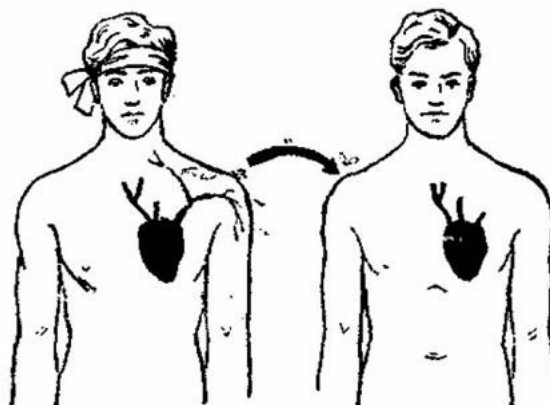


Рисунок 14.7 – Трансмиссивный механизм передачи инфекции.

**Парентеральный механизм** реализуется следующими путями (рисунок 14.8):

- гемотрансфузионный путь;
- инъекционный путь;
- инфузионный путь.



Рисунок 14.8 – Пути парентерального механизма передачи инфекции.

**Контактный механизм** (рисунок 14.9) реализуется следующими путями:

- прямой контакт (непосредственный контакт) характерен для заболеваний, передающихся половым путем (гонорея, сифилис), а также для некоторых грибковых заболеваний (микроспория, трихофития);
- не прямой контакт (инфицирование происходит опосредованно через предметы и вещи больного, например, при некоторых микозах).



Рисунок 14.9 – Контактный механизм заражения трихофитией.

**Вертикальная передача** возбудителя инфекции (рисунок 14.10) возможна



трансплацентарным путем (во время внутриутробного развития). Заражение может происходить и во время родов (при прохождении инфицированных родовых путей). В таком случае представляется целесообразным относить этот способ заражения к контактному механизму.



Рисунок 14.10 – Вертикальная передача инфекции.

В последние годы выделяют **артифициальный** (рукотворный, искусственный) механизм передачи возбудителя инфекции (при инструментальном обследовании, оперативных вмешательствах, ингаляциях, инъекциях и др.). При артифициальном механизме возможно заражение ингаляционным, парентеральным, энтеральным и контактными путями.

Тот анатомический отдел или ткань, через которые происходит внедрение в организм микробов, получили название **входные ворота инфекции**. Одни микробы вызывают инфекционное заболевание только при внедрении через строго определенные входные ворота (например, возбудители дизентерии, гонореи). Другие возбудители вызывают заболевание при внедрении через любые органы и ткани (например, возбудители чумы, сибирской язвы).

**Входными воротами** инфекции могут служить различные органы и ткани (рисунок 14.11).

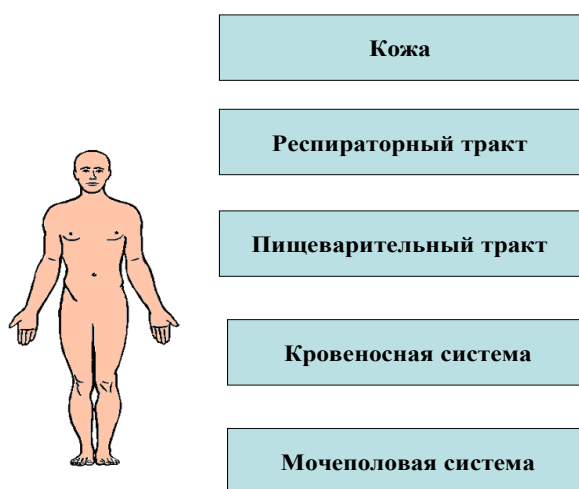


Рисунок 14.11 – Входные ворота инфекции.

1. **Кожа.** Стафилококки и некоторые грибы могут проникать в волосяные фолликулы и вызывать поражение кожи и глубоких тканей. Многие микроорганизмы находятся в поверхностных слоях кожи и при нарушении ее целостности легко вызывают инфекцию. Возбудители некоторых особо-опасных инфекций способны проникать в организм через неповрежденную кожу.

2. **Респираторный тракт.** Через слизистые оболочки респираторного тракта проникают в организм возбудители туберкулеза, гриппа, кори, краснухи и многих других инфекций.

3. **Пищеварительный тракт.** Через пищеварительный тракт проникают возбудители дизентерии, брюшного тифа, холеры, гепатита А и других инфекций.

4. **Кровеносная система** является входными воротами для возбудителей, передаваемых через укусы переносчиков, при переливаниях крови, при инъекциях и других манипуляциях.

5. **Мочеполовая система.** Слизистая полового тракта является входными воротами для возбудителей заболеваний, передающихся половым путем (гонорея, сифилис).

В зависимости от механизма передачи, входных ворот инфекции, локализации возбудителя в организме человека инфекционные болезни подразделяются на следующие группы:

- кишечные инфекции;
- инфекции дыхательных путей;
- кровяные инфекции;
- инфекции наружных покровов.

При **кишечных инфекциях** возбудитель проникает в организм перорально с загрязненной водой и пищей, локализуется в кишечнике и выделяется с фекалиями. К ним относятся брюшной тиф, дизентерия, холера, вирусный гепатит А и другие заболевания.

При **инфекциях дыхательных путей** возбудитель проникает в организм аэрогенно через слизистые оболочки органов дыхания, локализуется в основном в слизистой оболочке дыхательных путей и выделяется во внешнюю среду с ее секретами во время разговора, кашля, чихания. К этой группе инфекций относятся корь, краснуха, коклюш, грипп и другие заболевания.

При **кровяных (трансмиссивных) инфекциях** возбудитель попадает непосредственно в кровь (лимфу) от живых членистоногих переносчиков и локализуется в кровяном русле. К таким инфекциям относятся сыпной тиф, малярия, чума, эндемические риккетсиозы, геморрагические лихорадки и другие инфекции.

При **инфекциях кожных покровов** заражение происходит через кожу или слизистые оболочки при прямом контакте или опосредованно через белье, посуду и другие факторы передачи. При этих инфекциях возбудитель локализуется в коже или слизистых оболочках. К инфекциям кожных покровов относятся венерические болезни, рожа, другие заболевания.

Для предотвращения распространения инфекционных заболеваний среди населения применяют меры, направленные на все звенья инфекционного процесса:

- на источник инфекции;
- на пути и факторы передачи инфекции;
- на восприимчивый макроорганизм.

**Мероприятия в отношении источника инфекции** включают в себя своевременную диагностику заболеваний, регистрацию, изоляцию и этиотропное лечение больных, выявление и санацию носителей.

**Мероприятия в отношении путей и факторов передачи** включают комплекс санитарно-гигиенических мероприятий по благоустройству населенных пунктов (улучшение качества водоснабжения), карантинные мероприятия, санитарный надзор за объектами пищевой промышленности, соблюдение правил асептики, антисептики, дезинфекцию, дезинсекцию, дератизацию и другие меры.

**В отношении восприимчивого населения** проводится специфическая профилактика (вакцинация) с использованием вакцинных препаратов (живых вакцин, убитых вакцин, химических вакцин и анатоксинов), санитарная обработка, медицинское наблюдение, лабораторное обследование.

### 14.3. Роль микроорганизмов в развитии инфекционного процесса

#### 14.3.1. Патогенность и вирулентность микробов

Микробы, вызывающие инфекционные болезни, называются **возбудителями** заболеваний. Организм человека или животного, больного инфекционным заболеванием, называется **инфицированным**. Объекты или предметы внешней среды, на которых присутствуют возбудители инфекционных болезней, обозначаются **загрязненными** или **контаминированными**.

Отличительной чертой возбудителей инфекционных заболеваний является патогенность. **Патогенность** - это потенциальная способность микроорганизма вызывать развитие инфекционного заболевания.

В зависимости от выраженности патогенных свойств микроорганизмы подразделяются на 3 группы:

- **патогенные** микробы (безусловно-патогенные) – это микроорганизмы, способные проникать в организм хозяина, размножаться в нем и обязательно оказывать повреждающее действие, то есть вызывать заболевание у человека или животных;

- **условно-патогенные** микробы - это те свободно живущие микроорганизмы или постоянные обитатели организма хозяина, которые вызывают инфекционный процесс при определенных отягчающих условиях: при проникновении в организм в большом количестве, при попадании в нетипичные (эволюционно не обусловленные) места локализации (необычные входные ворота) или при существенном снижении общей резистентности макроорганизма;

- **непатогенные (сапрофитные)** микробы – это те микроорганизмы, которые принадлежат к постоянным обитателям организма человека или не вызывают заболеваний при проникновении в макроорганизм из внешней среды. Непатогенные микроорганизмы могут вызвать заболевание у человека либо в случае существенного угнетения защитных механизмов макроорганизма, либо в случае приобретения генов, детерминирующих факторы патогенности бактерий (например, плазмид патогенности).

Как представители разных видов, так и отдельные штаммы микроорганизмов внутри вида могут значительно различаться по степени патогенности. Степень патогенности (или мера патогенности) называется **вирулентностью**. Вирулентность индивидуальна для каждого штамма.

Вирулентность бактерий определяют в опытах на лабораторных животных и выражают следующими единицами:

- DLm (Dosis letalis minima) - минимальная летальная доза - минимальное количество возбудителя, вызывающее гибель 95% взятых в опыт лабораторных животных;

- DCL (dosis certae letalis) - абсолютно летальная доза - минимальное количество возбудителя, вызывающее гибель 100% взятых в опыт лабораторных животных;

- LD<sub>50</sub> - минимальное количество возбудителя, вызывающее гибель 50% взятых в опыт лабораторных животных.

### 14.3.2. Факторы патогенности микробов

Для проявления своих патогенных свойств микробы обладают специфическими факторами, которые называются **факторами патогенности**.

По функциональному назначению факторы патогенности бактерий подразделяются на следующие группы (патогенетические факторы):

- **факторы адгезии и колонизации** (способность бактерий прикрепляться к клеткам макроорганизма, размножаться и заселять поверхность тканей);

- **факторы инвазии** (способность преодолевать защитные барьеры и распространяться внутри клеток или вглубь тканей макроорганизма);

- **антифагоцитарные факторы** (способность препятствовать фагоцитозу);

- **токсические факторы** (способность продуцировать, накапливать и выделять различные токсины).

Факторы патогенности бактерий можно распределить также на группы **в зависимости от локализации** в микробной клетке (рисунок 14.12):

- **структурные компоненты клетки** (пили, капсула, пептидогликан клеточной стенки, белки наружной мембраны, липополисахарид клеточной стенки грамотрицательных бактерий);

- **секретируемые компоненты** (ферменты агрессии, токсины, бактериоцины, секретируемые факторы персистенции).

Структурные факторы могут выполнять функцию адгезии (например, пили) или антифагоцитарную функцию (например, капсула). Секретируемые факторы могут выполнять функцию инвазии (например, ферменты агрессии гиалуронидаза, коллагеназа) или токсическую функцию (например, экзотоксины).

**Адгезия бактерий** (лат. *adhaesio* - прилипание) обеспечивается специфическими образованиями или химическими веществами на поверхности микробной клетки – **адгезинами**.

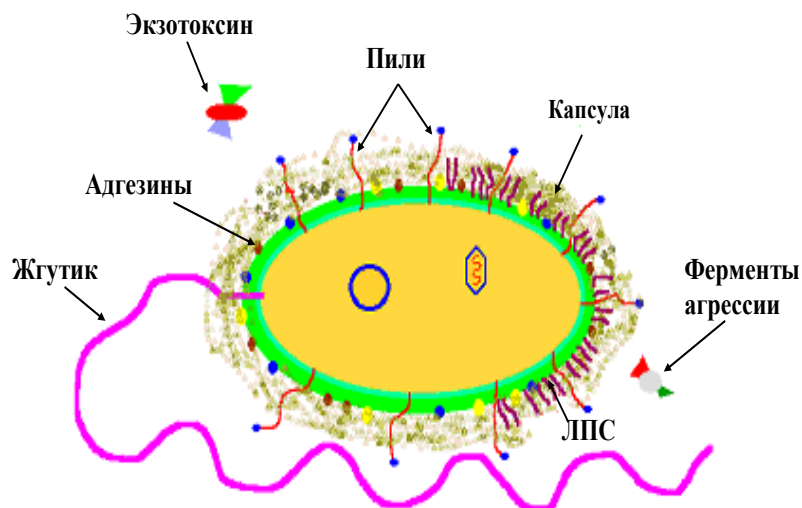


Рисунок 14.12 – Структурные и секретируемые факторы патогенности микроорганизмов.

К адгезинам бактерий относятся:

- пили (фимбрии), содержащие адгезивные белки (интимины);
- тейхоевые и липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий;
- капсула и капсуло-подобные субстанции;
- белки наружной мембраны (филаментозный гемагглютинин у возбудителя коклюша, М-протеин стрептококков группы А и др.).

По структуре адгезины бактерий могут быть фимбриальными (например, пили кишечной палочки, М-белок стрептококков) и афимбриальными (например, филаментозный гемагглютинин коклюшного микроба). В частности, основная роль в адгезии кишечной палочки к эпителиальным клеткам принадлежит пиям или фимбриям (рисунок 14.13).



Рисунок 14.13 – Жгутики (орган движения) и пили (адгезины) *Escherichia coli*.

У *Bordetella pertussis* основную функцию адгезии выполняет как фимбриальные агглютиногены, так и филаментозный гемагглютинин (рисунок 13.14).

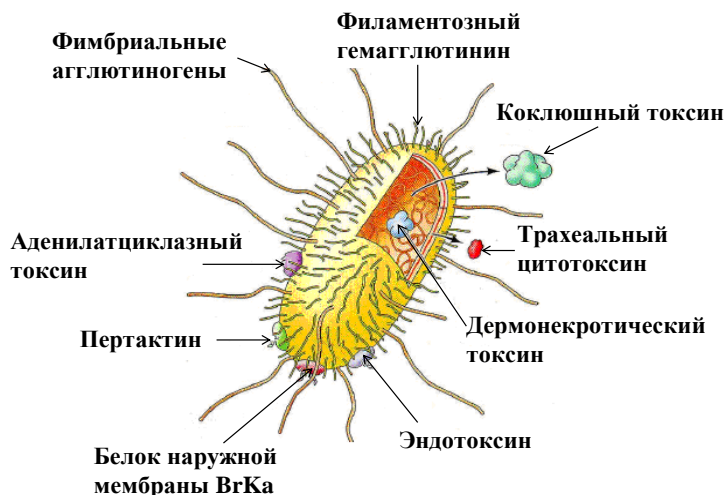


Рисунок 14.14 – Факторы патогенности *B. pertussis*.

Зачастую адгезия является сигналом к синтезу бактериальных белков, выполняющих функцию инвазии. Их транспорт внутрь эукариотической клетки осуществляет специальная система секреции III типа. Эти белки вызывают полимеризацию актина внутри эукариотических клеток, в результате чего формируются псевдоподии, охватывающие микробную клетку и поглощающие ее. Таким способом бактерия “заставляет” эукариотическую клетку поглотить себя.

Адгезия осуществляется при условии наличия на клетке хозяина специализированных **рецепторов**, к которым прикрепляются бактерии. Такими рецепторами могут быть гликолипиды, маннозные остатки, протеингликаны, фибронектин, белки межклеточного матрикса. Инвазивные энтеробактерии в качестве рецепторов используют **интегрины** эукариотических клеток. Листерии в качестве рецепторов используют **кадхерин**. Процесс адгезии схематически представлен на рисунке 14.15.

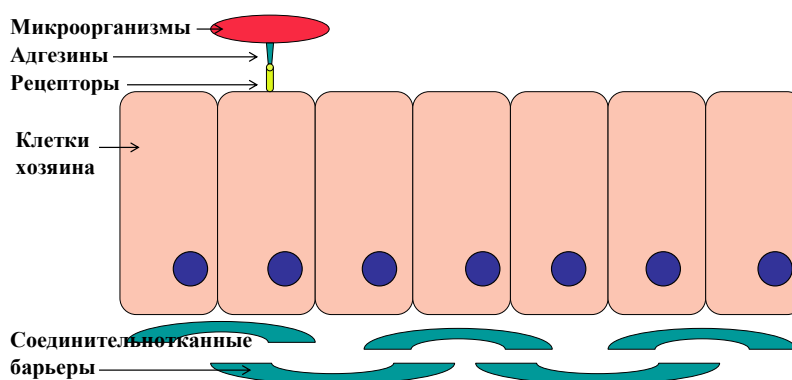


Рисунок 14.15 - Схема адгезии бактерий на эукариотических клетках.

Полноценная адгезия бактерий осуществляется именно на тех клетках, на которых имеются соответствующие рецепторы. Со специфичностью адгезии связан микробный **тропизм** – способность микробов поражать определенные органы и ткани (эпителиальные, нервную и др.).

**Колонизация** – это расселение микроорганизмов в определенном биотопе хозяина. Колонизации способствуют бактериальные протеазы (блокируют защитную функцию секреторного IgA), бактериоцины, антиоксиданты, сидерофоры. Схематически процесс колонизации представлен на рисунке 14.16.

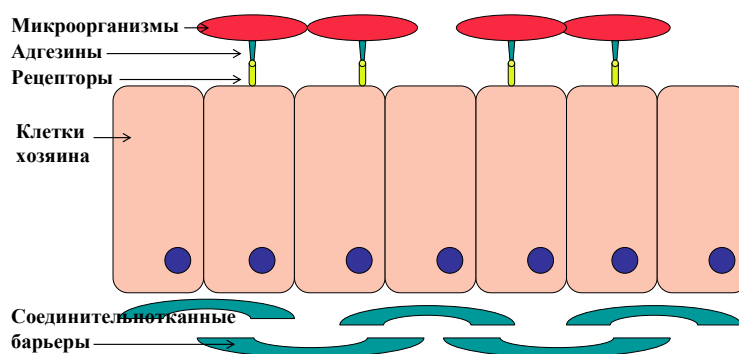


Рисунок 14.16 - Схематическое изображение процесса колонизации микробами тканей хозяина.

**Инвазия** – это процесс распространения возбудителя в тканях организма через соединительнотканное межклеточное пространство и пенетрация микробов внутрь клеток хозяина. К факторам инвазии относятся:

- инвазины;
- некоторые ферменты агрессии.

Процесс инвазии схематически представлен на рисунке 14.17.

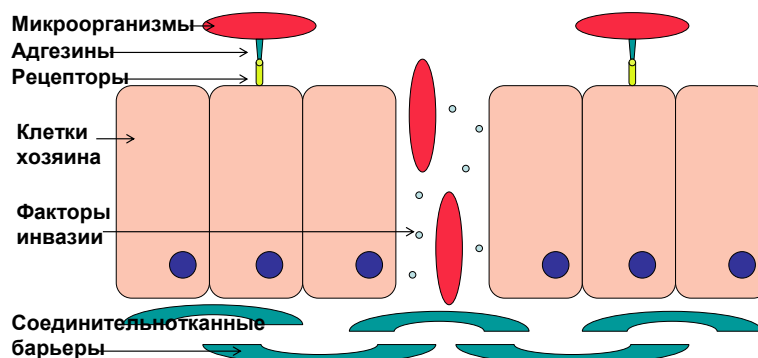


Рисунок 14.17 - Схематическое изображение процесса инвазии микробов в тканях организма.

**Инвазины** - это специализированные белки, которые синтезируются после адгезии и проникают внутрь эукариотической клетки с помощью специальной системы секреции (система секреции III типа). Инвазины, проникшие внутрь эукариотической клетки, “заставляют” ее поглотить микроб. Например, у листерий и йерсиний действует **Zipper mechanism** - механизм по типу “застежки – молнии”, то есть постепенный захват возбудителя цитоплазматической мембраной эукариотической клетки. У шигелл и сальмонелл действует **Trigger mechanism** –

так называемый спусковой механизм, при котором внутрь эукариотической клетки инъецируются белки – эффекторы, изменяющие цитоскелет клетки хозяина. Эти механизмы инвазии бактерий представлены на рисунке 14.18.

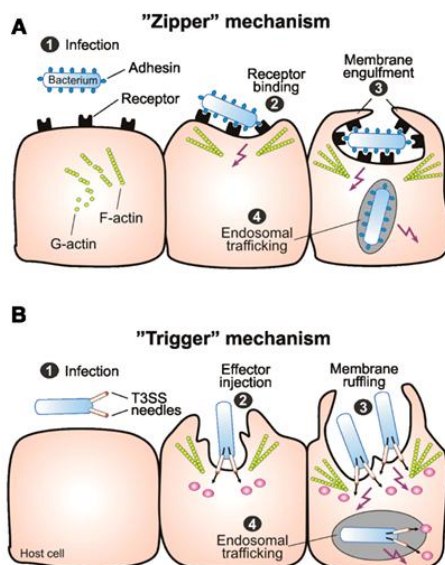


Рисунок 14.18 – Механизмы инвазии бактерий через клетку хозяина.

На рисунке 14.19 представлена электронная микрофотография процесса окружения *Shigella flexneri* цитоплазматическими выростами эукариотической клетки по типу ряби (Trigger mechanism).

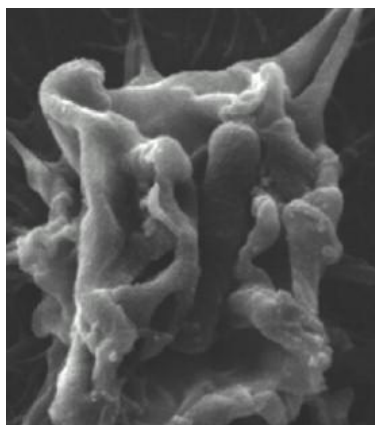


Рисунок 14.19 – Поглощение шигелл эукариотическими клетками.

Инвазии через межклеточные пространства способствуют некоторые **ферменты агрессии**. К ферментам агрессии бактерий относятся гиалуронидаза, коагулаза, фибринолизин, лецитиназа, коллагеназа, нейраминидаза и др.

**Гиалуронидаза** - фермент, расщепляющий гиалуроновую кислоту соединительной ткани (преодоление барьера).

**Коагулаза** - фермент, вызывающий свертывание (коагуляцию) белка (образование сгустка, фибринозной пленки).

**Фибринолизин** - фермент, лизирующий (растворяющий) фибриновый сгусток.



На рисунке 14.20 представлен результат действия коагулазы и фибринолизина на плазму крови.

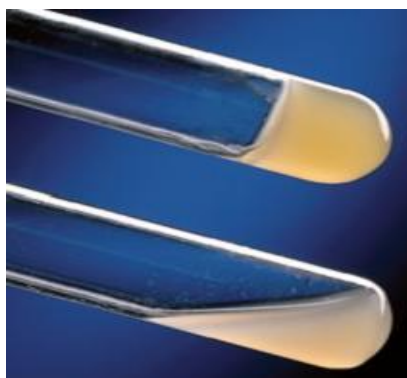


Рисунок 14.20 – Свертывание плазмы крови под действием коагулазы (верхняя пробирка) и растворение сгустка под действием фибринолизина (нижняя пробирка).

**Лецитиназа** (лецитовителлаза) - фермент, расщепляющий лецитин, входящий в состав клеточных мембран. Лецитиназу можно выявить на желточном агаре по формированию радужного венчика вокруг колоний (рисунок 14.21).



Рисунок 14.21 – Выявление лецитиназы на желточном агаре.

**Коллагеназа** - фермент, разрушающий коллаген мышечных волокон.

**Нейраминидаза** - фермент, расщепляющий сиаловую (нейраминовую) кислоту, входящую в состав поверхностных рецепторов клетки.

**Муциназа** - фермент, разрушающий муцин (слизь).

**Протеазы (эластаза, желатиназа)** – ферменты, разрушающие белки. Среди протеаз следует выделить IgA-протеазы, которые осуществляют гидролиз секреторных иммуноглобулинов, обеспечивающих защиту слизистых оболочек. К IgA-протеазам относятся сериновые протеазы *Neisseria meningitidis* и *Haemophilus spp.*, а также цинк-протеаза *Streptococcus spp.*

Доставка факторов патогенности на поверхность бактериальной клетки и внутрь эукариотической клетки осуществляется с помощью специализированных систем секреции нескольких типов. В настоящее время у бактерий описано 7 систем секреции. В проявлении патогенных свойств бактерий наибольшее значение имеют системы секреции I и III типов. Например, **система секреции I типа** осуществляет транспортировку факторов патогенности (альфа-гемолизина кишечной палочки,

внутриклеточной аденилатциклазы возбудителя коклюша, протеазы синегнойной палочки) с помощью 3-4 вспомогательных молекул, участвующих в образовании трансмембранного канала. **Система секреции III типа** осуществляет транслокацию эффекторов в цитозоль эукариотической клетки, обуславливая реорганизацию цитоскелета клетки. Присутствует у сальмонелл, шигелл и других патогенов. Описание систем секреции бактерий представлено в разделе 8.

Ферменты патогенности способствуют распространению бактерий в тканях. Например, бактерия, синтезирующая гиалуронидазу, легко проникает по межклеточным пространствам, достигая коллагеновых волокон. Расщепление коллагеновых волокон коллагеназой способствует проникновению возбудителя в глубже расположенные ткани (рисунок 14.22).

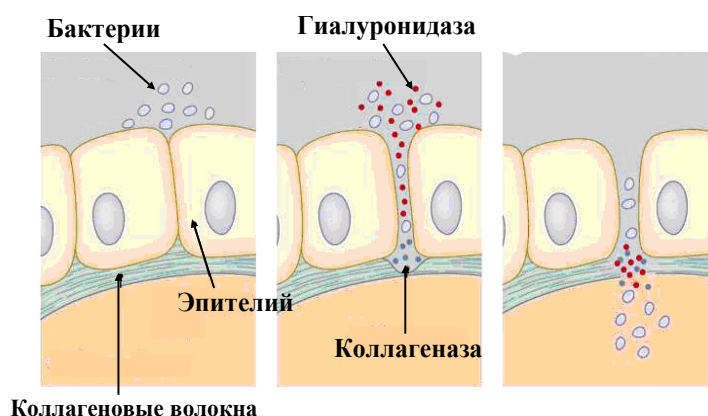


Рисунок 14.22 – Действие гиалуронидазы и коллагеназы.

К числу **антифагоцитарных факторов** патогенности бактерий относятся капсула, капсулоподобные структуры, М-протеин стрептококков, А-протеин стафилококков, корд-фактор микобактерий. Эти факторы действуют как на стадии узнавания и поглощения патогена, так и после поглощения микроба.

На стадии узнавания и поглощения патогена в качестве антифагоцитарных факторов действуют капсула, М-протеин стрептококков, К-антиген грамотрицательных бактерий, А-протеин и плазмакоагулаза стафилококков. Под действием плазмакоагулазы стафилококков вокруг клеток образуется фибриновый чехол, препятствующий распознаванию бактерий фагоцитами.

**Капсула** является важным фактором вирулентности, при ее наличии возбудитель вызывает более тяжелое течение инфекционного заболевания. Капсула предохраняет бактерии от фагоцитоза и от действия секреторных антител. Капсула состоит из полисахаридов (у пневмококков) или из белков (у возбудителя сибирской язвы). Электронная микрофотография пневмококковой капсулы представлена на рисунке 14.23.

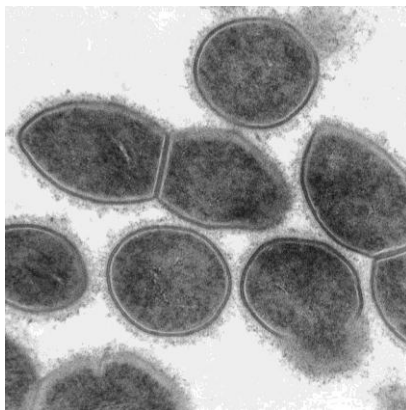


Рисунок 14.23 – Электронная микрофотография капсулы *Streptococcus pneumoniae*.

Корд-фактор микобактерий выступает в качестве антифагоцитарного фактора после поглощения микроба фагоцитом, он препятствует слиянию фагосомы с лизосомой. В результате этого лизосомальные ферменты не оказывают действия на фагоцитированную микробную клетку. Микобактерии внутри фагосомы продолжают размножаться, то есть отмечается незавершенный фагоцитоз (рисунок 14.24).

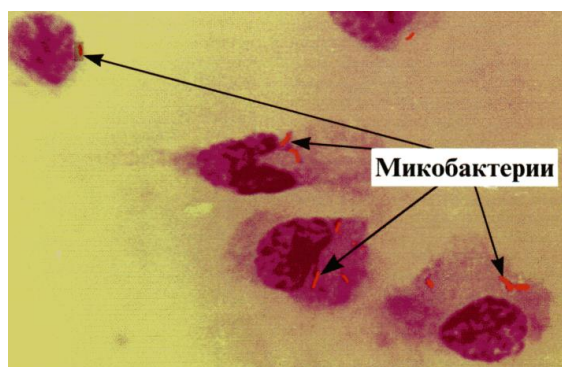


Рисунок 14. 24 - Незавершенный фагоцитоз микобактерий.

Патогенные бактерии продуцируют и выделяют различные токсины. У одних бактерий токсины в процессе синтеза постоянно выделяются во внешнюю среду без разрушения микробных клеток. Такие токсины называются **экзотоксинами**. У других бактерий токсины связаны с микробной клеткой и выделяются во внешнюю среду только после разрушения бактерий. Такие токсины называются **эндотоксинами**.

#### **Основные свойства экзотоксинов:**

1. Экзотоксины синтезируются и выделяются в окружающую среду живыми клетками как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий: возбудителем дифтерии, столбняка, ботулизма, сибирской язвы, холеры и других бактерий. Гены, ответственные за синтез экзотоксина, локализуются в плазмидах или профагах, но не в бактериальной хромосоме. Поэтому утрата профага или плазмиды делает клетку нетоксигенной.

2. По химической природе экзотоксины - полипептиды.

3. Экзотоксины термолабильны. Быстро разрушаются при 60°C.

4. Экзотоксины высоко токсичны - вызывают гибель лабораторных животных при введении нескольких микрограммов. Так, в 1 мл ботулинического токсина содержится 1.000000 DLm для морской свинки.

5. Экзотоксины не вызывают лихорадку в организме хозяина.

6. Действие экзотоксинов высоко специфично, то есть для каждого токсина характерно поражение определенных структур (мишеней), и картина болезни связана с их поражением. Например, экзотоксины ответственны за развитие симптомов дифтерии (возбудитель *Corynebacterium diphtheriae*), столбняка (*Clostridium tetani*), ботулизма (*Clostridium botulinum*), газовой гангрены.

7. Экзотоксины высоко иммуногенны, то есть являются сильными антигенами и стимулируют образование антител к токсину (антитоксина), которые нейтрализуют токсин.

8. При обработке 0,3-0,4% раствором формалина при температуре 38-50°C в течение 3-4 недель экзотоксины теряют ядовитые свойства, но сохраняют антигенную структуру и иммуногенность, то есть превращаются в **анатоксины** или **токсоиды**. При введении анатоксина в организм вырабатываются антитела (**антитоксины**), защищающие от действия токсина. Поэтому анатоксины используются в качестве вакцинных препаратов для активной профилактики таких заболеваний как дифтерия, столбняк, холера.

Продуцентами экзотоксинов являются как грамположительные бактерии (возбудители дифтерии, ботулизма, столбняка, газовой гангрены, некоторые виды стафилококков и стрептококков), так и грамотрицательные бактерии (холерный вибрион, некоторые виды псевдомонад, шигеллы).

По механизму действия экзотоксины подразделяются на 4 типа.

**Первый тип** – цитотоксины. Блокируют синтез белка на субклеточном уровне (дифтерийный токсин, токсин синегнойной палочки, энтеротоксины золотистого стафилококка и др.).

**Второй тип** – мембранотоксины. Повышают проницаемость клеточных мембран (гемолизины, лейкоцидины).

**Третий тип** – “функциональные блокаторы”. Активируют или инактивируют клеточную аденилатциклазу (холероген, энтеротоксины кишечной палочки, сибиреязвенный токсин и др.).

**Четвертый тип** – эксфолиатины и эритрогенины. Влияют на процесс взаимодействия клеток между собой (токсины золотистого стафилококка и скарлатинозного стрептококка).

#### **Основные свойства эндотоксинов:**

1. Эндотоксины являются компонентами клеточной стенки грамотрицательных бактерий (ЛПС) и высвобождаются при их разрушении.

2. По химической природе эндотоксины являются липополисахаридами.

3. Эндотоксины термостабильны. Выдерживают кипячение.

4. Эндотоксины являются слабыми антигенами и не стимулируют образование антитоксина.

5. Эндотоксины обладают пирогенностью, то есть способны вызывать в организме хозяина лихорадку и стимулировать процессы воспаления.

6. Эндотоксины обладают низкой специфичностью.

7. Эндотоксины слаботоксичны. Однако большие количества эндотоксина

могут стать причиной необратимого шока, наблюдаемого при бактериемии, вызванной грамотрицательными микроорганизмами.

8. Эндотоксины не переходят в анатоксин.

**Факторы персистенции** патогенов способствуют длительному переживанию микробов в инфицированном организме. Защита бактерий от антимикробных факторов макроорганизма осуществляется с помощью следующих способов:

- экранирование клеточной стенки бактерий;
- продуцирование секретируемых факторов, инактивирующих защиту хозяина;
- антигенная мимикрия;
- образование форм с отсутствием клеточной стенки бактерий.

## 14.4. Роль макроорганизма в развитии инфекционного процесса

### 14.4.1. Врожденные факторы защиты организма от инфекции

В процессе эволюции у человека сформировались механизмы, препятствующие проникновению в организм микробов и других чужеродных веществ и защищающие его от развития заболеваний.

Эти защитные факторы условно подразделяются на 2 группы:

- **врожденные факторы (конститутивные факторы, факторы естественной резистентности, неспецифические факторы)**, которые существуют и действуют в организме изначально и постоянно;
- **специфические (индуцибельные, иммунные) факторы**, которые функционируют только после воздействия на организм антигена.

В свою очередь, врожденные факторы защитной системы организма можно разделить на несколько групп:

1. Анатомо-физиологические барьеры.
2. Клеточные элементы защитной системы.
3. Гуморальные факторы.
4. Воспаление.
5. Фагоцитоз.
6. Нормальная микрофлора организма.
7. Защитно-адаптационные механизмы.

К анатомо-физиологическим барьерам организма (рисунок 14.25) относятся:

- **внешние барьеры** (кожа и слизистые оболочки);
- **внутренние барьеры** (система лимфатических сосудов и лимфатических узлов).



Рисунок 14.25 – Анатомо-физиологические защитные барьеры организма.

Кожа взрослого человека имеет в среднем площадь 1,72 м<sup>2</sup>, ее масса составляет около 5 кг. Кожа состоит из эпидермиса, дермы (собственно кожи) и подкожно-жировой клетчатки (гиподермы). Строение кожи представлено на рисунке 14.26.

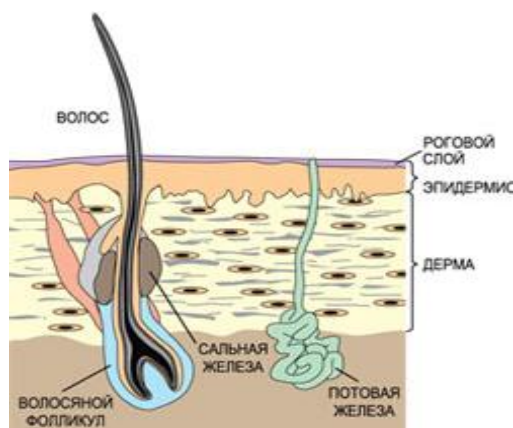


Рисунок 14.26 – Строение кожи.

**Эпидермис** включает 5 слоев эпидермальных клеток (базальный, шиповатый, зернистый, блестящий и роговой). **Дерма** состоит из 2 слоев (сосочкового и сетчатого). **Подкожно-жировая клетчатка** состоит из пучков соединительной ткани и жировых скоплений. Кроме этих составных частей имеются производные элементы (**придатки**) кожи (ногти, волосы, сальные и потовые железы).

Кожа выполняет следующие основные **функции**:

- механическая (барьерная) функция – защита организма от действия механических и химических факторов, ультрафиолетового излучения, проникновения микробов;

- иммунная функция – захват и транспорт антигенов с последующим развитием иммунных реакций;

- участие в водно-солевом обмене – потоотделение;

- экскреторная функция – выведение продуктов обмена, солей и лекарств.

**Механическая барьерная функция кожи** обеспечивается эпидермисом.

**Химическая барьерная функция кожи** обеспечивается потовыми и сальными железами. В среднем за сутки при комнатной температуре человек выделяет 400-600 мл пота, в жаркую погоду или при физической нагрузке – до 12 л пота в сутки. В состав пота входят сернокислые соединения, фосфаты, хлористый калий, соли кальция, натрия, продукты белкового обмена (мочевина, молочная кислота, некоторые аминокислоты), летучие жирные кислоты. Пот имеет рН 3,8-6,2. Кислая реакция пота способствует бактерицидности кожи. Степень бактерицидности кожи является объективным показателем состояния общей резистентности организма.

Сальные железы за сутки выделяют около 20 г кожного сала. Оно состоит из смеси липидов, усиливает барьерные и антимикробные свойства кожи.

В органах дыхания защитную функцию выполняют **мерцательный эпителий, клетки и секрет слизистой оболочки** (рисунок 14.27).

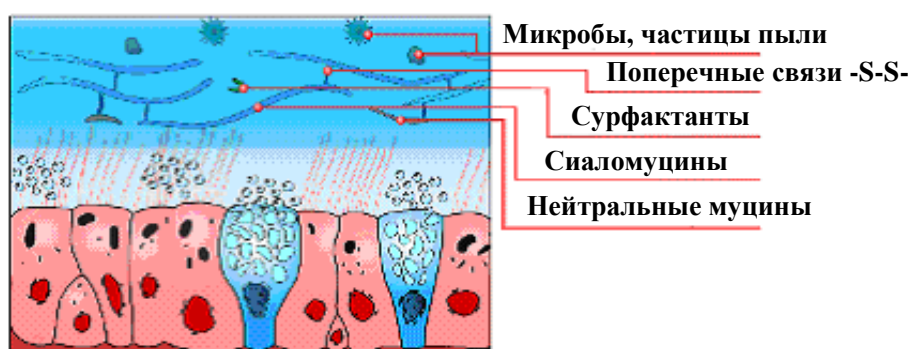


Рисунок 14.27 – Слизистая оболочка дыхательных путей.

**Мерцательный эпителий** (мукоцилиарный аппарат) производит механическую очистку бронхиального дерева, то есть удаляет во внешнюю среду попавшие с воздухом чужеродные вещества, в том числе микроорганизмы, особенно при разговоре, кашле, чихании. Основная роль в удалении чужеродных веществ из верхних дыхательных путей принадлежит именно реснитчатому эпителию (рисунок 14.28).

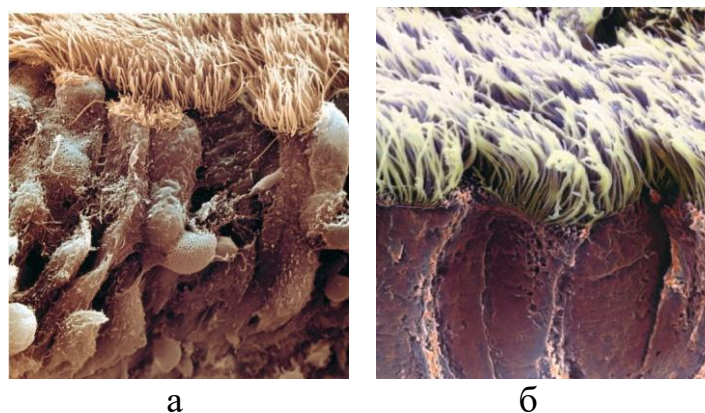


Рисунок 14.28 – Эпителий носовой полости (а) и бронхов (б).

**Клетки** дыхательных путей выполняют механическую и ферментативную функции. К ним относятся альвеолоциты, альвеолярные макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки.

**Секрет слизистой оболочки** дыхательных путей содержит секреторный иммуноглобулин А, лизоцим, интерферон, комплемент и другие биологически активные соединения.

Концевой частью дыхательного аппарата является альвеола. **Альвеола** имеет форму пузырька, открытого в просвет альвеолярного хода (рисунок 14.29).

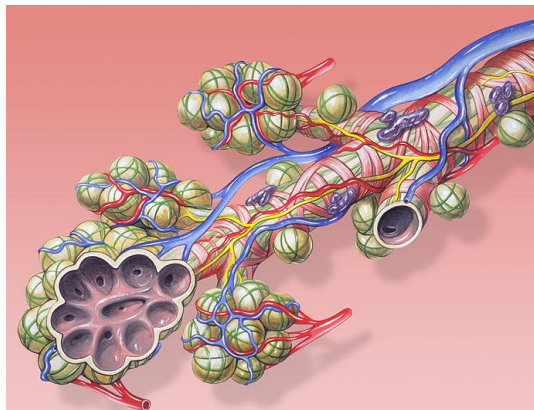


Рисунок 14.29 – Строение альвеол.

Через стенки альвеол происходит газообмен. Стенки легочных альвеол выстилают эпителиальные клетки - **альвеоциты** (альвеолоциты). Альвеолярный эпителий представлен клетками 3 типов. **Клетки I типа** (плоские или респирационные) являются компонентами аэрогематического барьера, через который осуществляется газообмен. **Клетки II типа** (большие или гранулярные) выступают в просвет альвеол, имеют на поверхности микроворсинки, содержат пластинчатые тельца, окруженные мембраной. Пластинчатые тельца выделяются из альвеоцитов и образуют на поверхности альвеолярного эпителия пленку **сурфактанта**. **Клетки III типа** (щеточные) осуществляют всасывание жидкости и концентрирование сурфактанта.

Легочный сурфактант выстилает альвеолы изнутри и представляет собой поверхностно-активное вещество, состоящее из фосфолипидов (85%), белков (10%) и полисахаридов (5%). Сурфактант способствует расправлению альвеол и препятствует слипанию их стенок, обладает бактерицидной и иммуномодулирующей способностью, стимулирует активность альвеолярных макрофагов.

Лёгочный сурфактант по своей структуре напоминает клеточные мембраны. Он может перемещаться, дрейфовать до бронхиол, вынося из альвеол обломки разрушенных клеток. Сурфактант предотвращает непосредственный контакт пневмоцитов с вредными частицами и инфекционными агентами. Обволакиваемые сурфактантом пылевые частицы транспортируются из альвеол в бронхи, из которых они удаляются со слизью. Бактерии, проникающие в альвеолы, опсонизируются сурфактантом (сурфактант адсорбируется на поверхности бактерий), что облегчает их фагоцитоз альвеолярными макрофагами.

Место и значение сурфактанта в аэрогематическом барьере легкого представлены на рисунке 14.30.



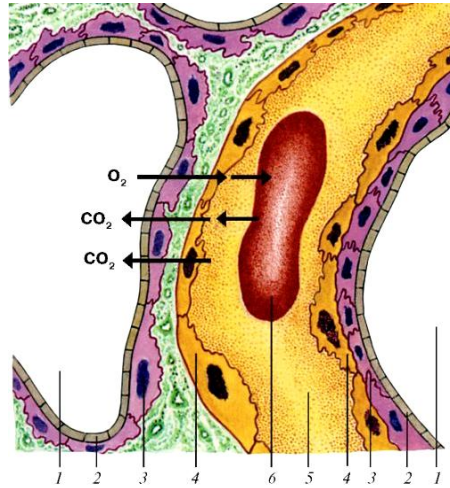


Рисунок 14.30 – Аэрогематический барьер в легком: 1 – просвет альвеол; 2 – сурфактант; 3 – альвеолоцит; 4 – эндотелиоцит; 5 – просвет капилляра; 6 – эритроцит в просвете капилляра.

Разные отделы желудочно-кишечного тракта выполняют разные защитные функции. В желудке специализированные клетки секретируют соляную кислоту. В результате этого проникшие перорально бактерии и вирусы инактивируются в желудке под влиянием ферментов и кислого содержимого (рН 1,5-2,5).

Слизистая оболочка кишечника (рисунок 14.31) состоит из круговых складок, ворсинок и микроворсинок, увеличивающих всасывающую поверхность кишечника.

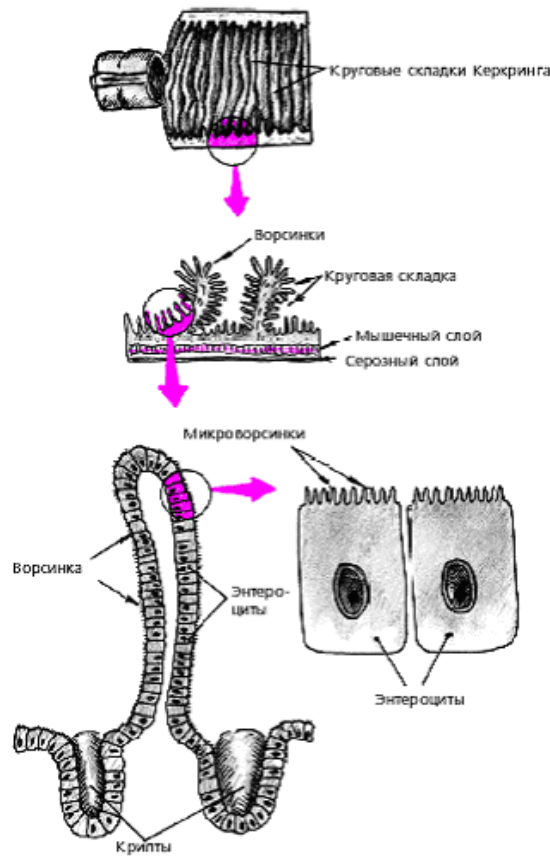


Рисунок 14.31 – Особенности строения слизистой оболочки тонкого кишечника.

Вместе с тем, в **кишечнике** в отношении проникших патогенов инактивирующими факторами служат ферменты и бактериоцины, образуемые нормальной микрофлорой кишечника, а также трипсин, панкреатин, липаза, амилазы и желчь, поступающие из других отделов желудочно-кишечного тракта.

**Лимфатическая система организма** (рисунок 14.32) представлена лимфатическими сосудами, лимфатическими узлами и лимфоидной тканью, ассоциированной с кожей (skin-associated lymphoid tissue, **SALT**) и слизистыми оболочками (mucosus-associated lymphoid tissue, **MALT**). В свою очередь, лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками, подразделяется на следующие группы:

- лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой дыхательных путей (**BALT**, bronchus-associated lymphoid tissue);
- лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой пищеварительного канала (**GALT**, gut-associated lymphoid tissue);
- лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой урогенитального тракта женщин (**VALT**, vulvovaginal-associated lymphoid tissue);
- лимфоидная ткань, ассоциированная с носоглоткой (**NALT**, nose-associated lymphoid tissue).

Лимфатические сосуды

Лимфатические узлы

Лимфоидная ткань, ассоциированная с кожей и слизистыми оболочками (**MALT**):

- с кожей (**SALT**);
- со слизистой дыхательных путей (**BALT**);
- со слизистой пищеварительного канала (**GALT**);
- со слизистой урогенитального тракта (**VALT**);
- со слизистой носоглотки (**NALT**).

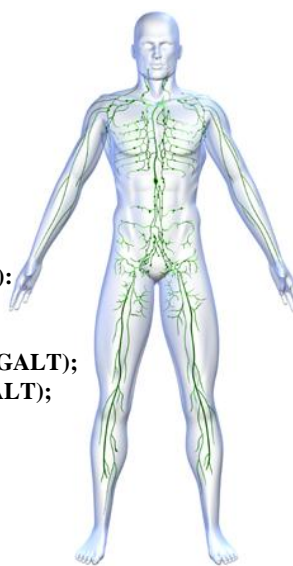


Рисунок 14.32 – Лимфатическая система организма человека.

В состав лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей (**SALT**), входят кератиноциты, белые отростчатые эпидермоциты (БОЭ или клетки Лангерганса), эпидермотропные Т-клетки.

В состав лимфоидной ткани, ассоциированной с пищеварительным трактом (**GALT**), входят М-клетки, пейеровы бляшки и солитарные фолликулы. В составе лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками респираторного и мочеполового тракта (**BALT** и **VALT**), также имеются специализированные подопные клетки.

Микробы и другие чужеродные частицы, проникшие в ткани, фагоцитируются в месте внедрения и доставляются фагоцитами в лимфатические узлы, где развивается процесс переваривания патогена, направленный на уничтожение

возбудителя.

**М-клетки** (*microfold* – микрозагонщики) слизистых оболочек располагаются среди эпителиальных клеток. Они способны эндоцитировать из слизи кишечника, дыхательных путей или мочеполового тракта чужеродные вещества и переносить их в подслизистые слои. Они утратили характерную цилиндрическую форму, содержат большое количество цитоплазматических вакуолей и имеют микроскладки (рисунок 14.33).

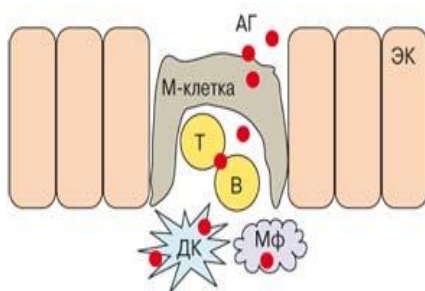


Рисунок 14.33 – Механизм действия М-клеток (АГ – антиген, ЭК – эпителиальная клетка, Т - Т-лимфоцит, В – В- лимфоцит, ДК- дендритная клетка, МФ – макрофаг).

М-клетки поглощают тот антиген, который связывается в просвете кишки с секреторным IgA. В свою очередь, секреторный IgA в виде димера продуцируется плазматическими клетками в подэпителиальной соединительной ткани и транспортируется в просвет кишки энтероцитами крипт.

**Клеточные элементы защитной системы** объединяют гранулоцитарные клетки (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, тучные клетки), моноцитарно-макрофагальные клетки (моноциты и макрофаги), естественные киллеры (рисунок 14.34).

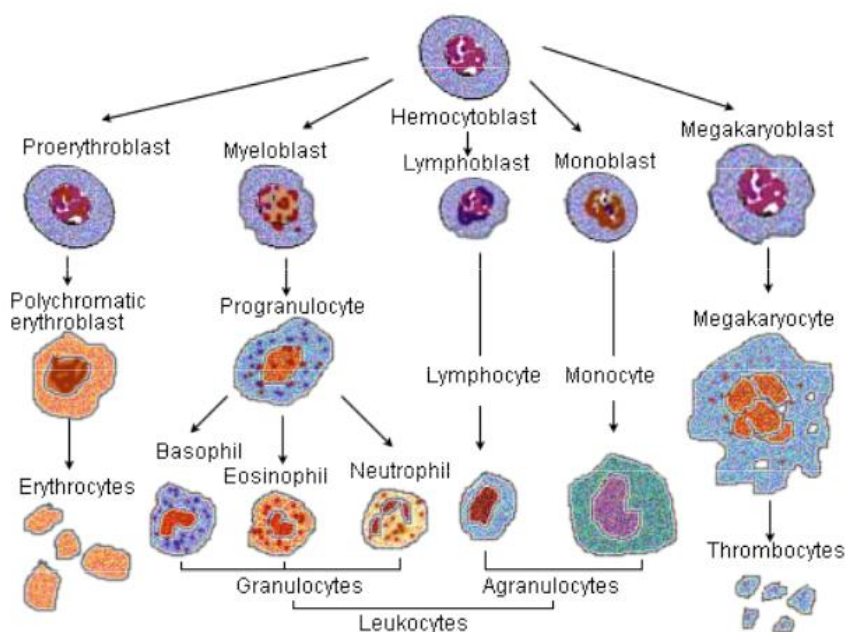


Рисунок 14.34 – Клеточные элементы защитной системы организма.

**Гранулоцитарные клетки** имеют гранулы с большим количеством гидролитических ферментов, способных расщеплять микроорганизмы и продукты деградации клеток. Все они короткоживущие, постоянно пополняются за счет развития в костном мозге. К гранулоцитарным клеткам относятся нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки.

**Нейтрофилы** – самые распространенные клетки крови, подвижные, первыми появляются в очаге воспаления, фагоцитируют и переваривают бактерии. Они участвуют в неспецифических иммунных реакциях.

**Эозинофилы** – крупные клетки, содержащие большие гранулы, в которых имеются полипептиды с высоким количеством аргинина. Они обладают высокой фагоцитарной активностью по отношению к паразитам.

**Базофилы и тучные клетки** содержат крупные гранулы с гистамином, серотонином, гепарином, трипсином и химотрипсиноподобными пептидгидролазами. При этом базофилы являются циркулирующими в кровотоке клетками, а тучные клетки представляют собой активированную форму базофилов и являются оседлыми, тканевыми клетками. Тучные клетки тканей и базофилы крови играют важную роль в реакциях воспаления и анафилактических реакциях (в иммунном ответе аллергического характера).

**Мононуклеарные фагоциты** являются потомками моноцитарно-макрофагального предшественника. В костном мозге образуются монобласты, превращающиеся затем в промоноциты. Промоноциты при делении образуют **моноциты** крови, которые выходят из костного мозга в кровотоки и циркулируют в нем или оседают в тканях, превращаясь в фиксированные (тканевые) или свободные **макрофаги** (в печени фиксированные макрофаги называются **клетками Купфера**, в селезенке и лимфатических узлах имеются фиксированные и свободные макрофаги, в легких – **альвеолярные макрофаги**, в серозных полостях – **плевральные и перитонеальные макрофаги**, в соединительной ткани – **гистиоциты**, в нервной ткани – **микроглиальные клетки**, в костях – **остеокласты**, в почках – **интрагломерулярные и мезангиальные клетки**).

**Естественные или натуральные киллеры (ЕК- и НК – клетки)** – это лимфоидные клетки, лишенные признаков Т- и В-лимфоцитов, то есть лишенные свойственных им антигенраспознающих рецепторов. Морфологически они представляют собой крупные гранулярные лимфоциты, в цитоплазматических гранулах которых в больших количествах содержатся перфорины и гранзимы. **Перфорин** – белок, обуславливающий образование пор в мембране клеток-мишеней, через которые поступают **гранзимы**. К гранзимам относятся сериновые пептидгидролазы (проникают в клетку-мишень через перфорированные поры и вызывают апоптоз или программированную гибель клеток) и хондроитин-сульфат А (защищает ЕК-клетки от аутолиза).

К **гуморальным факторам** неспецифической защиты относятся нормальные (естественные) антитела, лизоцим, комплемент, интерферон, ингибиторы сыворотки крови, бета-лизины, лейкины, пропердин, ферменты, белки острой фазы, цитокины.

**Нормальные (естественные) антитела** содержатся в сыворотке практически здорового неиммунизированного человека. Считают, что они возникают в результате естественной иммунизации микробами, попадающими в организм в малых количествах в течение жизни. Содержание их в сыворотке крови очень

малое, но они обладают выраженной противомикробной активностью. Их природа окончательно не установлена.

**Лизоцим** представляет собой фермент (мурамидаза), который регулирует проницаемость клеточных мембран, разрушая пептидогликановый слой клеточной стенки грамположительных бактерий. На грамотрицательные бактерии он действует совместно с комплементом. Он также активирует фагоцитоз и образование антител. Лизоцим открыт в 1909 г. П.Л. Лащенко, выделен и изучен в 1922 г. А. Флемингом. Лизоцим синтезируется макрофагами, нейтрофилами и другими фагоцитирующими клетками и постоянно поступает в жидкости и ткани организма. Фермент содержится в крови, лимфе, слезной жидкости, молоке, сперме, на слизистых оболочках дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и мочеполовых путей. Отсутствует лизоцим лишь только в спинномозговой жидкости и передней камере глаза. Нарушение синтеза лизоцима ведет к снижению резистентности организма и возникновению инфекционных заболеваний.

**Комплемент** – это система белков сыворотки крови. Он был открыт в 1899 г. французским иммунологом Ж. Борде, назвавшим его “алексином”. Современное название комплементу дал П. Эрлих (этот фактор комплементирует, то есть дополняет или усиливает действие антител и фагоцитов). Комплемент представляет собой сложный комплекс белков сыворотки крови, находящийся обычно в неактивном состоянии и активирующийся при соединении антигена с антителом или при агрегации антигена. В состав комплемента входят 20 взаимодействующих между собой белков, девять из которых являются основными компонентами комплемента; их обозначают буквами и цифрами: С1, С2, С3, С4...С9.

Основной **функцией комплемента** является участие в фагоцитозе и лизисе микробных клеток (цитоллиз). **Механизм активации комплемента** очень сложен и представляет собой каскад ферментативных протеолитических реакций, в результате которого образуется активный цитолитический комплекс, разрушающий стенку бактерии. Известны три пути активации комплемента:

- классический путь;
- альтернативный путь;
- лектиновый путь.

**Классический путь** активации комплемента характерен для специфического иммунного ответа, так как требует наличия антител. При классическом пути вначале к комплексу антигена с антителом присоединяется компонент комплемента С1. Затем последовательно активируются компоненты комплемента С4, С2, С3. Компонент С3 активирует компонент С5, который прикрепляется к мембране клетки. На компоненте С5 путем последовательного присоединения компонентов С6, С7, С8, С9 образуется литический или мембраноатакующий комплекс (МАК), который нарушает целостность мембраны (образует в ней дефект, пору). Через образующийся дефект в клетку поступает жидкость. В результате осмотического лизиса клетка погибает (рисунки 14.35).

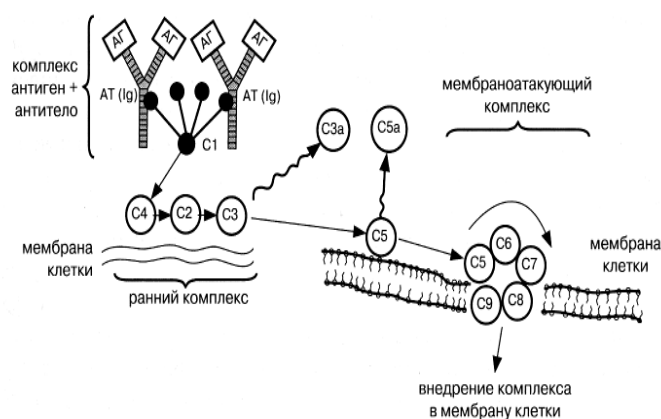


Рисунок 14.35 – Схема классического пути активации комплемента.

**Альтернативный путь** активации комплемента проходит без участия антител. Этот путь характерен для защиты от грамотрицательных микробов. Каскадная цепная реакция при альтернативном пути начинается сразу со взаимодействия патогена с компонентом комплемента C3. Далее реакция идет так же, как и при классическом пути - образуется мембраноатакующий комплекс, приводящий к гибели клетки (рисунок 14.36).

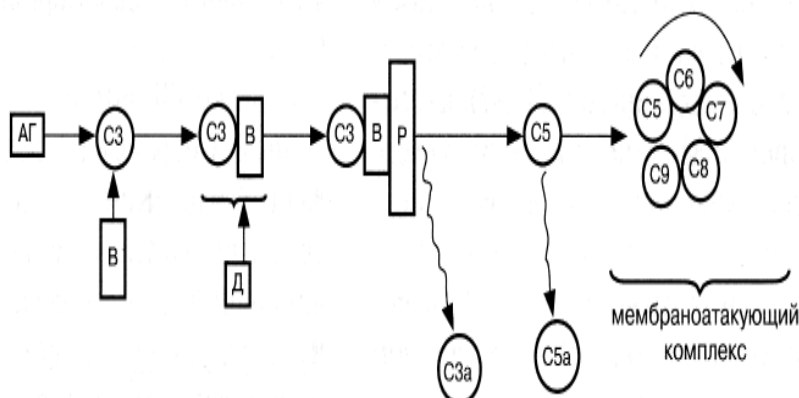


Рисунок 14.36 – Схема альтернативного пути активации комплемента.

**Лектиновый путь** активации комплемента также происходит без участия антител. Он инициируется особым маннозосвязывающим белком сыворотки крови, который после взаимодействия с остатками маннозы на поверхности микробных клеток катализирует компонент C4. Дальнейший каскад реакций сходен с классическим путем (рисунок 14.37).

**Интерфероны** – это группа термостабильных низкомолекулярных белков сыворотки крови. Интерфероны открыты в 1957 г. А. Айзексом и Ж. Линдеманом. В зависимости от вида клеток – продуцентов выделяют три типа интерферона.

**Альфа-интерфероны** синтезируются лейкоцитами, поэтому они называются лейкоцитарными.

**Бета-интерферон** называют фибробластным, поскольку он синтезируется фибробластами - клетками соединительной ткани.

**Гамма-интерферон** называется иммунным, так как он вырабатывается

активированными Т-лимфоцитами и другими иммунными клетками.

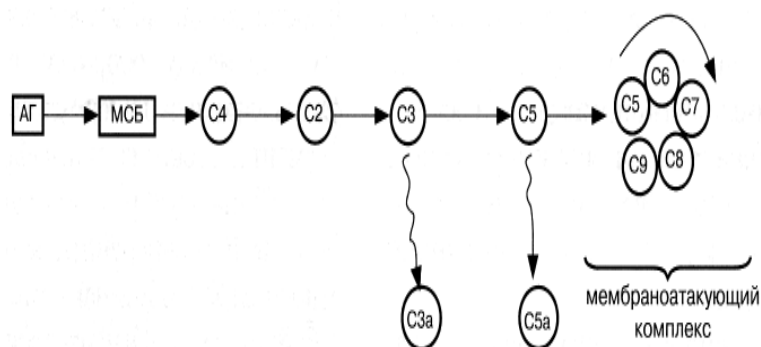


Рисунок 14.37 – Схема лектинового пути активации комплемента.

Альфа- и бета-интерфероны относятся к типу I, а гамма-интерферон – к типу II. Интерфероны обладают противовирусным и противоопухолевым действием, стимулируют фагоцитоз, регулируют образование антител. Их используют для профилактики вирусных инфекций, при лечении злокачественных опухолей и заболеваний, связанных с иммунодефицитами.

**Бета-лизины** представляют собой термостабильные бактерицидные факторы. Обнаруживаются в сыворотке крови после образования сгустка. По-видимому, выделяются тромбоцитами в процессе свертывания крови. Способны лизировать (растворять) некоторые бактерии. Наиболее активны в отношении грамположительных бактерий (микрококков и спорообразующих бактерий).

**Белки острой фазы** способствуют фагоцитозу, активации комплемента, формированию и ликвидации воспалительного очага. Они образуются в печени при действии цитокинов. К ним относятся С-реактивный белок (СРБ), маннозосвязывающий белок и другие.

**С-реактивный белок** имеет молекулярную массу 105 кД и состоит из 5 идентичных полипептидов. В норме в сыворотке крови С-реактивный белок присутствует в количестве 800 нг/мл. Его определяют в реакции преципитации с специфической иммуносывороткой. С-реактивный белок способствует удалению из организма патогенных микробов и некротического материала, поврежденных клеток, стимулирует активность фагоцитов и Т-лимфоцитов, являясь, таким образом, участником не только неспецифических, но и специфических защитных реакций. С-реактивный белок является индикатором воспаления.

**Маннозосвязывающий белок** - нормальный протеин сыворотки крови. Способен прочно связываться с остатками маннозы, находящимися на поверхности микробных клеток, и опсонизировать их. Способствует фагоцитозу, активирует систему комплемента по лектиновому пути.

**Пропердин** (фактор Р) представляет собой гамма-глобулин нормальной сыворотки крови. Способствует активации комплемента по альтернативному пути и таким образом участвует во многих иммунологических реакциях. Пропердин действует в составе пропердиновой системы. **Пропердиновая система** - это взаимосвязанная система пропердина, комплемента и двухвалентных ионов магния.

**Фибронектин** - универсальный белок плазмы и тканевых жидкостей,

синтезируемый макрофагами. Обеспечивает опсонизацию антигенов и связывание клеток с чужеродными веществами, например фагоцитов с антигенами и микробами, экранирует дефекты эндотелия сосудов, препятствуя тромбообразованию. Молекула фибронектина имеет участки для связывания коллагена, фибрина, некоторых бактерий (стафилококки, стрептококки). Связывая эти лиганды, фибронектин быстро их ферментирует.

**Лактоферрин** - железосвязывающий белок, конкурирующий с бактериями за железо. Синтезируется полиморфно-ядерными лейкоцитами и гроздьевидными клетками железистого эпителия. Является специфическим компонентом секрета слюнных, слезных, молочных желез, дыхательного, пищеварительного и мочеполового трактов.

**Бактерицидная активность сыворотки крови (БАС).** Свежая сыворотка крови человека и животных обладает выраженными бактериостатическими свойствами в отношении многих возбудителей инфекционных болезней. Основные компоненты, подавляющие рост и развитие микроорганизмов – это нормальные антитела, лизоцим, пропердин, комплемент, монокины, лейкины и другие вещества. Поэтому БАС является интегрированным показателем противомикробных свойств гуморальных факторов неспецифической защиты.

**Воспаление** – это сложная сосудисто-тканевая реакция организма на повреждение различной природы. При воспалении в зоне повреждения концентрируются фагоциты и другие защитные факторы, в результате чего ликвидируется повреждающий агент и восстанавливается структура и функции пострадавшей ткани. Клинические признаки воспаления:

- тканевой отек (*tumor*);
- боль (гипералгия, *dolor*);
- покраснение (гиперемия, *rubor*);
- локальное или системное повышение температуры (гипертермия, *calor*);
- нарушение структуры и функции поврежденного органа (*functia laesa*).

**Развитие воспаления протекает в три стадии:**

1. Тканевая альтерация или повреждение (протекает в течение нескольких минут) – это комплекс атрофических, дистрофических и некротических изменений.

2. Экссудация электролитов и белков плазмы - комплекс последовательно развивающихся сосудистых изменений.

3. Пролиферация – завершающаяся стадия воспаления с восстановлением поврежденной ткани или образованием рубца.

Воспаление может быть:

- острым – длительность до 2 недель;
- подострым – длительность до 6 недель;
- хроническим – длительность более 6 недель.

**Фагоцитоз** (греч. *phagos* - пожираю, *cytos* - клетка) – это поглощение клеткой инородных частиц и их обезвреживание. Фагоцитоз открыт и изучен И.И. Мечниковым (рисунок 14.38). В 1883 г. на 7 съезде русских естествоиспытателей и врачей в Одессе он доложил об открытии явления фагоцитоза.

Фагоцитоз осуществляют две популяции клеток:

- **циркулирующие в крови гранулоцитарные клетки** – моноциты, эозинофилы, базофилы, нейтрофилы;



- **тканевые макрофаги** печени, селезенки, лимфатических узлов.



Рисунок 14.38 – Илья Ильич Мечников.

В настоящее время все фагоциты объединены в единую моноклеарную фагоцитирующую систему (МФС) вместо существовавшей ранее ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). В нее включены **тканевые макрофаги** (альвеолярные, перитонеальные и др.), **клетки Лангерганса и Гренштейна** (эпидермоциты кожи), **клетки Купфера** (звездчатые ретикулоэндотелиоциты), эпителиоидные клетки, нейтрофилы и эозинофилы крови и некоторые другие.

**Процесс фагоцитоза** включает в себя несколько стадий (рисунок 14.39):

- 1) **стадия хемотаксиса** - приближение фагоцита к объекту поглощения;
- 2) **стадия адгезии** поглощаемой частицы на поверхности фагоцита;
- 3) **стадия поглощения** частицы путем инвагинации клеточной мембраны с образованием в протоплазме фагосомы (вакуоли, пузырьки);
- 4) **стадия слияния** фагосомы с лизосомой клетки с образованием фаголизосомы;
- 5) **стадия проникновения** в фаголизосому лизосомальных ферментов (кислой фосфатазы, миелопероксидазы, коллагеназы, каталазы и др.);
- 6) **стадия ферментативного переваривания** частицы (процессинг антигена) в фаголизосоме с помощью ферментов;
- 7) **стадия исхода** (удаление элементов).

В случае полного переваривания поглощенного патогена фагоцитоз является **завершенным**. В некоторых случаях поглощенные патогенные микробы внутри фагоцитов не перевариваются, сохраняют жизнеспособность и даже размножаются. Такой фагоцитоз называется **незавершенным** и обуславливает хроническое течение инфекции. В ряде случаев макрофаги с поглощенными бактериями образуют скопления, которые снаружи окружаются соединительно-тканной капсулой. Такие скопления клеток или узелки (бугорки) называются **инфекционной гранулемой**. Они образуются при туберкулезе, бруцеллезе, сифилисе.

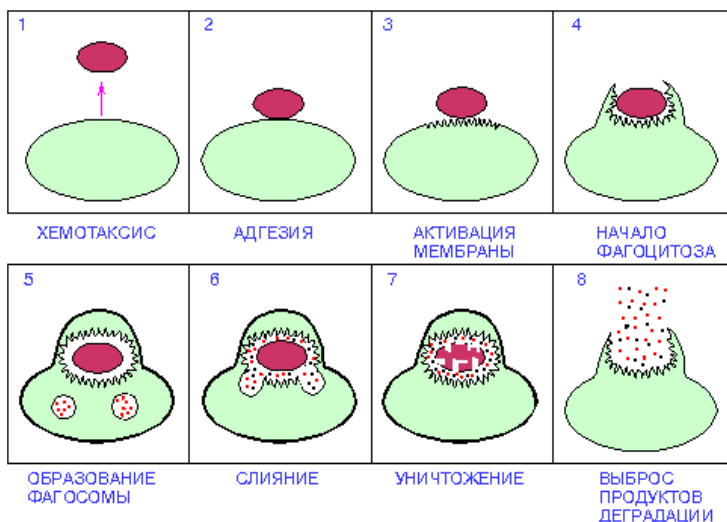


Рисунок 14.39 – Стадии фагоцитоза.

Некоторые полости организма постоянно заселены определенными микроорганизмами (нормальная микрофлора тела). Нормальная микрофлора на слизистых оболочках формирует биопленку, защищающую организм от внедрения возбудителей заболеваний (рисунок 14.40).

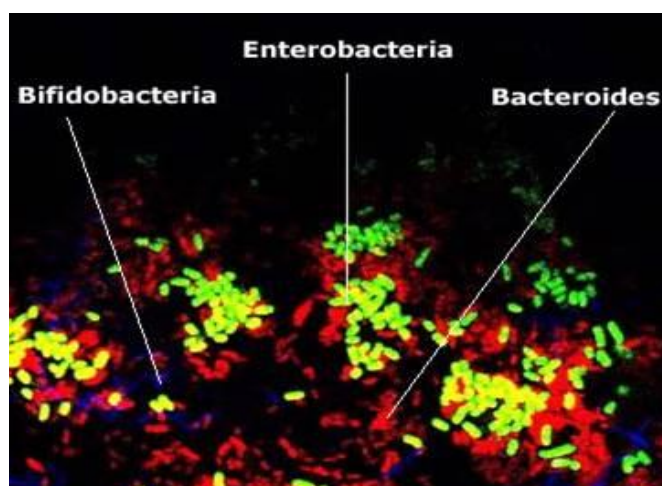


Рисунок 14.40 – Биопленка на слизистой оболочке кишечника.

Кожа, слизистые оболочки пищеварительной системы и других органов населены свойственными им микроорганизмами, которые составляют биоценоз этих органов. При различных заболеваниях нарушается количественное и качественное соотношение представителей нормальной микрофлоры, а иногда наблюдается и развитие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В этом случае развивается патологический процесс, называемый **дисбактериозом** (дисбиозом).

**Защитная функция нормальной микрофлоры** проявляется ее антагонистическими взаимоотношениями с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами (например, молочнокислые бактерии подавляют гнилостную микрофлору, эшерихии подавляют развитие стрептококков). Механизм антагонистического действия микроорганизмов самый разнообразный (продукция антибиотиков, антибиотикоподобных веществ, ферментов и других биологически

активных соединений).

**Генетическая реактивность клеток и тканей** связана с невосприимчивостью человека к некоторым возбудителям заболеваний. Например, человек не болеет такими инфекциями как чума собак, оспа мышей и т. д.

**Защитно-адаптационные механизмы.** К неспецифическим факторам защиты относится также **стресс**. Факторы, вызывающие стресс, были названы Г. Селье стрессорами. По Г. Селье стресс – особое неспецифическое состояние организма, возникающее в ответ на действие различных повреждающих факторов окружающей среды. В качестве стрессоров могут выступать патогенные микроорганизмы и их токсины, холод, голод, тепло, ионизирующее излучение и другие агенты, вызывающие ответные реакции организма. **Адаптационный синдром** на стресс может быть общим и местным. Он обуславливается действием гипофизарно-адренкортикальной системы, связанной с гипоталамическим центром. Под влиянием стрессора гипофиз усиленно выделяет адренкортикотропный гормон (АКТГ), который стимулирует функцию надпочечников, вызывая у них выделение противовоспалительного гормона типа кортизона, снижающего воспалительную реакцию.

Разные органы и системы организма обладают присущими им защитными факторами. **Защитная функция дыхательных путей** обусловлена слизью, реснитчатым эпителием, иммуноглобулинами и фагоцитозом. **Защитная функция конъюнктивы** обусловлена слезной жидкостью и лизоцимом. **Защитная функция пищеварительного тракта** обусловлена кислой средой желудка, щелочной средой кишечника, нормальной микрофлорой, механическим перемещением пищи, ферментами, лизоцимом, бактериоцинами. **Защитная функция кожи** обусловлена анатомическими барьерами, секретами потовых и сальных желез, антимикробными секретами, лактатом, жирными кислотами, кислой средой, нормальной микрофлорой. **Защитная функция урогенитального тракта** обусловлена током мочи, кислой средой, лизоцимом, вагинальным лактатом.

#### 14.4.2. Патоген-ассоциированные молекулярные образы и образспознающие рецепторы

Каким же образом клетки защитной системы узнают патогены и инфицированные или опухолевые клетки самого организма? Дело в том, что в последние годы на поверхности микроорганизмов обнаружены повторяющиеся молекулярные углеводные и липидные структуры, отсутствующие на клетках макроорганизма. Эти молекулярные структуры получили обозначение “**патоген-ассоциированные молекулярные образы или паттерны**” (pathogen-associated molecular patterns, PAMP). К таким PAMP относятся липополисахариды, липопротеины, гликолипиды, флагеллин, бактериальная и вирусная ДНК и РНК, белки теплового шока. Эти структуры синтезируются только микроорганизмами (в клетках млекопитающих их нет), они характерны для целого ряда патогенов, а не только для одного конкретного вида микробов, они являются важными для жизнедеятельности бактерий (рисунок 14.41).

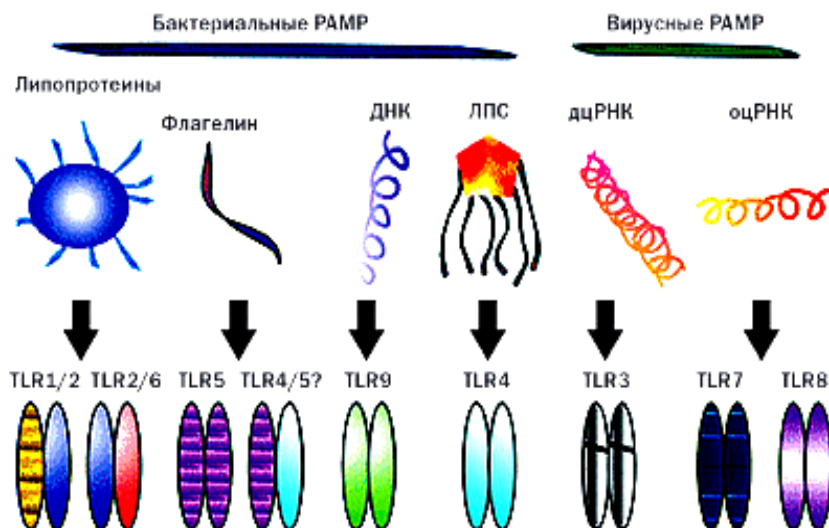


Рисунок 14.41 – Патоген-ассоциированные молекулярные образы.

Например, основными PAMP грамотрицательных бактерий являются липополисахарид клеточной стенки, ДНК, флагелин и пептидогликан. Для грампозитивных бактерий основными PAMP являются ДНК, пептидогликан, тейхоевые и липотейхоевые кислоты

Патоген-ассоциированные молекулярные образы распознаются особыми рецепторами, расположенными на поверхности практически всех клеток организма человека. Эти рецепторы называются **образраспознающими рецепторами** или **паттерн-распознающими рецепторами** – PRR (Pattern Recognition Receptors). Они распознают определенные консервативные молекулы патогенов и молекулы, экспрессируемые собственными клетками организма в случае их инфицирования или опухолевого перерождения. У человека обнаружено большое количество образраспознающих рецепторов. Они реагируют на молекулярные структуры (PAMP), присущие всем патогенным микроорганизмам. В результате этого происходит активация клеток (моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток), направленное разрушение патогенной, инфицированной или опухолевой клетки, либо высвобождение цитокинов.

В зависимости от локализации выделяют клеточные и внеклеточные паттерн-распознающие рецепторы. Клеточные PRR располагаются на мембранах клетки или в цитоплазме. Внеклеточные (растворимые, циркулирующие) PRR обнаруживаются в жидкостях организма.

К **мембранным формам PRR** относятся рецепторы, расположенные как на наружных, так и на внутренних мембранах клетки, в частности, **TLR** (Toll-Like Receptor) – Toll-подобные рецепторы (рисунок 14.42).

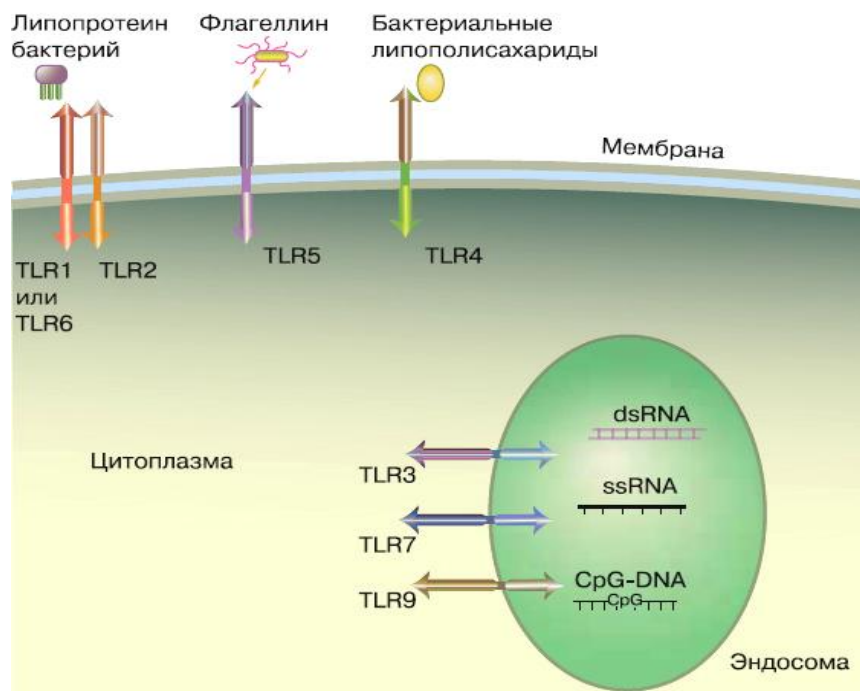


Рисунок 14.42 - Toll-подобные рецепторы.

В большинстве случаев TLR располагаются на поверхности клеток, реже – в цитоплазме, в области аппарата Гольджи. Эти рецепторы либо самостоятельно связываются с молекулярными структурами патогенов, либо действуют совместно с другими клеточными рецепторами. На наружной мембране клеток обычно располагаются те TLR, которые связываются с внеклеточными микроорганизмами (бактериями, грибами). На вирусы и внутриклеточные микроорганизмы действуют те TLR, которые находятся на внутренних мембранах клетки. У человека описано 10 различных вариантов TLR.

**Цитоплазматическими рецепторами** клеток являются **NOD-рецепторы** (NOD1 и NOD2) и **RIG-подобные рецепторы**. NOD-рецепторы распознают мурамилпептиды – соединения, образующиеся при ферментативном гидролизе пептидогликана. RIG-подобные рецепторы (RLR, RIG-I, MDA5 и LGP2) распознают вирусные РНК.

К **растворимым формам PRR** относятся липополисахарид-связывающий белок (LBP – Lipopolysaccharide Binding Protein), компонент системы комплемента C1q, белки острой фазы MBL и С-реактивный белок (СРБ), белки сурфактанта легких SP-A и SP-D. Они связывают в жидких средах организма микробные структуры и обеспечивают их поглощение фагоцитами. Следовательно, эти паттерн-распознающие рецепторы являются опсонинами (греч. *opsonein* – делающий вкусным).

За открытие механизмов активации врожденного иммунитета (за открытие патоген-ассоциированных молекулярных образов) американский ученый Б. Бётлер и французский иммунолог Ж. Хоффманн в 2011 г. удостоились Нобелевской премии (рисунок 14.43).



А



Б

Рисунок 14.43 – А - Брюс Бётлер (Bruce Alan Beutler, 1957 г.р.); Б - Жюль Хоффман (Jules Alphonse Hoffman, 1941 г.р.).

Таким образом, проникновение микроорганизмов в макроорганизм, их распознавание и последующая элиминация обеспечиваются многими факторами, действующими одновременно.

#### 14.5. Вопросы для контроля усвоения материала

1. Что такое инфекция, инфекционный процесс, инфекционная болезнь?
2. Назовите категории паразитов.
3. Охарактеризуйте периоды инфекционного процесса.
4. Назовите формы инфекции.
5. Назовите периоды инфекционной болезни.
6. Какие источники инфекции Вы знаете?
7. Расскажите о механизмах и путях передачи инфекции.
8. Что такое факторы передачи инфекции?
9. Что такое патогенность и вирулентность микробов?
10. Назовите факторы патогенности бактерий.
11. Назовите основные свойства экзотоксинов.
12. Назовите основные свойства эндотоксинов.
13. Охарактеризуйте неспецифические факторы защиты организма от патогенов.
14. Каким образом организм “узнает” о проникновении патогена?

#### 14.6. Тренировочные тесты

1. Взаимодействие микроорганизма с конкретным макроорганизмом - это:
  - + инфекционный процесс
  - эпидемический процесс
  - механизм передачи инфекции
  - путь передачи инфекции
  - ворота инфекции

2. Взаимодействие возбудителей с популяцией макроорганизмов – это:

- инфекционный процесс
- + эпидемический процесс
- механизм передачи инфекции
- факторы передачи инфекции
- пути передачи инфекции

3. Инфекционный процесс – это:

- проникновение возбудителя в организм человека
- + взаимодействие микроорганизма с макроорганизмом
- выделение возбудителя из макроорганизма
- нахождение возбудителя во внешней среде
- размножение возбудителя на питательной среде

4. Инфекционная болезнь - это:

- проникновение возбудителя в организм человека
- + изменения в органах и тканях под воздействием патогенного микроорганизма
- выделение возбудителя из макроорганизма
- нахождение возбудителя во внешней среде
- размножение возбудителя на питательной среде

5. Способ перемещения возбудителя от источника инфекции к восприимчивому организму - это:

- инфекционный процесс
- эпидемический процесс
- + механизм передачи инфекции
- ворота инфекции
- инфекционная болезнь

6. Элементы внешней среды, обеспечивающие механизм передачи инфекции, называются:

- переносчиком
- воротами инфекции
- + факторами передачи инфекции
- эпидемическим процессом
- инфекционным процессом

7. Входные ворота инфекции - это:

- локализация возбудителя во внешней среде
- способность микроорганизма вызывать заболевание
- + место проникновения возбудителя в организм
- передача возбудителя от больного здоровому
- патогенность микроорганизма

8. Способность микроорганизма вызывать инфекционный процесс называется:

- адгезией

- антигенностью
- + патогенностью
- токсичностью
- резистентностью

9. Ткань или орган, через который возбудитель проникает в макроорганизм, называется:

- путем передачи инфекции
- + воротами инфекции
- переносчиком
- восприимчивым организмом
- механизмом передачи инфекции

10. Антропонозная инфекция – это инфекция, при которой:

- + основным источником возбудителя является человек
- основным источником является больное животное
- основным источником является почва
- болеют только животные
- фактором передачи служит вода

11. Зоонозная инфекция – это инфекция, при которой:

- основным источником возбудителя является человек
- + основным источником является больное животное
- основным источником является почва
- болеет только человек
- фактором передачи служит вода

12. Сапронозная инфекция – это инфекция, при которой:

- основным источником возбудителя является человек
- основным источником является больное животное
- + основным источником является почва
- болеют только животные
- болеет только человек

13. Пути передачи при реализации фекально-орального механизма:

- + алиментарный
- + водный
- трансмиссивный
- воздушно-капельный
- воздушно-пылевой

14. Пути передачи при реализации аэрогенного механизма:

- алиментарный
- водный
- контактный
- + воздушно-капельный



+ воздушно-пылевой

15. Пути реализации контактного механизма передачи инфекции:

- алиментарный
- водный
- + опосредованный контакт
- воздушно-капельный
- + половой

16. Путь реализации вертикального механизма передачи инфекции:

- алиментарный
- + трансплацентарный
- водный
- контактный
- трансмиссивный

17. К факторам передачи инфекции относятся:

- больные животные
- больные люди
- членистоногие
- бактерионосители
- + объекты окружающей среды

18. К факторам передачи инфекции относятся:

- больные животные
- больные люди
- членистоногие
- + предметы обихода
- бактерионосители

19. Переносчиками возбудителей инфекционных заболеваний являются:

- больные животные
- больные люди
- + членистоногие
- бактерионосители
- объекты окружающей среды

20. Источниками инфекции являются:

- + больные животные
- + больные люди
- предметы обихода
- + бактерионосители
- медицинский инструментарий

21. Какой период инфекционной болезни характеризуется отсутствием клинических симптомов:

- + инкубационный
- продромальный
- период разгара болезни
- период реконвалесценции
- бактерионосительство

22. Какой период инфекционной болезни характеризуется неспецифическими клиническими симптомами:

- инкубационный
- + продромальный
- период разгара болезни
- период реконвалесценции
- период внедрения возбудителя

23. Какой период инфекционной болезни характеризуется выраженными специфическими клиническими симптомами:

- инкубационный
- продромальный
- + период разгара болезни
- период выздоровления
- период реконвалесценции

24. Какой период инфекционной болезни характеризуется выздоровлением:

- инкубационный
- продромальный
- период разгара болезни
- + период реконвалесценции
- период внедрения возбудителя

25. К периодам инфекционной болезни относятся:

- острое течение болезни
- + продромальный
- + инкубационный
- хроническое течение болезни
- носительство

26. Возврат симптомов заболевания после ремиссии называется:

- + рецидивом
- реинфекцией
- вторичной инфекцией
- суперинфекцией
- микст-инфекцией

27. Повторное заболевание в результате инфицирования тем же возбудителем после полного выздоровления называется:

- рецидивом

- + реинфекцией
- вторичной инфекцией
- суперинфекцией
- микст-инфекцией

28. Дополнительное инфицирование тем же возбудителем на фоне продолжающейся инфекционной болезни называется:

- рецидивом
- реинфекцией
- вторичной инфекцией
- + суперинфекцией
- микст-инфекцией

29. Дополнительное инфицирование другим возбудителем на фоне имеющейся инфекционной болезни называется:

- рецидивом
- реинфекцией
- + вторичной инфекцией
- суперинфекцией
- микст-инфекцией

30. Одновременное инфицирование несколькими возбудителями называется:

- рецидивом
- реинфекцией
- вторичной инфекцией
- суперинфекцией
- + микст-инфекцией

31. Способность микроорганизма вызывать у человека инфекционную болезнь:

- + патогенность
- вирулентность
- агрессия
- колонизация
- инвазия

32. Вирулентность – это:

- способность вызывать инфекционную болезнь
- + мера патогенности
- способность к колонизации
- адгезия микробов
- инвазия

33. Вирулентность - это:

- способность микроба проникать в организм человека
- способность микроба распространяться с кровью
- способность к синтезу токсина

- + степень патогенности
- способность к синтезу ферментов агрессии

34. Защищает бактериальную клетку от антител и фагоцитов:

- гиалуронидаза
- коллагеназа
- + капсула
- протеаза
- нейраминидаза

35. Для экзотоксинов характерно:

- пирогенность
- + перевод в анатоксины
- термостабильность
- + термолабильность
- низкая токсичность

36. Для эндотоксинов характерно:

- + пирогенность
- перевод в анатоксины
- + термостабильность
- термолабильность
- + низкая токсичность

37. Период между проникновением возбудителя в организм и первыми неспецифическими симптомами заболевания называется:

- + инкубационным
- реконвалесценции
- продромальным
- разгара болезни
- острым

38. Проникновение бактерий в кровь без их размножения в крови называется:

- септициемией
- токсинемией
- + бактериемией
- септикопиемией
- вирусемией

39. Циркуляция бактерий в крови и размножение в ней называется:

- + септициемией
- вирусемией
- бактериемией
- токсинемией
- пиемией

40. Циркуляция бактерий в крови, размножение в ней и образование гнойных очагов в тканях называется:

- септициемией
- колонизацией
- бактериемией
- + септикопиемией
- вирусемией

41. Размножение бактерий в месте входных ворот инфекции и поступление в кровь экзотоксина называется:

- септициемией
- + токсинемией
- бактериемией
- септикопиемией
- вирусемией

42. К факторам вирулентности бактерий относятся:

- + экзотоксин
- нуклеоид
- + ферменты агрессии
- + капсула бактерий
- рибосомы

43. Адгезия бактерий обусловлена:

- экзоспорами
- + пиями
- рибосомами
- О-антигеном
- Н-антигеном

44. Адгезивные свойства микроорганизмов обусловлены наличием:

- экзотоксина
- + пилей
- гиалуронидазы
- плазмокоагулазы
- жгутиков

45. К факторам инвазивности относится:

- экзоспора
- пили
- Н-антиген
- + гиалуронидаза
- О-антиген

46. К факторам инвазивности бактерий относятся:

- рибосомы

- эндотоксины
- лизосомы
- профаги
- + ферменты агрессии

47. Экзотоксин - это:

- липополисахарид
- дипиколиновая кислота
- фосфолипиды
- + белок
- тейхоевая кислота

48. Активируют процессы свертывания крови и приводят к тромбообразованию:

- экзотоксины
- + эндотоксины
- анатоксины
- антитоксины
- цитокины

49. Лихорадка развивается при поступлении в кровь:

- антитоксинов
- + эндотоксинов
- экзотоксинов
- анатоксинов
- пептидогликана

50. Критическое падение артериального давления наблюдается при массивном поступлении в кровь:

- экзотоксинов
- анатоксинов
- + эндотоксинов
- антитоксинов
- иммуноглобулина

51. Основным элементом эндотоксина является:

- дипиколиновая кислота
- миколовая кислота
- тейхоевая кислота
- + липополисахарид
- пептидогликан

52. Анатоксин получают из:

- эндотоксина
- + экзотоксина
- антитоксина
- иммуноглобулина

- бета-лизина

53. Анатоксин получают путем:

- кипячения эндотоксина
- + воздействия на экзотоксин формалина
- УФ-облучения эндотоксина
- фильтрации лизата клеток
- центрифугированием эндотоксина

54. К ферментам агрессии бактерий относятся:

- лактоферрин
- + гиалуронидаза
- + коллагеназа
- лизоцим
- комплемент

55. Адгезивные свойства микробов обусловлены наличием

- липополисахарида
- + пилей
- гиалуронидазы
- плазмокоагулазы
- жгутиков

56. Специфические симптомы проявляются в периоде болезни:

- инкубационном
- реконвалесценции
- продромальном
- + разгара болезни
- выздоровления

57. Инфицирующая доза возбудителя – это:

- максимальное количество микробных клеток, способных вызвать инфекционный процесс
- + минимальное количество микробных клеток, способных вызвать инфекционный процесс
- количество микробных тел, способных вызвать гибель 50% подопытных животных
- количество микробных клеток, вызывающих гибель 100% животных
- количество микробных клеток, вызывающих гибель 10% животных

58. В зависимости от природы возбудителя выделяют следующие формы инфекции:

- моноинфекция
- + бактериальная инфекция
- + вирусная инфекция
- зоонозная инфекция
- + грибковая инфекция

59. В зависимости от источника выделяют следующие формы инфекции:

- смешанная
- + антропонозная
- + зоонозная
- бактериальная
- протозойная

60. Инфекция, возникающая в результате поступления возбудителя из окружающей среды, называется:

- смешанной
- + экзогенной
- эндогенной
- аутоинфекцией
- суперинфекцией

61. Септикопиемия – это:

- размножение возбудителя в месте входных ворот инфекции
- + циркуляция и размножение возбудителя в крови, сопровождающееся образованием гнойных очагов во внутренних органах
- поступление в кровь большого количества эндотоксина
- образование гнойных очагов в месте входных ворот инфекции
- поступление в кровь большого количества экзотоксина

62. Инфекция, вызванная двумя или несколькими видами микроорганизмов, называется:

- суперинфекцией
- + смешанной инфекцией
- моноинфекцией
- реинфекцией
- вторичной инфекцией

63. В какой период инфекционной болезни проявляются специфические симптомы заболевания?

- инкубационном
- + разгара болезни
- продромальный
- реконвалесценции
- выздоровления

64. В какой период инфекционного процесса прекращается размножение возбудителя и нормализация функций?

- продромальный
- инкубационный
- разгара заболевания
- + реконвалесценции
- установления носительства



65. Патогенность – это:

- минимальная смертельная доза возбудителя
- максимальная смертельная доза возбудителя
- + способность микроорганизма вызывать инфекционную болезнь в чувствительном макроорганизме
- способность микроба образовывать токсины
- способность микроба синтезировать ферменты агрессии

66. Способность микроорганизма прикрепляться к клеткам макроорганизма называется:

- пенетрацией
- + адгезией
- колонизацией
- инвазией
- инфекцией

67. Функцию адгезии у грамотрицательных бактерий выполняют:

- жгутики
- ЛПС
- капсула
- + пили
- ЦПМ

68. К ферментам агрессии относятся:

- каталаза
- оксидаза
- + гиалуронидаза
- + нейраминидаза
- + плазмокоагулаза

69. Экзотоксин получают путем:

- разрушения клеток возбудителя высокой температурой
- + фильтрования бульонной культуры возбудителя
- воздействия на микробные клетки формалином
- разрушения микробных клеток замораживанием
- воздействия на микробные клетки УФ-лучей

70. Минимальное количество микробов, вызывающее гибель 50% лабораторных животных, называется:

- DIm
- DCL
- ID<sub>50</sub>
- + LD<sub>50</sub>
- ED50

Примечание: знаком + отмечены правильные ответы.

## 15. Методические указания к практическим занятиям

**Тема 1: Устройство и оснащение микробиологической лаборатории и правила работы в ней.**

**Цель занятия:** Познакомить студентов с устройством и оснащением типовой микробиологической лаборатории и правилами работы в ней.

**Задачи занятия:**

1. Изучение устройства типовой микробиологической лаборатории.
2. Ознакомление студентов с правилами работы в учебной микробиологической лаборатории.

После изучения темы студент должен:

**знать:**

- структуру типовой микробиологической лаборатории;

**уметь:**

- ориентироваться в предназначении помещений микробиологической лаборатории;

**владеть:**

- микробиологическим понятийным аппаратом.

### Справочные материалы

**Принципы устройства микробиологических лабораторий:**

1. Изолированность помещений.
2. Набор необходимых помещений.
3. Наличие необходимого оборудования, приборов, реактивов и посуды.
4. Использование спецодежды.
5. Обеззараживание посуды и инструментов после работы.
6. Проведение дезинфекции.
7. Использование стерильной посуды и инструментов.
8. Учет поступающих материалов.
9. Хранение материалов в соответствующих условиях.
10. Обеззараживание отходов и выбросов (инфицированных материалов, стоков, воздуха).

**Виды лабораторий органов здравоохранения:**

1. Клинико-диагностические лаборатории общего или специального типов (биохимические, бактериологические, иммунологические, цитологические и др.) в составе больниц, поликлиник, диспансеров и других ЛПУ.
2. Бактериологические, санитарно-бактериологические и санитарно-химические лаборатории органов Госсанэпиднадзора.
3. Центральные, проблемные, отраслевые, учебные лаборатории ВУЗов.
4. Специализированные лаборатории (например, особо опасных инфекций, вирусологические, микологические, протозоологические, риккетсиозные, туберкулезные и др.).

**Категории микробиологических лабораторий:**

1. Базовые лаборатории (основные или общего типа).
2. Режимные (изолированные) лаборатории.

### 3. Лаборатории особого режима (максимально изолированные)

#### **Устройство микробиологической лаборатории**

Микробиологическая лаборатория предназначена для исследования материалов, содержащих возбудителей бактериальных инфекций (или подозрительных на наличие возбудителей), для определения санитарно-микробиологических показателей, контроля состояния и напряженности специфического иммунитета и других микробиологических исследований. Микробиологическая лаборатория должна размещаться в изолированных от других лабораторий помещениях с необходимым оборудованием и мебелью. Лаборатория должна иметь отдельный вход, гардероб и душевую. В состав микробиологической лаборатории должны входить следующие помещения:

- комната приема и регистрации материалов;
- боксированные помещения для микробиологических исследований;
- автоклавная;
- моечная;
- виварий.

Комнаты для микробиологических исследований оборудуют термостатами, холодильниками, центрифугами, весами, водяными банями, электромагнитными мешалками и другими приборами и оборудованием. На столах размещают необходимую аппаратуру. Работу с инфицированным материалом проводят в **боксе с предбоксником**. У входа в бокс должен быть коврик, пропитанный дезраствором. В боксе разбирают поступившие пробы, готовят и фиксируют мазки-отпечатки, проводят посевы микроорганизмов на питательные среды. Поэтому в боксе располагают столы, на которых размещают необходимые для работы инструменты: емкости с дезрастворами для использованной посуды, штативы для пробирок, пробирки и чашки Петри с питательными средами, стерильные пипетки, ступки и т. д. В предбокснике в биксах необходимо иметь стерильные халаты, шапочки, маски, а также в предбокснике должна быть сменная обувь. В предбокснике можно размещать термостаты, холодильники, центрифуги и некоторое другое оборудование. В боксах и предбоксниках ежедневно проводят влажную уборку, дезинфекционную обработку и облучение с использованием бактерицидных ламп в течение 30-40 минут перед началом работы и после работы.

В настоящее время в микробиологических лабораториях работы с биологическими объектами в стерильных условиях проводят с использованием ламинар-боксов (ламинарных шкафов).

В **автоклавной** необходимо иметь два автоклава: один автоклав для чистых материалов (для стерилизации посуды, питательных сред, инструментов); другой автоклав для инфицированных материалов (для обезвреживания инфицированных инструментов, посуды).

**Моечная** предназначена для мытья посуды. Посуду и инструменты, загрязненные инфицированным материалом, моют только после дезинфекции или автоклавирования. После мытья посуду высушивают. Поэтому в моечной размещают ванны, раковины, сушильные шкафы.

**Виварием** называется помещение, используемое для содержания лабораторных животных и работы с ними. В виварии необходимо иметь карантинное отделение, комнаты для здоровых и инфицированных животных,

помещения для мытья и дезинфекции клеток, инвентаря и спецодежды, кухню для приготовления кормов, кладовую, фуражную, трупосжигательную печь. Все помещения вивария должны быть изолированы друг от друга.

### **Правила работы в микробиологической лаборатории**

1. Работать разрешается в специальной одежде – халате и шапочке. В боксе работают в стерильном халате, маске, шапочке, при необходимости надевают резиновые перчатки и очки. Обязательно меняют обувь.

2. Запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнюю одежду на халат.

3. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты питания. В лаборатории запрещается пить, курить и принимать пищу.

4. Весь материал, поступающий в лабораторию на анализ, должен рассматриваться как инфицированный. Поэтому при распаковке материала необходимо соблюдать осторожность. Емкости следует обтирать снаружи дезинфицирующим раствором и помещать их на подносы или в кюветы с ковриком, смоченным дезраствором.

5. В случае попадания инфицированного материала на халат, руки, стол, обувь необходимо провести дезинфекцию и сообщить об этом заведующему лабораторией.

6. Зараженный материал после окончания исследований обязательно уничтожают автоклавированием.

7. Запрещается выносить из лаборатории оборудование, инвентарь, материалы без предварительной их дезинфекции.

8. Пипетки, предметные и покровные стекла и другую посуду, бывшую в употреблении, обеззараживают, погружая в дезраствор.

9. По окончании работы рабочее место приводят в порядок, инструменты и поверхность рабочего стола тщательно дезинфицируют. Культуры микроорганизмов, необходимые для дальнейшей работы, убирают на хранение в холодильник.

**В учебной микробиологической лаборатории студентам следует соблюдать следующие правила:**

1. Запрещается без разрешения преподавателя включать электроприборы.

2. Приступать к работе только с разрешения преподавателя. Запрещается проводить практическую работу самостоятельно без разрешения преподавателя.

3. Личные вещи, портфели, сумки складывать в отведенное место.

4. О неисправности приборов следует сообщать преподавателю.

5. Материал, используемый в работе, рассматривается как особо опасный.

6. Инструменты, использованные в работе, помещают в емкость с дезраствором или фламбируют в пламени спиртовки. Инструмент на стол класть нельзя!

7. Запрещается выносить из учебной лаборатории пробирки с микроорганизмами, препараты и другие предметы.

8. После работы необходимо тщательно вымыть руки с мылом.

**В микробиологической лаборатории ведется следующая документация:**

1. Инвентарная книга музейных штаммов культур.

2. Журнал учета движения материала в лаборатории.

3. Журнал учета стерилизации и уничтожения инфицированного материала.

4. Журнал учета зараженных подопытных животных.

5. Журнал исследований (экспертиз).

### **Самостоятельная работа.**

На практическом занятии студенты знакомятся с правилами работы в учебной лаборатории под роспись.

### **Иллюстративный материал**



Помещение для приема и регистрации материалов.



Вытяжной шкаф.



Ламинарный бокс.



Микробиологический бокс.



Световой микроскоп.



Люминесцентный микроскоп.



Термостат.



Электрические дистилляторы.



Лабораторная центрифуга.



Весы.



рН-метр.



Шейкер.



Водяная баня с терморегулятором.

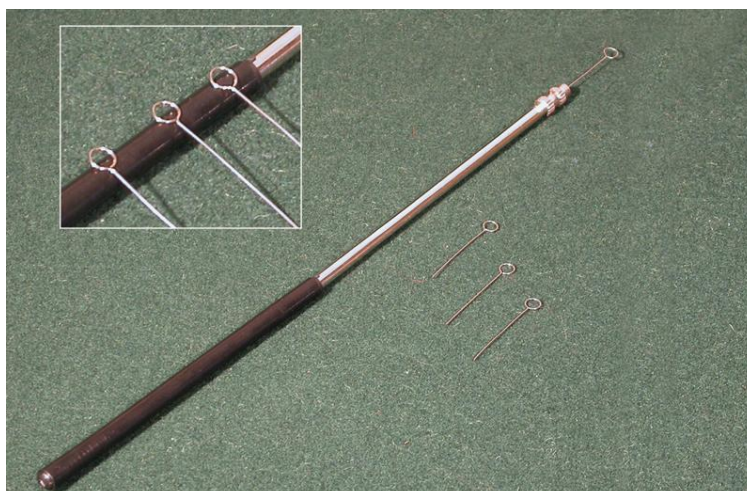




Анаэростат.



Лабораторные принадлежности.



Бактериологическая петля.



Бактериологические петли и иглы одноразового использования.



Чашка Петри.



Бактериологическая пробирка.



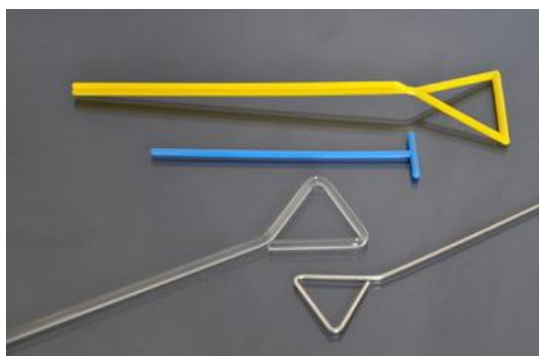
Пипетки стеклянные.



Пипетки пастеровские.



Пипетки автоматические.



Шпатели.



Средоварка автоматическая.



Моечная и стерилизационная машина.



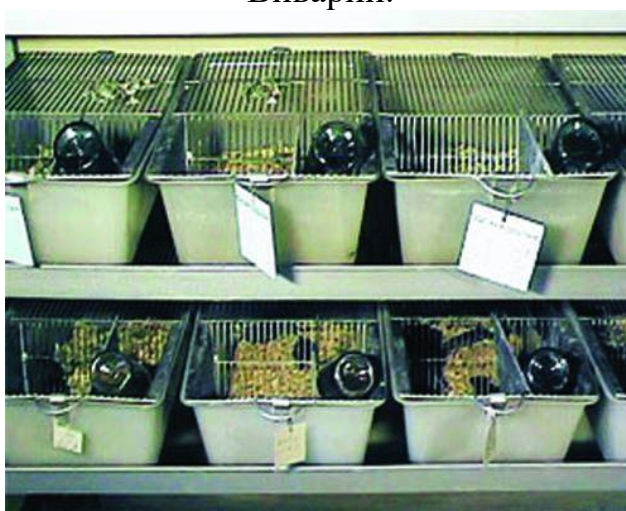
Автоклав.



Сухожаровой шкаф.



Виварий.



Корбки для содержания животных.



Биохимический анализатор.



Микробиологический анализатор.

**Тема 2: Изучение устройства светового микроскопа. Техника микрофотографирования с иммерсионной системой.**

**Цель занятия:** Обучить студентов технике микрофотографирования с использованием иммерсионной системы.

**Задачи занятия:**

1. Изучение устройства светового микроскопа.
2. Освоение студентами техники микрофотографирования с использованием иммерсионной системы.

После изучения темы студент должен:

**знать:**

- устройство светового микроскопа;

**уметь:**

- пользоваться световым микроскопом;

**владеть:**

- техникой микрофотографирования с иммерсионной системой.

### Справочные материалы

Клетки микроорганизмов можно изучать как в живом состоянии (метод раздавленной капли и метод висячей капли), так и в фиксированном и окрашенном состоянии.

**Метод раздавленной капли.** На поверхность обезжиренного предметного стекла наносят каплю исследуемого материала или суспензию бактерий и покрывают ее покровным стеклом. Капля не должна выходить за края покровного стекла. Микрофотографируют препарат с объективом х40. Метод раздавленной капли удобен для исследования подвижности бактериальных клеток, а также для изучения крупных микроорганизмов - плесневых грибов, дрожжей.

**Метод висячей капли.** Препарат готовят на покровном стекле, в центр

которого наносят каплю бактериальной суспензии. Затем специальное предметное стекло с лункой, края которой предварительно смазаны вазелином, прижимают к покровному стеклу так, чтобы капля находилась в центре лунки. Препарат переворачивают покровным стеклом вверх. В правильно приготовленном препарате капля должна свободно висеть над лункой, не касаясь ее дна или краев. Для микроскопии используют вначале сухой объектив х8, под увеличением которого находят края капли, а затем устанавливают объектив х40 и исследуют препарат.

**Приготовление фиксированных препаратов.** Для приготовления препарата на обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия, в которую бактериологической петлей вносят исследуемый материал и круговыми движениями петли распределяют его таким образом, чтобы получить тонкий и равномерный мазок диаметром 1-1,5 см. Если исследуют жидкий материал, то его наносят на предметное стекло непосредственно петлей и готовят мазок. Мазки высушивают на воздухе.

Для **фиксации** используют физические и химические методы. Для фиксации мазка физическим методом предметное стекло медленно проводят 3 раза через пламя горелки. Мазки крови, мазки-отпечатки органов и тканей фиксируют химическим методом путем погружения их на 5-20 минут в метиловый или этиловый спирт, смесь Никифорова и другие фиксирующие жидкости.

Для **окрашивания** микробов используют простые и сложные методы. При простом методе фиксированный мазок окрашивают каким-либо одним красителем, например, водным раствором фуксина (1-2 минуты) или метиленовым синим (3-5 минут), промывают водой, высушивают и микроскопируют. Сложные методы окрашивания включают последовательное использование нескольких красителей. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других.

#### **Техника микроскопирования с иммерсионной системой**

Для бактериоскопического исследования микроорганизмов наиболее часто применяют иммерсионные объективы. В отличие от сухих объективов, при работе с которыми между препаратом и линзой объектива находится воздух, при использовании иммерсионных объективов между линзой объектива и препаратом помещают жидкость, имеющую показатель преломления, близкий показателю преломления стекла. Роль такой жидкости выполняет иммерсионное масло, чаще всего - кедровое масло. Лучи света, проходя через однородную оптическую среду (стекло и масло), не меняют своего направления. Это позволяет существенно повысить четкость изображения. Иммерсионные объективы отличаются от сухих объективов по своему устройству (подвижная фронтальная линза) и по внешнему виду: на их оправе имеется черная круговая нарезка и выгравировано обозначение МИ (масляная иммерсия).

Для микроскопии с иммерсионным объективом требуется хорошее освещение объекта. Для этого используется дополнительная система линз, расположенная под предметным столиком – конденсор. При подготовке микроскопа к работе конденсор с помощью специального винта перемещают вверх до упора. На окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и помещают стекло на предметный столик. Под визуальным контролем сбоку опускают объектив до

соприкосновения с каплей. После погружения объектива в каплю масла вращением макрометрического винта определяют контуры объекта, а затем с помощью микрометрического винта устанавливают четкое изображение объекта.

После окончания микроскопии иммерсионный объектив поднимают, препарат убирают, а фронтальную линзу объектива протирают от остатков масла мягкой салфеткой. Затем объектив переводят на малое увеличение или в нейтральное положение и опускают конденсор.

### Самостоятельная работа.

На практическом занятии студенты изучают устройство светового микроскопа и проводят микроскопирование готовых препаратов с использованием иммерсионной системы. Результаты микроскопирования зарисовывают в рабочей тетради.

### Иллюстративный материал



Устройство светового микроскопа.



Иммерсионное масло.

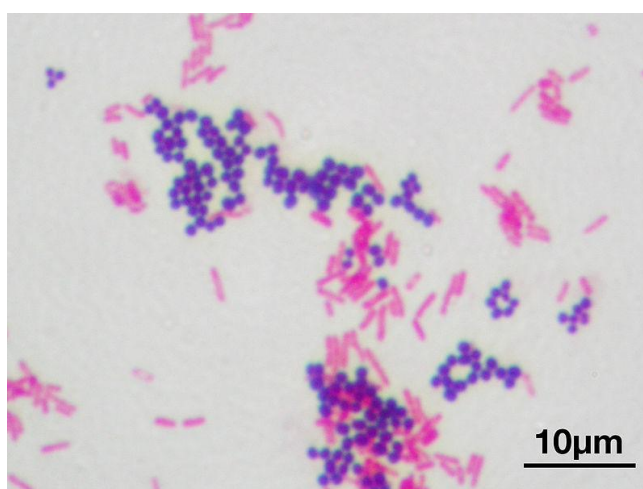




Нанесение на препарат иммерсионного масла.



Микроскопирование препарата с иммерсионной системой.



Грамположительные (синие) и грамотрицательные (розовые) клетки при иммерсионной микроскопии.

### **Тема 3: Приготовление препарата для микроскопического исследования. Окраска препарата по Граму.**

**Цель занятия:** Обучить студентов методике приготовления препарата для микроскопического исследования и технике окраски препарата по Граму.

**Задачи занятия:**

1. Освоение студентами методики приготовления препаратов для микроскопического исследования.

2. Освоение методики окраски препарата по Граму.

После изучения темы студент должен:

**знать:**

- правила приготовления препаратов для микроскопического исследования;

**уметь:**

- пользоваться световым микроскопом;

**владеть:**

- методикой окраски препарата по Граму;

- техникой микроскопирования с иммерсионной системой.

### **Справочные материалы**

**Приготовление препаратов.** Для приготовления препарата на обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия, в которую бактериологической петлей вносят исследуемый материал и круговыми движениями петли распределяют его таким образом, чтобы получить тонкий и равномерный мазок диаметром 1-1,5 см. Если исследуют жидкий материал, то его наносят на предметное стекло непосредственно петлей и готовят мазок. После приготовления препарата петлю прокаливают в пламени спиртовки. Для приготовления препарата из жидкой микробной культуры можно использовать пастеровскую пипетку, которую после нанесения капли на стекло помещают в емкость с дезинфицирующим раствором. Приготовленные мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре. Для ускорения высыхания препарат можно осторожно подогреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем спиртовки. Правильно высушенный препарат имеет вид сплошного белого налета на поверхности предметного стекла.

**Фиксацию** препарата осуществляют физическим методом: предметное стекло медленно проводят 3 раза через пламя спиртовки.

**Методика окрашивания бактерий по Граму:**

1. На фиксированный препарат наносят несколько капель раствора генцианового фиолетового или помещают полоску фильтровальной бумаги, на которую наливают раствор красителя. Краситель выдерживают в течение 1-2 минут, после чего избыток красителя сливают или снимают фильтровальную бумагу.

2. Не промывая препарата, наносят несколько капель раствора Люголя и выдерживают в течение 1-2 минут до почернения препарата. Избыток красителя сливают.

3. На препарат наносят несколько капель этилового спирта (96%) и выдерживают в течение 30 секунд. После этого спирт сливают, препарат промывают водой, избыток воды сливают.

4. На препарат наносят несколько капель раствора фуксина и выдерживают в течение 1-2 минут. Избыток красителя смывают водой.

5. Препарат высушивают фильтровальной бумагой и досушивают на воздухе.

#### **Порядок микроскопирования:**

1. Зеркало микроскопа устанавливают в соответствии с освещением (естественное или искусственное) и под малым увеличением (объектив х40, окуляр х7) и поднятом конденсоре регулируют освещенность поля зрения.

2. На окрашенный препарат капают каплю иммерсионного масла и препарат устанавливают на предметный столик микроскопа (при необходимости препарат закрепляют держателями).

3. Обычный объектив микроскопа заменяют на иммерсионный (х90).

4. Наблюдая сбоку, с помощью макрометрического винта осторожно опускают тубус до соприкосновения иммерсионного объектива с маслом.

5. Наблюдая в окуляр и осторожно поворачивая макрометрический винт, определяют контуры микробных клеток и с помощью микрометрического винта добиваются их ясного изображения. Изучают препарат.

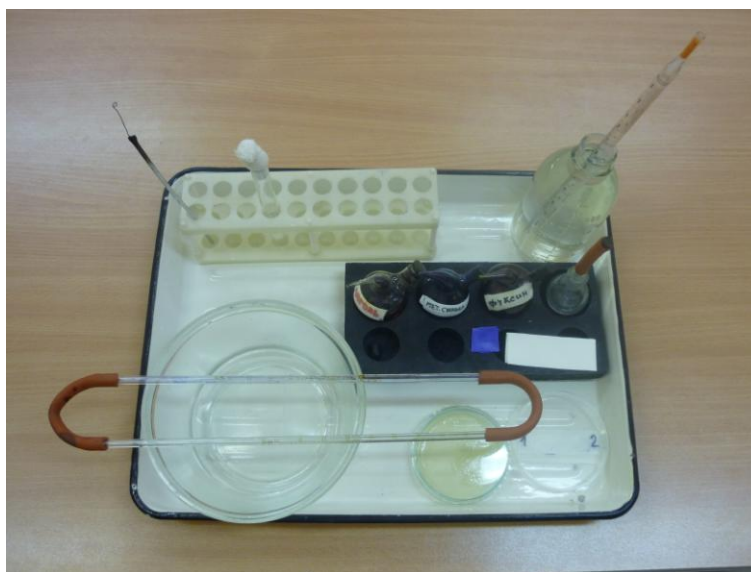
6. Поднимают тубус и убирают препарат с предметного столика. Объектив протирают мягкой салфеткой, смоченной бензином.

7. Револьвер устанавливают в нейтральное положение, подкладывают под него салфетку, опускают револьвер и конденсор.

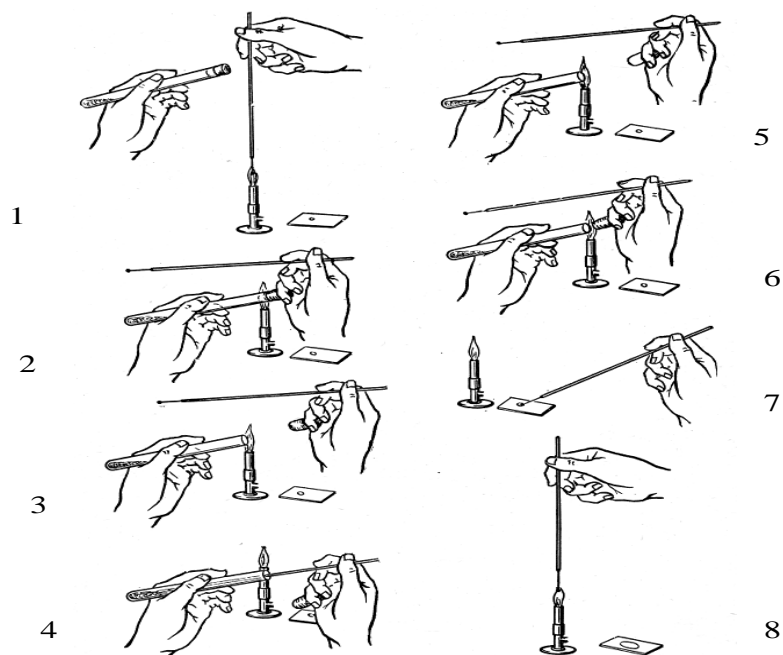
#### **Самостоятельная работа.**

На практическом занятии студенты готовят препараты грамположительных и грамотрицательных бактерий, окрашивают их по Граму и микроскопируют с иммерсией.

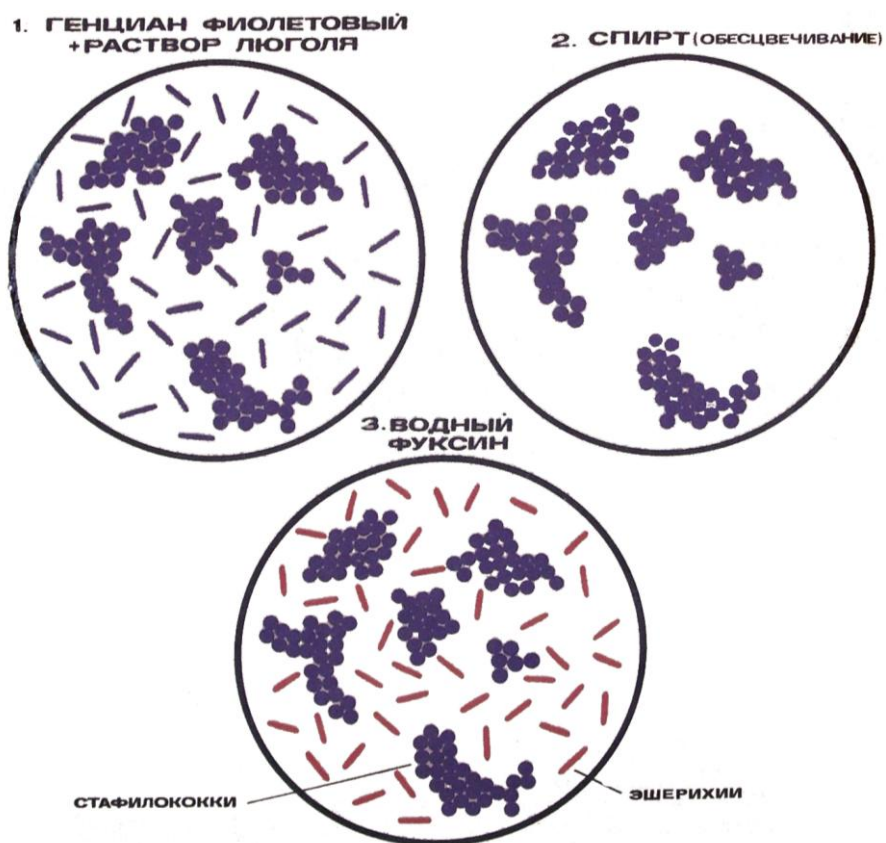
### **Иллюстративный материал**



Рабочее место для окрашивания препаратов.



Этапы приготовления препаратов для микроскопического исследования.



Этапы окраски препарата по Граму.



Нанесение на предметное стекло воды.



Отбор культуры с питательной среды.



Фиксирование препарата.



Смачивание водой бумажки Синева.



Нанесение раствора Люголя.



Нанесение спирта.



Промывание препарата водой.



Нанесение раствора фуксина.



Промывание препарата.



Высушивание препарата.



Нанесение на препарат иммерсионного масла.



Микроскопирование препарата с иммерсионной системой.

**Тема 4: Питательные среды. Посев микроорганизмов на плотные и в жидкие питательные среды.**



**Цели занятия:** Познакомить студентов с классификацией питательных сред. Обучить студентов технике посева микроорганизмов в жидкие и на плотные питательные среды.

**Задачи занятия:**

1. Ознакомление студентов с микробиологическими питательными средами.
2. Овладение студентами техники посева микроорганизмов в жидкие и на плотные питательные среды.

После изучения темы студент должен:

**знать:**

- классификацию питательных сред;
- правила посева культур на плотные и в жидкие питательные среды;

**уметь:**

- пользоваться бактериологической петлей;

**владеть:**

- методикой посева культур в жидкие и на плотные питательные среды;
- микробиологическим понятийным аппаратом.

## Справочные материалы

### **Питательные среды, их классификация.**

Микроорганизмы культивируют на питательных средах. Питательные среды подразделяются на группы в зависимости от свойств.

**По физическому состоянию** питательные среды подразделяются на:

- жидкие среды;
- полужидкие среды;
- твердые (плотные) среды;

**Жидкие среды** представляют собой настои, отвары, бульоны, приготовленные на основе мяса, рыбы, овощей (естественные среды), а также композиции определенных концентраций химических соединений (искусственные среды). **Полужидкие среды** получают путем добавления к жидким средам 0,5-0,9% агар-агара (желеобразующее вещество, получаемое из морских водорослей). К **плотным питательным средам** относят среды, содержащие 2-3% агара.

**По сложности** питательные среды подразделяются на:

- **простые**, или обычные среды (пептонная вода, мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар);
- **сложные**, или специальные среды (кровяной агар, асцитический агар и бульон, мясо-пептонный сахарный бульон, сывороточный агар и бульон, свернутая сыворотка, кровяной бульон).

**По происхождению** питательные среды подразделяются на:

- естественные среды;
- полусинтетические среды;
- синтетические среды.

**Естественные питательные среды** - это природные органические среды непостоянного состава, которые включают продукты животного или растительного происхождения. К ним относятся пептоны, кровь, отвары и экстракты, полученные из природных субстратов (мясо, рыба, крупы).

**Полусинтетические среды** кроме органических и неорганических веществ известного состава содержат продукты природного происхождения (картофельная среда с глюкозой, дрожжевая среда).

**Синтетические питательные среды** состоят из определенных количеств органических и неорганических химических соединений известного состава.

**По набору питательных веществ** выделяют:

- **минимальные среды**, которые содержат лишь источники питания, достаточные для роста;
- **богатые среды**, в состав которых входят многие дополнительные вещества.

В зависимости от назначения питательных сред различают:

- основные среды;
- элективные (селективные) среды;
- дифференциально-диагностические среды;
- накопительные среды (среды обогащения).

К **основным средам** относятся мясо-пептонный агар и мясо-пептонный бульон. На этих средах растет большинство бактерий.

**Дифференциально-диагностические среды** - это сложные среды, позволяющие изучать биохимические свойства бактерий. Эти среды используются для определения вида бактерий.

**Элективные (селективные) питательные среды** содержат вещества, подавляющие рост одних бактерий, и не влияющие на рост других бактерий. Эти среды служат для выделения определенного вида бактерий из смешанных популяций.

**Накопительные питательные среды** (среды обогащения) - это среды, на которых определенные виды культур растут быстрее и интенсивнее сопутствующих.

**Посев микроорганизмов на питательные среды.** Техника посева зависит от характера исследуемого материала и консистенции питательной среды.

Жидкий материал для посева берут бактериологической петлей или стерильной пипеткой. Все манипуляции проводят вблизи пламени спиртовки. Бактериологическую петлю перед взятием материала и по окончании посева стерилизуют прокаливанием в пламени спиртовки. Пипетки после посева погружают в емкость с дезраствором.

При посеве **в жидкую питательную среду** петлю с материалом погружают в среду и легким покачиванием смывают материал. При использовании пипетки материал сливают в среду.

При посеве **на скошенный питательный агар** в пробирке петлю с материалом вносят вблизи пламени спиртовки в пробирку и материал штрихом распределяют по поверхности агара.

Посев материала **на агар в чашке Петри** проводят с помощью бактериологической петли, шпателя или тампона. Посев бактериологической петлей проводят штрихом по поверхности агара. С помощью шпателя или тампона исследуемый материал распределяется по поверхности среды круговыми движениями.

Для посева **в толщу питательной среды** материал вносят в стерильную чашку Петри или в пробирку, добавляют остуженный (40-45<sup>0</sup>С) расплавленный агар

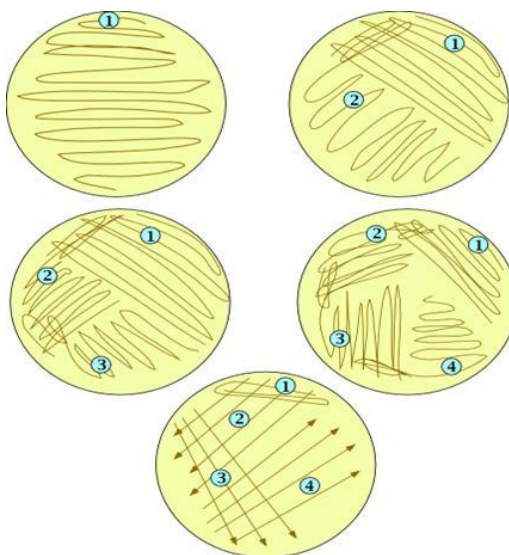
и перемешивают.

Посев уколом в столбик питательной среды проводят с помощью бактериологической иглы или петли путем прокалывания столбика среды.

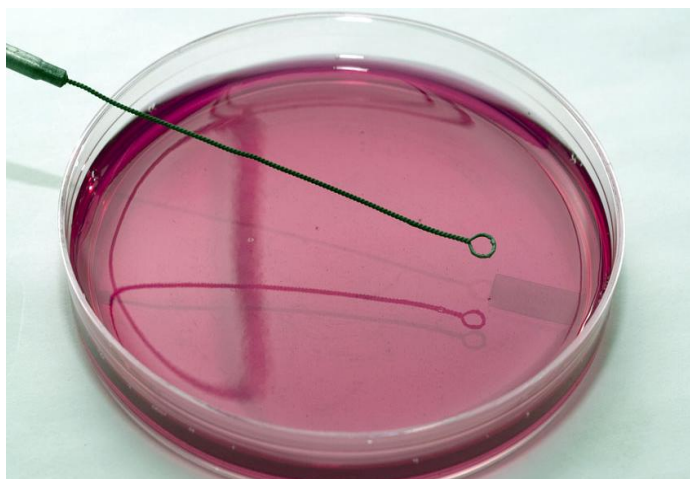
### Самостоятельная работа.

Каждый студент проводит пересев бактерий из жидких и с агаровых культур на плотные и в жидкие питательные среды. Порядок пересевов студенты записывают в рабочую тетрадь.

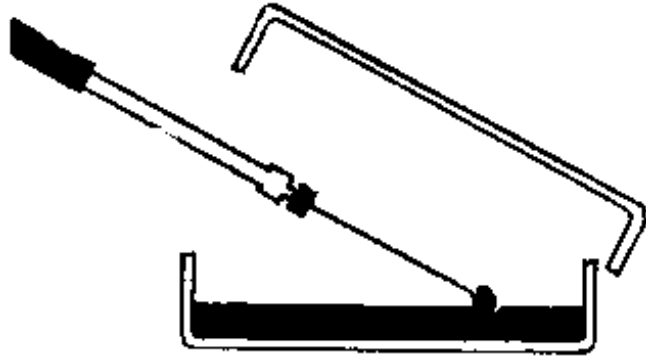
### Иллюстративный материал



Варианты посева штрихом.



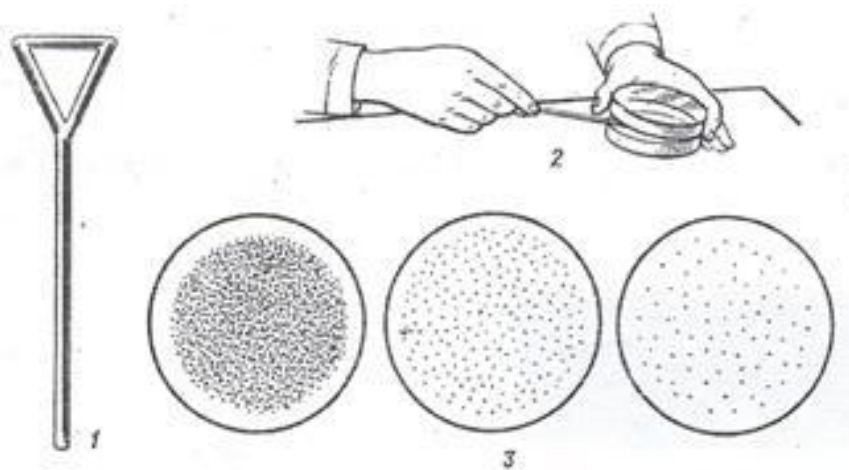
Расположение петли при посеве штрихом.



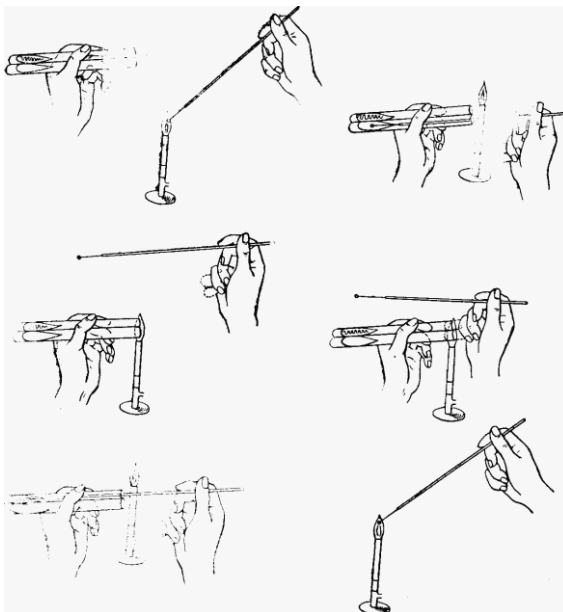
Посев в чашку Петри.



Посев тампоном.



Посев по Дригальскому.



Посев из пробирки в пробирку.

### **Тема 5: Антибиотики. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.**

**Цели занятия:** Изучить со студентами классификацию антибактериальных препаратов, механизмы действия антибиотиков на бактерии, методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

**Задачи занятия:**

1. Изучение классификации антибактериальных препаратов.
2. Изучение механизмов действия антибактериальных препаратов на микробную клетку.
3. Изучение методов определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

После изучения темы студент должен:

**знать:**

- классификацию антибиотиков;
- механизмы действия антибиотиков на бактерии;

**уметь:**

- определять чувствительность бактерий к антибиотикам методом дисков;

**владеть:**

- микробиологическим понятийным аппаратом.

### **Справочные материалы**

#### **Химиотерапевтические препараты:**

**По спектру активности:**

- действующие на клеточные формы микроорганизмов (антибактериальные, противогрибковые, противопротозойные). Антибактериальные препараты кроме того подразделяются на препараты широкого спектра действия (действуют на грамположительные и грамотрицательные бактерии) и препараты узкого спектра

действия (действуют только на грамположительные или только на грамотрицательные бактерии);

- действующие на неклеточные формы (противовирусные препараты).

**По направленности действия (по объекту):**

1. Противобактериальные препараты:

- бета-лактамы антибиотики (пенициллины, цефалоспорины);
- стрептомицины;
- макролиды (эритромицин, олеандомицин);
- аминогликозиды (канамицин, мономицин, неомицин, тобрамицин, сизомицин, гентамицин);
- тетрациклины;
- гликопептиды (ванкомицин, линкомицин);
- хлорамфеникол (левомицетин);
- противотуберкулезные препараты (ПАСК);
- фосфомицины;
- фторхинолоны.

2. Противовирусные препараты (амантадин, ремантадин).

3. Противогрибковые препараты.

**По типу действия:**

- микробицидные (бактерицидные, фунгицидные), то есть губительно действующие на микроорганизмы;
- микростатические (бактериостатические), то есть ингибирующие рост и размножение микроорганизмов.

**Сульфаниламидные препараты (сульфаниламиды)** - это химиотерапевтические препараты, являющиеся производными сульфаниловой кислоты. К ним относятся норсульфазол, сульфадимезин, сульфадиметоксин, фталазол и другие препараты.

**Антибиотики** - это препараты биологического (микробного, растительного, животного), полусинтетического или синтетического происхождения, которые в малых концентрациях вызывают торможение размножения или гибель чувствительных к ним микробов во внутренней среде организма. Основными источниками получения антибиотиков являются актиномицеты, плесневые грибы и некоторые бактерии.

**Классы антибиотиков по химической структуре:**

- бета-лактамы;
- гликопептиды;
- аминогликозиды;
- тетрациклины;
- макролиды;
- линкозамиды;
- левомицетин;
- рифамицины;
- полипептиды;
- полиены;
- разные антибиотики.

**Механизмы действия сульфаниламидов и антибиотиков:**

- ингибирование синтеза веществ, входящих в состав клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины, циклосерин, бацитрацин);
- ингибирование функций цитоплазматической мембраны - нарушение проницаемости клеточной мембраны (полимиксины, нистатин, колистин, амфотерицин В);
- ингибирование синтеза белка (тетрациклины, аминогликозиды, эритромицин, линкомицин, хлорамфеникол);
- ингибирование синтеза нуклеиновых кислот (налидиксовая кислота, рифампицин, фторхинолоны).

### **Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам**

1. **Метод серийных разведений в жидких средах.** В жидкие среды с серийными разведениями антибиотиков вносят исследуемую культуру, инкубируют посеvy при 37°C, и учитывают результаты визуально или нефелометрически. Этот метод позволяет установить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) препарата для возбудителя. **МИК** соответствует наибольшему разведению препарата, тормозящему рост тест-культуры.

2. **Метод серийных разведений в плотных средах.** Метод аналогичен предыдущей процедуре, но проводится на плотных питательных средах. При использовании этого метода готовят двойные серийные разведения антибиотика в расплавленном агаре, который затем вносят в чашки Петри и засевают исследуемой культурой. После инкубирования посевов определяют МИК по отсутствию роста на чашках, содержащих наименьшие концентрации препарата.

3. **Диффузионные методы.** Эти методы менее чувствительны, чем методы стандартных разведений, но проще по выполнению. На практике их применяют чаще.

**3.1. Классический метод.** На питательную среду в чашке Петри наносят исследуемую культуру и равномерно ее распределяют по поверхности среды. В агаре пробивают лунки и в каждую вносят по 0,1 мл раствора исследуемого антибиотика, после чего инкубируют при 37°C. После инкубирования в оптимальных условиях измеряют диаметр зоны подавления роста для каждого препарата.

**3.2. Метод дисков** (стандартный тест, чашечный или кольцевой метод, диско-диффузионный метод). После посева культуры на агар наносят диски из фильтровальной бумаги, пропитанные антибиотиками разной концентрации (используют коммерческие образцы, содержащие определенные концентрации). После инкубации при 37°C определяют диаметры зон торможения роста микроорганизмов и сравнивают с величинами зон задержки роста, указанными в инструкциях, прилагаемых к дискам. Вокруг дисков в зависимости от активности и концентрации антибиотика образуются разной величины зоны задержки роста микроба. Зоны точно измеряют с помощью циркуля и линейки.

### **Самостоятельная работа:**

**Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом стандартных индикаторных дисков.** В подсушенную чашку с МПА вносят 2-3 мл культуры исследуемого микроба (концентрация - 1 млрд., разведенная 1:1000). Культуру распределяют по всей поверхности среды путем покачивания чашки. Избыток культуры удаляют пипеткой. На поверхность среды размещают

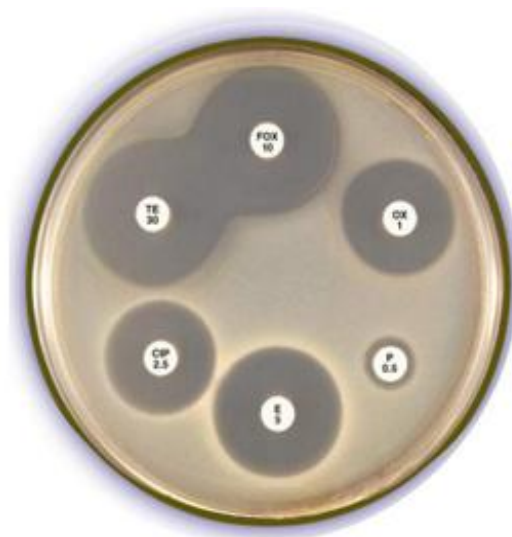
стандартные индикаторные диски, пропитанные антибиотиками. Расстояние дисков от края чашки должно быть не менее 1,5 см. Расстояние между дисками также должно быть не менее 1,5 см. На чашку помещают 5-6 дисков. Чашки инкубируют в термостате при 36<sup>0</sup>С в течение 18-24 часов.

Учет результатов проводится путем измерения диаметров зон ингибирования роста бактерий.

### Иллюстративный материал



Диски с антибиотиками.



Результат определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом дисков.





Измерение зон ингибирования роста бактерий.

### **Тема 6: Микрофлора почвы, воды, воздуха.**

**Цель занятия:** Изучить со студентами микрофлору почвы, воды, воздуха.

**Задачи занятия:**

1. Изучение микрофлоры почвы и методов определения микробного загрязнения почвы.
2. Изучение микрофлоры воды и методов определения микробного загрязнения воды.
3. Изучение микрофлоры воздуха и методов определения микробного загрязнения воздуха.
4. Обучить студентов методике определения микробного загрязнения воздуха седиментационным методом.

После изучения темы студент должен:

**знать:**

- микрофлору воды, почвы, воздуха;
- методы определения загрязненности микроорганизмами почвы, воды и воздуха;

**уметь:**

- определять микробную загрязненность воздуха седиментационным методом;

**владеть:**

- микробиологическим понятийным аппаратом.

### **Справочные материалы**

#### **Микрофлора почвы**

Находящиеся в почве микроорганизмы подразделяются на две группы:

- **аутохтонные микроорганизмы (резидентные микроорганизмы, резидентная микрофлора)**, то есть микробы, которые присутствуют только в конкретном типе почвы;
- **аллохтонные микроорганизмы (транзиторная микрофлора)**, то есть те микроорганизмы, которые в обычных условиях в почве не встречаются.

В плодородной почве общая биомасса бактерий достигает 500 кг/га и более. Наибольшее значение для почв имеют азотфиксирующие бактерии (*Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Mycobacterium* и другие). К типичным почвенным бактериям относятся актиномицеты и спорообразующие палочки родов *Bacillus* и *Clostridium*.

Наиболее многочисленны микроорганизмы в верхнем 5-15-сантиметровом слое, меньше их на глубине 20-30 см и минимальное количество на глубине 30-40 см. Однако бактерии найдены в почве даже на глубине 5 м.

Почва населенных мест загрязняется твердыми и жидкими отбросами, выделениями людей и животных, остатками растений, хозяйственно-бытовыми и промышленными сточными водами. Особенно опасны сточные воды боен, мясокомбинатов, предприятий по переработке кожи, шерсти, которые могут содержать патогенные бактерии. В связи с этим почва может служить фактором передачи возбудителей инфекционных заболеваний. Наиболее длительно живут спорообразующие микробы – возбудители столбняка, ботулизма, сибирской язвы.

**Микробиологическое исследование** почвы проводят для ее санитарной оценки, характеристики процессов самоочищения, оценки методов обезвреживания отбросов, при определении пригодности участков для строительства, а также при эпидемиологических и эпизоотологических обследованиях с целью выяснения путей заражения почвы, продолжительности выживания в ней патогенных микробов и т. д.

**Отбор проб почвы** производят с квадратного участка (не менее 5x5 м) из 5 точек - из каждого угла и центра квадрата (“метод конверта”). Образцы забирают в условиях асептики с глубины 20-30 см. Объем образцов 1 кг.

Наличие в почве бактерий группы кишечной палочки свидетельствует о ее свежем фекальном загрязнении. Обнаружение *Cl. perfringens* в почве указывает на ее давнее фекальное загрязнение.

### **Микрофлора воды**

**Микрофлору водоемов** образуют две группы:

- **аутохтонная микрофлора** – совокупность микроорганизмов, постоянно живущих и размножающихся в воде;
- **аллохтонная микрофлора** – совокупность микроорганизмов, случайно попавших в воду и сохраняющихся в ней сравнительно короткое время.

В соответствии с действующими нормативными документами обязательному микробиологическому контролю подлежит вода питьевая (центрального и местного водоснабжения).

**Отбор проб.** Для отбора проб питьевой воды используют стерильные флаконы ёмкостью 500 мл. Предварительно проводят обжигание водопроводных кранов пламенем и пропускают воду в течение 10-15 минут при полностью открытом кране.

### **Показатели загрязнения:**

- *E. coli* – свежее фекальное загрязнение;
- *Citrobacter*, *Enterobacter* – давнее фекальное загрязнение;
- *Cl. perfringens (sporogenes)* – как свежее, так и давнее фекальное загрязнение;
- термофильные бактерии – загрязнение разлагающимися отбросами;
- протей – гнилостный распад.

## Микрофлора воздуха

Воздух – неблагоприятная среда для размножения микроорганизмов (отсутствие питательных веществ, солнечные лучи, высушивание). **Состав микрофлоры воздуха** – это пигментные сапрофитные бактерии (микрококки, сарцины), актиномицеты, плесневые, дрожжевые грибы и др.

Наибольшее количество микроорганизмов содержит воздух крупных промышленных городов. Воздух же полей, лесов, лугов, а также над водными пространствами, в удалении от населенных пунктов отличается сравнительной чистотой. Значительные изменения претерпевает микрофлора воздуха в зависимости от времени года. Максимальное количество микробов обнаруживают в летнее время, а минимальное – в зимнее время.

Микробиологическое исследование воздуха проводится с помощью седиментационного или фильтрационного методов.

**Седиментационный метод Коха** - спонтанное оседание бактериальных частиц и капель под действием силы тяжести на поверхность питательной среды открытой чашки Петри. При этом читается, что в соответствии с формулой В.Л. Омелянского на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри площадью  $100 \text{ см}^2$  за 5 минут оседает такое количество бактерий, которое содержится в 10 л воздуха.

Для определения чистоты воздуха при седиментационном методе чашки выдерживают открытыми в течение 60 минут, а затем инкубируют при  $37^\circ\text{C}$ . Результаты оценивают следующим образом:

- менее 250 колоний – чистый воздух;
- 250-500 колоний – средняя степень загрязненности;
- более 500 колоний – загрязненный воздух.

При **фильтрационных методах** отбор проб воздуха осуществляется с помощью различных приборов и аппаратов. В частности при использовании аппарата Кротова отбор проб воздуха (по 100 л) производится над двумя чашками Петри с мясо-пептонным агаром. Посевы культивируют 48 часов при  $37^\circ\text{C}$ . После инкубирования подсчитывают число колоний на питательной среде и вычисляют количество бактерий в исследуемом воздухе.

Подсчет микробного числа для определения чистоты воздуха при использовании аспирационного метода (прибора Кротова) проводится по формуле:

$X = 1000a / V$ , где  $a$  – количество колоний на чашке;  $V$  – объем прокаченного воздуха.

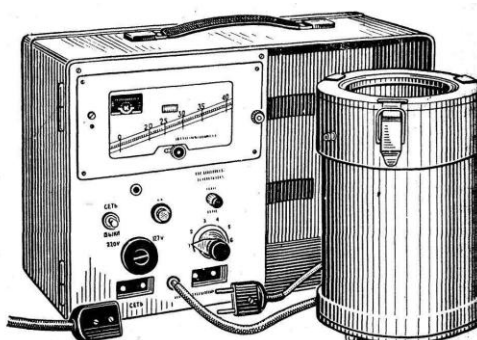
### Самостоятельная работа.

Студенты определяют микробную загрязненность воздуха седиментационным методом Коха. Для этого открытую чашку с МПА на 5 минут оставляют в помещении на уровне рабочего стола, после чего убирают в термостат при  $37^\circ\text{C}$  на 24 часа. Расчет микробного числа проводится по эмпирической формуле Омелянского: на поверхности среды в чашке Петри площадью  $100 \text{ см}^2$  в течение 5 минут оседает такое же количество бактерий, которое содержится в 10 л воздуха.

## Иллюстративный материал



Прибор вакуумного фильтрования.



Аппарат Кротова.



Пробоотборник бактериологический Тайфун Р-40.



Прибор ПУ-1Б.



Пробоотборники.



Пробоотборник MAS-100.

### **Тема 7: Нормальная микрофлора тела человека.**

**Цель занятия:** Изучить со студентами нормальную микрофлору тела человека и ее значение для организма.

**Задачи занятия:**

1. Изучение нормальной микрофлоры различных областей тела человека.
2. Изучение физиологического значения нормальной микрофлоры тела человека.
3. Изучение роли дисбиотических состояний в развитии заболеваний.

После изучения темы студент должен:

**знать:**

- нормальную микрофлору тела человека;
- роль нормальной микрофлоры в жизнедеятельности организма;

**уметь:**

- готовить препараты зубного налета для микроскопического исследования;

**владеть:**

- микробиологическим понятийным аппаратом.

### **Справочные материалы**

В организме человека обитают примерно 500 видов микроорганизмов, составляющих его нормальную микрофлору. Макроорганизм и его микрофлора в нормальных условиях находятся в состоянии динамического равновесия (**эубиоза**), которое сложилось в процессе эволюции.

Открытыми биологическими системами (**биотопами**), которые сообщаются с внешней средой, являются кожа, респираторный тракт, желудочно-кишечный тракт, наружные половые органы. Они заселяются микроорганизмами, среди которых доминируют бактерии. Простейшие и вирусы представлены значительно меньшим числом видов.

В норме от микроорганизмов свободны кровь, ликвор, синовиальная жидкость, костный мозг, брюшная полость, плевральная полость, матка.

Естественную микрофлору любых биотопов подразделяют на **резидентную** (или постоянную) и **транзиторную** (или случайную). Если постоянная микрофлора содержит представителей, специфичных для данного биотопа, то случайная состоит из особей, занесенных извне. Так, в желудочно-кишечном тракте могут оказаться посторонние микроорганизмы, попавшие с пищей. Кожные покровы наиболее часто контаминируются случайной микрофлорой из окружающей среды. В трахее, бронхах, легких, пищеводе также может обнаруживаться транзиторная микрофлора.

**Постоянная микрофлора** конкретного биотопа относительно стабильна по составу. Вместе с тем состав и физиологическая роль составляющих ее микроорганизмов далеко не равнозначны. Поэтому в постоянной микрофлоре различают две фракции: **облигатную** и **факультативную**.

**Облигатная микрофлора** является главной составляющей любого микробиоценоза, она противодействует заселению биотопа случайными микроорганизмами, участвует в процессах ферментации, иммуностимуляции, то есть выполняет защитную функцию.

**Факультативная микрофлора** составляет меньшую часть постоянных обитателей биотопа. Если постоянная микрофлора проявляет себя преимущественно бродильной активностью (то есть расщеплением углеводов с образованием кислых продуктов), то факультативная фракция весьма активно участвует в гнилостных процессах (распаде белковых веществ с образованием щелочных продуктов).

### **Микрофлора кожи**

Кожный покров является наиболее обширной областью человеческого тела, доступной для постоянных контактов с микроорганизмами окружающей среды.

В состав **резидентной** микрофлоры кожи входят, в основном, грамположительные сапрофитные бактерии - непатогенные коринебактерии, стафилококки, микрококки.

К **транзиторной** микрофлоре относятся грамположительные сарцины, золотистый стафилококк, грибы рода *Candida*, плесневые грибы. По типу дыхания микроорганизмы, заселяющие кожу, относятся к факультативным анаэробам. Основные зоны колонизации – поверхность ороговевших клеток эпидермиса, устья волосяных фолликулов, протоки сальных желез. На 1 см<sup>2</sup> кожи может находиться от 10 тыс. до 1 млн. бактериальных клеток. Бактерии расщепляют секреты сальных желез до ненасыщенных жирных кислот, при этом происходит сдвиг pH в кислую сторону. Кислая реакция среды и продукты метаболизма представителей

нормальной микрофлоры являются неблагоприятными факторами для патогенных бактерий, которые на поверхности здоровой кожи быстро погибают (в течение 5 минут). При ослаблении защитных реакций макроорганизма на коже возрастает количество грамотрицательных бактерий.

### **Микрофлора верхних дыхательных путей**

Наиболее колонизированы верхние отделы дыхательных путей, которые анатомически приспособлены для осаждения бактерий из вдыхаемого воздуха. Резидентная микрофлора полости носа и носоглотки представлена грамположительными зелеными и негемолитическими стрептококками, пептострептококками, микрококками, стафилококками, лактобактериями. Из грамотрицательных микроорганизмов здесь обитают непатогенные нейссерии и анаэробные неспорообразующие палочки - бактериоиды.

### **Микрофлора желудочно-кишечного тракта**

**Полость рта** – один из наиболее заселенных участков тела человека – там обнаруживается около 300 видов микроорганизмов. В полости рта обитают представители всех морфологических форм бактерий: кокки, палочки, извитые формы, а также простейшие, грибы, вирусы. Высокой обсемененности полости рта способствуют ее анатомические особенности (наличие десневых карманов, складок слизистой, межзубных промежутков), обилие питательных веществ, щелочная реакция среды, достаточное снабжение кислородом. Более 90% всей микрофлоры составляют облигатные анаэробы (лактобактерии, фузобактерии, пептострептококки). Анаэробные условия создаются в зубодесневых карманах, зубном налете. В большом количестве обнаруживаются кокки, как грамположительные (стрептококки, стафилококки), так и грамотрицательные (нейссерии, вейлонеллы). В состав **транзитной** микрофлоры входят грамотрицательные палочки (протей, клебсиелла, кишечная палочка, бактериоиды), а также грамположительные спорообразующие палочки (бациллы и клостридии). Зеленящие стрептококки, обитающие в полости рта, вызывают развитие кариеса (*S. mutans*, *S. mitis*).

**Пищевод и желудок** у здоровых людей не имеет постоянной микрофлоры. Бактерии, которые обнаруживаются в пищеводе, соответствуют микробному пейзажу полости рта. В желудке, благодаря кислой среде, подавляющая часть бактерий погибает. Из **транзитной** микрофлоры желудка следует отметить лактобактерии, сарцины, дрожжеподобные грибы.

**В тонкой кишке** находится  $10^5$ - $10^8$  микроорганизмов на 1 мл содержимого. Здесь обнаруживаются бифидобактерии, лактобактерии, клостридии, энтерококки.

**В толстой кишке** наблюдается наибольшее количество микроорганизмов. В 1 г фекалий содержится до  $10^{12}$  микробных клеток. Около 95% всех видов микроорганизмов составляют анаэробные неспорообразующие бактерии.

В состав **облигатной микрофлоры** толстой кишки входят анаэробные грамположительные неспорообразующие палочки (бифидобактерии, лактобактерии); анаэробные грамположительные спорообразующие палочки (клостридии); анаэробные грамотрицательные палочки (бактериоиды); факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки (кишечная палочка); анаэробные грамположительные кокки (пептострептококки, пептококки).

По количественному составу в облигатной микрофлоре преобладают

бифидобактерии, бактериоиды, лактобактерии и кишечная палочка ( $10^{12}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  колониеобразующих единиц в одном грамме, сокращенно КОЕ/г, соответственно).

В состав **факультативной флоры** входят фузобактерии, протей, вейлонеллы, стафилококки, синегнойная палочка, клебсиеллы, а также дрожжеподобные грибы.

**Микрофлора мочеполового тракта.** Почки, мочеточники, мочевого пузыря, матка, простата стерильны. Микрофлора наружных гениталий представлена эпидермальными стафилококками, зелеными стрептококками, непатогенными микобактериями, дрожжеподобными грибами рода *Candida*.

На слизистой оболочке передней уретры в норме встречаются стафилококки, непатогенные нейссерии и спирохеты.

Микрофлора влагалища у женщин детородного возраста состоит в основном из лактобактерий, которые расщепляют гликоген с образованием молочной кислоты. Закисление среды подавляет рост и размножение патогенных бактерий и грибов. При уменьшении численности молочнокислой флоры усиливается размножение грамотрицательных энтеробактерий (кишечная палочка), дрожжеподобных грибов, энтерококков, стафилококков.

### **Значение нормальной микрофлоры организма человека**

Нормальная микрофлора выполняет важные физиологические функции, она участвует:

- в обменных процессах – регуляции газового состава кишечника, в расщеплении белков, липидов, нуклеиновых, жирных и желчных кислот;
- в регуляции моторной функции кишечника;
- в синтезе витаминов группы В, К, никотиновой, фолиевой кислот;
- в детоксикации эндогенных и экзогенных токсических продуктов;
- в процессах стимуляции формирования иммунной системы у новорожденных и поддержания иммунного статуса у взрослых;
- в предотвращении колонизации слизистых оболочек транзитными, в том числе патогенными или условно-патогенными микроорганизмами.

Антагонистическая активность нормальной микрофлоры реализуется с помощью следующих механизмов:

- Образование кислых продуктов, подавляющих рост микроорганизмов-конкурентов (молочная кислота, уксусная кислоты). Кислая среда препятствует размножению гнилостной и патогенной микрофлоры, стимулирует перистальтику кишечника;
- Биосинтез веществ, обладающих активностью антибиотиков (бактериоцинов);
- Конкуренция бактерий за пищевые субстраты;
- Конкуренция за площадь адгезии на клетках эпителия.

### **Нарушение состава нормальной микрофлоры**

При различных заболеваниях нарушается количественное и качественное соотношение представителей нормальной микрофлоры, что способствует размножению патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В этом случае развивается **дисбактериоз (дисбиоз)**.

**Дисбактериоз** – это количественное и качественное изменение состава



нормальной микрофлоры, приводящее к развитию или усугублению патологического процесса.

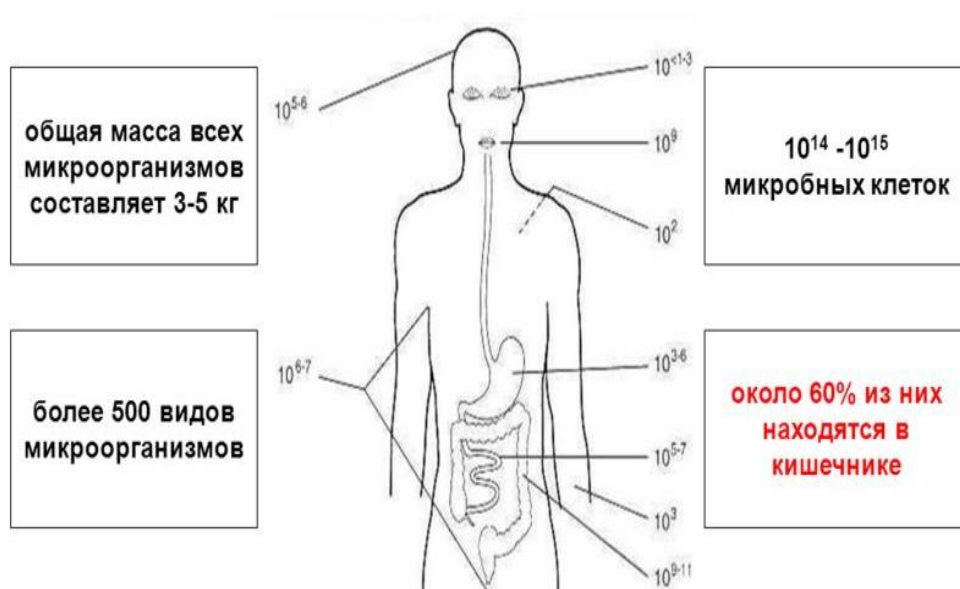
### Причины развития дисбактериоза:

- заболевания желудочно-кишечного тракта инфекционной или неинфекционной природы;
- нерациональное применение антибиотиков и химиопрепаратов;
- неполноценное (несбалансированное) питание (особенно у детей 1-го года жизни);
- злокачественные новообразования;
- хирургические вмешательства;
- гормональные нарушения;
- иммунодефицитные состояния.

### Самостоятельная работа.

Студенты готовят мазок из зубного налета, окрашивают его по Граму и микроскопируют. Зубной налет следует брать с помощью стерильной зубочистки у основания коренных зубов, смочив ее слюной. Взятый материал тщательно растирают в тонкий мазок на предварительно проведенном через пламя спиртовки предметном стекле. Затем мазок высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают по Граму. Студенты микроскопируют препарат, зарисовывают микроскопическую картину и обозначают виды обнаруженных бактерий, пользуясь рисунками.

### Иллюстративный материал



Микрофлора тела человека.



Микрофлора кожи.



Характерные представители микрофлоры кожи.



Микрофлора желудочно-кишечного тракта



Функции нормальной микрофлоры.

### Список учебной литературы

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.: ил.
2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: М: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2002. – 736 с.
3. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр “Академия”, 2006. – 464 с.
4. Галынкин В., Заикина Н., Кочеровец В. Основы фармацевтической микробиологии. 2008.
5. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник / В.И. Покровский, С.Г. Пак, Н.И. Брико, Б.К. Данилкин. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 816 с.: илл.
6. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для студентов мед. вузов / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - 5-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2012. – 759 с.: ил.
7. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 768 с.
8. Медицинская микробиология: учебник. 4-е изд. Поздеев О.К. / Под ред. В.И. Покровского. – 2010. – 768 с.
9. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева. Учебники и учеб. пособия для высшей школы. Издательство: Медицинское информационное агентство, 2012. – 702 с.
10. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 1 : учеб. по дисциплине “Микробиология, вирусология и иммунология” для студентов

учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 “Лечеб. дело”, 060103.65 “Педиатрия”, 060104.65 “Медико-профилактич. дело” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 448 с.: ил.

11. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 2 : учеб. по дисциплине “Микробиология, вирусология и иммунология” для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 “Лечеб. дело”, 060103.65 “Педиатрия”, 060104.65 “Медико-профилактич. дело” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 с.: ил.

12. Микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов (стоматология). / Под ред. В.Н. Царева. – М.: Практическая медицина, 2010. – 581 с.

13. Микробиология: учеб. для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальности 060301.65 “Фармация” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 608 с.: ил.

14. Одегова Т.Ф., Олешко Г.И., Новикова В.В. Микробиология. Учебник для фармацевтических вузов и факультетов. - Пермь, 2009. - 378 с.

15. Пожарская В.О., Райкис Б.Н., Казиев А.Х. Общая микробиология с вирусологией и иммунологией (в графическом изображении). Учебное пособие. М.: “Триада X”, 2004. – 352 с.

16. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / Колл. Авторы // Под редакцией Лабинской А.С., Волиной Е.Г. – М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 1080 с.: ил.

17. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II / Колл. авторов // Под редакцией Лабинской А.С., Костюковой Н.Н., Ивановой С.М. – М.: Издательство БИНОМ, 2010. – 1152 с.: ил.

18. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. акад. РАМН О.В. Бухарина. М.: Медицина; УрО РАН, 2002. 342 с.

19. Сбойчаков В.Б. Санитарная микробиология. Учебное пособие. 2007.

20. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: ОАО “Издательство “Медицина”, 2005. – 600 с.: ил.

21. Информационные ресурсы по микробиологии, вирусологии и иммунологии:

- <http://www.microbiology.ru>
- <http://ru.wikipedia.org>
- <http://www.virology.net>
- <http://immunology.ru>
- <http://www.rusmedserv.com>
- <http://www.molbiol.ru>

Иллюстрированное учебное пособие

Литусов Николай Васильевич

Общая микробиология