

Введение в микробиологию.

Предмет микробиологии.

Микробиология (от греч. micros- малый, bios- жизнь, logos- учение, т.е. учение о малых формах жизни) – наука о микроорганизмах. Объектом изучения микробиологии являются микроорганизмы – организмы, имеющие размеры в пределах 0,1 мм. К ним относятся простейшие, одноклеточные водоросли, микроскопические грибы, бактерии, вирусы. По наличию и строению клеток вся живая природа может быть разделена на прокариоты (не имеющие истинного ядра), эукариоты (имеющие ядро) и не имеющие клеточного строения формы жизни. Последние для своего существования нуждаются в клетках, т.е. являются внутриклеточными формами жизни.

К прокариотам, объединяющим эубактерии и архебактерии, относят бактерии, низшие (сине- зеленые) водоросли, спирохеты, актиномицеты, архебактерии, риккетсии, хламидии, микоплазмы. Простейшие, дрожжи и нитчатые грибы- эукариоты. Микроорганизмы заселяли Землю еще 3 - 4 млрд. лет назад, задолго до появления высших растений и животных. Микробы представляют самую многочисленную и разнообразную группу живых существ. Микроорганизмы чрезвычайно широко распространены в природе и являются единственными формами живой материи, заселяющими любые, самые разнообразные субстраты (среды обитания), включая и более высокоорганизованные организмы животного и растительного мира.

Микроорганизмы создали атмосферу, осуществляют кругооборот веществ и энергии в природе, расщепление органических соединений и синтез белка, способствуют плодородию почв, образованию нефти и каменного угля, выветриванию горных пород, многим другим природным явлениям.

Направления микробиологии.

Водная микробиология, Почвенная микробиология, Медицинская и ветеринарная микробиология, Сельскохозяйственная микробиология, Космическая микробиология, Геологическая микробиология и Генетика микроорганизмов.

1.1. История изучения микроорганизмов.

До XV в. предполагали, что болезни вызывают «миазмы» — особые болезнетворные испарения, содержащиеся в воздухе. Теорию «болезнетворных миазмов» в IV в. до н. э. создал *Гиппократ*. Его теория была подвергнута пересмотру в V в. до н. э. греческим ученым *Фукидидом*. Наблюдая ужасы чумы, свирепствовавшей во время пелопонесской войны, он предположил, что заболевания вызывают не столько болезнетворные миазмы, сколько мельчайшие живые частицы, проникающие в организм человека через рот, — явление, получившее у римлян название *contagium vivum*. Столь гениальное предвидение микробной теории начало утверждаться лишь в XIX столетии.

Позднее итальянский врач *Д. Фракасторо (1478-1553)*, развивая учение о «контагии», писал, что контагий представляет собой инфекционного возбудителя. Попадая, например в организм, этот возбудитель активно размножается и быстро распространяется по всему телу. Своей гениальной догадкой Фракасторо, как и Фукидид, предвосхитил открытие микробов.

Первые оптические приборы появились тысячи лет назад: в Древнем Вавилоне находили двояковыпуклые линзы из горного хрусталя. Дальнейшее совершенствование оптической техники относится к XVI–XVII вв. и связано с развитием астрономии. Микроскоп был создан в 1610 г. Г. Галилеем (1564-1642). Изобретение микроскопа открыло новые возможности для изучения живой природы. Р. Гук (1635-1703) обнаружил ячеистое строение древесной ткани и ввел термин «клетка» («Микрография», 1665). Дальнейшие этапы изучения микромира связаны с совершенствованием оптических приборов. Открытие невидимого мира принадлежит голландскому ученому *А. ван Левенгуку (1632—1723)*. Система Левенгука давала линейное увеличение в 280 раз. Благодаря интересным открытиям, сделанным при помощи микроскопов, А. ван Левенгук вошел в историю как великолепный естествоиспытатель. Он наблюдал компоненты крови, систему кровообращения, структуру тканей растений, микроскопировал насекомых, водоросли, простейших и т. д. Непосредственное открытие микробов произошло в 1676 г., когда А. ван Левенгук, рассматривая в микроскоп капли дождевой воды, стоявшей несколько дней в бочке, заметил огромное количество очень маленьких движущихся организмов.

Дальнейшее широкое развитие микробиологии связано с именем великого французского ученого *Луи Пастера (1822—1895)*.

Он впервые показал роль микроорганизмов как участников разнообразных биохимических превращений и возбудителей заболеваний живых существ. Исследования Л. Пастера, заложили основы новой науки — иммунологии. Его вклад — разработка принципов асептики, методов стерилизации, ослабления (аттенуации) вирулентности и получения вакцин (вакцинных штаммов). Он наблюдал, как гриб *Penicillium glaucum* и дрожжи, развиваясь на соли рацемической винной кислоты, потребляют лишь один из оптических изомеров.

Первым шагом на пути Л. Пастера к будущим микробиологическим исследованиям послужило открытие брожения как результата жизнедеятельности микроорганизмов. В дальнейшем ученый доказал, что сахар превращается в молочную кислоту под воздействием специфических молочнокислых бактерий, спиртовое же брожение вызывают другие микроорганизмы — дрожжи. Позднее, изучая возбудителей маслянокислого брожения, Л. Пастер выявил, что они могут жить только в отсутствие кислорода, т. е. были открыты «строгие анаэробы». Обнаруженное Л. Пастером явление анаэробнозиса имело большое значение в создании теории брожения.

Л. Пастер обнаружил анаэробный способ существования, вел термины «аэробный» и «анаэробный». Л. Пастер доказал невозможность самозарождения. Пастер разработал рекомендации по предупреждению попадания посторонних микробов из внешней среды (пастеризация). Исследуя болезни шелковичных червей, ученый приблизился к решению медицинских и ветеринарных вопросов. В результате анализа проведенных работ исследователь разработал микробную теорию заразных заболеваний.

В середине XIX в. в крови животных, павших от сибирской язвы, учеными были обнаружены неподвижные нитевидные тельца — «бактеридии». Л. Пастер установил, что его вызывает бактерия. Это было доказано опытами по отстаиванию чистой культуры сибиреязвенной палочки. Бактерии оседали на дно сосуда, и животное не заболело от прививки ему из верхнего прозрачного слоя жидкости, так как развитие болезни могли вызвать только бактерии, содержащиеся в нижнем, мутном слое.

Л. С. Ценковский (1822-1887) — родоначальник русской микробиологии. Им была организована одна из первых Пастеровских станций в России и в 1883 г. предложена вакцина против сибирской язвы («живая вакцина Ценковского»).

Н. Ф. Гамалея (1859-1949) — внес большой вклад в развитие медицинской микробиологии, иммунологии, вирусологии и учении о дезинфекции. Им были проведены работы по изучению бешенства, туберкулеза, холеры, чумы; предложена противохолерная вакцина.

Д. К. Заболотный (1866-1929) – основоположник эпидемиологии, создал учение о природной очаговости чумы, и выяснил роль диких грызунов как хранителей чумной палочки в природе. Он первым в нашей стране начал читать курс микробиологии на высших женских курсах в Петербурге.

Роберт Кох – создатель современной микробиологической техники.

Метод выделения чистых культур на твердых питательных средах, способы окраски бактерий анилиновыми красителями, открытие возбудителей сибирской язвы, холеры (запятой Коха), туберкулеза (палочки Коха), совершенствование техники микроскопии.

И.И. Мечников создал новую эпоху в микробиологии - учение о невосприимчивости (иммунитете), разработав теорию фагоцитоза и обосновав клеточную теорию иммунитета.

Открытие вирусов.

12 февраля 1892г. на заседании Российской академии наук **Д.И.Ивановский** сообщил, что возбудителем мозаичной болезни табака является фильтрующийся вирус.

Открытие антибиотиков.

Следующим важным этапом в развитии микробиологии стало открытие антибиотиков. В 1929г. **А.Флеминг** открыл пенициллин и началась эра антибиотикотерапии, приведшая к революционному прогрессу медицины. В дальнейшем выяснилось, что микробы приспосабливаются к антибиотикам, а изучение механизмов лекарственной устойчивости привело к открытию второго- внехромосомного (плазмидного) генома бактерий.

В 1939-40гг. **Говард Флори** и **Эрнст Чейн** разработали методы очистки и массового производства пенициллина. В 1945 они были удостоены Нобелевской премии. В 1949 посмертно Нобелевскую премию получил Эрнест Дюшесне. В 1942г. З. В. Ермольевой и ее сотрудниками во Всесоюзном институте эпидемиологии и микробиологии был найден активный продуцент пенициллина и выделен первый отечественный пенициллин — крустозин.

Развитие экологической микробиологии.

В это же время определилось и второе научное направление — эколого-физиологическое. Среди его приверженцев выделяется **С. Н. Виноградский** (1856—1953), открывший хемосинтез у микроорганизмов. Он же установил усвоение молекулярного азота свободноживущими бактериями и провел оригинальные исследования по экологии почвенных микроорганизмов.

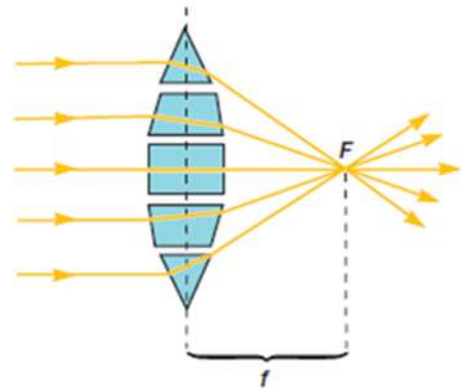
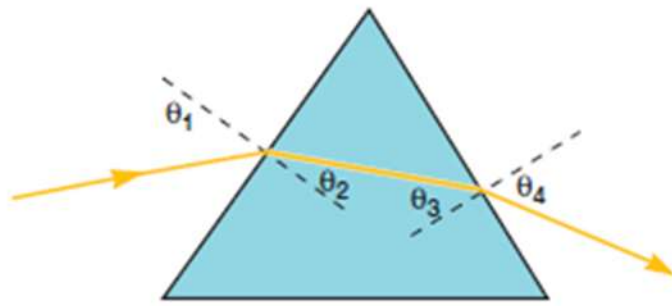
Другой крупнейший микробиолог — **В. Л. Омелянский** (1867— 1928), ученик С. Н. Виноградского, изучал вопросы нитрификации, азотфиксации, распада целлюлозы, а также экологию микроорганизмов почвы. В. Л. Омелянский написал учебник «Основы микробиологии» (1909), переиздававшийся несколько раз. В 1923 г. он опубликовал первое практическое руководство по микробиологии.

Современный молекулярно-генетический этап развития микробиологии, вирусологии и иммунологии начался во второй половине 20 века в связи с достижениями генетики и молекулярной биологии, созданием электронного микроскопа. В опытах на бактериях была доказана роль ДНК в передаче наследственных признаков. Использование бактерий, вирусов, а затем и плазмид в качестве объектов молекулярно- биологических и генетических исследований привело к более глубокому пониманию фундаментальных процессов, лежащих в основе жизни. Выяснение принципов кодирования генетической информации в ДНК бактерий и установление универсальности генетического кода позволило лучше понимать молекулярно- генетические закономерности, свойственные более высоко организованным организмам.

1.2. Методы микробиологии.

1. Микроскопия: световая, фазово-контрастная, темнопольная, флуоресцентная, электронная;
2. Культуральный метод (бактериологический, вирусологический);
3. Биологический метод (заражение лабораторных животных с воспроизведением инфекционного процесса на чувствительных моделях);
4. Молекулярно-генетический метод (ПЦР, ДНК- и РНК-зонды и др.);
5. Серологический метод — выявления антигенов микроорганизмов или антител к ним (ИФА).

Микроскопические методы исследований включают приготовление мазков и препаратов для микроскопирования. В большинстве случаев результаты микроскопических исследований носят ориентировочный характер (например, определяют отношение возбудителей к окраске). Тем не менее, микроскопией материала можно определить некоторые морфологические признаки возбудителей (наличие ядер, жгутиков, внутриклеточных включений и т.д.), а также установить факт наличия или отсутствия микроорганизмов в присланных образцах.



Разрешающая способность зависит от длины волны света и оптических свойств линзы.

$$d = \frac{0.5\lambda}{n \sin \theta}$$

Преломление света стеклянными линзами.

Чем больше преломляющая способность линзы, тем большее увеличение можно получить. Чем выше увеличение линзы, тем меньше фокусное расстояние. Слой масла между объективом и покровным стеклом («иммерсия») позволяет получить большее увеличение.

В оптической микроскопии **тёмного поля** неоднородности образца рассеивают свет, и этот рассеянный свет формирует изображение исследуемого образца. Особенностью микроскопа темного поля является способ освещения образца, который осуществляется «сбоку». При таком освещении неоднородности, имеющиеся в образце, рассеивают падающий свет и в микроскопе изображение образца наблюдают в рассеянном свете, а освещающий свет «напрямую» не попадает в объектив. Такое освещение называется эпи-подсветкой (EPI-illuminator, EPI—microscope, EPI-objective lens).

Для получения **фазово-контрастного** изображения свет от источника разбивается на два когерентных световых луча, один из них называют опорным, другой предметным, которые проходят разные оптические пути. Микроскоп юстируют таким образом, чтобы в фокальной плоскости, где формируется изображение, интерференция между этими двумя лучами гасила бы их. Длину оптического пути изменяют с помощью, так называемой фазовой пластинки, расположенной на фазовом кольце. Когда на пути одного из лучей находится образец, преломление света в нём изменяет оптический путь, а, следовательно,

и фазу, что изменяет условия интерференции. Фазово-контрастная микроскопия особенно популярна в биологии, поскольку не требует предварительного окрашивания клетки, из-за которого та может погибнуть.

Флуоресцентная микроскопия.

Объект, окрашенный флуоресцентным красителем, освещается ультрафиолетовыми лучами. Под действием УФ возникает флуоресценция – объект испускает видимый свет большей длины волны. Поток УФ от ртутной лампы проходит через дихроматическое зеркало: оно отражает короткие волны, но пропускает длинные волны видимого света, которые беспрепятственно проходят в объектив, формируя изображение объекта.

Электронная микроскопия.

Использует направленные пучки электронов для «освещения» объекта, электроны формируют изображение на флуоресцентном экране. Роль фокусирующих линз выполняют электромагниты. Ниже показано снимки полученные с помощью светового и электронного микроскопов. Часто для приготовления препаратов применяется техника «Замораживания-скалывания».

Культуральный метод

Бактериологический посев (культуральное или микробиологическое исследование) — лабораторное исследование, при котором биоматериал, в котором предположительно могут находиться патогенные микроорганизмы, помещают в благоприятную для их размножения среду при определенных температурных параметрах с последующей оценкой результатов и определения чувствительности к антибактериальным препаратам. Метод ценен для определения условно-патогенной микрофлоры, определения чувствительности к антибиотикам. Из всех методов диагностики инфекционных заболеваний это самый дорогой и трудоемкий метод. Однако эти его недостатки с лихвой компенсируются: если анализ на инфекцию методом посева дает положительный результат, можно не сомневаться в присутствии этих бактерий в организме.

Этапы культурального метода:

- 1) Забор и его доставка в бактериологическую лабораторию;
- 2) Микроскопия материала;
- 3) Обработка исследуемого материала физ. или хим. факторами в целях удаления или уменьшения посторонней микрофлоры. Эта мера применяется, напр., при

исследовании мокроты, выделении кислотоустойчивых и спорообразующих микробов;

- 4) Посев материала на питательные среды для получения изолированных колоний;
- 5) Инкубация засеянных питательных сред. Сроки и температура инкубации зависят от предполагаемой видовой принадлежности культуры. Обычно посевы выдерживают в термостате при 37°C 1-2 дня.
- 6) Исследование колоний. Для изучения выбирают однородные изолированные колонии, располагающиеся далеко от краев чашки и по штриху петли, окружают их чертой, нумеруют;
- 7) Пересев с выбранных колоний на среды накопления. Для этого с остатка колонии, в мазке которой выявлены однородные по форме и окраске бактерии, петлей, стараясь не задеть соседние колонии, забирают часть культуры и засевают на скошенный в пробирке МПА или специальную среду штрихом;
- 8) Инкубация посевов в термостате до появления сплошного роста (обычно 1 -2 дня);
- 9) Определение чистоты выросшей на скошенных средах культуры путем макроскопического осмотра роста и микроскопии мазка из него;
- 10) Идентификация выделенной чистой культуры. Заключение о видовой принадлежности выделенной культуры и ее свойствах.

Методы окраски.

Витальный способ окраски

Для витального (прижизненного) крашения применяют 0,2-0,001 % водные растворы метиленового и толуоидинового синего, нейтрального и конго красный, которые добавляют в придавленную или висячую капли культуры. Этим способом выявляют спирохеты, простейшие, определяют подвижность бактерий, иммунное набухание капсулы, но использование его требует строгого соблюдения правил, исключающих лабораторное заражение.

Поствитальные способы окраски

Способы окраски фиксированных препаратов (поствитальные) разделяют на простые и сложные. При простых способах красящие растворы фуксина Пфейффера (экспозиция 1-2 мин), щелочного метиленового синего (3-5 мин) наносят на фиксированный препарат, так, чтобы он полностью покрыл мазок, краситель сливают, препарат промывают струйкой воды, встряхивают, высушивают и микроскопируют. Простые способы позволяют судить о величине, форме, локализации, взаимном

расположении отдельных клеток, но с их помощью нельзя установить структуру микробов и часто их дифференцированное отношение к красителям.

Из сложных способов окрашивания бактерий в основном используют дифференцированный способ Грама, выявление кислотоустойчивости по Цилю — Нельсону, определение волутиновых зёрен по Леффлеру или Нейссеру, дифференцирующий способ Романовского — Гимзы.

Окраска по Граму.

На первом этапе клетки окрашиваются кристаллическим фиолетовым, затем добавляют раствор Люголя (J+KJ), после чего препарат обрабатывают этанолом. Грам+ клетки сохраняют пурпурную окраску, грамм- обесцвечиваются. На завершающем этапе клетки окрашивают красным красителем – сафранином. Грам+ клетки также остаются пурпурными, грамм-приобретают красную или розовую окраску.

	Steps in Staining	State of Bacteria
	Step 1: Crystal violet (primary stain)	Cells stain purple.
	Step 2: Iodine (mordant)	Cells remain purple.
	Step 3: Alcohol (decolorizer)	Gram-positive cells remain purple; Gram-negative cells become colorless.
	Step 4: Safranin (counterstain)	Gram-positive cells remain purple; Gram-negative cells appear red.

Биологические методы.

Биологические методы исследований направлены на определение наличия токсинов возбудителя в исследуемом материале и на обнаружение возбудителя (особенно при незначительном исходном содержании в исследуемом образце). Методы включают заражение лабораторных животных исследуемым материалом с последующим выделением чистой культуры патогена либо установлением факта присутствия микробного токсина и его природы. Моделирование экспериментальных инфекций у чувствительных животных — важный инструмент изучения патогенеза заболевания и характера взаимодействий внутри системы микроорганизм-макроорганизм.

Молекулярно-генетические методы.

Молекулярно-генетические методы позволяют анализировать фрагменты ДНК, находить и изолировать отдельные гены и их сегменты и устанавливать в них последовательность нуклеотидов. Метод клонирования ДНК позволяет изолировать отдельные гены или их части, создавать неограниченное количество их копий, транскрибировать и транслировать изолированные гены, что стало возможным благодаря открытию ферментов-рестриктаз. Эти ферменты «узнают» специфическую олигонуклеотидную последовательность в двухнитевой ДНК и разрезают ее в данном месте — сайте. Разные рестриктазы распознают различные последовательности нуклеотидов и разрезают ДНК в разных сайтах. Для получения достаточного количества фрагментов ДНК используется полимеразная цепная реакция — метод амплификации ДНК в условиях *in vitro*.

Серологические методы.

Серологические методы исследований выявления специфических антител и антигенов возбудителя — важный инструмент в диагностике инфекционных заболеваний. АТ обычно появляются в крови на 1-2-ю неделю заболевания и циркулируют в организме относительно долго, что позволяет использовать их выявление для ретроспективных эпидемиологических исследований. Особое значение имеют методы выявления микробных антигенов. В значимых количествах они появляются уже на самых ранних сроках, что делает их идентификацию важным инструментом экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, а количественное их определение в динамике инфекционного процесса служит критерием эффективности проводимой антимикробной терапии.

Методы асептики и стерилизации.

Асептика – поддержание стерильности рабочих инструментов и посуды, в отличие от *антисептики* – уничтожения микроорганизмов на поверхности тела и в живых тканях. Стерилизация — это освобождение объектов внешней среды от различных микроорганизмов с помощью физических и химических способов (обеззараживание, обеспложивание). Технология стерилизации включает следующие этапы: дезинфекция, очистка материала, помещение его в контейнеры и стерилизаторы, собственно стерилизация, оценка ее эффективности и хранение стерильного материала.

Различают стерилизацию паровую (водяным паром под давлением), воздушную (горячим воздухом) и газовую (стерилизующим газом), химическую, лучевую

(ионизирующим излучением, ультрафиолетовыми лучами). В сухожаровых шкафах-стерилизаторах в течение 30 мин инструменты на полках просушиваются при температуре 85 °С с открытыми дверцами шкафа, затем температура доводится до 180 °С и поддерживается автоматически в течение 1 часа. В автоклавах инструменты стерилизуются в течение 45 мин при 1,1 атм или 20 мин при 2 атм.