

Ветеринарная микробиология и микология

ЛПЗ 1

УНИЧТОЖЕНИЕ МИКРОБОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Для уничтожения микробов (бактерий, вирусов, грибов и простейших) на различных предметах и в материалах, используемых в медицине, в пищевой промышленности и в быту, применяют два способа: стерилизацию и дезинфекцию.

Стерилизация

Стерилизация (от лат. *sterilis* — бесплодный) предполагает полную инактивацию микробов в объектах, подвергающихся обработке.

Существует **три основных метода** стерилизации:

- тепловой,
- лучевой,
- химической.

Тепловая стерилизация основана на чувствительности микробов к высокой температуре. При 60 °С и наличии воды происходит денатурация белка, деградация нуклеиновых кислот, липидов, вследствие чего вегетативные формы микробов погибают. Споры, содержащие очень большое количество воды в связанном состоянии и обладающие плотными оболочками, инактивируются при 160—170 °С.

Для тепловой стерилизации применяют, в основном, сухой жар и пар под давлением.

Стерилизацию **сухим жаром** осуществляют в воздушных стерилизаторах (прежнее название — «сухожаровые шкафы или печи Пастера»).

Воздушный стерилизатор представляет собой металлический плотно закрывающийся шкаф, нагревающийся с помощью электричества и снабженный термометром. Обеззараживание материала в нем производят, как правило, при 160 °С в течение 120 мин. Однако возможны и другие режимы: 200 °С - 30 мин, 180 °С - 40 мин.

Стерилизуют сухим жаром лабораторную посуду и другие изделия из стекла, инструменты, силиконовую резину, т. е. объекты, которые не теряют своих качеств при высокой температуре.

Большая часть стерилизуемых предметов не выдерживает подобной обработки, и поэтому их обеззараживают в паровых стерилизаторах.



Обработка паром под давлением в паровых стерилизаторах (старое название — «автоклавы») является наиболее универсальным методом стерилизации.

Паровой стерилизатор (существует множество его модификаций) — металлический цилиндр с прочными стенками, герметически закрывающийся, состоящий из водопаровой и стерилизующей камер. Аппарат снабжен манометром, термометром и другими контрольно-измерительными приборами. В автоклаве создается повышенное давление, что приводит к увеличению температуры кипения. Поскольку кроме высокой температуры на микробы оказывает воздействие и пар, споры погибают уже при 120 °С. Наиболее распространенный режим работы парового стерилизатора: 2 атм — 121 °С — 15—20 мин. Время стерилизации уменьшается при повышении атмосферного давления, а следовательно, и температуры кипения (136 °С — 5 мин). Микробы погибают за несколько секунд, но обработку материала производят в течение большего времени, так как, во-первых, высокая температура должна быть и внутри стерилизуемого материала и, во-вторых, существует так называемое поле безопасности (рассчитанное на небольшую неисправность автоклава).

Стерилизуют в автоклаве большую часть предметов: перевязочный материал, белье, коррозионно-устойчивые металлические инструменты, питательные среды, растворы, инфекционный материал и т. д.

Эффективность стерилизации в паровом стерилизаторе зависит от правильного выбора упаковки, соблюдения правил загрузки для свободного прохождения пара (например, перевязочный материал укладывают в камеру параллельно движению пара), плотности загрузки камеры и других факторов.



Одной из разновидностей тепловой стерилизации является **дробная стерилизация**, которую применяют для обработки материалов, не выдерживающих температуру выше 100 °С, например, для стерилизации питательных сред с углеводами, желатина. Их нагревают в водяной бане при 80 °С в течение 30—60 мин, в результате чего вегетативные формы погибают. Процедуру повторяют три дня подряд, в промежутках между манипуляциями питательные среды выдерживают в термостате, что способствует прорастанию спор. Иногда эту процедуру производят в автоклаве при давлении 0,5 атм.

В настоящее время применяют **еще один метод тепловой стерилизации**, предназначенный специально для молока — **ультравысоко температурный (УВТ)**: молоко обрабатывают в течение нескольких секунд при 130—150 °С.

Тепловая стерилизация — наиболее надежный, экологически безопасный, дешевый и хорошо контролируемый метод. Однако его невозможно применять тогда, когда предметы повреждаются от высокой температуры. В этих случаях прибегают к другим методам.

Химическая стерилизация предполагает использование токсичных газов: оксида этилена, смеси ОБ (смеси оксида этилена и бромистого метила в весовом соотношении 1:2,5) и формальдегида. Эти вещества являются алкилирующими агентами, их способность в присутствии воды инактивировать активные группы в ферментах, других белках, ДНК и РНК приводит к гибели микроорганизмов. Стерилизация газами осуществляется в присутствии пара при температуре от 18 до 80 °С в специальных камерах. Перед химической стерилизацией все изделия, подлежащие обработке, должны быть высушены.

Этот вид стерилизации небезопасен для персонала, для окружающей среды и для пациентов.

Однако существуют объекты, которые могут быть повреждены нагреванием, например, оптические приборы, радио- и электронная аппаратура, предметы из нетермостойких полимеров, питательные среды с белком и т. п., для которых пригодна только химическая стерилизация. Например, космические корабли и спутники, укомплектованные точной аппаратурой, для их деконтаминации обезвреживают газовой смесью (оксид этилена и бромистого метила).

В последнее время в связи с широким распространением в медицинской практике изделий из термолabileльных материалов, снабженных оптическими устройствами, например эндоскопов, стали применять **обезвреживание с помощью химических растворов**. После очистки и дезинфекции прибор помещают на определенное время (от 45 до 60 мин) в стерилизующий раствор, затем прибор должен быть отмыт стерильной водой. Для стерилизации и отмытки используют стерильные емкости с крышками. Простерилизованное и отмытое от стерилизующего раствора изделие высушивают стерильными салфетками и помещают в стерильную емкость. Все манипуляции проводят в асептических условиях и в стерильных перчатках. Хранят эти изделия не более 3 суток.

Лучевая стерилизация осуществляется либо с помощью гамма-излучения, либо с помощью ускоренных электронов.

Источником гамма-излучения, получаемого в специальных гамма-установках, являются радиоактивные изотопы, например ^{60}Co , ^{137}Cs . Для получения электронного излучения применяют ускорители электронов.

Гибель микробов под действием гамма-лучей и ускоренных электронов происходит прежде всего в результате повреждения нуклеиновых кислот. Причем микробы более устойчивы к облучению, чем многоклеточные организмы.

Лучевая стерилизация является альтернативой газовой стерилизации в промышленных условиях, и применяют ее также в тех случаях, когда стерилизуемые предметы не выдерживают высокой температуры. Лучевая стерилизация позволяет обрабатывать сразу большое количество предметов (например, одноразовых шприцев, систем для переливания крови). Благодаря возможности широкомасштабной стерилизации, применение этого метода вполне оправданно, несмотря на его экологическую опасность и неэкономичность.

Еще одним способом стерилизации **является фильтрование**. Фильтрование с помощью различных фильтров (керамических, асбестовых, стеклянных), а в особенности мембранных ультрафильтров из коллоидных растворов нитроцеллюлозы или других веществ позволяет освободить жидкости (сыворотку крови, лекарства) от бактерий, грибов, простейших и даже вирусов. Для ускорения процесса фильтрации обычно создают повышенное давление в емкости с фильтруемой жидкостью или пониженное давление в емкости с фильтратом.

В настоящее время все более широкое применение находят **современные методы стерилизации**, созданные на основе новых технологий, с использованием **плазмы, озона**.

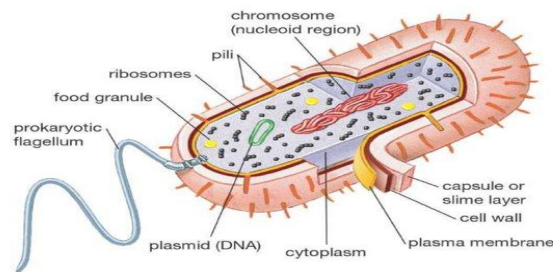
ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Организация генетического материала у бактерий. Генотип и фенотип

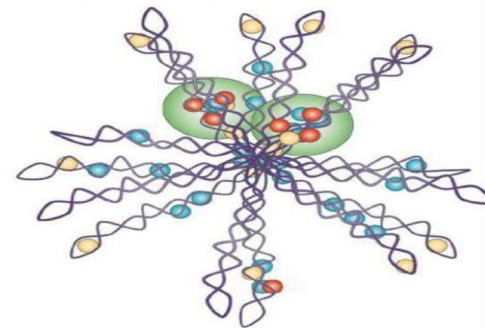
Материальной основой наследственности бактерий является ДНК. По сравнению с геномом эукариот геном бактерий устроен более просто - это молекула ДНК, замкнутая в кольцо, которое прикреплено к одной из мезосом. В отличие от парных хромосом эукариот, у бактерий одна хромосома, то есть гаплоидный набор генов, поэтому у них нет явления доминантности.

Кроме хромосомы, у бактерий имеются внехромосомные генетические элементы - плазмиды. Это молекулы ДНК, которые или находятся вне хромосомы, в автономном состоянии, в виде колец, прикрепленных к мезосомам, или встроены в хромосому (интегрированное состояние). Плазмиды придают бактерии дополнительные наследственные признаки, но не являются обязательными для нее. Плазмида может быть элиминирована (удалена) из бактерии, что не влияет на ее жизнеспособность.

Структура бактериальных геномов



Copyright © 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.



Генотип - это общая сумма генов микроба. В отношении микроорганизмов "генотип" означает то же, что "геном".

Фенотип - это весь комплекс свойств микроба, проявление генотипа в определенных, конкретных условиях существования.

Генотип - это возможные способности клетки, а фенотип - видимое их проявление.

Изменчивость микроорганизмов.

Наследственность - способность сохранения постоянства специфических свойств организма на протяжении ряда поколений, то есть способность воспроизводить себе подобных.

Изменчивость - различие в свойствах между особями одного вида. Различают изменчивость наследственную и ненаследственную.

Ненаследственная или фенотипическая изменчивость (модификации) не затрагивает геном микроба, не передается по наследству. Модификации возникают в ответ на изменяющиеся условия окружающей среды. При устранении фактора, вызвавшего модификацию, изменение исчезает. Например, кишечная палочка только в присутствии лактозы продуцирует ферменты, разлагающие этот углевод. Стафилококки образуют фермент, разрушающий пенициллин, только в присутствии этого антибиотика. Примером модификаций является также образование L-форм бактерий под действием пенициллина и возврат к исходной форме после прекращения его действия.

Наследственная или генотипическая изменчивость возникает в результате изменения самого генома. Изменение генома может наступить в результате мутаций или рекомбинаций.

Мутации (лат. mutatio - изменение) - изменение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, в результате которого происходит появление или потеря признака. Таким признаком может быть способность синтезировать какую-либо аминокислоту или резистентность к антибиотику.

По происхождению мутации могут быть спонтанными или индуцированными. Индуцированные мутации получают в эксперименте под влиянием мутагенов: радиации, некоторых химических веществ. Спонтанные мутации возникают под влиянием естественных факторов. Частота спонтанных мутаций невелика, в среднем 1 на 10 млн.

Образовавшиеся микробы называют мутантами. Если возникшая мутация выгодна для микроба и создает для него преимущества в определенных условиях среды, то мутанты выживают и дают многочисленное потомство. Если же мутация не создает преимуществ, мутанты погибают.

Мутации микроорганизмов могут иметь важное практическое значение. Получены штаммы-мутанты грибов и актиномицетов, являющиеся продуцентами антибиотиков во много раз более активных, чем исходные культуры. Из мутантов с ослабленной вирулентностью могут быть получены вакцинные штаммы для получения живых вакцин.

Диссоциация бактерий (лат. dissociatio - расщепление) - одно из проявлений мутаций. В популяции микроорганизмов появляются особи, вырастающие при посеве на плотную питательную среду в виде гладких S-форм и шероховатых R-форм колоний (англ, smooth - гладкий, rough - шероховатый). S-формы колоний - круглые, влажные, с гладкой блестящей поверхностью, с ровными краями. R-формы колоний неправильной формы, сухие, с изрезанными краями и шероховатой поверхностью.

Процесс диссоциации, то есть расщепления особей в популяции, обычно протекает в одном направлении: от S- к R-форме, иногда через промежуточные формы. У большинства видов бактерий вирулентными являются S-формы. Исключение составляют возбудители, чумы, сибирской язвы, туберкулеза.

S- и R-формы бактериальных колоний



Генетические рекомбинации

Генетические рекомбинации - (лат. recombination - перестановка) у бактерий - это передача генетического материала (ДНК) от клетки-донора к клетке-реципиенту, в результате появляются рекомбинанты с новыми свойствами.

Известны три типа генетических рекомбинаций: трансформация, трансдукция, конъюгация

Трансформация (лат. transforma-tio - превращение) - передача ДНК в виде свободного растворимого вещества, выделенного из клетки донора, в клетку реципиента. При этом рекомбинация происходит, если ДНК донора и реципиента родственны друг другу, и может произойти обмен гомологичных участков своей и проникшей извне ДНК. Впервые явление трансформации открыл Ф. Гриффите в 1928 г. Он ввел мышам живой неvirulentный бескапсульный штамм пневмококка и одновременно убитый virulentный капсульный штамм пневмококка. Мыши погибли, из их крови была выделена живая культура virulentного капсульного пневмококка. Сам Гриффите считал, что трансформация произошла путем поглощения неvirulentным пневмококком капсульного вещества virulentного штамма. Позже, в 1944 г. О. Эвери, К. Мак Леод и М. Мак-Картти доказали, что трансформирующее вещество - это ДНК, которая является носителем генетической информации. Так впервые была доказана роль ДНК как материального субстрата наследственности.

Трансдукция (лат transductio - перенос) - передача ДНК от бактерии-донора к бактерии-реципиенту с помощью бактериофага. Различают неспецифическую трансдукцию, специфическую и abortивную.

При неспецифической трансдукции может быть перенесен любой фрагмент ДНК донора. При этом ДНК донора попадает в головку бактериофага, не включаясь в его геном. Принесенный бактериофагом фрагмент ДНК донора может включиться в хромосому реципиента. Таким образом, бактериофаг в этом случае является только переносчиком ДНК, сама фаговая ДНК не участвует в образовании рекомбинанта. При специфической трансдукции хромосомы донора замещают собою некоторые гены бактериофага. В клетке реципиента фаговая ДНК вместе с фрагментом хромосомы донора включается в строго определенные участки хромосомы реципиента в виде профага. Реципиент становится лизогенным и приобретает новые свойства.

Трансдукция называется abortивной, если фрагмент ДНК, принесенный бактериофагом, не вступает в рекомбинацию с хромосомой реципиента, а остается в цитоплазме и может кодировать синтез какого-то вещества, но не реплицируется при делении, передается только одной из двух дочерних клеток и затем утрачивается.

Конъюгация (лат. conjugatio - соединение) - это переход ДНК из клетки-донора ("мужской") в клетку-реципиент ("женскую") при контакте клеток между собой. Донором является "мужская" клетка (F^+ -клетка), она содержит F-фактор - половой фактор, который кодирует образование половых пилей. Клетки, не содержащие F-фактора (F^- -клетки), являются женскими. При конъюгации клетки-доноры соединяются с клетками-реципиентами с помощью F-пилей, через которые происходит переход ДНК. Если клетка-реципиент получает F-фактор, она становится "мужской" F^+ -клеткой.

Если F-фактор включен в хромосому, то бактерии способны передавать фрагменты хромосомы и называются Hfr-клетками (англ. high frequency of recombination - высокая частота рекомбинации). При конъюгации хромосома разрывается в месте нахождения F-фактора и реплицируется, причем одна нить ДНК передается в клетку реципиента, а копия остается в клетке донора. F-фактор включается в хромосому в определенном ее участке, поэтому перенос отдельных генов хромосомы совершается в строго определенное время. Таким образом, прерывая процесс конъюгации через разные промежутки времени путем встряхивания взвеси бактерий, можно выяснить, какие признаки передаются за это время. Это позволяет построить карту хромосомы, то есть последовательность расположения генов в хромосоме. Перенос всей хромосомы может длиться до 100 минут. F-фактор при этом переносится последним.

Практическое значение учения о генетике микробов

При микробиологической диагностике инфекционных заболеваний возникают затруднения в определении вида атипичных микробов, например, бактерий дизентерии, не агглютинирующихся сыворотками. Для их идентификации приходится применять другие методы.

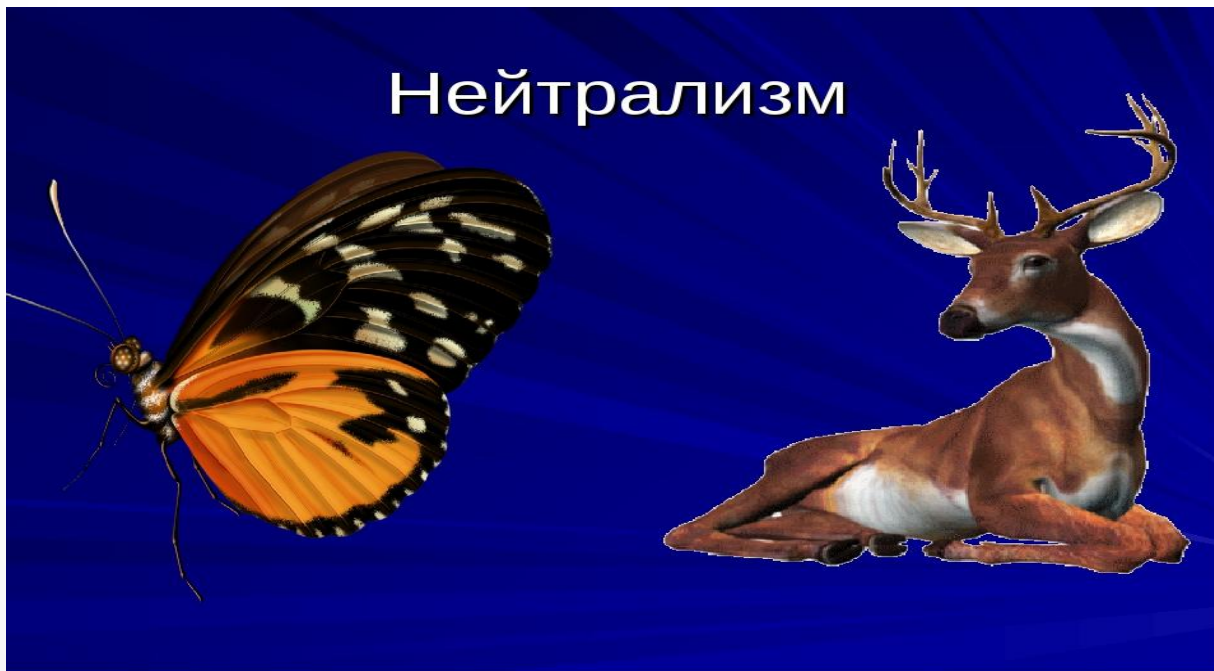
В процессе лечения больных инфекционными болезнями создаются препятствия в виде устойчивости возбудителей к антибиотикам, и требуются специальные методы для преодоления лекарственной устойчивости. Селекция в условиях стационаров штаммов микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью и высокой вирулентностью для человека, привело к формированию так называемых «госпитальных» штаммов, вызывающих внутрибольничные инфекции. Такие штаммы известны среди стафилококков, а также среди сальмонелл и других грамотрицательных палочек.

Методами направленной мутации и селекции получены живые вакцины, с успехом применяющиеся для профилактики инфекционных болезней.

Достижения молекулярной генетики используются для современных методов идентификации микробов: методы индикации нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция (ПЦР). Полимеразная цепная реакция является высокочувствительной реакцией, т.к. позволяет увеличить число копий исследуемой цепи ДНК в сотни тысяч раз за несколько часов. ПЦР может быть использована особенно тогда, когда в исследуемом материале имеются очень малые концентрации возбудителя или трудно выделить чистую культуру, а также при его высокой антигенной изменчивости.

Типы взаимоотношений микроорганизмов

Нейтрализм (лат. *neutralis* - не принадлежащий ни тому, ни другому) — взаимоотношения, при которых микроорганизмы, развиваясь в составе одного ценоза, не оказывают друг на друга непосредственного влияния. Косвенная взаимозависимость организмов при этом неизбежна, поскольку они являются элементами одного сообщества.



Конкуренция (лат. сопсигтеге — сталкиваться) — взаимоотношения между организмами одного или разных видов, соревнующихся за одни и те же ресурсы внешней среды при недостатке последних. Конкуренция может быть пассивной — потребление ресурсов внешней среды, необходимых обоим организмам или активной — подавление одного другим в результате образования определенных продуктов обмена. В микробиологии понятие конкуренции обычно распространяют лишь на взаимоотношения между микроорганизмами, хотя возможны конкурентные отношения между микро- и макроорганизмами, например почвенные микроорганизмы конкурируют с высшими растениями за элементы минерального питания.



Синтрофия (греч. *syn* — вместе, *trophe* — пища, питание) — способность двух или более видов бактерий осуществлять такой процесс, который ни один из них не может осуществлять по отдельности. Синтрофия является частным случаем симбиотических взаимоотношений между бактериями.



Симбиоз (греч. symbiosis — совместная жизнь) — различные формы совместного существования разноименных организмов, составляющих симбиотическую систему. В этих системах один из партнеров или оба, в определенной степени возлагают на другого (или друг на друга) задачу регуляции своих отношений с внешней средой. Основой для возникновения симбиоза могут быть трофические, пространственные и другие типы взаимоотношений. Один из партнеров системы или оба вместе приобретают возможность выигрыша в борьбе за существование. Симбиоз бывает *факультативным*, когда каждый из организмов при отсутствии партнера может жить самостоятельно, и *облигатным*, когда один из организмов (или оба) оказывается в такой зависимости от другого, что самостоятельное существование невозможно. По характеру взаимоотношений между партнерами выделяют несколько типов симбиоза: комменсализм, паразитизм и мутуализм.



Комменсализм (лат. com — с, вместе и mensa — стол, трапеза), т. е. сотрапезничество, форма симбиоза, при которой один из партнеров системы (комменсал) возлагает на другого (хозяин) регуляцию своих отношений с внешней средой, но не вступает с ним в тесные отношения. Основой для комменсальных отношений могут быть общее пространство, субстрат, кров, пища. Присутствие комменсала для хозяина остается обычно безразличным.

Паразитизм (греч. parasitos — нахлебник) — форма антагонистических взаимоотношений двух различных организмов, при которой один из них (паразит) использует другого (хозяина) в качестве среды обитания (среда 1-го порядка) или источника пищи, возлагая на него регуляцию своих отношений с внешней средой (среда 2-го порядка). Наблюдается различная степень специализации паразитов (приуроченность к различным органам и тканям) и специфичность паразитов (приуроченность определенного вида паразита к определенным видам хозяина). Считают, что узкая специфичность указывает на давнее происхождение системы. В процессе эволюции паразитической системы наблюдается тенденция к сглаживанию антагонистических отношений между партнерами. Однако даже в самых стабильных системах паразит — хозяин отношения между партнерами построены по принципу неустойчивого равновесия, нарушения которого могут привести к распаду системы и гибели одного или обоих партнеров. Паразиты принимают участие в регуляции численности популяций хозяев, а иногда определяют направленность микроэволюционных процессов. Паразиты подразделяются на облигатные (обязательные) и факультативные (необязательные).

Мутуализм (лат. mutuus — взаимный) - форма симбиоза, при которой отношения между партнерами характеризуются взаимовыгодностью и ни один из них не может существовать без другого.

Хищничество - такое отношение двух групп организмов, при котором одна использует другую в пищу. Примером может служить род *Clostridium* (патогенные виды), который сначала своими токсинами приводит к гибели животное, а затем использует труп в качестве источника питания.



Антагонизм (гр. antagonisma — спор, борьба) — термин, применяемый к таким взаимоотношениям между микроорганизмами, когда один вид задерживает или полностью подавляет рост другого. Если угнетение взаимно, говорят об аменсализме (лат. а - удаление, отказ и mensa - стол, кушание).

Типы антагонизма

- Пассивный
- Активный



Колония гриба
Rhizopus



Антагонист *Penicillium*
подавляет рост
Staphylococcus

Взаимосвязь между микроорганизмами проявляется и при различных инфекционных болезнях животных и человека. Так, гемофильные бактерии проявляют свое патогенное действие в организме в сообществе с различными сапрофитами – стафилококками, кишечной палочкой, что используется в лабораторной диагностике. Тяжесть течения злокачественного отека зависит от присутствия совместно с патогенными клостридиями сапрофитов. Наиболее широко используется человеком антогонистические взаимоотношения между микроорганизмами (антибиотики, пробиотики).