**МУНИЦИПАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «СРЕДНЯЯ ШКОЛА №33», ГОРОД СМОЛЕНСК**

**УЧЕБНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОЕКТ**

**Механизмы передачи патогенных микроорганизмов.  
Лабораторное подтверждение Триады Коха**

***Проект выполнила: Голуб Мария Алексеевна***

*(МБОУ Средняя школа №33 г. Смоленска)*

***Научные руководители:***

*Эйдельштейн Инна Александровна*

*Зав. Лабораторией НИИАХ ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России*

*Ковалева Наталья Валерьевна*

*Учитель биологии МБОУ «СШ №33 г. Смоленска»*

**Оглавление:**

Введение 3

Актуальность 3

Цель 4

Задачи 4

Методы исследования 5

Материалы 5

Ресурсы 6

Этапы работы 6

Практическая значимость 6

Триада Коха. Эксперимент 1. «Проверка жизнеспособности

дрожжевых грибков» 8

Эксперимент 2. «Метод пяти рукопожатий» 9

Эксперимент 3. «Заражение здоровых клубней картофеля» 11

Оценка результатов посева культур (1 пассаж) 12

Оценка результатов посева культур (2 пассаж) 12

Выводы 13

Список использованных источников 14

**Введение**

Микроорганизмы – самая многочисленная форма жизни на Земле и неотъемлемая часть нашей жизни, поэтому человек должен знать о путях их передачи и их свойствах. Роль микроорганизмов трудно переоценить. Микроорганизмы характеризуются своими микроскопическими размерами. В остальном они очень разные. Микроорганизмы играют основную роль в круговороте веществ в природе, расщепляют органические вещества, участвуют в образовании и обмене энергии, обеспечивают равновесие и плодородие почвы, поддерживают постоянный состав газов в атмосфере. Эти мельчайшие живые организмы – самые многочисленные обитатели суши, морей, атмосферы.

**Актуальность**

Организм человека населяет множество микроорганизмов. Полезные для организма человека бактерии, питающиеся органическими веществами отмерших тканей, называют *сапрофитами*. Эти микроорганизмы поддерживают постоянство внутренней среды организма. При некоторых условиях сапрофиты могут вызывать болезни, тогда их называют *условно-патогенными* микроорганизмами. Среди бактерий есть немало паразитических видов, которые, поселяясь в организме, провоцируют развитие разнообразных заболеваний. Такая категория микроорганизмов носит название *«Патогенные микроорганизмы»*, которые, в свою очередь, питаются органическими веществами живых тканей, вызывая болезни. От больного в другой здоровый организм бактерии могут проникать вместе с едой, водой, воздухом, через покровы тела. Самым распространённым путём проникновения бактерий в организм человека является воздушно-капельный путь. В данное непростое время необходимо знать о главных механизмах передачи микроорганизмов, ведь, наряду с распространяющейся по всему миру инфекцией Covid-19, следует сохранить своё здоровье и знать, как предостеречь себя от проникновения в организм патогенных микроорганизмов. С этой целью следует внимательно и грамотно ознакомиться с основными свойствами патогенных микроорганизмов и понять основные пути проникновения их в организм.

Таким же важным фактором, как здоровье человека, является фактор развития сельского хозяйства и агропромышленности, так как некоторые микроорганизмы поражают сельскохозяйственные растительные культуры и животных. В результате их жизнедеятельности возникают эпидемии заразных болезней многих растений, снижается урожай, что наносит значительный ущерб сельскому хозяйству. Для предотвращения порчи урожая следует знать о том, как защищать свой урожай от микроорганизмов, способных вызывать заболевания. Важно знать о том, каким именно образом можно заразиться патогенами.

**Цель**

Изучение в лабораторных условиях способов передачи микроорганизмов от одного живого объекта к другому на примере модельных экспериментов. Лабораторное подтверждение постулатов Коха в опыте с картофелем.

**Задачи**

1. Продемонстрировать в лабораторных условиях Триаду Коха;
2. Рассмотреть идентификацию микроорганизмов методом MALDI-TOF (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролётной масс-спектрометрией);
3. Показать на примере передачу патогена через рукопожатия;
4. Изучить научную литературу о патогенных микроорганизмах и формированиях эпидемиологических цепочек;
5. Научиться выращивать культуру грибков на чашках Петри с различными питательными средами и определять степень микробного обсеменения исследуемого объекта;
6. На основании проведённого эксперимента сделать выводы о риске возникновения эпидемиологического очага.

**Методы исследования**

**Теоретические:**

1. изучение научной литературы;
2. аналитические (анализ, синтез, сравнение).

**Практические:**

1. наблюдение;
2. эксперимент:

* посев на чашку Петри культуры *S. cerevisiae*;
* подготовка суспензии *S. cerevisiae*;
* оценка плотности микробной массы с помощью стандарта McFarland;
* приготовление «газонного» посева с поверхности заражённого картофеля;
* культивирование в термостате – 24 часа при 35°С и 7 суток при 22°С;
* отбор и пересев колоний с определённой морфологией;
* определение микроорганизмов до вида (рода) с использованием MALDI-TOF диагностики;
* подсчёт колоний на чашке Петри.

**Материалы**

1. Чашки Петри с различными питательными средами;
2. Пробирки со стерильным физиологическим раствором;
3. Стерильные ватные тампоны для посева;
4. Петли инокуляционные;
5. Пачка пекарских дрожжей;
6. Клубни картофеля;
7. Скальпель;
8. Дезинфицирующие салфетки и дезинфицирующее средство (Диаспрей).

**Ресурсы**

1. Временные – проект выполнялся в течение 6 месяцев (сентябрь 2020 г.-февраль 2021 г.);
2. Информационные – научная литература, сеть Интернет;
3. Материально-технические – компьютер, принтер, лабораторное оборудование (чашки Петри, пробирки, стерильные ватные тампоны, петли инокуляционные, скальпель);
4. Интеллектуальные – консультации руководителей проекта.

**Этапы работы**

1. Подбор и изучение литературы по данной проблеме (сентябрь-декабрь 2020 г.);
2. Подготовка и проведение исследования, обработка результатов (октябрь-январь 2021 г.);
3. Оформление работы и подготовка научно-исследовательского проекта

и презентации к защите (ноябрь-февраль 2021 г.).

**Практическая значимость**

Информация и опыты, проведённые в рамках данной научно-исследовательской работы, будут полезны любому человеку, так как каждый день мы контактируем друг с другом и велика вероятность заражения патогенными микроорганизмами, что может привести к заболеваниям организма. Людям, работающим с сельскохозяйственными культурами и занимающимся садоводством, будет полезно знать, как правильно обращаться с посевами для предотвращения заражения и порчи урожая. Чтобы обезопасить себя и окружающих, важно понимать основы формирования эпидемиологических цепочек и механизмы передачи патогенных микроорганизмов.

**Механизмы передачи патогенных микроорганизмов.  
Лабораторное подтверждение Триады Коха**

**Триада Коха –** это три условия признания микроба возбудителем определенной болезни:

1. микроб-возбудитель должен обнаруживаться во всех случаях данной, но не должен встречаться у здоровых людей или при других болезнях;

2. микроб-возбудитель должен быть выделен из организма больного в чистой культуре;

3. введение чистой культуры микроба в чувствительный организм должно вызывать данную болезнь.

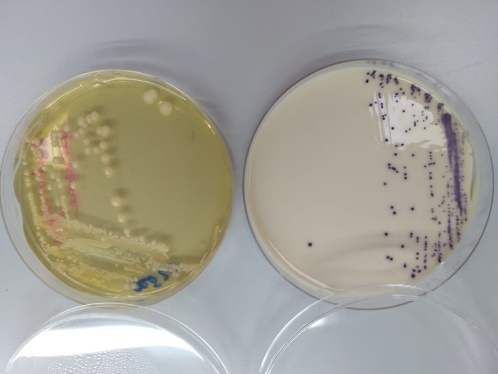
[Постулаты Коха](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BB%D0%B0%D1%82%D1%8B_%D0%9A%D0%BE%D1%85%D0%B0) определяют критерии, при которых бактерии могут считаться возбудителями болезни.

**Эксперимент 1. «Проверка жизнеспособности дрожжевых грибков»**

Суть эксперимента заключается в выяснении жизнеспособности и видовой принадлежности дрожжевого грибка (*Saccharomyces cerevisiae*) в пачке дрожжей из магазина для последующего эксперимента «Метод пяти рукопожатий».

Для проведения эксперимента понадобилось:

1. Собрать микробиологической петлёй 1мкл дрожжей из пачки;
2. Ресуспендировать содержимое петли в стерильном физиологическом растворе;
3. Посеять 10 мкл суспензии дрожжей до отдельных колоний штрихом на чашку Петри с питательными средами: Сабуро, СHROMagarCandida;
4. Инкубировать 24 часа при температуре +35°C.

**Результаты**: мы наблюдаем рост отдельных колоний грибков. Колонии имеют характерный цвет-фиолетовый на среде СHROMagarCandida. При идентификации на приборе MALDI-подтверждается вид микроорганизма *Saccharomyces cerevisiae.***Вывод**: в пачке дрожжей микроорганизмы являются жизнеспособными и подходят для проведения эксперимента. Выделена чистая культура микроорганизма и подтверждён его вид –*S. Cerevisiae*.

Оценка чистоты и видовой  
принадлежности культуры пекарских дрожжей»

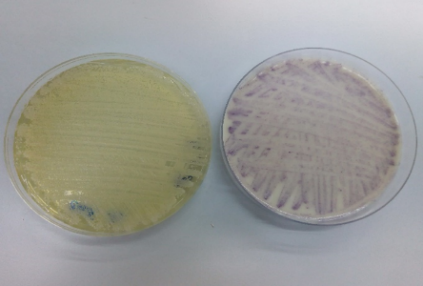
**Эксперимент 2. «Метод пяти рукопожатий»**

Суть эксперимента заключается в том, чтобы показать на примере пекарских дрожжей, как бактерии передаются от одного человека к другому контактным путями выяснить, что при этом происходит с самой культурой.

Проведение эксперимента:

1. Все участники моют и обеззараживают руки Диаспреем;
2. Наносим первому человеку на ладонь с помощью тампона суспензию дрожжей;
   1. ый здоровается за руку со 2-ым;
   2. ой здоровается за руку с 3-им;
   3. ий здоровается с 4-ым;
   4. ый здоровается с 5-ым;
3. У каждого участника эксперимента берётся мазок тампоном с ладони и делается посев на чашку Петри со средой Сабуро и СHROMagar-Candida;
4. Инкубирование чашек 24ч при температуре +35°C.

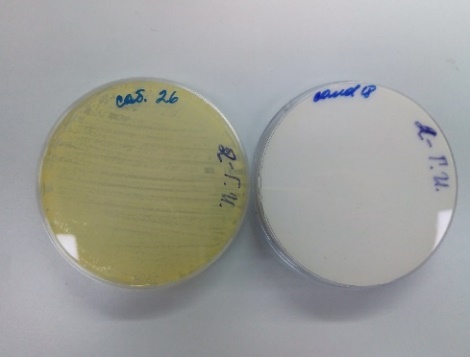
**Результаты:**

1. На 1 чашке Сабуро и СHROMagar-Candida наблюдается

сплошной рост микроорганизмов;

1. На 2 чашке Сабуро и СHROMagar-Candida также сплошной рост;

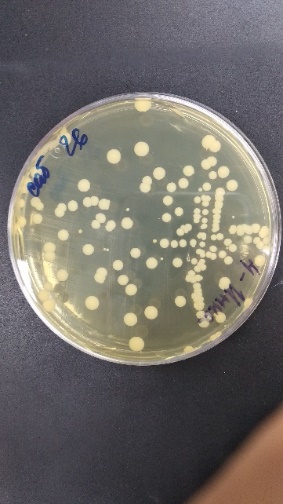
Первые чашки

1. На 3 чашке наблюдается рост отдельных колоний, однако степень обсеменения снижается
2. На 4 степень обсеменения снижается; колонии можно подсчитать (47) –среда Сабуро, на чашке СHROMagar-Candida роста нет;

Вторые чашки

1. На 5 чашке наблюдается минимальное количество колоний 11 – среда Сабуро;

Вторые чашки

1. Помимо культуры *Saccharomyces cerevisiae* на чашке вырастают обычные микроорганизмы, колонизирующие поверхность кожи ладони: *Staphylococcus haemolyticus* (гнойные и воспалительные процессы), *Enterobacter cancerogenus* (вызывает инфекции).

Третьи чашки

Третьи чашки

**Выводы:**

Четвёртая чашка

1. С каждым последующим рукопожатием количество колоний дрожжей смытых с рук участников уменьшалось, но продолжало сохраняться;
2. На коже рук человека постоянно находятся различные условно-патогенные микроорганизмы, которые могут вызывать кишечные инфекции, поэтому чистота рук

Пятая чашка

предотвращает развитие заболеваний, имеющих фекально-оральный путь распространения.

**Эксперимент 3. «Заражение здоровых клубней картофеля»**

Суть данного эксперимента заключается в том, чтобы описать и подтвердить триаду Коха на модели заражённого картофеля.

Проведение эксперимента:

1. В качестве объекта эксперимента выбираем клубень картофеля, поражённый сухой белой гнилью;

Картофель, поражённый сухой белой гнилью

1. Заражаем здоровый клубень картофеля сухой белой гнилью с больного клубня – для этого тщательно моем мылом и дезинфицируем салфеткой здоровый клубень, делаем надрез и вставляем чешуйку кожуры, снятой с поражённого картофеля;
2. Этот клубень убираем в тёмное место и храним при комнатной температуре 14 дней;
3. Делаем посев сухой белой гнили с больного картофеля на чашки Петри со средой Сабуро, McConckey, MullerHinton, Чапмана, СHROMagarCandida - для этого проводим тампоном по поражённому месту и засеваем штрихом питательную среду. Это необходимо для получения патогенна в чистой культуре. Мы выбрали несколько разных обогащённых питательных сред для оценки лучшей выживаемости культуры белой сухой гнили.
4. Отправляем чашки Петри с посевом в термостат +35°C для дальнейшего роста.

**Результаты:**

1. Ранее здоровый клубень картофеля был поражён сухой белой гнилью;
2. С надреза, куда была вставлена чешуйка, гниль распространилась по площади всего клубня;
3. Для распространения патологического процесса понадобилось 14 дней.

**Оценка результатов посева культур (1 пассаж)**

1. На всех чашках выросли культуры микроорганизмов, чашки заросли полностью в связи с большой бактериальной массой;

Поражение сухой белой гнилью

1. Наблюдается несколько видов колоний с различной морфологией;
2. На кровяном агаре в нескольких местах образовались зоны гемолиза;

Распространение гнили

1. На среде Чапманавыросли ярко-жёлтые колонии;
2. На чашке СHROMagarCandida наблюдается рост зеленоватых колоний;
3. На среде Сабуро мы видим характерные колонии плесени.

Был проведён повторный посев отдельных колоний на чашки со свежими средами для точности определения культур. После определения видовой принадлежности культур с использованием MALDI были отобраны нужные для продолжения эксперимента.

**Оценка результатов посева культур (2 пассаж)**

1. На кровяной чашке наблюдается рост отдельных колоний, пригодных для идентификации, в некоторых местах наблюдаются зоны гемолиза;
2. На чашке СHROMagarCandida обнаружен рост грибков и отдельных колоний фиолетового и синего цветов (*Myroides odoratus*);
3. На среде McConckey замечен рост крупных колоний розоватого цвета. (*klebsiella oxytoca, Acinterobacter dijkshoorniae*);
4. На чашке Сабуро – белые колонии с пушистой «шапкой» и прозрачные колонии-*Geotrichum silvicola* и ***Geotrichum candidum***;
5. На кровяном агаре наблюдается рост крупных колоний и зоны гемолиза*Enterobactercloacae;*
6. На среде MullerHinton – множество отдельных колоний.

Для заражения здорового картофеля был выбран грибок ***Geotrichum candidum***, который вызывает у клубней поражения под названием «резиновая гниль». После крестообразного насечения на плодовом теле картофеля, тампон с *Geotrichum candidum* был помещён в надрез и клубень оставили на 14 дней в тёмном месте при комнатной температуре. Спустя две недели, на здоровом клубне картофеля образовалась зона поражения – что говорит о патологическом процессе в плодовом теле картофеля.

**«Заражение здорового клубня культурой «*Geotrichum candidum»***

Заражение картофеля грибком ***Geotrichum candidum***

Такая же зона поражения наблюдается у картофеля, который был поражён непосредственно в эксперименте при помещении чешуйки с заражённого клубня.

**Выводы:**

1. Проведя первый опыт с пятью рукопожатиями, мы выяснили, что с каждым рукопожатием количество колоний на чашке Петри уменьшалось, но продолжало сохраняться. Проследили сохранение патогенного возбудителя до пятого рукопожатия (исключая тот факт, что первоисточник уже не является распространителем инфекции).
2. Микроб-возбудитель *Geotrichumcandidum* обнаруживался в нашем случае заболевания картофеля, но не был найден у здоровых клубней.
3. Микроб-возбудитель был выделен из организма, заражённого «резиновой гнилью» клубня в чистой культуре.
4. Введение чистой культуры гриба в плодовое тело картофеля вызвало данную болезнь.

**Список использованных источников**

Знаменитые врачи. Доступно на: [https://www.historymed.ru/encyclopedia/doctors/].