

Куб ГАУ

**кафедра микробиологии,
эпизоотологии и
вирусологии**

**Ведущий преподаватель
доктор биологических наук,
профессор**

Нино Нодариевна Гугушвили

Лабораторные занятия
по общей микробиологии
для факультета
ветеринарной медицины

Тема

**Культуральные свойства
микроорганизмов. Антибиотики.
Методы определения
антибиотикорезистентности
бактерий**

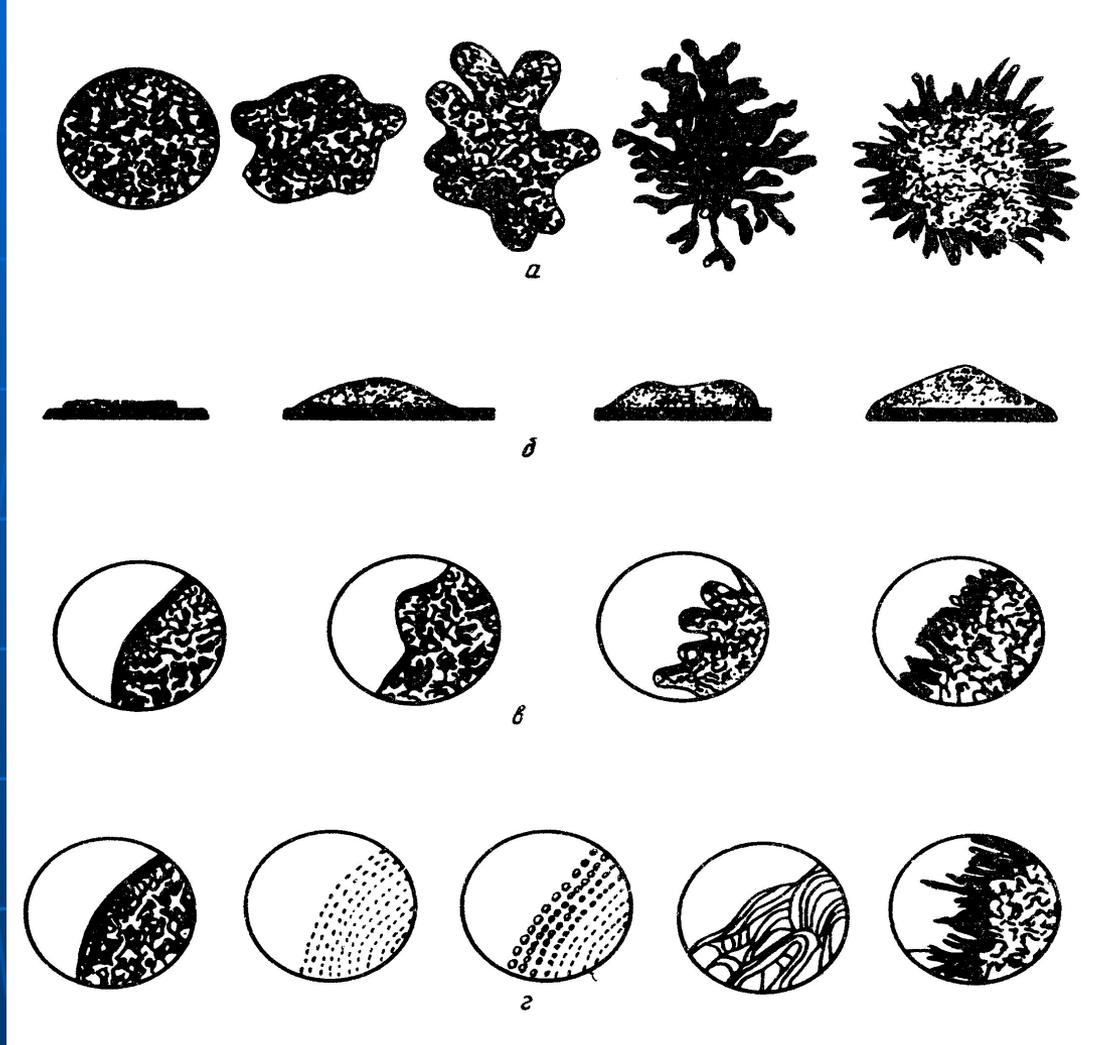
Задание

1. Изучить методы выделения чистых культур микроорганизмов и характер роста на жидких, полужидких и плотных питательных средах.
2. Изучить морфологию актиномицетов, грибов, дрожжей в препарате под покровным стеклом по таблицам, плакатам, зарисовать.
3. По результатам посевов на прошлом занятии, изучить характер роста выделенной чистой культуры на МПА (косячке), МПБ, определить морфологические и тинкториальные свойства (окраска по Граму), зарисовать.
4. Произвести посев чистой культуры на МПА в чашках Петри с наложением дисков с антибиотиками для определения чувствительности микробов к антибиотикам.

1. Изучить методы выделения чистых культур микроорганизмов и характер роста на жидких, полужидких и плотных питательных средах

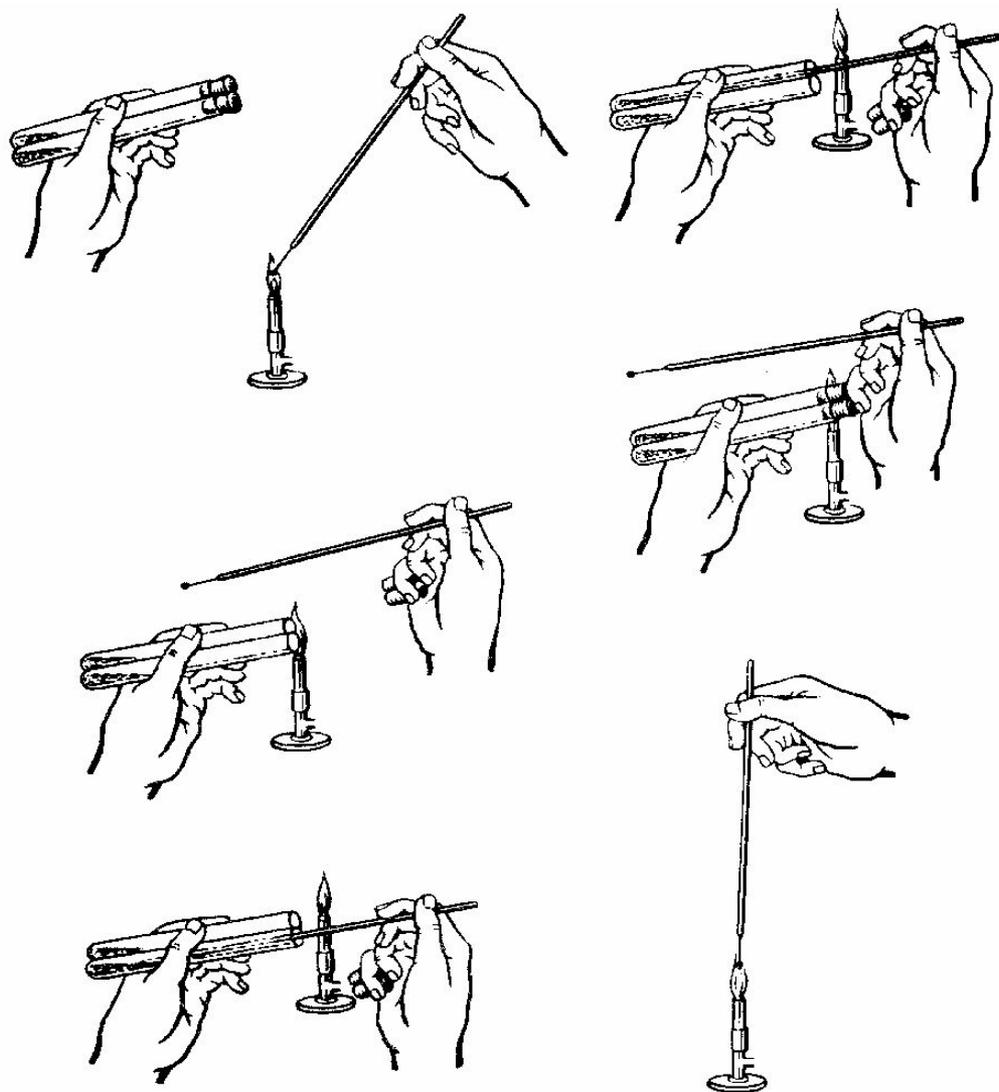
Чистая культура микроорганизмов – это популяция микробов, выращенная из одной клетки. Выделение чистой культуры микробов – необходимое условие для изучения видовых, родовых и иных свойств микроорганизмов.

Выбирают одну из изолированных колоний бактерий на чашке Петри и проводят ее описание по следующим признакам: цвет, диаметр (мм), форма, поверхность, контур края, консистенция.



Характеристика бактериальных колоний: **а** – форма (круглая, неправильная, амёбовидная, ризоидная, мицелиевидная), **б** – поверхность (плоская, выпуклая, с вдавленным краем, конусообразная), **в** – контур края (ровный, волнистый, фестончатый, зубчатый), **г** – консистенция (плотная, мелкозернистая, крупнозернистая, вязкая, волокнистая) (по Й.Сеги)

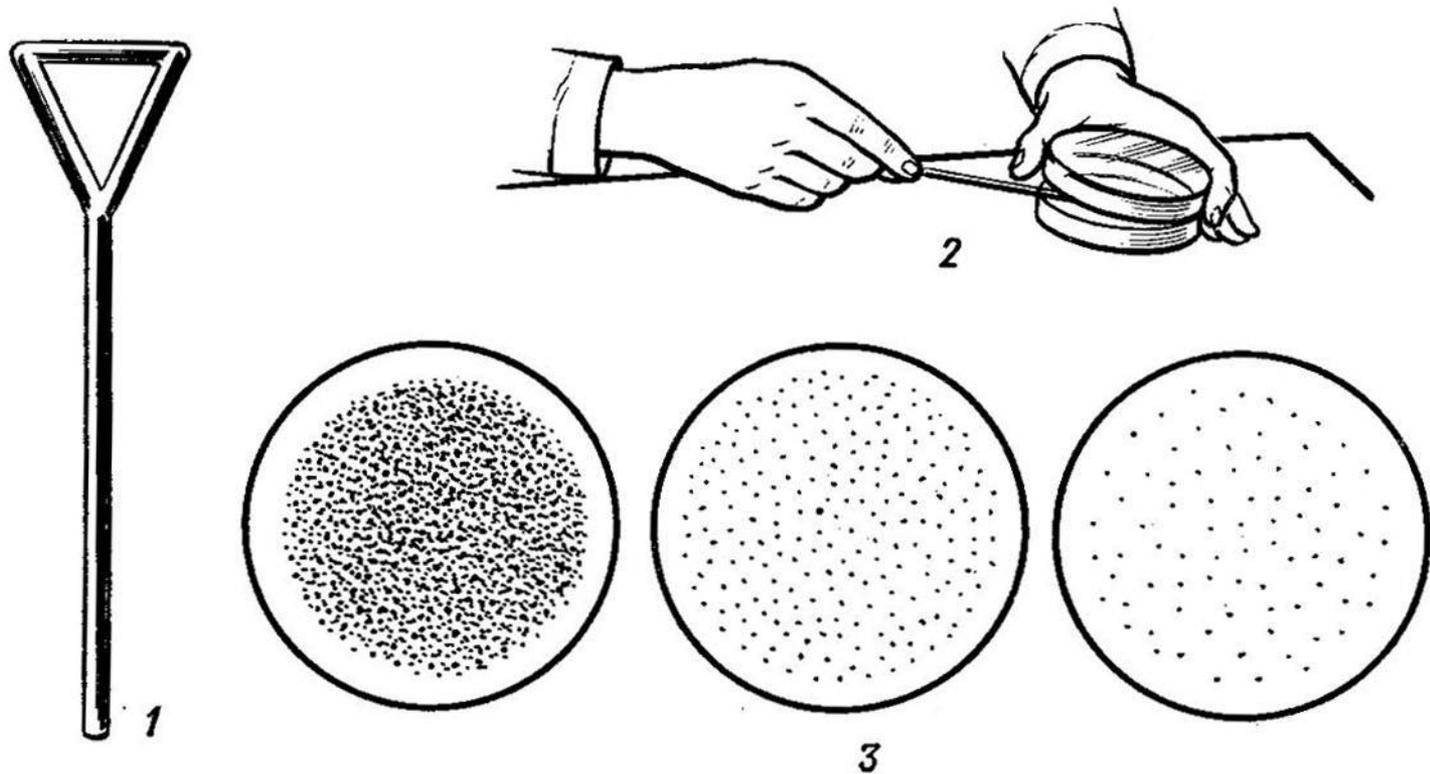
С целью выделения чистой культуры бактерий одну из колоний пересевают с помощью стерильной бактериальной петли в пробирки с МПА и МПБ



Порядок работы при пересеве культуры из одной пробирки в другую

Засеянные пробирки помещают в термостат при температуре 28–30°C на несколько суток.

Для получения изолированных колоний при высокой плотности их на чашках используют шпатель Дригальского для проведения последовательных газонных посевов колонии на стерильные плотные среды.



Посев культуры микроорганизмов на поверхность
плотной питательной среды шпателем

1.шпатель Дригальского

2.посев

3.рост микроорганизмов после посева

Получить изолированные колонии можно и с помощью посева штрихом, используя бактериальные петли. Небольшую массу клеток из колонии рассеивают на чашке с плотной питательной средой

согласно схеме .

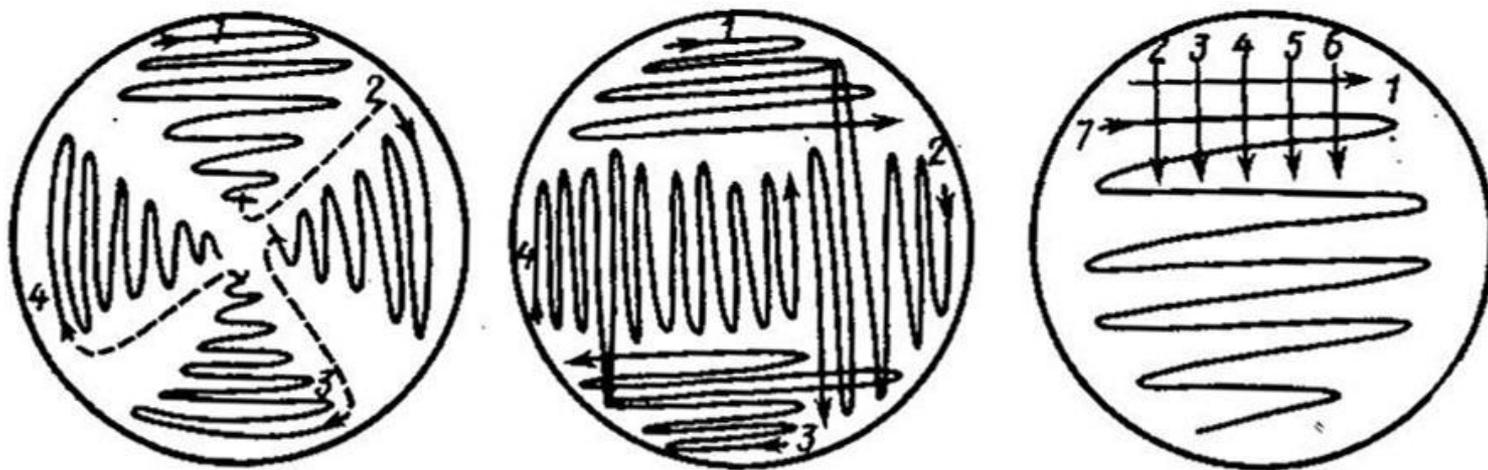


Схема посева культуры микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды бактериальной петлёй

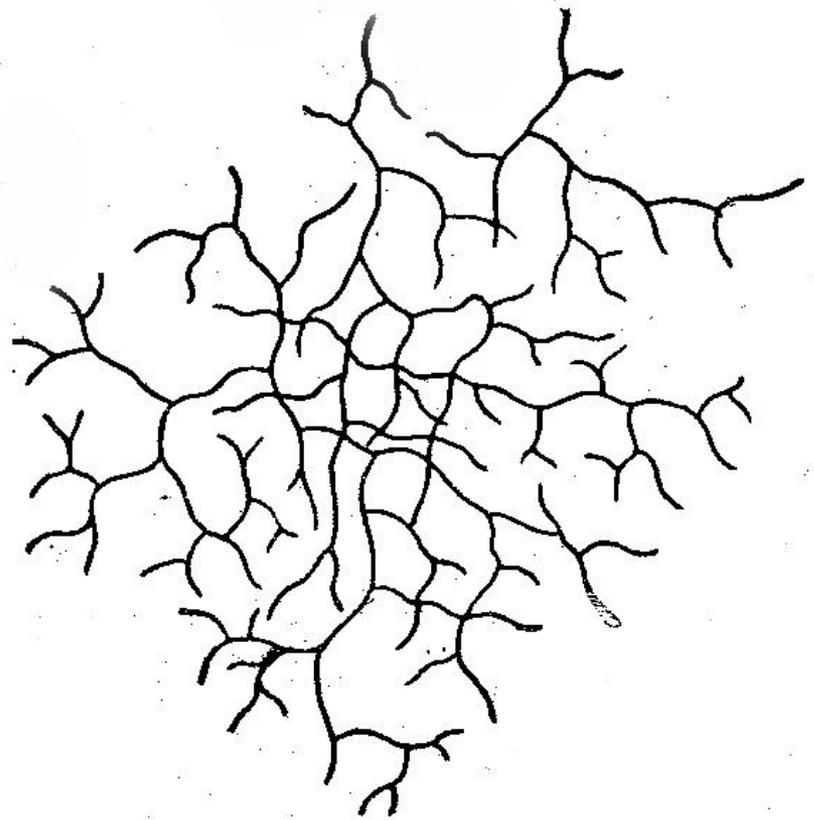
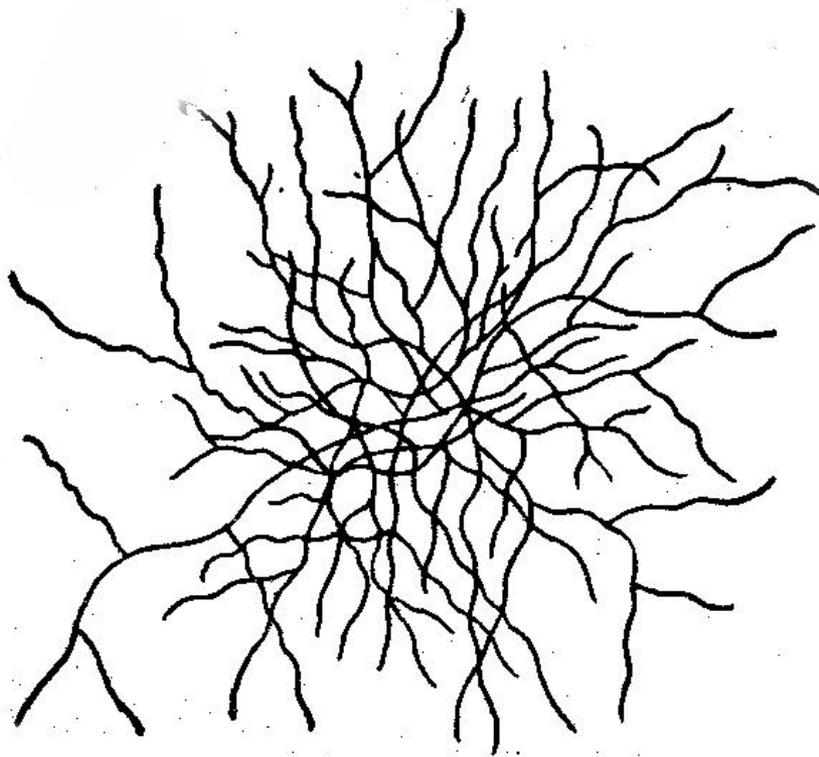
2. Изучить морфологию актиномицетов, грибов, дрожжей в препарате под покровным стеклом по таблицам, плакатам, зарисовать

Актиномицеты занимают промежуточное положение между бактериями и грибами.

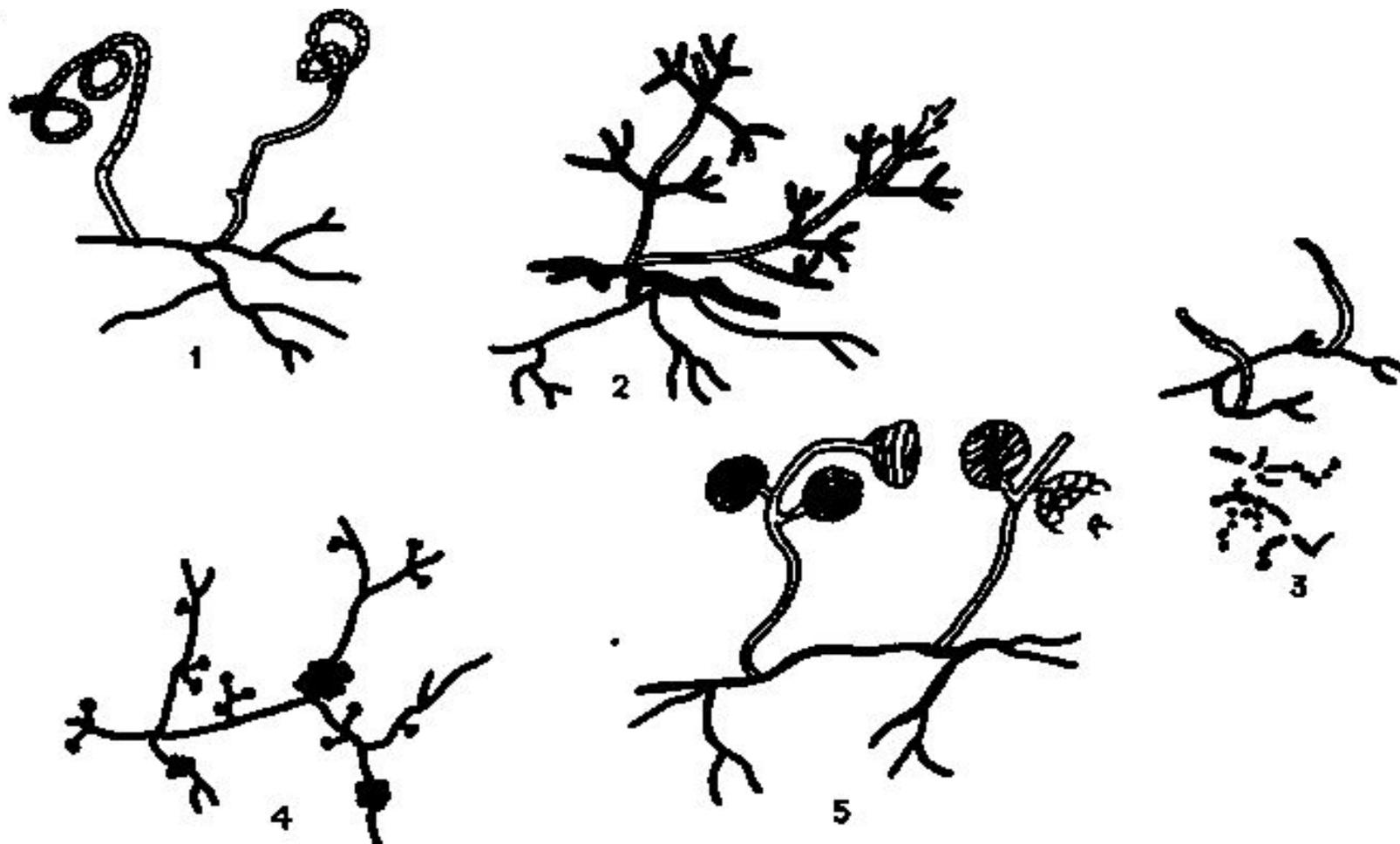
Оставаясь прокариотами с диаметром клеток не более 1 мкм как бактерии, многие из них обладают мицелиальным строением тела, образуя субстратный и воздушный мицелий со спорами или без них как грибы. Они относятся к грамположительным бактериям со специфическим строением клеточной стенки и более сложным циклом развития в отличие от эубактерий.

Большинство их находится в почве, разрушая органические соединения и выделяя ряд метаболитов, входящих в состав гумуса. Многие актиномицеты являются продуцентами антибиотиков: стрептомицина, тетрациклина, нистатина, левомицетина и других. Среди этих организмов есть возбудители заболеваний (актиномикозов) человека, животных и растений.

Чашки Петри с МПА, засеянные актиномицетами, используют для микроскопии с объективом 8 (10). Обращают внимание на радиальный рост гиф субстратного мицелия актиномицетов молодых колоний и на характер спороношения зрелых колоний.



Субстратный мицелий актиномицетов



Актиномицеты.

Представители родов: 1 – *Streptomyces*; 2 – *Streptoverticillium*;
3 – *Nocardia*; 4 – *Micromonospora*; 5 – *Streptosporangium*

Большинство актиномицетов аэробы, развиваются в нейтральной среде и нуждаются в тех же факторах роста, что и эубактерии. В неблагоприятных условиях обитания актиномицеты переходят к спороношению и фрагментации мицелия. Большой вклад в развитие актиномицетологии сделал российский академик Н.А. Красильников – основатель кафедры биологии почв МГУ. Важными признаками для классификации актиномицетов наряду с особенностями строения клеточной стенки являются характер спороношения и окраска спор.

Провести простую окраску мицелия

Для этого с помощью стерильной бактериальной петли в каплю воды на предметном стекле вносят участок колонии актиномицетов с чашки Петри и проводят простую окраску. Обращают внимание на морфологию гиф (толщину, характер ветвления, наличие и расположение эндо- или экзоспор).

Изучить строение колоний плесневых грибов, представителей родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*

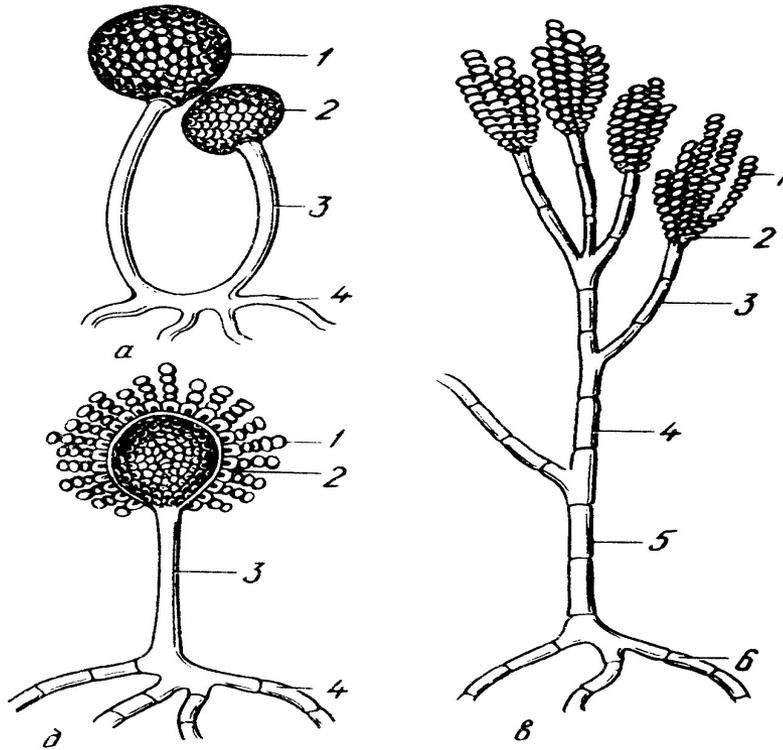
В отдельное царство объединены организмы, сочетающие в себе растительные, животные признаки и специфические признаки.

Вегетативное тело большинства грибов - мицелий, состоящий из нитей - гиф, позволяет максимально оккупировать субстрат и всасывать органические и минеральные вещества (осмотрофный тип питания). Высокомолекулярные субстраты утилизируются благодаря их гидролизу экзоферментами, выделяемыми грибами.

Клетки многих грибов многоядерны, т.к. цитокинез у них не сопряжен с митозом. Более того, ядра часто неоднородны по составу, что объясняет такое явление, специфичное для цитологии грибов, как гетерокариоз, определяющий в значительной степени высокую адаптивность грибов к условиям среды. Циклы развития этих организмов отличаются сложностью, сменой гаплоидных и диплоидных фаз, большим разнообразием способов размножения, что отражено в классификации грибов.

Грибы объединены в царство *Mycota* и представляют собой большое число независимо возникших или давно разошедшихся эволюционных линий.

В готовых препаратах
«раздавленная капля»
изучить строение
органов спороношения
микроспоридиоцитов

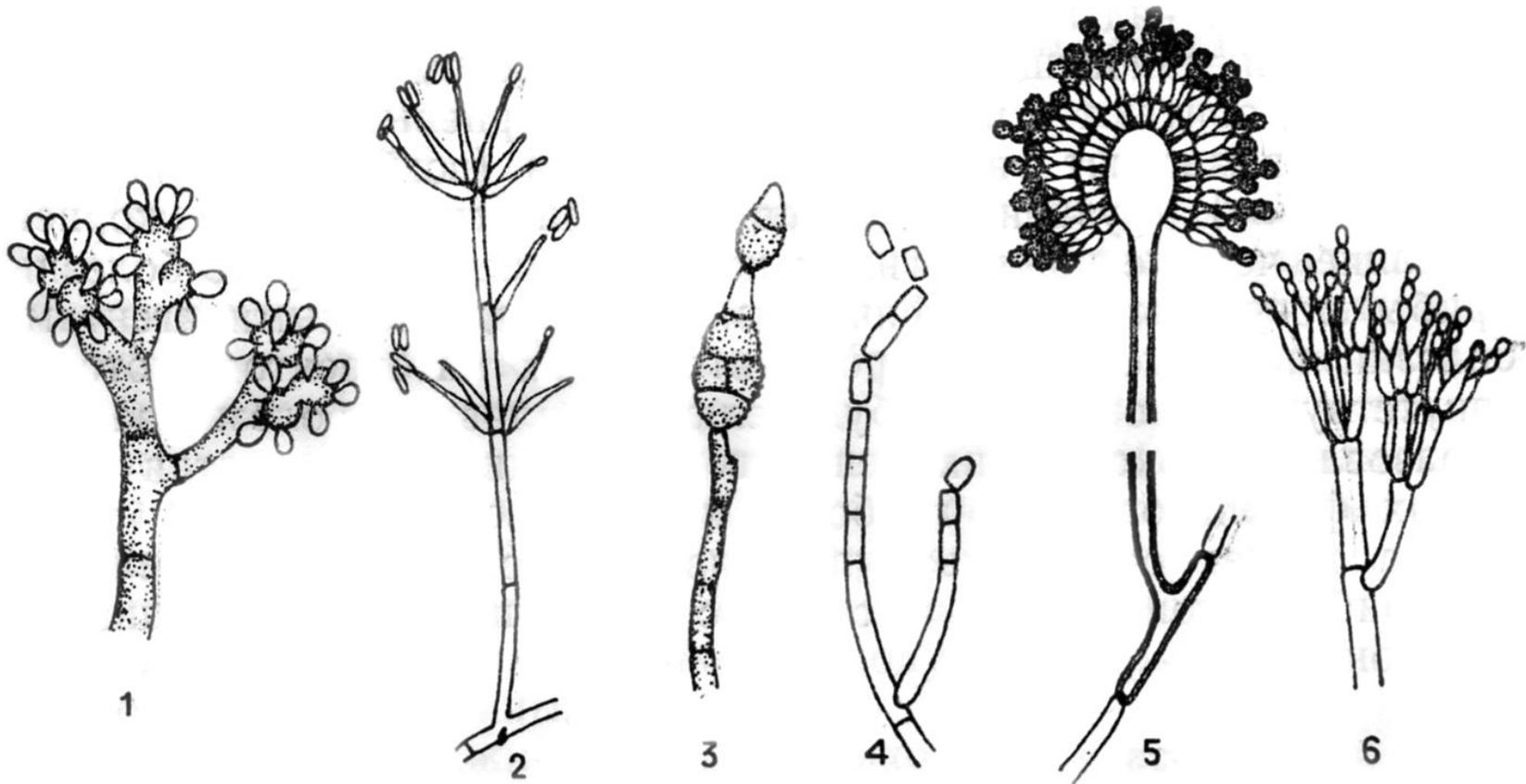


Строение плесневых грибов:

а – мукора: (Mucor) 1 – эндоспоры, 2 – спорангий, 3 – спорангиеносец, 4 – субстратный мицелий;

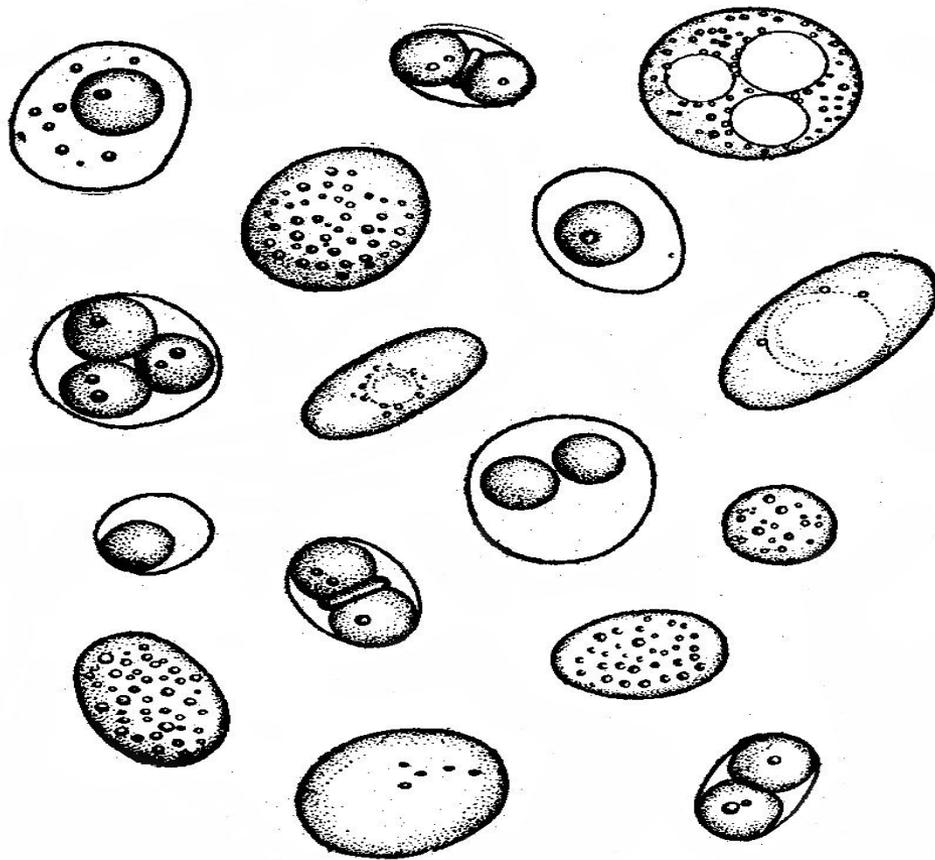
б – аспергилла (Aspergillus): 1 – конидии (экзоспоры), 2 – стеригмы, 3 – конидиеносец, 4 – субстратный мицелий;

в – пеницилла (Penicillium): 1 – конидии, 2 – фиалиды, 3 – метула, 4 – ветка, 5 – конидиеносец, 6 – субстратный мицелий



Конидиальные спороношения несовершенных грибов:

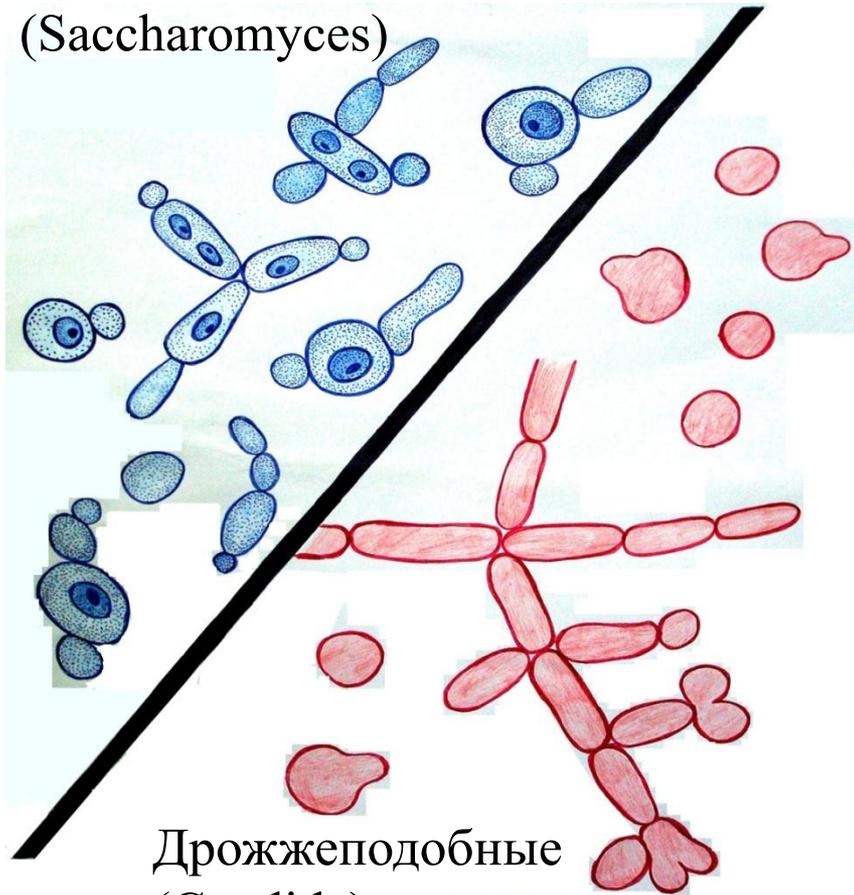
- 1 – Botrytis; 2 – Verticillium; 3 – Alternaria; 4 – Geotrichum;
5 – Aspergillus; 6 – Penicillium



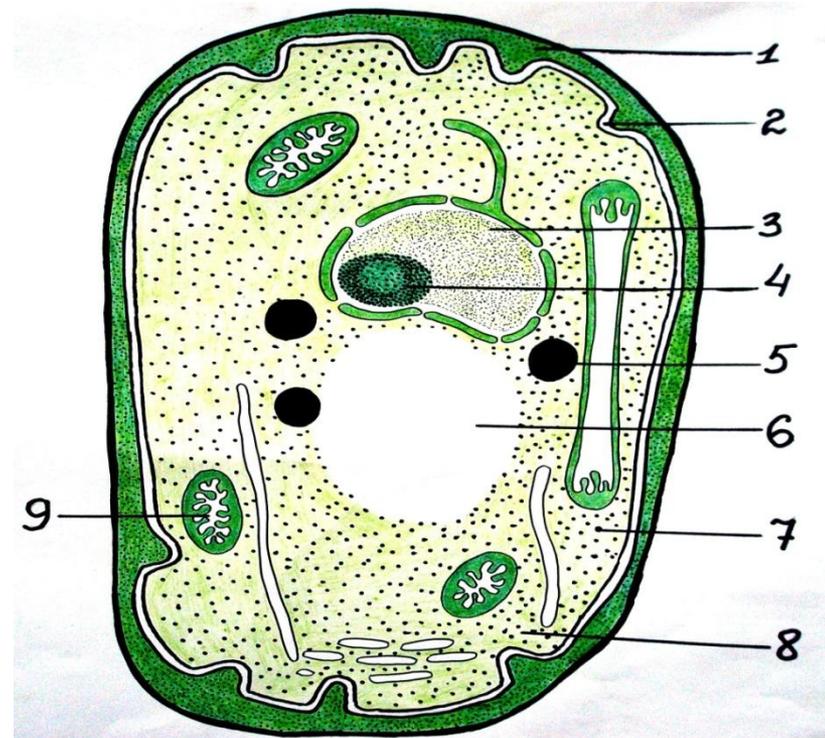
Дрожжевые клетки: морфология, спорообразование

Дрожжевые и дрожжеподобные грибы

Дрожжевые
(*Saccharomyces*)



Дрожжеподобные
(*Candida*)



Ультраструктура дрожжевой клетки (схема):
1— клеточная стенка; 2— цитоплазматическая мембрана; 3— ядро; 4— ядрышко; 5— капельки жира; 6— вакуоль; 7— рибосомы; 8— цитоплазма; 9— митохондрия

Изучить морфологию и внутриклеточные включения дрожжей, зарисовать

Приготовить препарат из взвеси дрожжевых клеток, добавить каплю раствора люголя, промикроскопировать (препарат «раздавленная капля»). Обратить внимание на морфологию дрожжевых клеток и наличие гликогена.

Окраска гликогена. *Гликоген* – углевод, животный крахмал. Встречается у эукариот и прокариот. Впервые был обнаружен французским физиологом *К.. Бернаром* в печени крыс при их обильном питании углеводами. Часто гликоген накапливается в клетках дрожжей, бацилл. Для обогащения дрожжевых клеток гликогеном их выращивают на солодовой среде.

На чистое предметное стекло наносят небольшую каплю суспензии микроорганизмов и к ней добавляют такую же каплю раствора I_2 в KI (7 г I_2 и 20 г KI на 100–300 мл дистиллированной воды). Сверху помещают покровное стекло, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат просматривают с масляной иммерсией.

На препарате **Saccharomyces cerevisiae** много почкующихся клеток. В образующихся (растущих) почках гликогена практически нет, поскольку углеводы расходуются в процессе активного метаболизма и гликоген не запасается. В материнских клетках окраска гликогена интенсивна — в зависимости от степени его накопления она варьирует от ярко-желтых оттенков до коричнево-желтых.

Включения гликогена хорошо исследовать в 1–2-суточных культурах *Saccharomyces mycoides* и *Bacillus*

4. Произвести посев чистой культуры на МПА в чашках Петри с наложением дисков с антибиотиками для определения чувствительности микробов к антибиотикам

Антибиотики – продукты жизнедеятельности организмов, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам организмов. В данном определении указано происхождение этих веществ, что отличает антибиотики от химиопрепаратов искусственного происхождения. Физиологическая активность антибиотиков соответствует концентрациям от десятков и сотен мкг/мл до десятых и сотых долей мкг/мл.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и другим лечебным препаратам является неотъемлемым условием правильного их применения в медицине, ветеринарии и защите растений в борьбе с инфекционными заболеваниями человека, животных и растений соответственно. Существует несколько методов определения чувствительности микробов к антибиотикам, в том числе метод разведений при посеве культур в жидкие среды, диффузионные методы лунок, дисков, агаровых блоков при посеве микробных культур на плотные питательные среды.

Для определения чувствительности чистой культуры бактерий к антибиотикам методом индикаторных дисков стерильной бактериальной петлей переносят клетки бактерий из пробирки с МПА в чашку Петри с МПА, затем проводят газонный посев микробов с помощью стерильного шпателя Дригальского. На засеянную питательную среду с помощью пинцета накладывают диски (до 8-ми), при этом следят, чтобы диски находились на расстоянии не менее 1 см от края чашки и были расположены симметрично относительно друг друга. Чашки Петри подписывают и ставят в термостат (28–30°C) на время необходимое для прорастания бактерий.

Свойства некоторых антибиотиков

Название	Продуцент	Объект действия	Механизм действия
Пенициллин	<i>Penicillum spp.</i>	грам+ бактерии	Подавление синтеза пептидогликана
Цефалоспорин	<i>Cephalosporium spp.</i>	грам+ бактерии	Подавление синтеза пептидогликана
Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i>	грам+ и грам– эубактерии	Подавление трансляции на уровне переноса аминоксил-тРНК к рибосоме
Эритромицин	<i>S. erythreus</i>	грам+ и грам– эубактерии	Подавление трансляции на уровне 50S-субъединицы рибосомы
Тетрациклин	<i>S. aureofaciens</i>	грам+, грам– эубактерии, риккетсии	Подавление трансляции на стадии связывания аминоксил-тРНК с 30S-субъединицей рибосомы, подавление дыхания, фосфорилирования и др.
Хлорамфени-кол (левомицетин)	<i>S. venezuelae</i>	грам+, грам– эубактерии, риккетсии, хламидии	Подавление трансляции на уровне 50S-субъединицы рибосомы
Нистатин	<i>S. nouresei</i>	микровицеты	Нарушение функции мембран, содержащих холестерол или эргостерол
Грамицидин	<i>Bacillus brevis</i>	грам+ и грам– эубактерии	Нарушение структуры и транспортной функции мембран
Полимиксин	<i>B. polymyxa</i>	Грам– бактерии	Нарушение функции мембран (транспорта ионов, дыхания и др.)
Низин	<i>Streptococcus lactis</i>	грам+ бактерии	Нарушение проницаемости мембран, инактивация сульфгидрильных групп

Благодарю за внимание!