

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ
Б1.В.ОД.4.2 Микология**

Направление подготовки (специальность) 36.06.01 Ветеринария и зоотехния
(уровень подготовки кадров высшей квалификации по программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре)

Профиль подготовки (специализация) 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций.....	3
1.1 Лекция № 1 Строение вегетативного тела грибов	3
1.2 Лекция № 2 Размножение грибов.....	7
1.3 Лекция № 3 Генетика грибов.....	11
1.4 Лекция № 4 Физиология грибов	16
1.5 Лекция № 5 Вторичный метаболизм грибов	19
1.6 Лекция № 6 Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы.....	22
1.7 Лекция № 7 Принципы микологической систематики и номенклатуры	27
1.8 Лекция № 8 Микозы животных	34
1.9 Лекция № 9 Микроскопические грибы – возбудители микотоксикозов.....	40
1.10 Лекция № 10 Экология грибов	45
2. Методические указания по проведению практических занятий.....	51
2.1 Практическое занятие № ЛР -1 Размножение грибов.....	51
2.2 Практическое занятие № ЛР-2 Отбор материала для микологического исследования	54
2.3 Практическое занятие № ЛР -3 Питательные среды для культивирования грибов. Приготовление сред.....	59
2.4 Практическое занятие № ЛР -4 Техника посева и культивирования грибов. Приготовление микроскопических препаратов	61
2.5 Практическое занятие № ЛР -5 Изучение морфологии плесневых грибов. Идентификация плесневых грибов	64
2.6 Практическое занятие № ЛР -6 Противогрибковые препараты. Определение лекарственной чувствительности грибов.....	72
2.7 Практическое занятие № ЛР -7 Выделение грибов из природных субстратов. Выделение грибов из почвы	75
2.8 Практическое занятие № ЛР -8 Экология грибов	87
2.9 Практическое занятие № ЛР -9 Прикладная микология.....	90

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

Лекция №1. (2 часа)

Тема «Строение вегетативного тела грибов».

Вопросы лекции:

1. Мицелий и его особенности.
2. Строение грибной клетки.
3. Видоизменения мицелия.
4. Ложные ткани.

Краткое содержание

1. Мицелий и его особенности.

Типичное вегетативное тело, или таллом (трофическая стадия), большинства грибов, мицелий, представляет собой систему ветвящихся трубок, гиф, с апикальным ростом и боковым ветвлением. Мицелий может быть клеточный и неклеточный.

Неклеточный мицелий лишён перегородок. В течение его роста деления ядер происходят в нём без образования клеточных перегородок — септ, что ведёт к развитию большой массы цитоплазмы, содержащей много ядер. Эта многоядерность, или **ценоцитичность** мицелия грибов пространственно ограничена в своем разрастании клеточными стенками гиф. Ценоцитический мицелий фактически представляет собой одну гигантскую многоядерную клетку. Он характерен для ряда представителей отдела хитридиомикота, а также для представителей отделов оомикота и зигомикота.

Другой тип вегетативного тела грибов — клеточный, или септированный, мицелий, разделённый перегородками на одно-, дву- или многоядерные клетки. Он характерен для сумчатых, базидиальных и несовершенных, или анаморфных грибов. Септы могут формироваться и на неклеточном мицелии, обычно это происходит при повреждении мицелия или при образовании репродуктивных органов. При делении клетки септа вырастает с боков к центру. В центре септы обычно остаётся пора, через которую из клетки в клетку перемещаются питательные вещества и некоторые клеточные органеллы.

Существуют и немиецелиальные грибы. У части хитридиевых и у гифохитридиевых, являющихся в основном внутриклеточными паразитами водорослей и водных грибов, таллом одноклеточный, микроскопический, иногда даже лишённый в вегетативном состоянии клеточной стенки, которая образуется только при формировании репродуктивных органов. Клетка бывает сферической, эллипсоидальной или неправильной формы размером от нескольких микрометров до нескольких сотен микрометров по большему диаметру.

У некоторых грибов из этих групп от такой клетки отходят тонкие разветвленные нитевидные структуры, лишённые собственных ядер, — ризомицелий пронизывающий субстрат. Ризомицелий можно рассматривать как зачаточный мицелий, эволюционную ступень к настоящему неклеточному мицелию (рис. 5-3). При образовании ризомицелия может развиваться только одна клетка, содержащая ядро, которая в дальнейшем становится центром образования ризомицелия и развития репродуктивных органов. Это моноцентрический ризомицелий. Если у особи имеется несколько центров образования ризомицелия и, соответственно, несколько центров формирования репродуктивных органов — это полицентрический ризомицелий.

У некоторых грибов, например дрожжей, относящихся, в основном, к классу сумчатых, вегетативное тело представлено одиночными почкующимися или делящимися клетками. Если такие почкующиеся клетки не расходятся, то образуется псевдомицелий.

2. Строение грибной клетки.

Грибы - типичные эукариоты с характерным строением клетки. Тем не менее, многие цитологические особенности свидетельствуют о несомненном своеобразии их клетки. Все грибы - гетеротрофы, поэтому никаких пластид в цитоплазме нет.

Поверхностный аппарат клетки. Мицелиальная клетка грибов (рис. 5), так же как и растительная клетка, снаружи окружена *клеточной стенкой*. Химический состав этой структуры и соотношение ее компонентов определяются в первую очередь систематическим положением грибов, хотя зависят также от стадии развития грибов и от экологических условий. Как и у растений, в клеточной стенке грибов преобладают полисахариды, из них основной — хитин (подобно покровам насекомых и ракообразных), что и отличает грибную клетку от растительной, стенка которой построена из целлюлозы. Исключение составляют представители отделов Oomycota и Hyphochytridiomycota, в состав клеточной стенки которых входит целлюлоза (у представителей последнего отдела наряду с хитином), что свидетельствует об их ином происхождении по сравнению с другими грибами. Хитин грибной клетки отличается от хитина, образующего покровы членистоногих, низким содержанием азота. Кроме хитина (или целлюлозы у Oomycota) в состав клеточной стенки грибов входят глюканы, а также галактаны и маннаны. У представителей порядка Mucorales (отдел Zygomycota) обнаружен хитозан. Из неполисахаридных соединений в стенке клеток грибов могут быть обнаружены белки, липиды, пигменты, в первую очередь меланины, и ионы неорганических соединений. Снаружи клеточная стенка грибов часто покрыта слизистым слоем - капсулой.

Непосредственно с плазмалеммой связана специфическая структура, нередко считающаяся характерной исключительно для клеток грибов. Это ламеллы. Они представляют собой складку плазмалеммы, в периплазматическом пространстве которой находится большое количество разнообразных пузырьков и трубочек. Предполагается, что эта структура играет определенную роль в синтезе полисахаридов клеточной стенки.

Основные органеллы клетки. Под плазмалеммой располагается цитоплазма с характерными для эукариотических клеток органеллами, многие из которых имеют у грибов некоторые отличительные особенности. Рибосомы в грибной клетке в основном свободные, не связанные с эндоплазматическим ретикулумом. Эндоплазматический ретикулум развит у грибов относительно слабо. В большинстве случаев в вегетативных клетках он гладкий. Шероховатый эндоплазматический ретикулум встречается значительно реже. Аппарат Гольджи типичного для эукариотических клеток строения в вегетативных клетках большинства грибов не обнаружен. У представителей отделов Ascomycota и Basidiomycota в клетках мицелия имеются так называемые цистерны Гольджи, являющиеся, по-видимому, специализированными цистернами эндоплазматического ретикулума. Митохондрии у грибов отличаются более мелкими в сравнении с другими эукариотами размерами. Исключение составляют гигантские митохондрии (митохондрии) зооспор некоторых представителей отдела Chytridiomycota. Одна из особенностей грибной клетки — большое количество вакуолей, пузырьков, микротелец, выполняющих разнообразные функции. **Ядерный аппарат.** Ядро в грибной клетке — типично эукариотическое. Оно окружено двойной мембраной,

имеющей хорошо заметные поры. В большинстве случаев хорошо различимо ядрышко. У грибов встречаются одноядерные (монокарионы), двухъядерные (дикарионы) и многоядерные (мультикарионы) клетки. Одноядерные клетки известны у представителей порядка Erysiphales и других сумчатых грибов, клетки мицелия базидиальных грибов чаще всего двухъядерные. Многоядерны клетки многих несовершенных грибов. Размеры ядер чаще от 2 до 12 мкм, преобладают размеры в 3 — 4 мкм. Особенность ядер грибной клетки — их способность к передвижению, миграция их из старых частей мицелия к растущим, что может быть одной из причин появления мультикариотических клеток. **Строение порового аппарата септ.** Большое значение для систематики имеет строение клеточных перегородок, или септ. Существует несколько типов септ. Наибольший таксономический интерес представляет строение септ у аскомицетов и базидиомицетов.

Аскомицетный тип септ — пластинка с центральной порой, через которую и мигрируют ядра. Пора снабжена микротельцами и другими структурами, обеспечивающими при необходимости частичную или полную изоляцию клетки. Среди них важнейшие структуры — тельца Воронина. Этот тип септ обнаружен в отделах Ascomycota и Deuteromycota.

Иное строение септ у большинства базидиомицетов, для которых характерен долиопоровый тип более сложного строения. Начало развития такой септы сходно с первым типом — ее рост начинается из внутренних слоев клеточной стенки и также направлен внутрь гифы. Но далее концы отростков в центре гифы расширяются, возникают кувшинообразные септальные вздутия, которые не смыкаются, образуя пору. Эти вздутия обычно окружены мембраной — парентосомой, которая нередко тесно связана с эндоплазматическим ретикулумом. Парентосома чаще всего не препятствует миграции ядер через такие септы.

3.Видоизменения мицелия. У грибов иногда можно наблюдать известную дифференцировку гиф мицелия. Отдельные гифы в результате приспособления к выполнению определенных функций несколько изменяют свой внешний вид.

Столоны, ризоиды, аппрессории и гифоподии. У некоторых мукоровых грибов можно обнаружить воздушные дугообразные гифы, которые называют столонами, с помощью которых гриб быстро распространяется по субстрату. Столоны прикрепляются к субстрату ризоидами. Ризоиды — это пучок коротких разветвленных гиф, напоминающих по внешнему виду корни. У многих грибов наблюдается образование так называемых **аппрессориев**, которые, так же как и ризоиды, выполняют функцию прикрепления. Аппрессории имеют вид плоских утолщений на ветвях гиф и могут быть простыми и лопастными и представлять собой одну видоизмененную клетку мицелия, либо могут быть сложными, многоклеточными. **Гифоподии** - имеют вид вздутых одноклеточных коротких боковых ветвей гифы. Считаются аналогами аппрессориев, которые служат для прикрепления к субстрату грибницы (некоторые виды порядка Perisporiales), или как запасные органы, где скапливаются питательные вещества. **Гаустории и арбускулы.** Гаустории представляют собой своеобразные органы питания и встречаются исключительно у грибов-паразитов (мучнисторосяных, ржавчинных, пероноспорных и др.). Гаустории состоят из трех частей: материнской клетки, расположенной обычно в межклетниках растения-хозяина, шейки гаустории — узкой части, пронизывающей клеточную стенку, и расширенной части — собственно гаустории, расположенной в полости клетки-хозяина. Аналогами гаусторий грибов-паразитов можно считать арбускулы

грибов-микоризообразователей. Арбускулы представляют собой многократно дихотомически разветвленные гифы, проникающие в паренхимные клетки корня. **Анастомозы, пряжки, липкие петли.** При обильном ветвлении гифы мицелия могут расти по направлению друг к другу и в местах соприкосновения нередко сливаются с образованием мостиков, которые носят особое название — анастомозы. **Пряжки** - это маленькие клетки, лежащие сбоку гифы против поперечных перегородок. Пряжки встречаются преимущественно у базидиальных грибов и служат систематическим признаком, устанавливающим принадлежность к этой группе грибов. Роль пряжек состоит в том, что через них ядра передаются из одной клетки в другую. У некоторых грибов мицелий в присутствии соответствующих животных (личинок нематод) формирует **липкие петли**, которые, соединяясь друг с другом, образуют сети. Эти структуры рассматриваются как приспособления грибов-хищников к улавливанию своей жертвы. **Оидии, хламидоспоры.** К видоизменениям мицелия относят оидии, представляющие собой различной формы (цилиндрические, эллипсоидальные или др.) клетки, на которые распадается мицелий. Оидии образуются в неблагоприятных условиях, связанных с кислородным голоданием. При подходящих условиях оидии прорастают в новый мицелий. Хламидоспоры - представляют собой толстостенные клетки, возникающие одиночно или группами на вегетативном мицелии. Иногда они обособляются и становятся свободными, не связанными с мицелием. Хламидоспоры выдерживают высыхание и действие других неблагоприятных условий и могут сохраняться жизнеспособными до 10 и более лет. Они содержат значительные запасы питательных веществ (жиров, углеводов), их плотная клеточная стенка часто пигментирована и имеет различные скульптурные утолщения. **Везикулы, геммы.** Аналог хламидоспор — везикулы, встречающиеся у грибов-микоризообразователей. Везикулы — это пузырьвидные вздутия, содержащие капли жира, функция запасания питательных веществ. По своему происхождению очень близки к хламидоспорам так называемые **геммы**. Они имеют толстостенную окрашенную оболочку, что позволяет им перезимовывать в неблагоприятных условиях. Геммы встречаются среди сапролегниевых, энтомофторовых, головневых и некоторых несовершенных грибов. **Склероции.** Под названием склероций понимают такое уплотнение грибных гиф, при котором получается твердое тело. Склероции представляют собой темноокрашенные твердые тела, состоящие из плотного сплетения мицелиальных гиф.

1. Ложные ткани.

У грибов нет настоящих тканей, а те сложные образования в виде плодовых тел или крупных склероциев состоят не из настоящих, а из так называемых ложных тканей. И хотя нередко микроскопически «ткани» грибов напоминают ткани высших растений, но по происхождению они существенно отличаются. Анатомическая картина массивных плодовых тел гриба представляет собой сплетение и срастание гиф, каждая из которых делится только в одном поперечном направлении. Такие соединения мицелия называют ложными тканями или плектенхимой. По происхождению плектенхима состоит из нитчатых элементов.

По структуре (морфологии) различают два типа ложных тканей: параплектенхиму и прозоплектенхиму. **Параплектенхима** представлена изодиаметрическими клетками, т.е. клетками одинакового диаметра, и внешне напоминает паренхимную ткань. **Прозоплектенхима** образована удлиненными клетками, расположенными более рыхло, чем параплектенхима. У грибов еще отмечают палисадную «ткань», которую напоминает

гимениальный слой в плодовых телах некоторых сумчатых грибов, когда еще сумки находятся в незрелом состоянии, но это чисто внешнее сходство.

Лекция №2. (2 часа)

Тема: «Размножение грибов».

Вопросы лекции:

1. Плеоморфизм.
2. Вегетативное размножение
3. Бесполое размножение
4. Половое размножение

Краткое содержание

1. Плеоморфизм. Для многих грибов характерно явление *плеоморфизма* — формирования и жизненном цикле нескольких спороношений разного облика. Половое спороношение (*телеоморфа*) обычно бывает только одно, а бесполовых спороношений (*анаморф*) может быть одно или несколько. Телеоморфа может отсутствовать, так что спороношения представлены одной или несколькими анаморфами. При этом найти правильное место таким грибам в системе (которая строится преимущественно на основании строения телеоморфы) бывает иногда очень сложно. В связи с этим для плеоморфных грибов допускается употребление самостоятельных названий каждой стадии, но при этом название телеоморфы распространяется на все стадии, а название анаморфы относится только к соответствующей стадии. В частности, такие широко известные грибы, как аспергилл (*Aspergillus*) и пеницилл (*Penicillium*), — это, строго говоря, название не грибов, а анаморф некоторых аскомицетов. Названия же этих грибов (телеоморфы) — *Talaromyces*, *Eurotium* и др. У многих видов телеоморфа вообще не известна и названия для нее нет. Совокупность анаморф высших грибов, прежде всего аскомицетов, составляет группу (формальный отдел) *несовершенных грибов*, или *дейтеромицетов* (Fungi imperfecti, Deuteromycota). Вследствие отсутствия мейоза в ядерном цикле их называют митотическими грибами. При отсутствии телеоморфы единственная возможность установить их принадлежность к тому или иному таксону аскомицетов — сравнение их рибосомальных генов со структурой соответствующих генов аскомицетов. У грибов встречаются три типа размножения: вегетативное, бесполое и половое. У многих видов они последовательно сменяют друг друга в цикле развития. Структуры, образующиеся при бесполом и половом размножении, часто сложны по строению и морфологически значительно отличаются друг от друга.

2. Вегетативное размножение обычно осуществляется неспециализированными частями мицелия, которые дают начало новому мицелию. Мицелий большинства грибов обладает высокой способностью к регенерации, что и лежит в основе этого способа размножения и широко используется, например, при приготовлении грибницы для искусственного выращивания съедобных грибов, таких как шампиньон двуспоровый, вешенка обыкновенная и др., а также при получении биомассы грибов в пищевых и кормовых целях.

К специализированным структурам вегетативного размножения относятся **оидии**, тонкостенные клетки, и **хламидоспоры**, толстостенные клетки, на которые распадается

мицелий и которые дают начало новому мицелию. Хламидоспоры выполняют и функцию перенесения неблагоприятных условий. У большинства дрожжей вегетативное размножение происходит путем почкования клеток.

3. Бесполое размножение грибов может осуществляться подвижными и неподвижными спорами. Зооспоры образует небольшое число грибов, водных и наземных, у которых отчетливо прослеживаются генетические связи с водными. Большинство видов грибов размножается неподвижными спорами, что указывает на их очень давний выход на сушу. Споры могут формироваться *эндогенно* в спорангиях (*спорангиоспоры*) или *экзогенно* (*конидии*). Эндогенные споры освобождаются только после разрушения спорангия, что происходит обычно при его намокании. Обычно в спорангиях формируется большое количество (тысячи) спор, однако некоторые виды образуют мелкие спорангии (*спорангиоли*), в которых находится лишь несколько спор (иногда одна). В последнем случае оболочки спорангиоли и споры могут срастаться и тогда эндогенная спора функционирует как экзогенная. Это свидетельствует о первичном возникновении эндогенных спор, которые были предшественниками экзогенных.

Конидии образуются у большинства видов грибов (аскомицеты, базидио-мицеты, некоторые зигомицеты). Несовершенные грибы, или дейтеромицеты, размножаются только конидиями. Они могут быть бесцветными (гиалиновыми) или темноокрашенными (меланизированными), одноклеточными или с перегородками, одно- или многоядерными, формироваться одиночно, в головках или в цепочках. Формируются они на конидиеносцах, которые могут представлять собой недифференцированные гифы или специальные выросты, специфичные по форме (булавовидные, древовидно-разветвленные и др.). У многих видов грибов конидиеносцы расположены на мицелии группами, защищенными специальными сплетениями гиф мицелия (ложка, пикниды). Большой интерес представляет и процесс формирования конидий (конидиогенез). По способу образования выделяют *таллоконидии* и *бластоконидии*. При талломном (таллическом) способе конидия развивается из целой клетки, которая целиком превращается в спору; изменение размеров и формы конидии происходит уже после ее отделения перегородкой от конидиеносца. При бластическом конидиеобразовании спора приобретает свою форму и размеры до отделения перегородкой от конидиогенной (материнской) клетки, и на ее образование идет не все содержимое клетки, которая, следовательно, может участвовать в формировании нескольких конидий. В этом заключается принципиальная разница между двумя типами конидиогенеза: при таллическом конидиогенная клетка не пролиферирует, а при бластическом она претерпевает многократные митотические деления, давая *клон* одинаковых спор, подобно стволовым клеткам млекопитающих.

4. Половое размножение у грибов, связанный с ним процесс смены ядерных фаз, строение половых органов — всё это отличается у разных групп грибов. Существеннейшие моменты полового процесса у грибов: **плазмогамия, кариогамия и мейоз**. Соответственно гриб может находиться в гаплоидной или диплоидной стадиях. Плазмогамия и кариогамия у сумчатых и базидиальных грибов не совпадают во времени, в результате чего после плазмогамии у них возникает особая стадия **дикариотического мицелия**, когда гаплоидные ядра попарно ассоциированы, сближены, но не слились и образуют **дикарион**. Ядра дикариона обычно синхронно делятся с параллельным расположением осей веретен деления. В определенный момент цикла развития они сливаются, образуя диплоидное ядро, которое затем делится редукционно.

В результате полового процесса образуются гаплоидные, неоднородные в генетическом отношении споры, что принципиально отличает их от спор бесполого размножения грибов. Эти гаплоидные споры располагаются или на мицелии или, чаще, на поверхности или внутри плодовых тел различного строения, которые называются **телеоморфами**. Таким образом, размножение с помощью спор, возникших половым путем, даёт начало формам с новой комбинацией генетического материала, что является основой дальнейшей эволюции форм, а размножение спорами, возникшими бесполом путем, способствует распространению и сохранению данной формы.

Типы полового процесса у грибов. Половое размножение у грибов известно у всех групп, за исключением анаморфных, или несовершенных, грибов, за что они и получили такое название. Половой процесс у грибов разнообразен и его особенности лежат в основе выделения классов. У грибов известно три основных типа полового процесса: гаметогамия, гаметангиогамия и соматогамия

Гаметогамия — слияние гамет, образующихся в гаметангиях. Различают **изогамия** — слияние подвижных морфологически сходных гамет и **гетерогамия** — слияние подвижных, отличающихся по размерам и часто по степени подвижности гамет. Эти два типа гаметогамии характерны для хитридиевых и гифохитридиевых грибов. При **оогамии** крупные, неподвижные яйцеклетки, формирующиеся в специальных **оогониях**, оплодотворяются мелкими, подвижными **сперматозоидами**, развивающимися в специализированных **антеридиях**. У многих грибов с этим типом полового процесса сперматозоиды не образуются, а яйцеклетка оплодотворяется недифференцированным на сперматозоиды содержимым выростов многоядерного антеридия. Такой тип оогамии характерен для всех представителей отдела оомикота.

Второй тип полового процесса, **гаметангиогамия**, состоит в слиянии двух обычно многоядерных специализированных структур, содержимое которых не дифференцировано на гаметы. Гаметангиогамия характерна для зиго- и аскоми-кот. Гаметангиогамия у зигомикот носит название **зигогамии**. Она заключается в слиянии в основном многоядерных клеток, гаметангиев, хорошо отличимых от вегетативного мицелия, на котором они формируются, но недифференцированных морфологически по половому знаку на мужской и женский. Из образовавшейся в результате их слияния зиготы формируется одетая толстостенной окрашенной оболочкой **зигоспора**, которая прорастает после периода покоя в особый зародышевый спорангий

У аскомикот при гаметангиогамии также сливаются два многоядерных гаметангия, но у них, в отличие от зигомикот, половые органы дифференцированы на женский — **аскогон** и мужской — **антеридий**. Аскогон состоит из двух клеток: крупной многоядерной, или собственно аскогона, и тонкой нитевидной — **трихогины**, помещающейся на его вершине, через которую в аскогон переливается содержимое многоядерного антеридия. При этом происходит только плазмोगамия, а ядра ассоциируются в пары, образуя **дикарион**. Из оплодотворенного аскогона без периода покоя вырастают **аскогенные** дикариотичные гифы. В их клетках происходит слияние ядер дикариона и образование диплоидного ядра, которое в дальнейшем делится мейотически. В результате этого процесса на аскогенных гифах достаточно сложным путем формируются особые образования — **сумки**, или **аски**, внутри которых после митотического деления постмейотических ядер формируются восемь эндогенных гаплоидных **аскоспор**.

Третий тип, **соматогамия**, — половой процесс, при котором сливаются обычные соматические, или вегетативные, клетки мицелия. Половые органы и гаметы отсутствуют.

Соматогамия характерна для некоторых представителей отделов хитридиомикота и гифохитридимикота, имеющих одноклеточный таллом. В этом случае целиком сливаются две одноклеточные особи. Такой тип соматогамии называется **хологамией**. Соматогамия у базидиомикот заключается в слиянии двух вегетативных клеток гаплоидного мицелия. При этом, как и у аскомикот, сначала имеет место только плазмогамия, в результате чего формируются дикарионы и образуется дикариотический (состоящий из двухядерных клеток) мицелий. Это наиболее длительная стадия в цикле развития базидиальных грибов. Затем на этом дикариотическом мицелии формируются особые клетки, **базидии**, в которых происходит слияние ядер дикариона и мейотическое деление диплоидного ядра, после чего на базидии формируются **экзогенные** гаплоидные **базидиоспоры**.

Эндогенные аскоспоры сумчатых грибов и экзогенные базидиоспоры базидиальных образуются в результате полового процесса, т. е. их появление связано с половым размножением этих групп. Половой процесс сумчатых и базидиальных грибов имеет две характерные общие особенности: во-первых, разрыв между плазмогамией и кариогамией и появление дикариотической фазы и, во-вторых, отсутствие у зиготы состояния покоя: мейотическое деление диплоидного ядра происходит сразу же после слияния гаплоидных ядер дикариона.

По характеру половой дифференцировки у грибов различают **гомоталлические** (обоеполюе) и **гетероталлические** (раздельнополюе) формы. У гомоталлических грибов к слиянию способны клетки одного и того же мицелия. На одном и том же мицелии формируются и мужской и женский половые органы (например, оогонии и антеридии у оомикот). У гетероталлических грибов на мицелии, выросшем из одной споры, половые органы не закладываются и, соответственно, зиготы не образуются. Они развиваются лишь при встрече двух мицелиев, отличающихся друг от друга по половому знаку (+ и -, или мужской и женский). Понятие гетероталлизма относится к гаплоидной стадии, так как определение пола у грибов происходит в основном генотипически. Гетероталлизм, или раздельнополюе, у грибов может быть двух типов: **биполярный**, когда пол определяется одной парой аллелей, и **тетраполярный**, когда пол определяется двумя парами аллелей, локализованных в разных хромосомах и независимо комбинирующихся.

У несовершенных (анаморфных) грибов половой процесс отсутствует, и жизненный цикл эти грибы проводят в гаплоидном состоянии. В определённой степени отсутствие полового процесса в этой группе компенсируется гетерокариозом и происходящим на его основе парасексуальным процессом. **Гетерокариоз**, или разнаядерность, — это наличие в клетках мицелия генетически разных ядер. Гетерокариоз характерен для многих групп грибов и обеспечивает адаптацию грибов к изменяющимся условиям среды. В таком мицелии ядра иногда могут сливаться, образуя диплоидное гетерозиготное ядро. Такое ядро делится митотически, при этом происходит митотическая рекомбинация и затем вегетативная гаплоидизация этих диплоидных ядер путем потери ими части хромосом. Этот сложный процесс, включающий в качестве существеннейшего момента митотическую рекомбинацию, получил название **парасексуального процесса**. Он известен у разных групп грибов, и имеет особое значение для несовершенных грибов, лишённых настоящего полового процесса.

Лекция №3. (2 часа)

Тема: «Генетика грибов».

Вопросы лекции:

1. Геном грибов.
2. Митохондриальный геном грибов
3. Грибные плазмиды
4. Вирусы грибов
5. Гетерокариоз и вегетативная несовместимость
6. Ядерные жизненные циклы
7. Особенности деления ядра

Краткое содержание

1. Геном грибов. Геном грибов, как и у всех эукариот, состоит из ядерных и митохондриальных ДНК-содержащих структур, к элементам, отвечающим за наследственность относят также плазмиды и вирусы.

По размеру и строению ядерного генома настоящие грибы занимают как бы промежуточное положение между прокариотами и остальными эукариотами, в среднем размер генома грибов на 2 порядка меньше, чем у высших растений. Число хромосом колеблется от 2 до 28, у большинства видов - от 10 до 12. Размер хромосом у грибов также значительно меньше, чем у других эукариот. Так, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеется 15 хромосом, но каждая из них примерно в 5 раз меньше, чем «хромосома» бактерии *Escherichia coli* и всего в 4 раза превышает размер ДНК бактериофагов группы Т. Количество ДНК на гаплоидный геном составляет от 0,015 пг (у *Saccharomyces cerevisiae*) до 8,3 пг (у зигомицетов рода *Entomophaga*), то есть колеблется более, чем в 500 раз (у высших растений разница в содержании ДНК составляет менее 100 раз). По числу нуклеотидных пар (н. п.) наименьший геном (9,7 млн н. п.) имеет *Eremothecium gossypii*, поражающий хлопчатник. Среди эукариот меньший размер генома известен только у некоторых водорослей, не живущих свободно, а являющихся эндосимбионтами. Для базидиомицетов характерные размеры генома составляют от 0,023 пг (или 21 млн н. п.) у вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) до 0,1 пг (90 млн н. п.) у плутея оленьего (*Pluteus cervinus*).

Характерной особенностью, обнаруженной у некоторых видов грибов, является наличие мелких, так называемых В-хромосом. В отличие от «нормальных» хромосом, число их непостоянно и может быть различным у штаммов одного и того же вида. Наличие В-хромосом не обязательно для обеспечения жизнедеятельности клетки, но они выполняют функцию адаптации к внешним условиям. Например, у фитопатогенных видов эти хромосомы контролируют факторы вирулентности и штаммы, лишённые их, способны только к сапротрофному питанию.

Промежуточное положение между бактериями и высшими эукариотами грибы занимают и по структуре ядерного генома. Для эукариот характерно наличие множества повторяющихся последовательностей ДНК, на долю которых приходится 10-50 и более процентов от всего генома, что отчасти и обуславливает большой размер эукариотического генома. У бактерий повторяющиеся последовательности почти отсутствуют, а у грибов составляют обычно 10-15 % генома. Известны лишь единичные исключения, например, зигомицет *Phycomyces blackesleeianus*, у которого геном состоит на

45 % из повторяющихся последовательностей. Грибоподобные организмы, не относящиеся к царству настоящих грибов, по размерам повторяющихся последовательностей сходны с высшими эукариотами (у оомицетов повторы составляют 15—65 %).

Структура грибных генов аналогична таковой у других эукариот - гены состоят из экзонов (участков, кодирующих аминокислотные последовательности белков) и интронов (некодирующих участков, вырезаемых из гена перед трансляцией), интроны однако у грибов также отличаются меньшими размерами. Средняя длина их составляет 85 н. п., а размах значений длины - от 36 до 250 н. п. Благодаря такой структуре генома и самих генов, у грибов больший процент ДНК (по сравнению с высшими эукариотами) участвует в кодировании белков.

2. Митохондриальный геном грибов.

Митохондриальный геном грибов представлен кольцевыми молекулами мтДНК, размер которых варьирует от приблизительно 20 000 н. п. до более, чем 100 000 н. п. Эта ДНК содержит как некодирующие участки, так и гены, кодирующие рибосомные (рРНК) и транспортные (тРНК) рибонуклеиновые кислоты, а также такие ферменты, как цитохромоксидазы, АТФазы, являющиеся необходимыми компонентами дыхательной цепи. Организмом с хорошо изученным митохондриальным геномом являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. У них имеется 20-70 молекул мтДНК, упакованных в один или несколько нуклеоидов, что составляет 5-30 % от всего генома. Размер мтДНК у этих дрожжей составляет 85 779 н. п., она содержит значительную долю некодирующих участков, 2 гена рРНК, 25 генов тРНК и 26 генов, кодирующих ферменты окислительного фосфорилирования. Мутации в митохондриальных генах часто оказываются летальными, которые приводят к снижению скорости роста, дыхательной активности грибов.

Плазмиды у эукариот наиболее характерны для царства грибов. Предполагают, что наличие их связано со спецификой физиологии и среды обитания грибов и даёт им преимущества в прорастании и распространении.

3. Грибные плазмиды

Грибные плазмиды могут находиться в ядре, митохондриях или в цитоплазме и представляют собой линейные или кольцевые молекулы ДНК. Большинство плазмид принадлежат митохондриям и обычно их наличие не проявляется в фенотипе, однако известны плазмиды, связанные с патогенностью штаммов, так называемые *killer*-плазмиды, и плазмиды, вызывающие старение колонии. *Killer*-плазмиды отвечают за синтез определённых токсинов и одновременно за устойчивость к этим токсинам, то есть клетки, имеющие такие плазмиды убивают клетки, не имеющие их.

Плазмиды грибов разделяют на три класса в зависимости от структуры молекулы и наличия гомологии с мтДНК:

1. линейные, не имеющие гомологичных последовательностей с митохондриальным геномом;
2. циклические, не имеющие гомологий с мтДНК - могут вызывать синдром старения;
3. циклические, имеющие гомологии с мтДНК - вызывают синдром старения.

Плазмиды могут передаваться через анастомозы мицелия (горизонтально) и через конидии (вертикально), также могут являться не видоспецифичными, что делает их идеальными для использования в качестве векторов переноса в генетической инженерии.

4. Вирусы грибов

Вирусы грибов содержат двухцепочечную молекулу РНК и вызывают различные симптомы: снижение или повышение вирулентности у патогенных видов, дегенерацию мицелия и плодовых тел, изменение окраски, подавление спороношения. Некапсидированные, то есть не покрытые белковыми оболочками вирусные РНК передаются через анастомозы независимо от митохондрий. Вирусные заболевания могут наносить ущерб грибоводческим предприятиям, например, вызывают побурение плодовых тел шампиньона, изменение окраски у зимнего опёнка, что снижает его коммерческую ценность. Вирусы, вызывающие гиповирулентность грибов-патогенов могут использоваться для контроля над заболеваниями растений.

5. Особенности деления ядра

Митоз и мейоз у грибов отличаются рядом специфических особенностей. У большинства видов грибов деление ядра происходит по закрытому типу, то есть с сохранением ядерной оболочки. Центриоли имеются лишь у псевдогрибов и некоторых грибов, имеющих жгутиковые стадии, у остальных видов веретено деления формируется более просто устроенными белковыми структурами - полярными тельцами веретена. Фазы митоза чередуются быстро, а хромосомы имеют небольшие размеры; в сочетании эти факторы затрудняют микроскопическое исследование, поэтому ранее считалось, что деление ядер у грибов происходит амитотически. Телофаза митоза происходит несинхронно, в результате чего могут образовываться гетероплоидные дочерние ядра, то есть содержащие неравное число хромосом. Чаще всего при гетероплоидии наблюдается различное число В-хромосом. Митоз и образование новых клеток (цитокinesis) у мицелиальных (не дрожжевых) грибов происходят независимо друг от друга — ядра перемещаются в дочернюю клетку уже после отделения её перегородкой (септой) от материнской (у грибов с неклеточным мицелием цитокinesis вообще наблюдается редко, при регенерации повреждённых участков и при образовании репродуктивных органов).

Рекомбинация генетического материала у грибов может происходить не только в мейозе, но и в митозе.

При мейотической, или половой рекомбинации у высших грибов диплоидное (зиготическое) ядро без периода покоя делится редукционно с образованием *тетрады* - четырёх гаплоидных ядер, после чего может произойти ещё одно (митотическое) деление и образуется *октада*. Затем ядра тетрады или октады отделяются оболочками и образуют *мейоспоры*. Исследования фенотипа непосредственных продуктов мейоза называют *тетрадным анализом*. Этот метод позволяет определить истинное расщепление признаков, а не статистически достоверное, как в «обычных» генетических экспериментах, подобных опытам Г. Менделя. Тетрадный анализ широко применяется на модельных аскомицетах, у которых споры в асках располагаются в строгом порядке, обусловленном постоянной ориентацией веретена деления при мейозе и последующем митозе (*упорядоченные тетрады*). Применение тетрадного анализа позволяет получить ценную информацию о сцеплении генов, механизме рекомбинации (наличии кроссинговеров) и др.

Митотическая рекомбинация происходит путём слияния гаплоидных ядер в многоядерных вегетативных клетках, при слиянии генетически разнородных ядер образуется гетерозиготный диплоид. В природных условиях вероятность образования такой гетерозиготы высока, поскольку мицелий вырастает из множества генетически неоднородных спор. Впоследствии при митотическом делении такого ядра происходит рекомбинация. Впервые это явление наблюдалось в 1952 году английским микологом Дж.

Ропером, а итальянский генетик Г. Понтекорво назвал его *парасексуальным* (псевдополовым) *процессом* (или *циклом*). Особое значение парасексуальный процесс имеет для «несовершенных грибов», у которых половая рекомбинация отсутствует или образование совершенных (половых) стадий происходит очень редко.

6. Ядерные жизненные циклы

Царство грибов характеризуется разнообразием жизненных циклов и вариантов ядерного статуса (плоидность, количество ядер в клетке, их генетическая разнородность или однородность).

Признаки, определяющие ядерный статус грибов			
Число ядер в клетке	одно — монокарион	два — дикарион	много — мультикарион
Состав ядер	генетически однородный — гомокарион		
	разнородный — гетерокарион		
Плоидность	1n	—	гаплоиды
	2n	—	диплоиды
	>2n — полиплоиды		
Состав хромосом	гомозиготы		
	гетерозиготы		

Ядерный статус определяется комбинацией признаков, представленных в данной таблице. Например, дикарион и мультикарион могут быть гомокарионом или гетерокарионом, ядра в моно- ди- и мультикарионе — иметь различную плоидность, ди- и полиплоидные ядра быть гомозиготными или гетерозиготными.

У различных таксономических групп грибов выделяют до 7 типов жизненного цикла.

- **Бесполой** цикл характерен для нескольких десятков тысяч видов аскомицетов и базидиомицетов, утративших половую стадию — так называемых дейтеромицетов. Мейоз у этой группы отсутствует и плоидность неизвестна, рекомбинации происходят в парасексуальном цикле.

- **Гаплоидный** цикл известен у зигомицетов, многих хитридиомицетов. Мицелий содержит множество гаплоидных ядер (мультикариотический мицелий), которые делятся митотически по мере роста гиф. Диплоидная стадия представлена только зиготой (зигоспорой), которая после периода покоя делится мейотически и даёт начало новому гаплоидному поколению.

- **Гаплоидный цикл с ограниченным дикарионом** характерен для большинства аскомицетов, мицелий их также чаще всего бывает гаплоидный мультикариотический. Гаметы или гаметангии вначале сливаются цитоплазмами (происходит *плазмोगамия*) без слияния ядер (*кариогамии*) и прорастают дикариотическими гифами, называемыми также *аскогенными*. На концах аскогенных гиф формируются сумки, в которых происходит кариогамия, затем без периода покоя диплоидное ядро делится мейозом и даёт гаплоидные аскоспоры. Скрытая изменчивость у этих грибов отсутствует, так как все рецессивные мутации сразу проявляются в фенотипе.

- **Гаплоидно-дикариотический** (гапло-дикариотический) цикл встречается у многих базидиомицетов — гименомицетов, гастеромицетов, ржавчинных грибов. Он

сходен с предыдущим, но характеризуется длительной стадией дикариона, которая чаще всего бывает доминирующей. Стадия первичного гаплоидного мицелия также может быть длительной.

- **Дикариотический** цикл характерен для ограниченной группы базидиомицетов — головнёвых грибов. Гаплоидная фаза у них представлена базидиоспорами и прорастающими из них одноядерными *споридиями*, которые способны расти на питательной среде. Сливаясь попарно, споридии формируют дикариотический мицелий.

- **Гаплоидно-диплоидный** (гапло-диплоидный) цикл встречается у низших водных грибов - бластокладиевых, хитридиомицетов. Диплоидный спорофит образует зооспоры, прорастающие в такие же диплоидные спорофиты (бесполое размножение) и мейоспорангии, дающие начало гаплоидному половому поколению - гаметофитам. Такой тип жизненного цикла характерен для многих водорослей, а у грибов встречается редко.

- **Диплоидный** цикл известен у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и других сахаромицетов, кроме настоящих грибов характерен также для оомицетов, например, *Phytophthora infestans*. Преобладает диплоидная стадия почкующихся клеток, ядра которых в определённых условиях (например, истощение питательной среды) делятся мейозом и формируют гаплоидные аскоспоры. Клетки гаплоидного поколения также способны почковаться, но чаще диплоидизируются слиянием (спариванием), то есть выполняют функцию гамет. Рецессивные мутации у этих грибов, как и у высших эукариот, могут сохраняться скрыто и появляться в потомстве после рекомбинаций.

7. Гетерокариоз и вегетативная несовместимость

Одна из характерных особенностей грибов — явление *гетерокариоза*, то есть наличие в одной клетке (или несептированном мицелии) двух и более генетически разнородных ядер. Это обусловлено 1) возможностью наличия в клетке более, чем одного ядра (ди- и мультикариотичность); 2) возможностью миграции ядер между клетками и 3) возможностью обмена ядрами через анастомозы гиф, принадлежащих разным штаммам. Гетерокариотическое состояние может возникать и в результате мутаций ядер исходного гомокариона. Выделяют два основных типа гетерокариоза (по Р. Пухалла):

- тип *Neurospora* - клетки мультикариотичны, ядра свободно мигрируют внутри них и между ними;
- тип *Verticillium* - клетки в норме монокариотичны, ядра не мигрируют между клетками, в результате образуются мозаичные колонии.

Гетерокариоз выполняет у гаплоидных организмов ту же функцию, что и гетерозиготность у диплоидных: маскировку рецессивных признаков доминантными. Однако, если у диплоидов соотношение аллелей всегда постоянно и равно 1:1 (у полиплоидов может быть иное), то при гетерокариозе это соотношение может легко варьировать путём изменения количества ядер в клетке и позволяет быстро адаптироваться к изменениям внешней среды.

Гетерокариоз - гибкий механизм физиологической адаптации, суть которого заключается в количественных изменениях качественно фиксированного множественного генома.

Широко распространено у различных таксономических групп грибов явление *вегетативной*, или *гетерокарионной несовместимости* — невозможности слияния мицелиев определённых штаммов, что препятствует образованию

гетерокарионов. Несовместимость проявляется в том, что анастомозы не образуются или гифы погибают после слияния, в последнем случае на границе контакта между двумя колониями образуется полоса из вакуолизированных отмерших клеток — *барраж*. По механизму генного контроля вегетативная несовместимость является противоположной половой совместимости, для которой необходимо наличие гетероаллельности по генам совместимости. Вегетативная несовместимость, напротив, проявляется если штаммы имеют различные гены, отвечающие за совместимость, поэтому немецкий генетик К. Эссер назвал вегетативную несовместимость *гетерогенной*, а половую — *гомогенной*. Гены, отвечающие за гетерокарионную совместимость называют *het*-генами. Природные штаммы часто различаются по нескольким *het*-генам, в результате чего может существовать большое число (десятки) взаимно несовместимых групп.

Предполагается, что вегетативная несовместимость выполняет важную экологическую роль — защищает колонии от заражения через анастомозы плазмидами и вирусами.

Лекция №4. (2 часа)

Тема: «Физиология грибов».

Вопросы лекции:

1. Превращения питательных веществ
2. Превращения низкомолекулярных веществ в ходе первичного метаболизма
3. Ростовые вещества и микроэлементы

Краткое содержание

1. Превращения питательных веществ. Грибы и некоторые другие группы потребляют, кроме того, почти все встречающиеся в природе органические соединения, включая сложные и нерастворимые субстраты, с помощью экзоферментов; растворимые продукты разложения поглощаются их клетками и претерпевают в них дальнейшие превращения. По наличию способности к активации и другим условиям функционирования различных ферментов можно различить некоторые крупные и мелкие таксоны грибов.

Белки. К экзогенному расщеплению белков способны очень многие грибы. Выделяют три основных типа протеолитических ферментов. *Эндопептидазы* разрушают пептидные связи внутри белковых цепочек; чаще всего-между вполне определенными аминокислотными остатками; *экзопептидазы*, наоборот, действуют только на концы цепочек, в том числе *карбоксипептидазы* - на карбоксильные, а *аминопептидазы* - на аминные. У фагоцитирующих плазмодиев миксомицетов аналогичных им клеток переваривание поглощенных частиц начинается во внутриклеточных пищеварительных вакуолях. При классификации протеаз учитывают оптимальные значения pH и температуры, кофакторы, субстратную специфичность и как тончайший критерий - последовательность их аминокислотных остатков. Некоторые протеазы грибов производятся промышленным путем и используются, например, в текстильной промышленности. Дерматофиты разлагают такие трудноусвояемые белки, как кератины кожи, волос, ногтей, когтей, перьев и т. д.

Полисахариды также используются в качестве питательных веществ очень многими грибами. Три типа разлагающих целлюлозу ферментов действуют синергично: вместе и одновременно они преобразуют в 30 раз больше субстрата, чем по очереди. Это преимущество проявляется и в природе. Лигноцеллюлозы—химически наиболее устойчивые полисахариды, однако, и их грибы разрушают активнее, чем прочие организмы. Широко распространенные ферменты грибов гидролизуют крахмал, пектины и гемицеллюлозы, так что в целом им доступны все природные органические макромолекулы. Это их свойство важно с точки зрения повреждения материалов и в промышленных процессах

Липиды. Разложение жиров начинается липазами, расщепляющими их на глицерин и жирные кислоты. Оба эти продукта включаются в дальнейший обмен веществ. В естественных условиях потребляемые грибами жиры чаще всего представлены тонкими включениями в водных растворах других питательных веществ (эмульсиями типа молока, вакуолями в цитоплазме растительных клеток и т.д.). Накапливаемые в их клетках запасные жиры относятся к немногим типам (частые в них жирные кислоты: пальмитиновая - C16, стеариновая - C18, олеиновая - C18 с одной ненасыщенной связью), на утилизацию которых грибы ориентированы в первую очередь. Однако виды-специалисты способны использовать экзогенные жирные кислоты с большим и меньшим числом углеродных атомов. При этом, как и при эндогенном обмене веществ, двууглеродные фрагменты переносятся на кофермент А. У большинства расщепляющих жиры грибных ферментов оптимум действия приходится на щелочную область (как и у липаз человека), но некоторые из них более активны в нейтральной или (как исключение) в кислой среде. С промышленной точки зрения микробное разложение жиров не играет особой роли.

2. **Превращения низкомолекулярных веществ в ходе первичного метаболизма.**

Углеводный обмен. Важнейшая, быстрее всего усвояемая пища грибов состоит из моносахаридов и других низкомолекулярных водорастворимых соединений углерода, которые могут непосредственно поглощаться протопластом. Почти все организмы ассимилируют простые сахара и аналогичные им молекулы одинаково, однако грибы, конкурируя за эти питательные вещества, обладают некоторыми существенными преимуществами. Зачатки «сахарных грибов» присутствуют практически повсюду. Как только какой-либо живой или мертвый органический субстрат основательно увлажняется, возникает водный раствор, содержащий по крайней мере следы питательных веществ. Тотчас же там развиваются талломы «подходящих» грибов, быстро образуются их новые вегетативные единицы, и стремительно размножающаяся популяция полностью берет на себя использование данного источника пищи. За подобные субстраты с грибами конкурируют бактерии; получит ли преимущество кто-то из них или они будут сосуществовать относительно «равноправно», зависит от обстоятельств, и общего правила вывести здесь невозможно.

В отсутствие источников азота некоторые грибы окисляют глюкозу до глюконовой кислоты. При этом pH падает ниже 2,0, и обычные бактерии уже не могут размножаться, однако сами грибы при последующем поступлении азота способны утилизировать глюконовую кислоту. И все же примеров, объясняющих превосходство грибов над бактериями особенностями первичного обмена веществ, немного. Что касается превращений низкомолекулярных органических соединений, для грибов специфичны определенные пути разложения сахаров, работа некоторых цитохромов и синтез полиолов. Разложение сахаров. В клетку часто проникают моносахариды - продукты внеклеточного разложения

полисахаридов; ди- и олигосахариды также поглощаются из окружающей среды и включаются в метаболизм. Необходимые для этого ферменты либо широко распространены (мальтаза, сахараза и т.д.), либо обнаружены у более или менее многих представителей грибов (например, рафиноза утилизируется некоторыми дрожжами).

Наиболее обычный источник углерода - глюкоза. Полное разложение одного ее моля дает 675 ккал энергии. Другие гексозы (глюкоза - не обязательно) включаются в универсальный процесс разложения только после фосфорилирования; этим же путем идут продукты расщепления внеклеточных полисахаридов, запасных и входящих в состав клеточной стенки макромолекул.

Аминокислотный обмен. Грибы и растения синтезируют аминокислоты из простых соединений углерода и азота. В противоположность человеку, нуждающемуся в потреблении восьми так называемых незаменимых аминокислот с пищей (т. е. он в отношении них ауксотрофен), грибы в этом плане, как правило, прототрофны. Аминокислоты используются для синтеза белков, витаминов (например, пантотеновой кислоты), нуклеотидов и алкалоидов, получения других аминокислот (путем трансаминирования) и энергии (разлагаясь, подобно углеводам или жирам), а при определенных обстоятельствах выделяются в среду. Синтез двух аминокислот у грибов имеет свои особенности.

Лизин. Из известных возможностей биосинтеза лизина каждый организм выбирает лишь одну:

ДАП-путь (из аспартата и пирувата через диаминопимелиновую кислоту): оомицеты, гифохитриомицеты; зеленые водоросли, папоротники и цветковые растения, бактерии;

ААП-путь (из ацетилкофермента А и о-кетоглутаровой кислоты через аминoadипиновую кислоту): хитридиомицеты, зигомицеты, Ascomycota, Basidiomycota, дейтеромицеты; Euglenophyta.

Триптофан. При многоэтапном биосинтезе триптофана отдельные ферменты у разных организмов сочетаются неодинаково, что напоминает мультиферментные комплексы с характерными особенностями седиментации *in vitro*.

I (1a): миксомицеты, хитридиомицеты, аскомицеты (один раз среди Aphyllophorales из базидиомицетов); (1c): базидиомицеты - Agaricales;

II: эндомицеты;

III (1b): зигомицеты, устомицеты, среди базидиомицетов - phyllophorales, Tremellales, Auriculariales (по одному представителю Agaricales и Nidulariales);

IV: оомицеты;

V: бактерии.

3. Ростовые вещества и микроэлементы

Витамины. Потребность в витаминах считается присущей почти каждой клетке, а если их поступление в нее извне необязательно, предполагается ее способность синтезировать их самостоятельно (прототрофность). Это характерно для большинства растений и многих грибов, причем некоторые грибы важны как продуценты витаминов для других организмов. Так, целые линии базидиомицетов ауксотрофны по тиамину, представители тех же или других линий - по одному или нескольким другим витаминам группы В (рибофлавіну, пиридоксину, реже - пантотеновой или фолиевой кислотам) или биотину (витамины Н). Очевидно, совершенно не важны для грибов жирорастворимые витамины, а также водорастворимый витамин С.

Сидерамины - это соединения, переносящие железо. Они выделяются в среду (преимущественно при недостатке железа) в форме не содержащих его молекул, там образуют комплексы с Fe^{3+} , а те могут поглощаться (часто активно) клетками продуцирующих переносчики; затем железо передается на соответствующие акцепторы (эффект накопления, обогащение против градиента). Сидерамины образуют, кроме бактерий (включая *Streptomycetaceae*), некоторые хитридиомицеты, очень многие аскомицеты, *Basidiomycota* и дейтеромицеты; выход может достигать нескольких грамм на литр питательного раствора. У оомицетов и зигомицетов сидераминов не обнаружено. Большинство организмов поглощают железо другими путями (например, в виде цитрата), а некоторые используют транспортные соединения типа сидераминов, но сами неспособны их синтезировать (ауксотрофность по сидераминам, например, у зигомицета *Pilobolus kleinii* из *Mucorales*).

Микроэлементы. Грибы и все прочие организмы нуждаются в очень малых количествах некоторых неорганических компонентов питательной среды. Важнейшие из них - ионы тяжелых металлов. Как правило, достаточны концентрации порядка миллиграмма на литр или ниже (10^{12} - 10^6), однако магния и железа обычно требуется несколько больше. Недостаток микроэлементов ограничивает рост или активность, а высокие их концентрации часто токсичны. Относительно низки пороги токсичности для ртути и меди (а также для серы, не связанной в сульфат ионах или аминокислотах), что используется в некоторых фунгицидных препаратах. Ионы металлов либо прочно связаны в составе «металлоферментов» (например, медь и цинк - в металлопротеиновых ферментах без простетических групп, железо - в хелатных комплексах с порфирином и гемом, в металлфлавиновых группировках оксидаз и гидрогеназ), либо служат активаторами различных ферментативных превращений, например магний в ходе гликолиза, марганец - в цикле лимонной кислоты. Хлорид стимулирует активность α-амилаз.

Лекция №5. (2 часа)

Тема: «Вторичный метаболизм грибов».

Вопросы лекции:

1. Общая характеристика вторичного метаболизма
2. Вторичные метаболиты с морфогенетическим действием
3. Вторичные метаболиты без морфогенетического действия

Краткое содержание

1. Общая характеристика вторичного метаболизма

Вторичный обмен веществ как физиологический эквивалент репродуктивной фазы охватывает превращения, отражающие «индивидуальные» особенности грибного таксона. Если первичный метаболизм у всех грибов протекает примерно одинаково, а его основные продукты, как правило, неядовиты для других организмов и за отдельными исключениями не находят применения в медицине, ветеринарии и фитопатологии, вторичные метаболиты, специфичные для продуцирующих их штамма, вида, рода или (изредка) семейства, могут вызывать дифференцировку собственного таллома гриба, подавлять его

развитие (вплоть до гибели) или же влиять в основном не на него, а на другие организмы, как, например, антибиотики и микотоксины. Сырьем для синтетических процессов вторичного обмена веществ служат первичные метаболиты, однако конечные продукты получаются особые. Иногда при этом происходит переключение с гликолиза на пентозофосфатный путь или активация глиоксилатного цикла (хотя в обоих случаях могут образоваться и первичные метаболиты. Так как наследственность клетки не изменяется, особую роль в такой перестройке, по-видимому, играют запас энергии (АТФ) и генная регуляция ферментов. Большое значение имеют также процессы транспорта: вещества и протоплазма попадают в воздушные гифы исключительно из субстратного мицелия; рост и морфогенез этих гиф (споруляция, образование плодовых тел, а у аскомицетов также питание всей дикариофазы) требуют подвода в них основных элементов питания (в случае первичного метаболизма они поглощаются из среды). Основу для понимания межклеточного транспорта у грибов дает изучение зигомицетов: к развивающимся спорангиям *Mucorales* движутся вещества от обширных областей субстратного мицелия, т. е. как в направлении роста гиф, так и в противоположном ему; у *Entomophthorales* протоплазму содержат только нарастающие молодые части гиф; из более старых участков она оттекает вперед и те отделяются от живого мицелия поперечными стенками («шаговый рост»). В гифах аскомицетов, дейтеромицетов и базидиомицетов, как правило, септированных также всегда происходит межклеточный транспорт протоплазмы и растворенных веществ. Дифференцируются и талломы, омываемые питательной жидкостью. Гифы *Neurospora* после перенесения из ростовой среды в фосфатный буфер при аэрации образуют конидии; к сходному результату ведет замена гексоз ацетатом или аммония нитратом (относительно влияния температуры ср. «микроциклическое развитие»). У *Neurospora africana* поочередное добавление аминокислот к твердой основной среде вызывает четыре следующих друг за другом этапа половой дифференцировки: метионин (дифференцировки нет), триптофан (протоперитеции), аланин (перитеции), фенилаланин (сумки), изолейцин (аскоспоры). Почему развитие каждый раз идет до определенной стадии и останавливается, пока удовлетворительно не объяснено. Некоторые примеры позволяют судить об этапах-мишенях и последующих реакциях обмена веществ. Повышенная концентрация CO_2 в клетке или добавка к среде бикарбоната активируют ферменты восстановительного карбоксилирования, обращая в результате цикл лимонной кислоты у *Blastocladiella*. Синтезируется изолимонная кислота, вследствие чего усиливается синтез аминокислот, белков, нуклеиновых кислот, цитохромов и т. д. и, наконец, образуются устойчивые спорангии. Такие факторы эффективны только тогда, когда предварительно выполнен целый ряд условий. Так, предпосылкой образования аскоспор у некоторых дрожжей (например, *Saccharomyces*) служит полноценное питание во время вегетативной фазы. У *Neurospora* дифференцировке сопутствует разложение материала стенок и повышение проницаемости соответствующих клеток. Переход от первичного метаболизма к споруляции, индуцируемый химическими и физическими факторами, связан у *Aspergillus niger* с утратой высокой восстановительной способности (SH-группы) на концах вегетативных гиф, сочетающейся с гликолизом и спиртовым брожением, и образованием воздушного мицелия, обладающего в основном противоположными свойствами. В течение некоторого времени (до «точки необратимости») начавшееся развитие еще может смениться противоположным; так, иногда добавки питательных веществ, изменения pH способствуют смене вторичного обмена веществ вегетативной фазой.

2. Вторичные метаболиты с морфогенетическим действием

Пути синтеза рассмотренных ниже веществ отчасти сходны с известными для антибиотиков. Триспоровые кислоты обнаружены у многих Mucorales и, по-видимому, действуют также на других представителей этой группы. Широко распространены у грибов и микоспорины. Из-за недостаточной специфичности половые гормоны и микоспорины не совсем подходят под определение «вторичные метаболиты». Механизм их действия изучен еще слабо.

Половые гормоны. Половые реакции точно вызывают два вещества - антеридиол у оомицетов и триспоровая кислота у зигомицетов; кроме того, сиренин у хитридиомицета *Allomyces* (Blastocladales) и циклический АМФ у акразиомицетов привлекают гаметы.

Микоспорины выделены с последующей идентификацией из репродуктивных органов различных грибов (75 штаммов зигомицетов, аскомицетов, дейтеромицетов, устомицетов и базидиомицетов), а также из единичных представителей водорослей, моллюсков и кишечнорастворимых. В искусственных культурах содержание микоспоринов у спорулирующих колоний данного таксона всегда выше, чем у вегетирующих (наблюдения были связаны прежде всего с индукцией споруляции светом). Действие микоспоринов состоит в резком изменении метаболизма стероидов: выросшие в темноте и не спорулирующие колонии аскомицета *Nectria galligena*, содержат их втрое больше, чем культуры, спорулирующие 13 дней в условиях чередования света и темноты; сходное низкое содержание стероидов обеспечивает добавка микоспоринов при идентичных в остальном условиях инкубации (в темноте). У некоторых других грибов, несмотря на неподходящие условия (темноту), они вызывают споруляцию. Микоспорины, обнаруживаемые при половых и бесполовых спороношениях одного и того же таксона, идентичны.

3. Вторичные метаболиты без морфогенетического действия

Примерно 1000 грибных метаболитов открыто и описано за последние 35 лет в связи с их антибиотическим и токсичным действием. Одновременно обнаружены многие необычные химические структуры, пути биосинтеза и механизмы действия. Вторичные метаболиты, не обладающие заметным действием, описываются значительно реже, чем соответствующие той или иной «индикаторной системе» пигменты, антибиотики и микотоксины. Каждая из этих категорий объединяет химически разнородные соединения; с другой стороны, многие вещества относятся к двум или одновременно ко всем трем категориям (например, окрашенные микотоксины; ядовитые пигменты с антибиотическим действием). Часто при попытках идентификации и описания «биологически активного» вещества обнаруживают целый ряд родственных молекул, большинство из которых, как правило, «неактивно» и, если бы не изучение «активного» компонента (например, скрининг антибиотиков), осталось бы неизвестным. Биохимический арсенал вторичного метаболизма, как будто не приносящего непосредственной пользы грибам, многими из них тем не менее используется самыми разнообразными путями. Во всех случаях прослеживается его связь с первичным обменом веществ, хотя всю цепочку реакций, ведущих к конечному продукту удается установить лишь изредка.

Антибиотики. Из примерно 3200 известных антибиотиков 772 (около 24%) синтезируются грибами (*Streptomycetaceae* дают 65%, другие бактерии - 11%). В медицине важны преимущественно (β-лактамы, пенициллин, цефалоспорины и тысячи их полусинтетических производных с «улучшенными» свойствами - кислотостойкостью (т. е. применимостью оральным путем), действием против устойчивых микробов и против

широкого спектра патогенов. Из стероидных антибиотиков, к которым, в частности, относятся цефалоспорин и гельволовая кислота, в качестве лекарственного средства используется фузидиновая кислота, а из прочих, применяемых в клинике групп, следует упомянуть гризеофульвин.

Микотоксины. Вещества типа афлатоксина, случайно попадая в организм человека или животных с зараженной грибами пищей, поражают печень, оказывают канцерогенное, тератогенное, мутагенное действие и нарушают иммунные реакции. Молекулярный механизм действия основан на образовании соединений токсина с ДНК и РНК. Важнейшие продуценты афлатоксинов - *Aspergillus flavus* и *A. parasiticus*. Биосинтез начинается со связывания C₇-компонентов в своей молекулярной основе афлатоксины относятся к кумаринам. Известное уже в течение столетий токсичное действие алкалоидов спорыньи по своему спектру еще шире: сокращается гладкая мускулатура (чаще всего сосуды при этом сужаются, однако гидергин их расширяет); подавляется действие адреналина и серотонина, поражается центральная нервная система и возникают галлюцинации. Галлюциногенные микотоксины встречаются также среди производных иботеновой кислоты. В случае трихотеценов – у человека раздражение кожи, конъюнктивит и т. д., а у животных при поедании с кормом (например, соломой, инфицированной *Myrothecium*) - отравления (нарушая синтез белков на рибосомах). Токсичность патулина основана на изменениях клеточных дыхания и проницаемости; раньше патулин иногда обнаруживали в продуктах, предназначенных для потребления человеком (яблочном соке, заплесневелом хлебе, ферментированной грибами колбасе). К нейротропным микотоксинам относятся, помимо уже названных, цитреовиридин, мальторизин, фумитреморген, и другие треморгены, рокфортин, слафрамин и т.д. Классификация по биосинтетическим группам или химической структуре облегчает ориентацию среди микотоксинов. В последнем случае иногда удается выявить взаимосвязь между строением и механизмом действия. Так, в основе внешне совершенно различных эффектов цитохалазанов возможно, лежит их влияние на микротрубочки, а особенности поражения клеточного дыхания эпиполитиодиоксопиперазинами, например, глиотоксином, споридесмином, хетоминном, зависит от характера их боковых цепей. К дыхательным ядам относятся и антрахиноны. Современные знания о взаимосвязях между грибными инфекциями и образованием и действием микотоксинов (и аллергенов) остаются весьма фрагментарными. Группа токсинов рода *Candida* относится к белкам и не подходит под принятое здесь определение, согласно которому микотоксины (и антибиотики) являются низкомолекулярными соединениями.

Лекция №6. (2 часа)

Тема: «Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы».

Вопросы

1. Действие физических факторов.
2. Действие химических веществ.
3. Действие биологических факторов.

1. К числу основных физических факторов, воздействующих на

микроорганизмы как в естественной среде обитания, так и в условиях лаборатории, относятся температура, высушивание, гидростатическое давление, лучистая энергия и другие.

Влияние температуры. Температура – один из наиболее важных факторов в жизни микробов. Она может быть оптимальной, т.е. наиболее благоприятной для развития, а также максимальной, когда подавляются жизненные процессы; минимальной, ведущей к замедлению или прекращению роста. Микроорганизмы по их адаптации к определенным температурным условиям объединяют в три физиологические группы:

- психрофилы
- мезофилы
- термофилы

Психрофильные микроорганизмы – обитатели холодных источников, глубоких морей и океанов с оптимальной температурой 15-20⁰С, рост возможен от 0⁰С до 35⁰С. К ним относят светящиеся бактерии, железобактерии и другие.

Мезофильные бактерии живут при средних температурах с оптимумом 30-37⁰С, минимум 3⁰С и максимум до 45⁰С. Сюда относятся большинство сапрофитов и все патогенные микроорганизмы.

Термофильные бактерии требуют для своего развития более высокую температуру – от 35 до 80⁰С, при оптимуме – 50-60⁰С. Они встречаются в горячих источниках, пищеварительном тракте животных, в почвах районов с жарким климатом.

Высокие и низкие температуры по-разному влияют на микробы. Низкие температуры обычно не вызывают гибели микробов, а лишь задерживают их рост и размножение. Жизнедеятельность многих микробов сохраняется при температуре, близкой к абсолютному нулю. Так, эшерихии остаются жизнеспособными при – 190⁰С до 4-х месяцев, а бруцеллы при –40⁰С сохраняются более 6 месяцев. Однако, следует иметь в виду, что когда замораживание происходит без образования кристаллов (-190), то такая температура менее губительна, чем температура (-20), при которой образуются кристаллы льда, ведущие к механическим повреждениям и необратимым процессам в микробной клетке.

Низкие температуры приостанавливают гнилостные и бродильные процессы.

Высокая температура, в особенности нагревание паром под давлением, губительно действует на микробов. Чем больше температура выходит за пределы максимума, тем быстрее погибают вегетативные формы микроорганизмов: при 60⁰С – через 30 мин., при 80-100⁰С – через 1 мин. Споры бактерий более устойчивы к действию высокой температуры.

В основе бактерицидного действия высоких температур лежит угнетение ферментов, денатурация белков, нарушение осмотического барьера. Воздействие высокой температуры лежит в основе многих методов термической стерилизации, которая осуществляется главным образом в автоклаве (при 120⁰С, с давлением 1 атм, 30 минут), либо путем кипячения, дробной стерилизации текучим паром (при 100⁰С, три дня подряд по 30 минут), воздействия сухим жаром (при 170⁰С 1,5 часа) – более подробно на ЛПЗ. Под термином стерилизация понимают мероприятие, направленное на полное уничтожение в стерилизуемом материале (трупы животных, лабораторная посуда, питательные среды, использованные микробные культуры) всех микробов.

Влияние высушивания. Высушивание, приводящее к обезвоживанию, действует губительно на микроорганизмы. В бактериальной клетке вследствие обезвоживания

жизненные процессы замедляются, процесс размножения приостанавливается, клетка переходит в анабиотическое состояние. Дегидратация вегетативных бактериальных клеток в большинстве случаев вызывает их гибель (особенно патогенных). Споровые формы микробов в высушенном состоянии могут сохраняться многие годы. В лабораторной практике для сохранения микробных культур широко применяют метод сублимации – обезвоживания при низкой температуре. Этим методом высушивают вакцины, музейные баккультуры, лечебные и диагностические сыворотки и другие биопрепараты.

Влияние гидростатического и осмотического давления. Гидростатическое давление, превышающее 108-110 Мпа, вызывает денатурацию белков, инактивацию ферментов, повышает электролитическую диссоциацию, увеличивает вязкость многих жидкостей, что неблагоприятно сказывается на жизнедеятельность микробов и нередко приводит к их гибели. Большинство микробов выдерживают давление около 65 Мпа в течение часа. Встречаются баротолерантные (113-116 Мпа) микроорганизмы, обитающие в глубинах океана, нефтяных скважинах. Повышенное давление ($10^3 - 10^6$ Па) в сочетании с высокой температурой (120^0C) используется в автоклавах в целях обезвреживания (стерилизации) материалов.

Большое влияние на рост микроорганизмов оказывает осмотическое давление среды, определяемое концентрацией растворенных в ней веществ. Внутри бактерий осмотическое давление соответствует давлению 10-20% раствора сахарозы. Если поместить микробную клетку в среду с более высоким осмотическим давлением, то наступит плазмолиз (потеря воды и гибель клетки), если в среду с низким осмотическим давлением, то вода будет поступать внутрь клетки, клеточная стенка может разорваться – плазмолитиз. Эти явления используют в промышленности и в быту для консервирования продуктов (огурцы, помидоры, капуста и др.).

Однако, существуют микроорганизмы любящие расти при высоких концентрациях солей – галофилы. Напр., роды *Micrococcus*, *Sarcina* размножаются при высокой 20-30% концентрации NaCl. Это свойство используется в лабораторной практике для дифференциации этих микроорганизмов от других, подобных.

Действие различных видов излучения на микроорганизмы. Различные виды излучений бактерицидно действуют на микробы. Однако степень этого действия зависит от вида лучевой энергии, ее дозы и длительности экспозиции.

Солнечные лучи – сильно действующий на микробы физический фактор. Многие патогенные микроорганизмы погибают при воздействии солнечных лучей в течение 10-30 минут, некоторые через 2 часа (туберкулезная палочка), споры бацилл – через несколько часов. Рассеянный свет действует слабее. На практике культивирование микроорганизмов проводят в темноте, в термостатах. Видимый свет положительно влияет только на пигментообразующие бактерии. Бактерицидное действие света связано с образованием в клетке гидроксильных радикалов и других высокоактивных веществ.

Ультрафиолетовые лучи (100-380 нм) широко применяются для санации воздуха в животноводческих помещениях, в лабораториях и промышленных цехах, боксах для обеспечения асептических условий посевов. Используют при этом ртутно кварцевые (ПРК) или бактерицидные (БУВ) лампы. Механизм действия УФЛ заключается в подавлении репликации ДНК.

Несколько слабее действуют на микробов радиоактивные гамма-лучи и рентгеновские лучи, из-за того, что стерилизуемые объекты надо располагать в

непосредственной близости от источника излучения. Их применяют для уничтожения микробов на инструментах, в перевязочном материале, биопрепаратах.

Из-за нехватки времени действие на микроорганизмы ультразвука, электричества и других физических факторов прочитаете самостоятельно.

2. Микробы, как и все живое, высокочувствительны к факторам среды. При возникновении благоприятных импульсов микробы устремляются к объекту раздражения, неблагоприятные – отталкивают их. Такое явление получило название хемотаксиса. Вещества, благоприятно действующие на микробную клетку (мясной экстракт, пептон) вызывают положительный хемотаксис; сильнодействующие, ядовитые вещества (кислоты, щелочи и др.) ведущие к перевозбуждению или угнетению, приводят к отрицательному хемотаксису. Ядовитые вещества, попадая в бактериальную клетку, взаимодействуют с ее жизненно важными компонентами и нарушают их функции. Это вызывает остановку роста микроорганизма (бактериостатическое действие) или его гибель (бактерицидное действие). Бактерицидным действием обладают химические вещества различных групп: кислоты (H_2SO_4 , HCl , HNO_3), спирты (метилловый, этиловый и др.), поверхностно-активные вещества (жирные кислоты, порошок, мыло), фенолы и их производные, соли тяжелых металлов (свинец, медь, цинк, ртуть), окислители (хлор, йод, $KMnO_4$, H_2O_2), группа формальдегида, красители (б.зеленый, риванол и др.). Механизм антимикробного действия этих веществ различен. Одни из них (формальдегид, кислоты, щелочи и др.) вызывают свертывание белка, другие изменяют реакцию окружающей среды, третьи – повреждают клеточную стенку.

Действие химических веществ на микробы усиливается при повышении температуры раствора до $60-70^0$, увеличении концентрации химического вещества, срока действия. Имеет значение и характер материала, к которым требуется уничтожить микробов – в навозе, трупах животных, гное микробы менее доступны, и для обеззараживания их необходимо длительное воздействие высококонцентрированными растворами химических веществ.

Для уничтожения вегетативных форм бактерий наиболее часто применяют 5% раствор фенола, лизола или хлорамина, 10-20% раствор негашеной извести, 2% раствор формальдегида, 4% горячий раствор едкого натра, вызывающие их гибель в среднем через 1-2 часа. Споры бацилл погибают при воздействии 3% раствора формальдегида, 20% раствора хлорной извести, 5% раствора фенола в течении 10-24 часов.

В некоторых случаях химические средства применяют в виде аэрозоля; используют и газообразные вещества.

Антимикробное действие химических веществ лежит в основе дезинфекции – мероприятия, направленного на уничтожение патогенных микробов определенного вида. В отличие от стерилизации при дезинфекции не происходит уничтожения всех видов – многие сапрофиты не чувствительны к тому или иному дезинфектанту и сохраняют жизнеспособность.

3. Действие биологических факторов проявляется прежде всего в антагонизме микробов, когда продукты жизнедеятельности одних микробов обуславливают гибель других. С проблемой микробного антагонизма непрерывно связано современное учение об антибиотиках.

Антибиотики (греч. *anti* – против, *bios* – жизнь) – вещества микробного, животного и растительного происхождения, подавляющие развитие и биохимическую активность

чувствительных к ним микробов. По происхождению антибиотики разделяют на следующие группы:

1. Антибиотики, выделенные из грибов.

Наиболее активными продуцентами антибиотиков являются плесневые грибы и актиномицеты. Плесень пенициллий образует широко используемый антибиотик пенициллин, а аспергиллус и мукор – фумагацин, аспергиллин, клавицин. Большинство антибиотиков выделено из актиномицетов: стрептомицин, тетрациклин, биомицин, неомицин, нистатин и другие.

2. Антибиотики, выделенные из бактерий.

Продуцентами являются разнообразные бактерии. В основном это сапрофиты с интенсивно выраженной биохимической активностью, обитающие в почве. К ним относятся грамицидин, колицин, пиоцианин, субтилилин, полимиксины, бацитрацин, лизоцим и другие бактериальные ферменты.

3. Антибиотики животного происхождения.

В биологическом отношении к антибиотикам близки некоторые вещества, выделяемые животными тканями, способные избирательно поражать отдельные виды микробов. Это эритроин, выделяемый из эритроцитов животных; экмолин, полученный из тканей рыб.

4. Антибиотики растительного происхождения.

Ядовитые летучие вещества, выделяемые растениями (лук, чеснок, хрен, горчица, алоэ, крапива, можжевельник и др.) наз. фитонцидами. Открыты в 1928 году Б.Н.Токиным. Часть фитонцидов выделены в чистом виде: алицин – из чеснока, рафинин – из семян редиски и др.

Антибиотики могут оказывать на микроорганизмы бактерицидное (убивающее) или бактериостатическое (задерживающее рост) действие. Данное свойство зависит от вида антибиотика, его концентрации, чувствительности микроорганизма к нему и других факторов. Каждый антибиотик обладает определенным антимикробным спектром действия: существуют антибиотики, действующие на немногие виды микроорганизмов (пенициллин, грамицидин), и антибиотики, имеющие широкий спектр антимикробного действия (левомицетин, тетрациклин и др.). В основе механизма действия антибиотиков на микроорганизмы лежит нарушение синтеза клеточной стенки и ее мембран или же нарушение синтеза ДНК. РНК и белка. Напр., пенициллин нарушает образование бактериальной стенки, левомицетин отрицательно влияет на РНК и синтез белка.

В связи с широким и длительным использованием антибиотиков в качестве лекарственных препаратов в природе возникли и очень распространились антибиотикоустойчивые формы микробов, в частности L-формы, являющиеся возбудителями различных инфекционных болезней. Механизм образования устойчивых форм микробов довольно сложный: выработка адаптивных ферментов (напр. пенициллиназа), синтез естественных метаболитов, ингибирующих действие антиметаболитов химиопрепаратов (напр. стафилококки вырабатывают парааминобензойную кислоту, и становятся нечувствительны к этому препарату. А также в результате мутаций, конъюгации, трансформации, трансдукции.

Предварительное определение чувствительности микроорганизмов позволяет выбрать наиболее активный антибиотик и затем использовать его как лечебный препарат. Определение чувствительности микробов к антибиотикам проводят методом диффузии в агар или методом серийных разведений – подробнее на ЛПЗ.

Бактериофаги. Противомикробное действие оказывают посредством лизиса микробной клетки: вначале инфицирует, затем репродуцируется, образуя многочисленное потомство, и лизирует клетку, сопровождающимся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий.

Бактериофаги широко распространены в почве, воде, экскрементах больных и здоровых животных, человека и обнаружены у большинства видов бактерий. Открыты они Д.Эррелем в 1917 году.

Фаг обладает хорошо выраженными антигенными свойствами. При парентеральном введении фага в организме образуются антитела, нейтрализующие литическую активность фага и обладающие высокой специфичностью. По антигенным свойствам фаги делят на серологические варианты.

По степени специфичности фаги могут быть разделены на три группы: полифаги лизируют родственных бактерий, монофаги – бактерий одного вида, а фаговары – только определенные варианты данного вида бактерий.

Большинство фагов инактивируется при температуре 65-70⁰С. Более низкая температура снижает активность фага. Относительно легко фаги переносят замораживание при -185⁰С, а также хорошо выдерживают высушивание. К дезинфицирующим веществам фаг более устойчив, чем бактерии.

Фаг действует только на живые клетки бактерий в процессе их активного роста. В зависимости от характера проявляемого действия различают вирулентные и умеренные фаги. Вирулентные фаги при проникновении в клетку бактерий размножаются в ней и вызывают лизис; умеренные фаги не вызывают лизиса, а остаются в состоянии лизогении.

Размеры бактериофагов, как и вирусов, невелики – 8-100 нм. Форма их напоминает сперматозоид – от округлой или многогранной головки отходит хвостовой отросток различной длины. Однако иногда встречаются фаги, лишенные отростка. Бактериофаг – неклеточное образование. У него нет оболочки, ядра, цитоплазмы, т.е. элементов присущих клетке. Он состоит из молекулы нуклеиновой кислоты (чаще ДНК, реже РНК) и окружающего ее белкового чехла. Нуклеиновая кислота (40-50%) находится внутри головки, белковый чехол (50-60%) покрывает как головку, так и хвостовой отросток, на конце которого имеются специальные волокна, облегчающие прикрепление фага к оболочке микробов. Липиды и ферменты в фаговой частице находятся в минимальных количествах – около 2%.

Бактериофаги используются для фагодиагностики, фаготипирования бактерий, для профилактики и лечения инфекционных болезней.

Лекция №7. (2 часа)

Тема: «Принципы микологической систематики и номенклатуры».

Вопросы лекции:

1. Систематика грибов
2. Общая характеристика царства грибов и грибоподобных организмов
3. Хитридиомикеты
4. Зигомицеты
5. Аскомицеты

6. Базидиомицеты
7. Дейтеромицеты

Краткое содержание

1. Систематика грибов - раздел [микологии](#), занимающийся естественной классификацией [грибов](#). Принципы систематики в микологии базируются на общих принципах [биологической систематики](#).

Грибы являются одним из наиболее сложных для систематики объектов, особенно для создания естественной, [филогенетической](#) системы. Научные представления о грибах, об их происхождении и месте в системе живого мира бурно развивались и часто менялись в течение всего периода изучения этих организмов, это отражалось и на систематике. [Линней](#) поместил грибы в царству растений, но уже у него были сомнения по этому поводу.

К началу XIX века было описано уже несколько сотен видов грибов, в том числе плесневых, и уже в 1801 году появилась работа Христиана Персона «*Synopsis methodica fungorum*», первая попытка разобраться в грибном хаосе и расширить систему Линнея. Персон разделил грибы на два класса каждый по три порядка, порядки же разбил на семейства. Многие семейства, введённые Персоном используются и в современной систематике.

Система грибов Персона:

- CLASSIS I Angiocarpi
- ORDO I Sclerocarpi
- ORDO II Sarcocarpi
- ORDO III Dermatocarpi
- CLASSIS II Gymnocarpi
- ORDO IV Lythothecii
- ORDO V Hymenophecii
- ORDO VI Naematophecii

Классы Персон определил по признаку местонахождения спороносного слоя: первый класс — грибы закрытые, с внутренним гимением, второй — открытые, с гимением на внешней поверхности. В порядок I вошли грибы с твёрдой стромой, во II — мясистые, в III — с кожистой оболочкой и мякотью, превращающейся в порошок, в IV порядок попали роды *Phallus* и *Clathrus*, V был разделён на 6 семейств по признаку строения гимения — агариковые (пластинчатые), болетовые (пористые), гидновые (см.Ежовик) и др. В 6-е семейство (*Helvelloidei*) этого порядка вошли сморчковые грибы и дрожалки. VI порядок — плесневые грибы, *Fungi bissoidei*. В то время не был ещё открыт мицелий, его считали самостоятельным организмом — «биссусом», который тоже вошёл в VI порядок системы Персона как род *Rhizomorpha* с описанием «*rigida glabra fibrae aut radiciformis* (жёсткие гладкие волокна или корневидный)».

В первой половине [XIX века](#) Э. Фрис впервые предложил определить грибы в самостоятельное царство, но этот взгляд не находил поддержки учёных почти полтора века, до 1970-х годов. К концу [XX века](#) сформировалось представление о том, что и одного царства мало для этих, очень разнообразных по жизненным формам, морфологии и происхождению организмов. Часть отделов переносят из царства *Mycota* в царства [Protozoa](#) и [Chromista](#), введённые в последние годы XX века, и называют «грибоподобными организмами». В начале [XXI века](#) система грибов продолжает бурно

развиваться, в неё постоянно вносятся коррекции, проводимые на основании результатов комплексного анализа морфологических, цитологических, биохимических и молекулярно-генетических признаков.

2. Общая характеристика царства грибов и грибоподобных организмов

Примерно до 1970-х - 1980-х годов грибы считались отделом царства растений и характеризовались как низшие растения, не имеющие хлорофилла и питающиеся гетеротрофно. В методологии современной биологической науки существуют несколько критериев, позволяющих выделять определённые группы организмов, основные из таких критериев - филогенетический, структурно-морфологический и эколого-трофический. Грибы в старом научном понимании (бесхлорофилльные низшие растения) представляли собой очень разнородную группу организмов, выделить среди них по филогенетическому критерию единую кладу — **царство настоящих грибов** — удалось только с появлением и развитием молекулярной филогенетики и геносистематики. По третьему критерию современная наука разделяет весь живой мир на три крупные эколого-трофические группы, или экоморфы — *растения, животные и грибы*, не совпадающие с одноимёнными таксономическими группами (царствами). В **эколого-трофическую группу грибов** входит царство настоящих грибов и исключённые из этого царства таксоны, которые получили название «грибоподобные организмы», «псевдогрибы» или «микоиды». К ним относятся грибоподобные представители, относимые к группе хромистов (*Chromista*) или страменопил (*Straminopila*):

- Оомицеты (*Oomycota*) — имеют хорошо развитый синцитий, клеточная стенка содержит целлюлозу, бесполое размножение двужгутиковыми (гладкий и перистый) зооспорами и конидиями, полового спороношения нет, половой процесс — оогамия, паразиты и сапрофиты;

- Лабиринтуловые (*Labyrinthulomycota*);
- Гиφοхитриевые (*Hyphochytriomycota*).

Существуют также так называемые грибоподобные протисты (*Protista*):

- Миксомицеты (*Myxomycota*);
- Плазмодиофоровые (*Plasmodiophoromycota*).

Грибоподобные протисты не относятся ни к царству, ни к экоморфе грибов, поскольку отличаются способом питания. Для них характерно как осмотротрофное питание (всасывание через клеточную мембрану), так и эндоцитоз — захват клетками пузырьков, содержащих питательный материал. Эти организмы рассматриваются вместе с грибами только благодаря исторической традиции. Всю группу организмов, называемых грибами в самом широком смысле, можно охарактеризовать фразой английского миколога Д. Хоуксворт: «это организмы, которых изучают микологи».

Царство Fungi (Eumycota)

Отделы:

Chytridiomycota

Glomeromycota

Zygomycota

Ascomycota

Basidiomycota

Deuteromycota

3. Хитридиомицеты (лат. - отдел царства грибов (*Fungi*). Объединяет более 120 родов и около 1000 видов. Мицелий слабо развит, основная масса таллома представляет собой т.н. плазменное тело, из которого вырастают ризоидные гифы. Самые примитивные представители совершенно не имеют мицелия, и тело их в вегетативном состоянии представлено одиночной клеткой, иногда лишённой жёсткой клеточной стенки. Основа клеточной стенки хитиново-глюкановая, как и у высших грибов. Хитридиомицеты тесно связаны с водной средой (морской и пресноводной), где паразитируют на водорослях и беспозвоночных. Могут вызывать массовую гибель водных организмов вплоть до амфибий. Могут развиваться во влажных почвах и вызывать болезни высших растений: чёрную ножку капусты (*Olpidium brassicae*), рак картофеля (*Synchytrium endobioticum*) и др., однако не так опасны как оомицеты. Меньшее количество хитридиомицетов сапротрофы на субстратах, содержащих хитин, целлюлозу и кератин. Особое место занимает порядок *Neocallimasticales* - его представители обитают как анаэробы в кишечном тракте травоядных животных. Гаплоидные зооспоры хитридиомицетов снабжены одним жгутиком, при движении всегда направленным назад (редко многожгутиковые - только у анаэробных видов из порядка *Neocallimasticales* может быть до 10 и больше) и могут как непосредственно давать начало новому гаплоидному организму, так и сливаться друг с другом и уже тогда создавать диплоидный организм, формирующий новые гаплоидные зооспоры (порядок *Chytridiales*). У ряда видов имеет место половой процесс по типу хологамии (слияние целых организмов) или формируются гаметы, отличные от зооспор. В большинстве хитридиомицеты гаплонты, но встречается и смена ядерных фаз.

Поскольку в жизненном цикле хитридиомицетов присутствуют жгутиковые зооспоры, в конце 1980-х—1990-х годах многие исследователи исключали их из царства грибов и относили к грибоподобным хромистам. Примерно в то же время (1991 — 1996) появились данные по ультраструктуре митохондрий, химическому составу клеточных стенок и молекулярно-филогенетические анализы этих организмов, которые показали, что хитридиомицетов всё же следует относить к настоящим грибам.

4. Зигомицеты (лат. *Zygomycota*) - отдел грибов, объединяющий 10 порядков, 27 семейств, около 170 родов и более 1000 видов. Отличаются развитым ценоцитным мицелием непостоянной толщины, в котором септы образуются только для отделения репродуктивных органов.

Зигомицеты считаются парафилетической или полифилетической группой, точное систематическое положение их не установлено. Деление на классы не определено, отдел делят на 10 порядков, которые условно распределяют между 4 подотделами:

- *Enthomophthoromyconina*
- *Kickxellomycotina*
- *Mucoromycotina*
- *Zoopagomycotina*

Размножаются половым, собственно бесполом и вегетативным путём. Все стадии развития, кроме зиготы, гаплоидны. Мицелий зигомицетов имеет два знака («+» и «-»). При контакте противоположных мицелиев (слиянии клеток на их концах — *зигогамии*), формируется зигота, после мейоза, дающая зачаточный мицелий со спорангием, в котором развиваются споры полового спороношения, дающие вегетативный мицелий разных знаков. Для бесполого размножения на нём образуются спорангии или спорангиоли (многочисленные спорангии с 2-3 спорами), в которых развиваются споры бесполого

спороношения, дающие новые вегетативные мицелии. Вегетативно распространяются столонами — выбрасываемыми в воздушную среду длинными гифами, которые находят подходящий субстрат и выпускают ризоиды, давая начало новой колонии. Порядок *Zoopagales* включает в себя хищные грибы, обладающие клейкими гифами и ловчими кольцами и питающиеся простейшими, нематодами и мелкими личинками насекомых.

Экология. Типичные почвенные грибы, многие образуют микоризу. В основном являются сапротрофами, хотя многие могут развиваться на живых ослабленных растениях в качестве паразитов, а *Spinellus* паразитирует на базидиомицетах. Порядок *Entomophthorales* — патогены насекомых, некоторые зигомицеты способны вызывать вторичные инфекции человека. Тропические роды могут вызывать гранулематоз. **Использование человеком.** Используются как продуценты различных веществ, наиболее интенсивно — в Японии. *Rhizopus stolonifer* применяется для получения фумаровой кислоты, *R. oryzae* — спиртов, *Blakeslea trispora* — β -каротина, *Phycomyces blakesleanus* и различные виды *Rhizopus* используются для получения медицинских препаратов.

5. Аскомицеты или сумчатые грибы (лат. Ascomycota) — отдел в царстве грибов, объединяющий организмы с септированным (разделённым на части) мицелием и специфическими органами полового спороношения — сумками (асками), содержащими чаще всего по 8 аскоспор. Имеют и бесполое спороношение, причём во многих случаях половой процесс утрачивается и такие виды грибов относят к несовершенным грибам (Deuteromycota). К аскомицетам относят до 2000 родов и 30 000 видов. Среди них — дрожжи (класс Saccharomycetes) — вторичноодноклеточные организмы. Из других известных представителей аскомицетов можно назвать сморчки, пармелию, строчки и трюфели.

Морфология. Мицелий разделён поперечными перегородками (септирован), что позволяет гифе в случае повреждения терять меньше клеточного содержимого и обуславливает большую выживаемость аскомицетов по сравнению с ценоцитными зигомицетами. Так, наименьший жизнеспособный фрагмент мицелия, способный дать начало новому организму, для зигомицета составляет около 100 мкм, а для аскомицета — 15—20 мкм (1—3 целых клетки). В середине септы имеется простая пора, через которую возможен обмен цитоплазмой, органеллами и даже ядрами. Чаще всего у аскомицетов одногаплоидное ядро в клетке.

Размножение. У аскомицетов выражены две стадии развития: анаморфа, в которой организм размножается бесполом путём, и телиоморфа, в которой он формирует половые структуры. Вместе обе стадии носят название голоморфа. Анаморфа и телиоморфа не схожи, в зависимости от условий организм может переходить в телиоморфу, а может и нет, в результате чего часто один и тот же аскомицет описывался как два разных вида. **Бесполое размножение.** Бесполое размножение аскомицетов осуществляется практически всегда конидиями. Морфология конидий очень разнообразна. Формирование конидий из конидиогенных клеток может происходить разными способами. Выделяют два типа: **Таллический.** Конидии образуются в результате видоизменения ранее существовавшей части мицелия, иногда имеющей специфический облик (так что получается конидиеносец). **Бластический.** Зачаток конидии заметно увеличивается в размерах до своего отделения перегородкой от конидиогенной клетки.

Половое размножение. Половое размножение аскомицетов проходит в форме гаметангиогамии, без образования дифференцированных гамет. Для этого на разных гифах образуются половые органы: мужские — антеридии и женские — архикарпы, представляющие собой видоизменённые оогонии. Аскогенные гифы с асками могут образовываться не только беспорядочно, как это происходит у низших форм, но и на плодовых телах, состоящих из плотно переплетённых гиф. У сумчатых грибов имеются четыре типа плодовых тел:

- **Клейстотеции** (клеистокарпии) представляют собой полностью замкнутое плодовое тело с находящимися внутри асками, освобождающимися после разрушения его стенок. Характерны для группы порядков плектомицеты.

- **Перитеции** (др.-греч. *περί* — возле, около, *θήκη* — хранилище) — почти замкнуты («полузамкнуты»), то есть сумки окружены перидием, обычно имеют кувшинообразную форму с выводным отверстием в верхней части. Характерны для группы порядков пиреномицеты.

- **Апотеции** — открытые вместилища аск. Образуют чаши (блюдца). Аскомицеты с апотециями считаются наиболее высокоорганизованными и объединяются в группу порядков дискомицеты.

Псевдотеции характерны для класса *Loculoascomycetes*. При их формировании вначале образуются мицелиальные стромы, в полостях которых формируются гаметангии, происходит половой процесс и образование сумок.

Выделяют 4 класса аскомицетов:

- Archaeascomycetes, или Taphrinomycetes
- Ascomycetes, или Euascomycetes — Истинные аскомицеты
- Loculoascomycetes
- Saccharomycetes — Дрожжи

К истинным аскомицетам относятся более 90 % видов из отдела *Ascomycota*. По строению плодовых тел и сумок их разделяют на 40 порядков.

Значение. Аскомицеты играют важную роль в наземных экосистемах. Разрушая такие субстраты, как опад, мёртвые ветки и стволы деревьев, они вносят существенный вклад в биологические циклы углерода и азота. Сами по себе аскомицеты являются пищей для беспозвоочных, грызунов и более крупных животных: олений и кабанов. Много аскомицетов и в водной среде — в самом разном качестве. Аскомицеты являются основой для многих (до 98 %) лишайников. С корневыми системами высших растений многие аскомицеты образуют микоризу. Широко распространены аскомицеты как паразиты растений, в том числе возбудители исключительно тяжёлых болезней. Среди паразитов животных и человека большинство — аскомицеты. От некоторых аскомицетов страдают и пищевые продукты. Многие асковые широко используются в хозяйственной деятельности человека, например, трюфели и сморчки употребляются в пищу. Дрожжи незаменимы в хлебопечении и на бродильных производствах, другие виды широко используются для получения биологически активных веществ, органических кислот, кормового белка. Многие виды широко используются в генетических исследованиях.

6. Базидиомикота (лат. *Basidiomycota*), **базидиомицеты**, или **базидиальные грибы** — отдел царства грибов, включающий виды, производящие споры в булавовидных структурах, именуемых *базидии*. Вместе с аскомицетами относятся к подцарству высших грибов (*Dikarya*).

Мицелий базидиомицетов септирован, каждая клетка содержит по два гаплоидных ядра. Обычно ядра расположены рядом посередине клетки, их пара носит название дикарион. Возле септы у гифов базидиомицетов формируется пряжка, участвующая при делении клетки. При делении клетки ядра синхронно удваиваются и пряжка позволяет оказаться в одной клетке ядрам, сформировавшимся из разных исходных.

Бесполое размножение базидиомицетов осуществляется конидиями, но происходит редко. Половое размножение происходит в виде соматогамии, при которой сливаются две вегетативные одноядерные клетки гаплоидного мицелия. У небольшого количества гомоталлических видов могут сливаться клетки одного и того же мицелия. Большинство видов являются гетероталлическими, соответственно у них соматогамия происходит только между гифами с противоположными знаками «+» и «-». Половые органы у базидиальных грибов не образуются. Органы полового спороношения — базидиоспоры — развиваются экзогенно в особых структурах — базидиях. При этом происходит кариогамия — слияние ядер дикариона, и образуется зигота, которая без периода покоя делится мейотически. Образовавшиеся при этом четыре гаплоидные клетки становятся базидиоспорами, а клетка, от которой они возникли, — базидией. Обычно базидиоспоры располагаются на маленьких и тонких выростах базидии — стеригмах.

В зависимости от строения различают несколько типов базидий. Холобазидии имеют булабовидную форму и одноклеточное строение. Гетеробазидии состоят из расширенной нижней части — гипобазидии и верхней — эпибазидии, являющейся выростом гипобазидии. Фрагмобазидии, или телиобазидии, образуются из толстостенной покоящейся клетки путём образования поперечных перегородок, делящих её на четыре клетки. По бокам от этих клеток развиваются базидиоспоры.

Согласно современным представлениям, отдел *Basidiomycota* делится на два класса — *Homobasidiomycetes* и *Heterobasidiomycetes*.

Экология. Базидиомицеты в основном сапротрофы, играют важную роль в минерализации органических соединений, в особенности трудноразрушимых (целлюлоза, лигнин). Грибы выделяют свои ферменты в среду и впитывают всей поверхностью продукты распада органики, разрушая при этом гораздо больше вещества чем реально используют. Наибольшее распространение базидиомицеты имеют в лесных почвах и подстилке.

Многие базидиомицеты выступают в качестве симбионтов растений, другие - паразитов растений (опёнок, трутовик, головня, ржавчинные грибы).

7. **Дейтеромицеты** (лат. *Deuteromycota*), или Несовершенные грибы – не таксономическая группа грибов, ранее считавшаяся отделом. Их тело состоит из расчленённых прозрачных или окрашенных многоклеточных гиф и иногда из почкующихся клеток. Размножаются исключительно бесполым путём, при котором образование конидий происходит на изолированных или расположенных группами конидиеносцах или специальных образованиях, называемых пикнидами.

К дейтеромицетам относятся три порядка:

- *Sphaeropsidales*,
- *Melanconiales*
- *Hyphomycetales* (*Moniliales*).

Грибы порядка *Sphaeropsidales* характеризуются конидиями, которые образуются в пикнидах, остающихся закрытыми или открывающихся наружу порами или трещинами. Сюда входит род *Phoma* и др. Виды рода *Phoma* образуют микоризу с корнями некоторых растений.

В порядок *Melanconiales* входят организмы, которые не имеют пикнид. Конидии расположены на конидиеносцах, соединённых в особые образования — ацервулы.

Грибы порядка *Hyphomycetales* имеют расчленённые, разветвлённые, прозрачные или тёмно-окрашенные гифы. Их весьма разнообразные конидии находятся на конидиеносцах, последние расположены по одному или группами.

В почве имеются многие представители данного порядка — *Cephalosporium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium* и др. Несовершенные грибы подразделяются на семейства, различающиеся между собой типом мицелия и формой конидиеносцев.

К несовершенным грибам относят и группу грибов с неустановленным способом полового и бесполого размножения (порядок *Mycelia sterilia* - грибы со стерильным мицелием). Сюда входит ряд грибов (*Sclerotium*, *Rhizoctonia* и др.), имеющих значение в почвенных процессах

Лекция №8. (2 часа)

Тема: «Микозы животных».

Вопросы лекции:

1. Общая характеристика микозов животных
2. Дерматомикозы
3. *Malassezia*-инфекции животных
4. Пеницилломикоз
5. Эпизоотический лимфангоит
6. Редкие микозы

Краткое содержание

1. **Общая характеристика микозов животных.** Микозы - грибные болезни животных, для которых характерно активное паразитирование патогенного гриба в живом организме. Практически животные всех видов восприимчивы к микозам. Некоторые из них опасны для человека, особенно для детей.

К группе микозов относят: дерматомикозы (трихофития, микроспория, парша), аспергиллез, кандидомикоз, кокцидиоидомикоз, эпизоотический лимфангоит, риноспоридиоз, споротрихоз, гистоплазмоз, североамериканский бластомикоз, криптококкоз, мукоромикоз, сапролегниоз и бронхиомикоз рыб, аспергиллез, аскоферомикоз и меланоз пчел, мускардину тутового шелкопряда.

Микозы наблюдаются круглый год, но чаще в зимне-осенний период. Преимущественно микозами поражаются молодые животные. Развитие болезни зависит от степени патогенности возбудителя, предрасполагающих факторов, устойчивости макроорганизма и условий внешней среды. Микозы возникают также как вторичные

заболевания при поражении органов дыхания, на фоне диспепсии и дисбактериозов молодняка, обусловленных воздействием различных препаратов, особенно антибиотиков.

В основу современных классификаций микозов в области ветеринарной медицины положена способность грибов поражать те или иные ткани организма.

Так, Н. А. Спесивцева (1964) подразделяет микозы на следующие четыре группы:

- поверхностные микозы кожи и ее производных, возбудители — грибы из группы *Dermatophytes*;
- глубокие микозы кожи, характеризующиеся появлением узлов в собственно коже и образованием язв (эпизоотический лимфангит, споротрихоз, североамериканский бластомикоз);
- висцеральные микозы с локализацией патологического процесса в органах дыхания или других органах (гистоплазмоз, кокцидиоидомикоз, криптококкоз, риноспориридоз, кандидомикоз, аспергиллез, мукомормикоз);
- псевдомикозы, вызываемые актиномицетами, для которых характерно хроническое течение и гранулематозное поражение органов и тканей (актиномикоз, актинобациллез, дерматофилез).

Все микозы животных С. В. Петрович (1989) условно разделяет на 2 большие группы: поверхностные и глубокие, или висцеральные, характеризующиеся, как правило, поражением внутренних органов и тканей.

2. Дерматомикозы

Дерматомикозы (дерматофитии) — грибковые заболевания (микозы) кожи, вызываемые дерматомицетами.

Дерматофиты (*Dermatophytes*) являются основной группой патогенных для человека грибов. Они представлены 39 видами, объединенными в роды *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*. Одним из признаков, возможно объединяющим эти грибы, является то, что в процессе своей эволюции основные патогенные представители дерматофитов покинули почву (по-видимому, основную исходную среду их обитания) и приспособились к жизни в тканях человека и животных, содержащих кератин (кератинофилия). Кератин стал основным местом их существования, размножения, роста и питания. Некоторые дерматофиты (антропофилы) используют для этих целей кератинсодержащие ткани человека (роговой слой эпидермиса, волосы, ногти); другие — животных и птиц (зоофилы). Третья небольшая группа патогенных дерматофитов осталась в почве (геофилы). Некоторые виды зоофильных дерматофитов могут паразитировать в коже, волосах или ногтях человека (зооантропофилы).

Подавляющее большинство дерматофитов распространены повсеместно, другие приспособились к обитанию в определенных географических регионах.

Дерматофиты отличаются друг от друга совершенной стадией развития: трихофитоны относятся к роду *Arthroderma*, микроспорумы — к *Nanizzia*. Совершенная стадия не установлена для гриба *Epidermophyton floccosum*.

В культурах дерматофиты различаются по типу образуемых ими макро- и микроконидий: *Trichophyton* и *Microsporum* образуют как макро-, так и микроконидии, у *Epidermophyton* микроконидии отсутствуют. У трихофитонов макроконидии неровные, у микроспорумов — гладкие. Дерматофиты отличаются от большинства бактерий и

сапрофитных грибов способностью продуцировать в культурах аммиак, некоторые из них обладают уреазной активностью и могут проникать в волос *in vitro*.

Отдельные виды трихофитонов и микроспорумы, паразитируя в волосах человека и шерсти животных, образуют вещества, флюоресцирующие зеленым цветом при исследовании в ультрафиолетовых лучах, пропущенных через фильтр Вуда. Дерматофиты имеют различную способность избирательно поражать те или иные кератинсодержащие структуры кожи человека.

Трихофитоны в равной степени поражают роговой слой эпидермиса, волосы, ногти; микроспорумы предпочитают кожу и волосы, изредка поражают ногти; эпидермофитон инфицирует только гладкую кожу.

Вирулентность дерматофитов неодинакова. Первое место по распространенности и степени контагиозности для человека занимает *Trichophyton rubrum*, второе в различной степени выраженности в определенных условиях — *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes* и *Trichophyton tonsurans*.

Клиническая картина вызываемых дерматофитами микозов также весьма разнообразна. Она определяется местом инокуляции гриба, особенностями расположения в волосе, характером воспалительной реакции со стороны кожи в ответ на внедрение гриба, экологическими особенностями возбудителя (антропофилы, зоофилы, геофилы вызывают различную по степени выраженности воспалительную реакцию), родом и видом гриба и т. п.

Решающее значение в диагностике микозов, вызванных дерматофитами, имеют микроскопическое и культуральное исследования возбудителей из очагов поражения.

В пораженных чешуйках кожи и ногтей мицелий дерматофитов дает различной густоты сплетения, распадающиеся на отдельные сегменты. В волосе мицелий располагается правильными рядами по длине и, в зависимости от видовых особенностей и интенсивности роста гриба, то сплошь, то частично заполняет волос. Грибы, поражающие волос, делятся на два основных типа: *endotrix* и *ectotrix*. Первый тип характеризуется тем, что элементы гриба растут преимущественно внутри волоса, не вызывая резкой воспалительной реакции со стороны кожи. При микроскопическом исследовании таких волос граница их представляется четкой.

Споры гриба располагаются строго внутри волоса правильными цепочками, частично или сплошь заполняя его. Споры имеют одинаковые размеры; круглую, овальную или квадратную форму. Волосы в этих случаях скручиваются и обламываются. К дерматофитам, поражающим волос по типу *endotrix*, относятся *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. soudanense*, *T. yaoundei*.

Грибы, поражающие волос по типу *ectotrix*, растут преимущественно вокруг волоса и в эпителии внутреннего волосяного влагалища. При микроскопическом исследовании волос представляется окутанным цепочками из круглых спор; граница его нечеткая. К грибам этого типа относятся некоторые виды трихофитонов и микроспорумы. Споры грибов, поражающих волос по типу *ectotrix*, могут быть мелкими (3—5 мкм в диаметре) — *T. ectotrix microides*; крупными (5—10 мкм в диаметре) — *T. ectotrix megasporon*, и промежуточными. К мелкоспоровым трихофитонам относится *T. mentagrophytes*, к крупноспоровым — *T. verrucosum*; промежуточное положение занимают *T. rubrum*, *T. megninii*.

На практике важно то, что источником заражения *Trichophyton endotrix* является больной человек, а грибами типа *Trichophyton ectotrix* — больные животные (рогатый скот, лошади, кошки, собаки, мыши и т. п.). Антропофильные трихофитоны вызывают

поверхностное воспаление кожи, зоофильные — образуют глубокий перифолликулярный инфильтрат, приводящий к гнойному расплавлению волосных фолликулов и окружающих тканей. Следует, однако, иметь в виду, что в зависимости от биологической изменчивости грибы группы *Trichophyton endotrix* могут вызывать инфильтративно-нагноительные формы микозов, а *Trichophyton ectotrix* — поверхностные.

Грибы рода *Microsporum* представлены несколькими близкими, возможно родственными видами. Полагают, что родоначальником является *M. canis*, а *M. audouinii*, *M. ferrugineum* и *M. distortum* являются его дегенеративными вариантами. Все микроспорумы поражают волос по типу мелкоспорового, реже крупноспорового (*M. gypseum*) эктотрикса. При микроскопическом исследовании пораженных волос они представляются окутанными чехлом из очень мелких спор, располагающихся мозаично, а не цепочками. При надавливании на покровное стекло чехол распадается на отдельные пучки спор. Внутри волоса обнаруживаются лишь небольшие скопления спор и септированные ветвящиеся нити мицелия, расположенные по длине волоса.

Микроспорумы являются весьма контагиозными возбудителями микозов кожи и волосистой части головы, особенно у детей; они могут быть зооантропофилами (*Microsporum canis*), антропофилами (*Microsporum audouinii*, *Microsporum ferrugineum*) и геофилами (*Microsporum gypseum*).

3. **Malassezia-инфекции (малассезиозы) животных**

Отдельную группу ОМ представляют заболевания, вызываемые липофильными дрожжевыми грибами рода *Malassezia*. Этиологическая роль этих грибов в заболеваниях животных установлена относительно недавно, однако на сегодня *Malassezia*-инфекции представляют весьма существенную проблему в ветеринарной микологии. Как и другие грибы-оппортунисты, представители рода *Malassezia* не являются «истинными» патогенами, и обитают на кожном покрове многих видов млекопитающих в качестве комменсалов. При возникновении патологического процесса наблюдается многократное увеличение плотности популяции грибов в очаге поражения, однако точные механизмы патогенеза этих заболеваний окончательно не установлены.

Для *Malassezia*-инфекций наиболее характерной является локализация в слуховом канале (*Malassezia*-отиты). *Malassezia*-дерматиты чаще локализуются в области губ, в межпальцевых пространствах, в паховой области. Во многих случаях *Malassezia*-дерматиты распространяются на значительную площадь поверхности тела. *Malassezia*-инфекции носят хронический характер, как правило, сопровождаются интенсивным зудом, причиняя животным болезненность и дискомфорт. Лабораторная диагностика *Malassezia*-инфекций имеет ряд существенных особенностей, обусловленных липофильными свойствами возбудителей, их низкой жизнеспособностью во внешней среде, прихотливостью при культивировании *in vitro*.

Malassezia-инфекции диагностированы у многих видов домашних животных, однако в наибольшей степени им подвержены собаки. По нашим данным, этиологическая роль грибов рода *Malassezia* при отитах у собак составляет 80%, при дерматитах у собак — 14%, при отитах у кошек — 11%. В качестве основного возбудителя в наших исследованиях был диагностирован вид *M. pachydermatis*, причем во многих случаях он обнаруживался в ассоциации с бактериями, реже — с мицелиальными грибами.

4. **Пеницилломикоз**

Пеницилломикоз — заболевание животных, вызываемое представителями рода *Penicillium*, возникающее на фоне снижения общей резистентности организма.

Заболевание изучено слабо. В качестве возбудителей могут быть грибы *P. glaucum*, *P. crustosum* и др. Восприимчивы многие виды животных, однако ввиду трудности подтверждения диагноза не всегда диагностируются.

Пенициллы поражают кожу, слизистые оболочки, часто выделяются из легких, пораженных туберкулезом. Могут вызвать осложнения различных заболеваний верхних дыхательных путей.

Диагностика. Складывается из исследования патологического материала, выделения чистой культуры и гистологического исследования.

5. Эпизоотический лимфангоит

Lymphangoitis epizootica (африканский сап, бластомикоз, эпизоотическое воспаление лимфатических сосудов) — хроническое микозное заболевание однокопытных животных, характеризующееся воспалением лимфатических сосудов кожи и подкожной клетчатки с образованием гнойных фокусов и язв.

Возбудитель болезни — почкующийся дрожжевидный гриб *Cryptococcus (Histoplasma) farciminosus rivolta*. Клетки гриба, выделенные из гноя язв и гранулематозных очагов, имеют вид округлых, овальных или яйцевидных почкующихся тел, телец-криптококков. Они имеют двухконтурную оболочку с несколькими включениями в протоплазме. В гное криптококки располагаются одиночно или массивными кучками, часто включены в макрофаги. В тканях гриб развивается с мицелия, который распадается на криптококки (споры).

Криптококки, попав во внешнюю среду, весьма устойчивы к влиянию различных факторов. В сухих гнойных корках сохраняются до 5 лет, а мицелий гриба в почве и навозе разрушается через 2-2,5 месяца. При воздействии прямых солнечных лучей гриб погибает в течение 10 дней.

Диагноз устанавливают на основании эпизоотических данных, клинических признаков, результатов лабораторного и аллергического исследований.

6. Редкие микозы

Кокцидиомикоз - (кокцидиомикоз, кокцидиомикозная гранулема, болезнь Посадаса-Вернике, лихорадка Сан-Иоахима, ревматизм пустынь, лихорадка долин) — контагиозное микозное заболевание многих видов животных, характеризующееся гранулематозным (локальным или диссеминированным) поражением легочной ткани с преимущественным поражением лимфатических узлов органов дыхания. К заболеванию восприимчив и человек. Заболевание распространено в странах Северной и Южной Америки. В нашей стране описано несколько случаев заболевания людей. Этиология. Возбудитель — гриб *Coccidioides immitis* Rixford a. Gilchrist. Гриб устойчив к химическим и физическим воздействиям. Кипячение культур и патологического материала инактивирует его в течение 20 мин. Остается жизнеспособным при длительном хранении на холоде (до 110 дней). Попадая во внешнюю среду с различными выделениями от больных животных и человека, гриб длительное время остается жизнеспособным. В неблагоприятных по заболеванию местностях гриб длительно сохраняется в почве и заражение животных в большинстве случаев происходит через пыль, содержащую споры возбудителя.

Споротрихоз - (болезнь Бермана) — хроническое микозное заболевание животных и человека, характеризующееся узелково-язвенными поражениями кожи, подкожной клетчатки и лимфатической системы. Возбудитель — несовершенный гриб — *Sporotrichum Schenckii* (1898) из рода *Sporotrichum*. Это факультативный паразит, который

выделяется из пораженных тканей животных в виде грамположительных дрожжевидных, почкующихся или округлых веретенообразных клеток. Заболевание регистрируется среди лошадей, мулов, собак, кошек. Из лабораторных животных болеют мыши, крысы, хомяки.

Североамериканский бластомикоз - (бластомикоз, болезнь Джилькрайста) — хроническое микозное заболевание собак, лошадей и человека, характеризующееся образованием на коже папул, язв, а также поражением внутренних органов. Диагностируется в США, Англии, Канаде. В РФ североамериканский бластомикоз не зарегистрирован. Возбудитель болезни — дрожжевидный гриб *Blastomyces dermatitidis* Gilchrist a Stokes (1898). Из пораженных тканей и экссудата выделяется в виде круглых, овальных, одноклеточных, почкующихся или непочкующихся образований диаметром от 5 до 30 мкм. К заболеванию восприимчивы собаки, лошади. Гриб широко распространен в окружающей среде, и его природным резервуаром в неблагополучных местностях является почва, а источником инфекции — больное животное, из организма которого гриб выделяется с мокротой, мочой, а при поражении кожи — с экссудатом. Очевидно, естественное заражение происходит через пораженную кожу или аэрогенным путем.

Гистоплазмоз - (ретикулоэндотелиальный цитоплазмоз, болезнь Дарлинга) — микозное заболевание животных многих видов, характеризующееся поражением ретикулоэндотелиальной системы. К гистоплазмозу восприимчив и человек. Возбудитель болезни *Histoplasma capsulatum* Darling (1906) из семейства *Histoplasmaeae*, принадлежит к несовершенным грибам *Fungi imperfecta*. Это дрожжеподобный почкующийся гриб овальной, округлой или грушеподобной формы, размером от 1 до 5 мкм в диаметре, окружен неокрашивающейся зоной. Клетки гриба чаще обнаруживают внутри клеток ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), грамположительные, могут быть кислотоустойчивыми. Гриб поражает собак, кошек, реже крупный рогатый скот, лошадей, овец, свиней, кур, индеек, лисиц, енотов. Носителями инфекции часто могут быть крысы и мыши.

Риноспоридиоз - хроническое микозное заболевание животных, характеризующееся образованием полных разрастаний на слизистых оболочках носа, глаз, и гортани. Восприимчив и человек. Заболевание распространено преимущественно в странах с жарким климатом. Возбудитель — гриб *Rhinosporidium Seeberi* — является строгим паразитом и на искусственных питательных средах не растет. Риноспоридиоз наблюдается у лошадей, мулов и крупного рогатого скота. Имеются сообщения ряда исследований о том, что это заболевание специфично только для рыб, а человек и животные выступают случайными хозяевами гриба. Заражение животных происходит в результате попадания спор гриба с пылью и водой на слизистую оболочку верхних дыхательных путей и глаз.

Криптококкоз - (торулез, европейский бластомикоз, мкмромикоз, болезнь Буссе-Бушке) — широко распространенное микозное заболевание животных, характеризующееся поражением центральной нервной системы и развитием гранулематозных очагов в различных органах и тканях. К заболеванию восприимчив и человек. Возбудитель — *Cryptococcus neoformans*. Это дрожжевидный, почкующийся, аспорогенный гриб, широко распространенный в природе. К криптококкозу восприимчивы крупный рогатый скот, лошади, кошки, собаки, обезьяны и лабораторные животные.

Лекция №9. (2 часа)

Тема: «Микроскопические грибы – возбудители микотоксикозов».

Вопросы лекции:

1. Общая характеристика микотоксикозов
2. Афлатоксикоз
3. Фузариотоксикоз
4. Эрготизм

Краткое содержание

Микотоксикозы — заболевания, обусловленные попаданием в организм микотоксинов, которые образуются в процессе жизнедеятельности ряда микроскопических (плесневых) грибов.

Алиментарные микотоксикозы характеризуются поступлением микотоксинов с пищей.

Источники микотоксинов:

Чаще - растительные продукты. Поражение их грибами происходит в период созревания и уборки урожая при неблагоприятных метеорологических условиях и неправильном хранении. Сельскохозяйственные продукты и корма, пораженные грибами, изменяют свой внешний вид, что помогает установить их недоброкачественность. Такие продукты и корма могут стать причиной тяжелых заболеваний людей и животных вследствие накопления в них микотоксинов.

Могут они накапливаться и в продуктах животного происхождения. Микотоксины накапливаются в тканях и органах животных, у яйценесущих птиц — также в яйцах, из организма лактирующих животных микотоксины, метаболизируясь, выделяются с молоком. Такие продукты представляют наибольшую опасность для здоровья человека, т.к. микотоксины могут присутствовать в них без видимого роста плесени.

Микотоксины устойчивы к действию физических и химических факторов. Поэтому разрушение их в пищевых продуктах представляет трудную задачу. Общепринятые способы технологической и кулинарной обработки лишь частично уменьшают содержание микотоксинов в продукте. Высокая температура (свыше 200°), замораживание, высушивание, воздействие ионизирующего и ультрафиолетового излучения оказались также малоэффективными.

К настоящему времени выделено и идентифицировано более 100 микотоксинов. Многие из них являются высокотоксичными веществами, оказывающими канцерогенное, мутагенное, тератогенное, нейтропное и иное воздействие на организм человека. Наиболее опасными из микотоксикозов являются ***афлатоксикоз, фузариотоксикоз и эрготизм.***

1. Афлатоксикоз

Афлатоксикоз - пищевое отравление, возникающее при употреблении пищевых продуктов, содержащих афлатоксины.

Продуценты: плесневые грибы *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*.

Характеристики: В настоящее время к афлатоксинам относится 20 соединений. Наибольшую опасность в отношении заражения пищевых продуктов, представляют афлатоксин В1 и афлатоксин М1 (метаболит афлатоксина В1). Очень высокая токсичность!!!

Афлатоксины термостабильны и практически не разрушаются при обычной технологической и кулинарной обработке.

Источники:

- арахис и арахисовое масло;
- лесные орехи;
- миндаль,
- фисташки;
- грецкий орех;
- кокосовый орех;
- бразильский орех;
- специи, например, различные виды перца, мускатный орех;
- бобы кофе и какао;
- кукуруза;
- рис;
- пшеница;
- масличные семена - например, арахис, соя, подсолнечник, хлопок;
- продукты преобразования афлатоксина иногда обнаруживают в яйцах, молочных продуктах и мясе, когда животные питаются загрязненными зернами.

Условия:

Оптимальные условия для роста аспергилл и токсинообразования: температура 27-30° С, относительная влажность воздуха 97-98 %.

Загрязнение афлатоксинами может происходить при неблагоприятных условиях роста растений, неудовлетворительной сушке и увлажнении урожая при хранении. Наиболее распространены афлотоксикозы в тропических и субтропических странах, где климат способствует росту продуцентов афлатоксина.

Длительная транспортировка этих продуктов в трюмах кораблей при повышенной температуре и влажности увеличивает содержание АТ во много раз.

Поступая в организм сельскохозяйственных животных с загрязненными кормами, афлатоксины типа В трансформируются в аналогичные соединения типа М, которые накапливаются во внутренней среде и выделяются с молоком.

Патогенез поражений:

Афлатоксины в организме человека подвергаются внутриклеточному гидроксилированию монооксигеназной системой с образованием вторичных метаболитов (включая афлотоксин М1 и эпоксидные соединения). При недостаточности клеточной защиты, вторичные продукты способны повреждать белковые и нуклеиновые соединения, вызывая сенсibilизацию организма, нарушая функции мембран, повреждая наследственную информацию и инициируя канцерогенез.

Главным органом - мишенью афлатоксинов является печень. Афлатоксины обладают сильным гепатотоксическим и гепатоканцерогенным действием - они вызывают первичный рак печени. При попадании высокой дозы яда в организм смерть может наступить в течение нескольких суток из-за необратимых поражений печени.

Действие на организм:

- Оказывают сильное токсическое воздействие на печень, а высоких концентрациях могут привести к летальному исходу в течение нескольких суток из-за острого поражения клеток печени;

- Вызывают печеночный некроз, при хронической интоксикации - цирроз и карциноме печени;
- Нарушают метаболизм витамина Д, тем самым снижая прочность костей;
- Снижают образования желчных солей;
- Ухудшают всасывание жиров и пигментов;
- Снижают метаболизм минералов, включая железо, фосфор и медь;
- Угнетают иммунную систему;
- Вызывают задержку роста и развития у детей;

Симптомы:

1. Острое отравление афлатоксинами проявляется ярко выраженными симптомами уже в течение получаса после употребления заражённой пищи.

Основные из них:

- головная боль;
- вялость, слабость;
- боль в области печени;
- появление судорог;
- парезы;
- нарушение координации движений;
- снижение аппетита;
- нарушение ф-ций ЖКТ;
- геморагии;
- отеки.

2. Регулярное попадание в организм продуктов жизнедеятельности плесневых грибов в незначительных дозах вызывает хронический афлатоксикоз, который с высокой долей вероятности приводит к развитию рака печени. Поэтому так важны меры предосторожности при выборе и хранении продуктов питания.

Лечение:

Отравление требует немедленной квалифицированной медицинской помощи, поскольку может привести к тяжёлым поражениям печени и нервной системы. Попадание яда в организм ребёнка способно привести к летальному исходу из-за высокой чувствительности детского организма к действию этого токсина.

Профилактика:

Основные меры профилактики афлатоксикозов - правильное хранение зерна, предупреждение плесневения продуктов питания, систематический контроль продуктов и кормов на загрязнение афлатоксинами. Норма безопасной суточной дозой для человека с массой тела 60 кг считается не более 0,3 – 0,6 мкг афлатоксина.

2. Фузариотоксикоз

Фузариотоксикозы вызываются токсинами плесневых грибов рода *Fusarium*, которые продуцируют токсины, относящиеся к классу трихотеценов.

Характеристика:

Известно более 40 трихотеценовых микотоксинов (ТТМТ), из которых к основным загрязнителям пищевых продуктов и кормов животных относят Т-2 токсин, дезоксиниваленол (вомитоксин). Наиболее интенсивно ТТМТ накапливаются при повышенной влажности и пониженной температуре.

Действие на организм:

ТТМТ относятся к сильнодействующим токсинам, которые вызывают некроз кожи и слизистых, изменения состава крови (анемия, лейкопения и др.), кровоизлияния, повреждения иммунной системы, злокачественные новообразования, уродства плода и т. д.

Загрязнение пищевых продуктов и кормов трихотеценовыми микотоксинами вызывает давно известные пищевые микотоксикозы: алиментарно-токсическую алейкию и отравление «пьяным хлебом».

А. Алиментарно-токсическая алейкия или септическая ангина (споротрихиеллотоксикоз) - относится к числу тяжелых заболеваний, связанных с употреблением продуктов переработки перезимовавшего под снегом или поздней уборки зерна (пшеницы, ржи, гречихи и чаще всего проса: хлеб, лепешки, каши т. д.).

Продуцент: *Fusarium sporotrichioides*.

Действие на организм:

Образующийся в зерне токсин оказывает местное действие по типу ожога и общее, поражая костный мозг и аппарат, регулирующий кроветворение, что приводит к торможению выработки лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов и ослаблению общей сопротивляемости организма.

Клиническое течение:

Имеет три стадии:

1) кроме симптомов общей интоксикации (слабость, недомогание, потливость), наблюдается острое поражение пищеварительного тракта — стоматит, глоссит, фарингит, гастроэнтерит;

2) стадия лейкопении — снижение количества лейкоцитов до 3000 и ниже, геморрагическая сыпь; 3) ангинозно-геморрагическая стадия — снижение лейкоцитов до 2000—1000 и ниже, некротическая ангина с гангренозным распадом миндалин, мягкого нёба, глоточного кольца, лихорадка септического типа, падение тромбоцитов до 80 000—50 000 и ниже, кровотечения из носа, глотки, пищевода, желудка и кишечника.

Наиболее частые **осложнения** — пневмонии, флегмоны, обширные некрозы. Прогноз благоприятный при раннем лечении, сомнительный — при септических осложнениях. Летальность достигает 60-70 %.

Лечение:

При первых явлениях острой пищевой интоксикации необходимо промыть желудок и дать слабительное (сульфат магния 30 г). Дальнейшее лечение проводится в стационаре, где обеспечивается постепенный переход на полноценное витаминизированное питание, переливают кровь, назначают нуклеиновокислый натрий, препараты кальция, витамин К, фолиевую кислоту, витамин В12, для борьбы с инфекцией антибиотики, сульфаниламидные препараты, противогангренозную сыворотку.

Профилактика:

Запрещение употребления перезимовавшего, увлажненного и заплесневелого зерна; исключение условий увлажнения и плесневения зерна при хранении; контроль за содержанием в зерне, мукомольно-крупяных и хлебобулочных изделиях трихотеценовых метаболитов, в частности Т-2 токсина и дезоксиниваленола.

Б. Отравление «пьяным хлебом» (фузариограминеаротоксикоз) - возникает в результате употребления выпеченных изделий из зерна, пораженного плесневым грибом *Fusarium graminearum* и накоплением ТТМТ.

Действие на организм:

Токсины гриба оказывают нейтропное действие.

Симптомы:

Похоже на состояние опьянения:

- возбуждение;
- эйфория (смех, пение и т. д.);
- нарушение координации движений (шаткая походка).
- в дальнейшем: депрессией и упадком сил, возникает чувство тяжести в конечностях.

При длительном использовании зараженного хлеба возможно развитие анемии и психических расстройств.

Профилактика:

Строгое соблюдение температурно-влажностных условий хранения зерна, предупреждение его увлажнения и плесневения, контроль за содержанием в зерне, муке, крупе и хлебобулочных изделиях ТТМТ.

+ есть еще **отравление «красной плесенью»**, при употреблении продуктов из риса, пшеницы, ячменя, пораженными *F. nivale* (тошнота, рвота, диарея, гол. боли, судороги)

3. Эрготизм

Эрготизм - заболевание, развивающееся в результате потребления продуктов из зерна, загрязненного склероциями спорыньи (*Claviceps purpurea* и *Claviceps paspalum*). Склероции гриба - темно-фиолетовые рожки на ржаных колосьях, иногда на ячмене и пшенице. Отравление возникает при употреблении зерна, муки и печеного хлеба, загрязненных склероциями спорыньи более 2 %.

Характеристика:

Склероции содержат токсичные для человека и животных производные лизергиновой кислоты (эрготамин, эргозин, эргокристин и др.) и клавиновые алкалоиды (эргоклавин, сетоклавин, элимоклавин и др.).

Действие:

Эрготоксины обладают нейротропным и галлюциногенным действием. Они также способны вызывать сокращение гладких мышц и сужение сосудов.

Симптомы:

Различают три формы эрготизма: *гангренозная* — «антонов огонь» (которая сопровождается нарушением трофики тканей вследствие необратимого сужения капилляров преимущественно в конечностях и ушных раковинах), *конвульсивная* — «злые корчи», *смешанная*.

А. При конвульсивной форме эрготизма основными симптомами являются тонические судороги отдельных групп мышц (чаще сгибателей), парестезии, боли по ходу нервов. Возможны депрессивно-маниакальные состояния и эпилептические судороги. Длительность болезни — от 3 до 6 нед., иногда наблюдаются рецидивы.

Б. Гангренозная форма возникает при длительном приеме малых доз алкалоидов спорыньи. Через 10—20 дней на фоне общей интоксикации на периферических частях конечностей появляются некротические изменения, что сопровождается сильными непрекращающимися болями. Иногда по линии демаркации может наступить самопроизвольное отторжение омертвевшей части конечности — мутиляция.

+ Сопровождается:

Повышением температуры, головокружением, галлюцинациями, сильными головными болями и болями в животе, рвотой, поносом, сильными судорогами, нередко возможен летальный исход. *При невысоких дозах* алкалоидов спорыньи признаки отравления проявляются нарушением зрения, постепенным притуплением слуха и нарушениями психики. Возможны частая рвота, понос, дерматоз, а также симптомы, которые напоминают неврологические нарушения при хорее.

При вскрытии людей, умерших от отравления спорыньей, отмечаются кровоизлияния и изменения в разных органах (легких, почках, матке). В кишечнике констатируются изменения тифозного характера, в глазах — помутнение хрусталика, в головном и спинном мозге — дегенеративные изменения.

Специфическое лечение отсутствует

Профилактика:

Заключается в очистке продовольственного и семенного зерна от спорыньи. В соответствии с действующей нормативной документацией в муке и крупе должно содержаться не более 0,05 % примеси спорыньи.

Общие принципы диагностики, лечения и профилактики:

Диагностика М. основана на выявлении связи между интоксикацией и употреблением в пищу пораженных грибками продуктов, индикации микотоксинов в продуктах питания, а также в биологических жидкостях и тканях.

Лечение проводится по общим принципам, принятым в клинической токсикологии, носит, в основном, симптоматический характер. Прежде всего необходимо прекратить попадание в организм зараженных микотоксинами продуктов. С целью детоксикации в 1-е сутки осуществляют промывание желудка, очищение кишечника, затем перорально или через зонд вводят активированный уголь (по 30 г 2—3 раза в сутки); показаны диурез форсированный, а в тяжелых случаях — гемосорбция. В дальнейшем лечение микотоксикозов направлено на профилактику поражений печени и инфекционных осложнений.

Профилактика М. у человека заключается в регламентации и организации контроля за содержанием микотоксинов в пищевых продуктах. ПДК микотоксинов: афлатоксина В₁ (во всех видах продуктов) — 5 мкг/кг; афлатоксина М (в молоке и молочных продуктах) — 0,5 мкг/кг; патулина (в продуктах из овощей и фруктов) — 50 мкг/кг; Т-2-токсина и зеараленона (в зерне и зерновых продуктах) — соответственно 100 и 1000 мкг/кг; дезоксиниваленола в твердой и сильной пшенице — 1000 мкг/кг (в остальной пшенице — 500 мкг/кг). Наличие микотоксинов в продуктах детского питания не допускается.

Лекция №10. (2 часа)

Тема: «Экология грибов».

Вопросы лекции:

1. Образ жизни и распространение грибов
2. Экологические группы грибов
3. Роль грибов в биосфере

Краткое содержание

1. Образ жизни и распространение грибов

- Грибы и грибоподобные организмы входят практически во все наземные и водные экосистемы как компоненты гетеротрофного блока, занимая в них вместе с бактериями и другими группами организмов уровень редуцентов, или деструкторов органического материала. Их можно повсеместно обнаружить в почвах, пресных и соленых водоемах и водотоках; растениях, животных и их остатках; предметах и материалах промышленного производства и т.п. Нередко они встречаются в экстремальных условиях обитания — в термальных источниках, вулканических почвах, во льдах Арктики и Антарктики и многих других. Широкое распространение в биосфере Земли определяется рядом биологических особенностей грибов, важнейшие из которых следующие. Наличие у большинства грибов мицелиальной структуры таллома, обеспечивающей большую величину отношения поверхности гиф к их объему. Такая структура позволяет грибам быстро колонизовать субстрат, пронизывая его гифами по всему объему, и дает им высокую степень контакта со средой, что очень важно при осмотрофном питании.

- Значительные скорости роста и размножения, позволяющие грибам в короткие сроки заселять большие массы субстратов, накапливать большое число спор и распространять их на огромные расстояния.

- Высокая метаболическая активность, проявляющаяся в широком диапазоне действия различных факторов окружающей среды (температуры, влажности, света, аэрации и т.д.).

- Значительная генетическая и биохимическая изменчивость (экологическая пластичность), позволяющая грибам быстро адаптироваться к меняющимся условиям среды обитания и к новым субстратам.

- Способность быстро реагировать на действие неблагоприятных факторов среды переходом к покоящимся структурам (анабиозу), возможность длительно пребывать в этом состоянии, не теряя жизнеспособности, и также быстро переходить к активной жизнедеятельности при наступлении благоприятных условий.

- Грибы как гетеротрофы нуждаются в готовом органическом веществе. В природе они находят его в виде разнообразных органических остатков растительного или животного происхождения, на которых развиваются как сапротрофы, либо в виде содержимого клеток живых организмов, на которых грибы паразитируют или с которыми вступают в симбиотрофные отношения. Экологические группы грибов выделяют по двум признакам — **трофическому** (на основе способа питания — паразитический, симбиотрофный, сапротрофный — и заселяемых субстратов — гумусовые сапротрофы, подстилочные сапротрофы и проч.) и **топическому** (на основе среды обитания, например почвенные, водные грибы).

2. Роль грибов в биосфере

Грибы занимают в наземных экосистемах ведущее положение деструкторов растительных полимеров и поддерживают тем самым круговорот биогенных элементов и энергии в биосфере. Они активно участвуют в почвообразовании, начиная с разрушения минералов и горных пород, в процессах образования гумуса, в оструктурировании почвы и подзолообразовательном процессе. Ниже приведены основные функции грибов, выполняемые ими в биосфере.

- Разложение природных органических веществ до двуокиси углерода, в том числе разложение труднодоступных для других деструкторов соединений (лигнина, целлюлозы, хитина, кератина).
- Иммобилизация биофильных элементов в грибной биомассе (закрепление, предотвращающее их потери из биологического круговорота в экосистемах).
- Процессы почвообразования: гумусообразование, структурирование почвы, формирование почвенного профиля, подзолообразование и др.
- Трансформация соединений N, P, K, S и др. в вещества, доступные для минерального питания растений.
- Создание в почвах пула ферментов и биологически активных соединений.
- Снабжение растений элементами минерального питания и водой, регуляция фотосинтеза (симбиотрофные грибы).
- Разрушение горных пород и минералов.
- Образование минералов: осаждение карбонатов кальция и гидроокисей металлов (Fe, Al), образование минералов в болотных почвах.
- Участие в трофических цепях в экосистемах (пища для животных и других организмов).
- Регуляция структуры сообществ и численности популяций растений, животных и микроорганизмов.
- Детоксикация поллютантов.

3. Экологические группы грибов

Гетеротрофный способ питания, характерный для грибов, обуславливает то, что их развитие в большой степени зависит от субстрата, на котором они развиваются. В связи с высокими адаптивными возможностями грибы занимают самые разнообразные экологические ниши и играют значительную роль в биоценозах. При выделении экологических групп грибов учитывают как место их обитания, так и характер субстрата, который они используют для своей жизнедеятельности. По способу питания грибы относят к сапротрофам, паразитам или симбиотрофам. Традиционно выделяют несколько эколого-трофических групп грибов. В каждую из них входят грибы различных таксономических групп.

Почвенные грибы. В почве обитают представители практически всех отделов грибов. Одни из них находятся в ней постоянно — истинно почвенные грибы, другие попадают случайно с опадом листьев и растительными остатками, дождевыми и талыми водами, частицами пыли из воздуха и т. п. Случайно попавшие в почву грибы находятся в неактивном состоянии — в виде различного типа спороношений (конидий, телиоспор, склероциев) или в виде неактивного мицелия. Циклы развития этих грибов часто не связаны с почвой. Она служит только для их выживания и перезимовки. Почвенные грибы по приуроченности к определенным горизонтам подразделяют на более мелкие группы — подстилочные сапротрофы, гумусовые сапротрофы, грибы корневой зоны или ризосферы, по способу питания выделяют микоризные грибы, образующие микоризу с древесными и травянистыми растениями, питающиеся за счет обмена питательными веществами между грибом и растением.

К микоризным грибам относятся многочисленные шляпочные грибы класса базидиомицетов (гимено- и гастеромицеты), образующие микоризу с деревьями и кустарниками, а также представители зигомицетов из порядка *Glomerales* (*Zygomycota*) - образующие микоризу преимущественно с травянистыми растениями.

Микориза — сложный симбиоз грибов с корнями высших растений. Потому как осуществляется этот контакт различают три типа микориз: эндотрофную, эктотрофную и промежуточную между ними — экто-эндотрофную.

При **эндотрофной** микоризе мицелий гриба распространяется главным образом внутри тканей корня растений (в коровой паренхиме) и относительно мало выходит наружу. Корни при этом имеют нормальные корневые волоски. Мицелий гриба располагается в межклеточном пространстве или внутри клеток. При этом часто образуются клубки гиф — везикулы и внутриклеточные разветвления в виде гаусторий — арбускулы. Этот тип микоризы называют арбускулярной микоризой, а формирующие ее грибы АМ-грибами. Эндотрофная микориза встречается у многих травянистых растений. Она образуется главным образом микроскопическими грибами с неклеточным мицелием из отдела *Zygomycota* (порядок *Glomerales*), или грибами с клеточным мицелием из отдела *Ascomycota*, или анаморфными грибами. Эндотрофная микориза орхидных (сем. *Orchidaceae*) образована базидиальным грибом в его анаморфной стадии — *Rhizoctonia*, о чем свидетельствуют типичные пряжки на мицелии, характерные для базидиальных грибов. Микориза орхидных облигатна для большинства видов этого семейства. Семена этих растений не прорастают в отсутствие своего микоризного партнера. Для большинства травянистых растений она не столь обязательна.

Эктотрофная микориза отличается тем, что на корнях формируется наружный чехол из гиф или она имеет вид плотно переплетенной ткани, одевающей корень. От этого переплетения в окружающую почву отходят свободные гифы. Собственных корневых волосков корень при этом не образует. Иногда при усиленном росте корень разрывает на вершине грибной чехол и дальше растет свободно. Такая микориза характерна для древесных растений и редко встречается у травянистых.

В природных условиях провести четкую границу между эндотрофной и эктотрофной микоризами трудно. Переходной между ними является экто-эндотрофная микориза, очень распространенная у большинства древесных пород. При такой микоризе гифы гриба густо оплетают корень снаружи и в то же время дают обильные ветви, проникающие в коровую паренхиму. Мицелий идет отчасти по межклетникам, отчасти внутриклеточно, образуя в клетках везикулы и арбускулы. Кроме того, гифы гриба, проходя между клетками эпидермиса, образуют однослойное сплетение — “сеть Гартига”. Наружные свободные гифы гриба широко расходятся в почве от корня, заменяя ему корневые волоски. Эти свободные гифы получают из почвы воду, минеральные соли, а также растворимые органические вещества (главным образом азотистые). Часть этих веществ поступает в корень, а часть используется самим грибом на построение грибницы и плодовых тел. В клетках корня частично перевариваются и внедрившиеся туда гифы. Гриб получает от корня углеродное питание, так как сам, будучи гетеротрофом, не может синтезировать органические вещества. Такая микориза характерна для большинства древесных пород. Ее образуют в основном макромицеты из отдела *Basidiomycota* группы гименомицетов. Это преимущественно шляпочные грибы. В отделе *Ascomycota* экто-эндотрофную микоризу образуют виды рода *Tuber* — трюфель и *Elaphomyces*, вступающие в симбиоз с дубом, буком и др. Для большинства микоризных грибов этот симбиоз обязателен.

К постоянным обитателям почвы относятся многие виды анаморфных грибов, при чем комплексы видов этих микромицетов различаются для разных типов почв, например, пустынных, лесных, почвах под производственными посевами различных

сельскохозяйственных культур и т.п.

К почвенным грибам относят часть группы хищных грибов, которая объединяет грибы, улавливающие с помощью специальных приспособлений (ловчие кольца, клейкие головки и сети и т.п.) нематод, коловраток, простейших и, даже иногда, мелких насекомых. К этой группе относятся анаморфные грибы гифомицеты, а также представители зигомицетов (зоопаговые), оомицетов и хитридиомицетов.

Водные грибы. Большая по объему группа грибов, связанная в своих местообитаниях с водой. Среди них виды-сапротрофы, живущие на растительных остатках, попавших в водную среду, паразиты водных животных, водорослей, высших водных растений. Причем водные грибы известны как в пресных, так и морских водоемах. К водным грибам относятся, например, сапролегниевые грибы, а также грибы из многих таксономических групп.

Грибы — эпифиты это группа грибов, обитающая на поверхности различных органов растений — ветвях, стеблях и т.д.

Грибы филлопланы составляют группу различных видов, обитающих на поверхности листьев растений. Среди них наиболее часты сапротрофные виды, питающиеся выделениями растений, например, различные группы дрожжей.

Широко распространена группа грибов паразитов растений. По характеру развития на растениях паразитные грибы, относящиеся к разным таксонам, можно отнести к различным трофическим группам микроорганизмов, выделенным еще в 19-м веке французским ботаником А. Де Бари.

Облигатные (обязательные) сапротрофы — грибы, питающиеся мертвыми растительными остатками или почвенным гумусом и не способные развиваться на растениях.

Факультативные паразиты — грибы, ведущие сапротрофный образ жизни, но способные поражать ослабленные растения или их части.

Факультативные сапротрофы — грибы, способные продолжать вегетативный рост и размножение на растительных остатках после гибели растения-хозяина.

Облигатные паразиты — грибы, способные питаться только питательными продуктами клеток живого растения, и после его гибели переходящие в стадию покоя или погибающие. Изучение паразитных грибов и их взаимодействием с растением является предметом фитопатологии — науки о болезнях растений.

Большую группу грибов — обитателей леса представляют **ксилотрофы**. Сюда относятся виды грибов, обладающие комплексом ферментов, благодаря которым они могут разлагать древесину. Среди ксилотрофов есть ксилосапротрофы, развивающиеся преимущественно на мертвой древесине и ксилопаразиты, паразитирующие на живых деревьях и кустарниках. К специализированным в отношении различных субстратов группам относятся копрофильные грибы, обитающие на навозе травоядных животных, микофильные грибы, живущие на плодовых телах и мицелии других грибов, карбофильные грибы, встречающиеся на обугленной древесине и кострищах и др.

Все перечисленные эколого-трофические группы грибов представлены, как правило, видами из различных таксономических групп. Некоторые особенности экологии отдельных видов грибов представлены в соответствующих разделах, посвященных описанию отдельных таксономических групп.

Считается, что сапротрофный способ питания первичен для грибов, а паразитизм представляет собой один из путей специализации, как к субстрату, так и способу питания.

Это прослеживается при рассмотрении эволюции паразитизма грибов от факультативных паразитов, у которых паразитизм в известной степени случаен, до обязательных или облигатных паразитов (биотрофов), для которых питание за счет хозяина обязательно. Во многих работах обсуждается коэволюция грибов-биотрофов и их растений-хозяев.

Факультативные паразиты способны обычно развиваться как сапротрофы в почве или на поверхности листьев растений, но переходить к паразитизму на ослабленных растениях, вызывая корневые гнили или некоторые пятнистости листьев.

Факультативные сапротрофы, наоборот, обычно развиваются как паразиты, но в определенных условиях или на определенной стадии развития, существуют как сапротрофы. Например, многие сумчатые грибы на растениях паразитируют в вегетативной стадии (мицелий) и стадии бесполого (конидиального) спороношения. При этом сумчатая — половая стадия всегда формируется в сапротрофных условиях на отмерших листьях или стеблях растений

Настоящие или облигатные паразиты в природе развиваются только на живых растениях. Это, например, настоящие мучнисторосяные грибы из класса аскомицетов, или ржавчинные из класса базидиомицетов.

Процесс формирования новых эколого-трофических групп грибов продолжается и в настоящее время. Возникающие в процессе деятельности человека новые материалы (стекло, пластмассы, бумага, различные, сложные по составу промышленные материалы, нефтепродукты и т. д.), приводят к тому, что грибы адаптируются к этим специфическим субстратам, осваивают их и, таким образом, формируют новые эколого-трофические группы. При этом наносится значительный ущерб изготовленным из этих материалов изделиям. Например, разрушение специальных стекол оптических приборов, особенно в тропических странах, разрушение бумаги и порча книг от плесневения при нарушении режима их хранения, повреждение произведений искусства и т.д. Даже металлы оказались доступны некоторым грибам, которые вызывают у них биокоррозию. Разнообразие эколого-трофических групп грибов свидетельствует об их большой роли в природе и деятельности человека.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Размножение грибов»

Цель работы: изучить жизненные циклы грибов.

Задачи работы:

1. Изучить жизненные циклы грибов родов *Aspergillus*, *Neurospora* и дрожжей

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска

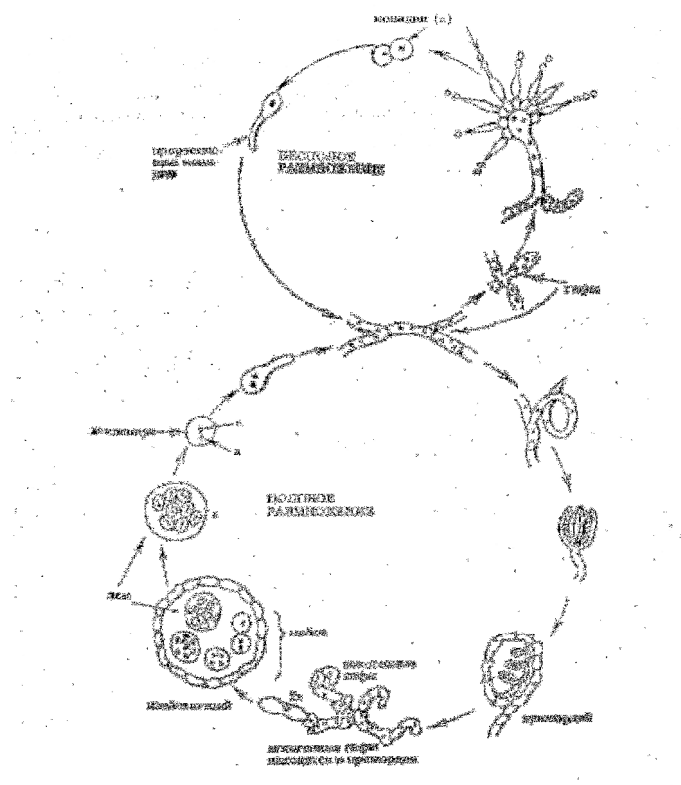
Описание (ход) работы:

Аспергилл (*Aspergillus*)

Аспергилл - гомоталлический гриб, половой цикл которого сходен с циклом нейроспоры. Бесполое размножение осуществляется с помощью конидий. Мицелий диких штаммов не способен к неограниченному росту, он образует многочисленные гаплоидные зеленые колонии ($n = 8$). На питательной среде примерно через 6 час конидии прорастают, и из каждой конидии образуется бесцветная гифа, разделенная на множество клеток с помощью перегородок с отверстиями, через которые ядра могут перемещаться из клетки в клетку. Гифы, переплетаясь, образуют мицелий. Через 20 час начинается созревание мицелия, его ядра увеличиваются, хромосомы большинства клеток становятся полигенными. В клетках, в которых не происходит полигенизации хромосом, при их дифференцировке возникают особые гифы - конидиеносцы. На конце конидиеносца формируется пузырек, который отделяется от него перегородкой. При созревании пузырька образуются выросты - одноядерные клетки (первичные стеригмы). Последние образуют одну или две вторичные одноядерные стеригмы, при делении которых формируется шарообразная конидия. После 100 делений возникают цепочки одноядерных конидий, которые постепенно стареют, меняя цвет, и отмирают. Но многие из них сохраняют жизнеспособность в течение нескольких лет. Цепочки конидий образуют колonoобразную головку. Гифы разных мицелиев могут срастаться, при этом образуется гетерокарион, содержащий ядра разных генотипов. Если конидиеносец формируется на гетерокариотическом мицелии, то образующиеся цепочки конидий могут быть генетически и фенотипически различными (так как в каждую конидиогенную клетку попадает только одно ядро), например, зелеными и белыми.

Половой процесс у аспергилла протекает на среде, содержащей мало азота и много восстановителей. При этом формируются половые органы - спирально закрученные, короткие гифы, при слиянии которых возникает двуядерная клетка, от которой отходят многочисленные аскогенные гифы. Ядра в этих гифах делятся митотически и после деления остаются рядом. Аскогенные гифы обрастают мицелием и превращаются в примордий, развивающийся в клейстотеций, в котором формируются аски. Гаплоидные ядра родоначальников асков сливаются и сразу же происходит мейоз, образуется 4 гаплоидных дочерних ядра, которые делятся митотически и превращаются в аскоспоры,

расположенные в аске беспорядочно. Количество асков в зрелом клейстотеций может колебаться от 10 до 100 000. На аспергилле был открыт парасексуальный процесс, доказано существование митотической рекомбинации. Это дало возможность использовать парасексуальный процесс в генетическом анализе не только на аспергилле, но и на других грибах. На аспергилле впервые был разработан специальный метод картирования с использованием гаплоидизации гетерозиготных диплоидов на нем применяют те же методы генетического анализа, что и на других микроорганизмах - анализ случайной выборки спор, митотической сегрегации и др.



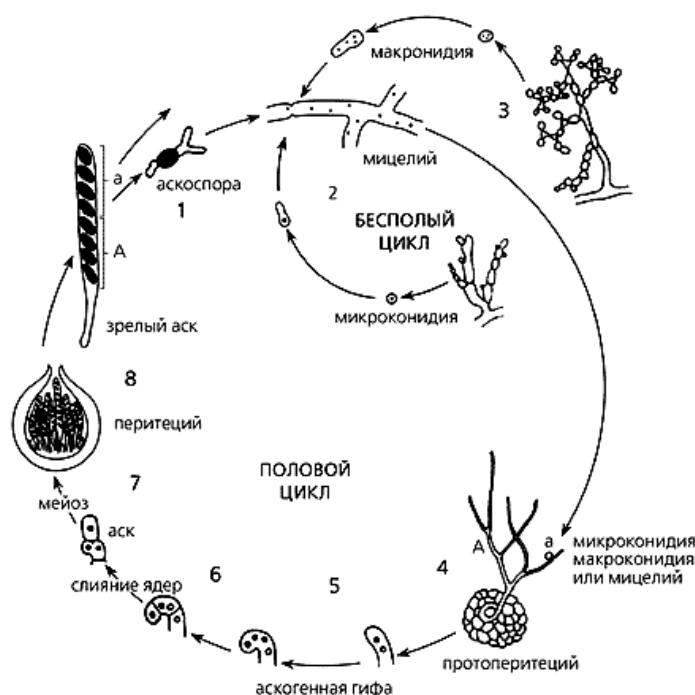
Жизненный цикл грибов
рода *Aspergillus*.

Нейроспора (*Neurospora crassa*)

Нейроспора - хлебная плесень - многоклеточный гриб, его вегетативное тело состоит из нитей (гифов), переплетение которых образует мицелий. Клетки гриба многоядерны, и ядра гаплоидны, перегородки между стенками клеток мицелия имеют отверстия, так что цитоплазма гриба объединена. На гифах формируются вегетативные споры (конидии) с разным числом ядер: многоядерные макроконидии или одноядерные микроконидии, при прорастании которых вновь образуется мицелий. Таким образом, «бесполое размножение нейроспоры осуществляется прорастанием спор. Мицелии диких штаммов способны к неограниченному росту.

Для полового размножения необходимо участие двух плесеней противоположных типов спаривания А и а. Половой процесс, носящий название гаметангиомии, осуществляется с участием специализированных клеток — гаметангиев. Женский гаметангий состоит из двух частей - аскогона и тонких длинных волокон - трихогин (от греч. трихос - волос, гине - самка). В качестве мужского гаметангия выступают гаплоидные микроконидии. При оплодотворении конидия по трихогине попадает в аскогон. Гаплоидные ядра после плазмогонии объединяются попарно, образуя дикарион. Из аскогона вырастают аскогенные гифы, в которых ядра дикариона синхронно делятся. На аскогенных гифах в плодовых телах (перитециях) развиваются сумки (аски). После оп-

лодотворения оба гаплоидных ядра существуют некоторое время раздельно и многократно делятся митотически, образуя множество аскогенных гиф. Спустя определенное время кончик каждой аскогенной гифы выпячивается и изгибается. Ядра в ней делятся митотически, и образуются четыре гаплоидных ядра. Затем возникают три клетки, две из них содержат по одному, и одна - два гаплоидных ядра, которые сливаются и образуют диплоидное ядро зиготы. Зигота делится мейотически, при этом в обоих делениях сохраняется ориентация веретена и споры располагаются в определенном (линейном) порядке. Четыре гаплоидные споры еще раз делятся митотически и образуется аск с 8 упорядоченными спорами, расположенными вдоль оси аска. Гифы разных штаммов нейроспоры могут сливаться и образовывать гетерокарион, содержащий ядра разного генотипа, на котором могут формироваться как гомо-, так и гетерокариотические макроконидии, а также микроконидии с генотипами исходных штаммов.



Жизненный цикл нейроспоры

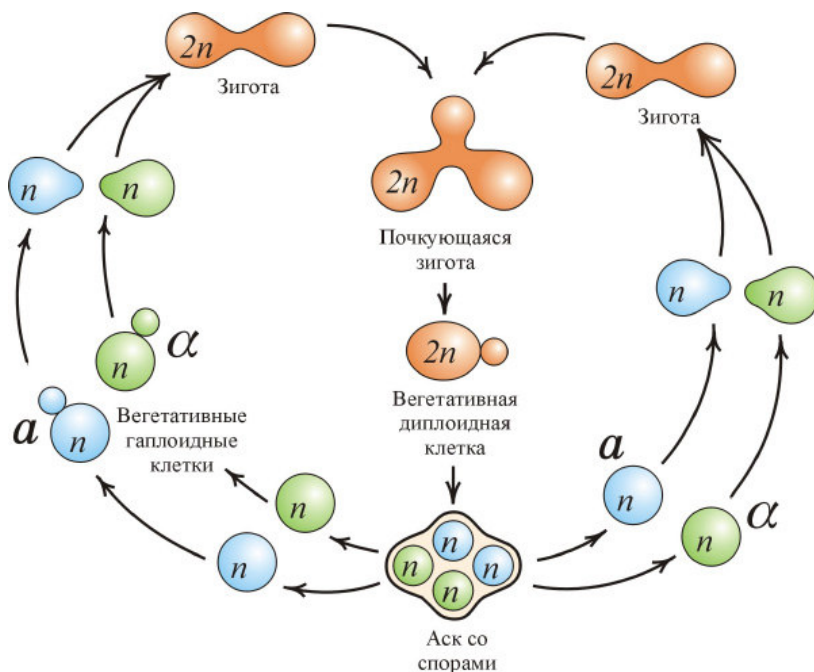
В генетических исследованиях нейроспора появляется в 40-х гг прошлого века, и опыты на ней позволили сформулировать основополагающую гипотезу «один ген — один фермент». На нейроспоре получены прямые доказательства закона чистоты гамет, происхождение кроссинговера на стадии четырех нитей, разработан метод тетрадного анализа, на ней ведется изучение митохондриального наследования, биохимических молекулярных генетических процессов.

Дрожжи

Дрожжи *Saccharomyces* - одноклеточные грибы. Дрожжевые клетки имеют округлую форму, очень мелкое ядро и не превышают 5-10 мкм. Клеточное деление у них осуществляется путем почкования. Вегетативные клетки штаммов, выделяемые в природных условиях или используемые в производстве, диплоидные. При определенных условиях в вегетативной клетке происходит мейоз и она превращается в аск с четырьмя аскоспорами.

На свежей питательной среде споры прорастают и попарно копулируют. При копуляции за слиянием клеток (цплазмогамия) почти сразу же следует слияние и их ядер (кариогамия). В результате образуется диплоидная зигота, далее размножающаяся вегетативно. Некоторые штаммы дрожжей гомоталличны, т. е. копуляция у них может происходить между спорами так же, как и между гаплоидными клетками, в любых комбинациях. У других (главным образом у производственных видов *Sacch. cerevisiae*)

споры принадлежат к одному из двух типов спаривания, обозначаемых А и а. Копуляция совершается лишь при встрече спор или клеток противоположных типов спаривания. У гетероталличных дрожжей при искусственном выделении одиночных спор могут быть получены гаплоидные клоны, у гомоталличных при этом происходит автодиплоидизация, т. е. удвоение числа хромосом за счет слияния сестринских клеток.



Жизненный цикл дрожжей

Контрольные вопросы: 1. Назовите основные этапы жизненного цикла дрожжей. 2. Назовите основные этапы жизненного цикла аспергиллов. 3. Назовите основные этапы жизненного цикла нейроспоры.

Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: Отбор материала для микологического исследования.

Цель занятия – ознакомиться с правилами забора и транспортировки материала для микологических исследований.

Задачи работы:

1. Изучить устройство и правила работы в микологической лаборатории.
2. Познакомиться с правилами взятия и доставки патологического материала
3. Освоить правила работы с культурами микромицетов.
4. Освоить технику микроскопического исследования патологического материала

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска, микроскопы световые,

спиртовые горелки, предметные и покровные стёкла, предметные и покровные стёкли, красители, микологические иглы.

Описание (ход) работы:

Устройство микологической лаборатории

Работа с патологическим материалом, содержащим грибы должна проводиться с соблюдением особых правил техники безопасности, противоэпидемиологического режима, личной гигиены и быть направлена на обеспечение профилактики заражения, аллергизации населения и распространения инфекций. В связи с этим микологические исследования должны проводиться в специализированных лабораториях.

Микологическая лаборатория должна иметь определенный набор помещений, который включает:

- комнату для приема и регистрации материала;
- комнату для микроскопии;
- бокс-посевную, комнату для посева и работы с культурами;
- средоварочную комнату;
- автоклавную для стерилизации и уничтожения патологического материала и культур;
- моечную;
- препараторскую;
- кладовую;
- гардероб для одежды сотрудников;
- туалет.

Для работы в микологической лаборатории необходимо иметь спиртовки или газовые горелки, микробиологические петли, эпиляционный пинцет для удаления пеньков волос, микологические лопаточки, которые служат для отделения грибковых культур от питательной среды, скальпель для забора соскобов с кожи и пораженных волос, шпатели анатомические, пинцеты, кусачки маникюрные, ножницы, ложечки Фолькмана, пипетки пастеровские, иглы препаровальные, пилку для ногтей; расщепляющие иглы для чешуек кожи, стеклянные палочки, шприцы, низкоскоростную центрифугу, аппарат для встряхивания, чашки Петри, пробки, стеклянную посуду, ультрафиолетовую лампу Вуда с фильтром, микроскопы, осветители, термостаты, автоклавы, холодильники, сухожаровые шкафы, бактерицидные лампы.

В лаборатории, где работают с патологическим материалом, пол и рабочие столы ежедневно убирают влажным способом с использованием дезинфицирующих средств (15% раствор хлорамина, раствор с 5% осветленной хлорной известью.)

Термостаты ежедневно протирают 0,5% раствором хлорамина. Стены обрабатывают дезинфицирующим раствором 1 раз в месяц.

Стерилизацию посуды и инструментов горячим воздухом в сухожаровом шкафу проводят при 180 °С в течение 60 минут.

Требования, предъявляемые к работе в микологической лаборатории

Согласно инструкции СП 1.2.036-95 Госкомэпиднадзора РФ «Порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов 1-4 групп патогенности» дрожжевые грибы принадлежат к 3-4 группам возбудителей инфекционных болезней, а грибы, вызывающие гистоплазмоз, бластомикоз, кокцидиоидоз относятся к 2 группе патогенности.

II группа *Blastomyces brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*.

III группа *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*.

IV- группа *Absidia corymbifera*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Candida crusei*, *Candida intermedia*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Cephalosporium acremonium*, *Cephalosporium cinnabarium*, *Epidermophyton floccosum*, *Geotrichum candidum*, *Microsporum spp*, *Mucor mucedo*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium luteo-viride*, *Penicillium notatum*, *Pityrosporum orbiculare*, *Rhizopus nigricans*, *Trichophyton spp*, *Trichosporum cerebriforme*.

Проводить работу с культурами грибов 4-й группы патогенности разрешается только на основании особого разрешения, с соблюдением инструкций по технике безопасности:

- если забор патологического материала проводят с ног, то используют специальную скамейку, покрытую клеенкой;
- салфетки, пелерины используемые при заборе материала, подвергают обеззараживанию с использованием кипячения в течение 15 мин. или полного погружения в дезраствор на 3 часа;
- исследуемый материал транспортируют в металлической или пластмассовой таре (ящики с крышками, биксы), которые ежедневно обрабатывают дезрастворами;
- посеvy патологического материала необходимо проводить около газовой горелки. На засеянных чашках и пробирках необходимо ставить четкие, разборчивые надписи, в которых указывается дата посева, номер анализа;
- загрязненную посуду в ходе исследования (пипетки, шпатели, предметные стекла) необходимо подвергать обеззараживанию; для этого погружают в 5% раствор хлорамина или 5% раствор осветленной хлорной извести на 2-3 часа. После чего обеззараженную посуду подвергают мойке и кипячению;
- исследуемый материал (ткань, кожные и ногтевые чешуйки), отработанные культуры грибов автоклавируют при 2 атм (132 C) в течение 10 мин;
- жидкий исследуемый материал (кровь, мочу, мокроту, промывные воды, фекалии смешивают с водой 1:1) засыпают хлорамином или хлорной известью 200г/л на 2 часа с последующей эвакуацией в канализацию.

Требования, предъявляемые при работе с возбудителями глубоких микозов.

- все работы с культурами мицелиальной фазы грибов проводят в боксе биологической безопасности III класса;
- просмотр посевов с мицелиальной фазой грибов проводят в боксовых комнатах в костюме 4 типа с ватно-марлевой повязкой;
- чтобы не заразиться аэрогенным путем при работе с мицелиальными фазами грибов агаровые пластинки с посевами выдерживают в термостатах не более 5 суток (до начала спороношения). Не разрешается открывать матрасы и пробирки с посевами мицелиальной фазы грибов вне бокса;
- работу с дрожжевыми фазами грибов проводят в боксовой комнате в костюме III - типа с маской, серологические исследования - в костюме IV-типа;

- при заражении лабораторных животных место введения материала обрабатывают 1% настойкой йода.

Режим и техника безопасности при работе с грибами

Режим и техника безопасности при работе с грибами также соответствует таковым бактериологических лабораторий с учетом специфики работы с плесневыми грибами, которая заключается в следующем:

1. Во избежание возможной аллергизации персонала спорами культур плесневых грибов нельзя открывать чашки Петри и пробирки с культурами плесневых грибов без соблюдения специальных мер предосторожности. Следует работать с ними и настольных боксах с вытяжкой или в марлевых масках в боксе.
2. Воздух в посевной комнате и боксе лаборатории обеззараживается ультрафиолетовыми облучателями, которые включают на 1-1,5 часа.
3. Пол и рабочие столы в помещениях, где производится работа с патологическим материалом и выделенными культурами, ежедневно убирают влажным способом с применением дезинфицирующих средств (5% хлорамин, 5% осветленная хлорная известь). Термостаты еженедельно протирают 5% хлорамином, стены обрабатывают дезсредствами 1 раз в месяц.
4. Загрязненные микроорганизмами пипетки, шпатели, предметные и покровные стекла обеззараживают погружением в 5% раствор фенола, лизола на 30 мин, или в 5% раствор хлорамина, осветленной хлорной извести - на 2-3 часа, затем кипятят и моют.
5. Случайно разбитые емкости, содержащие патологический материал или культуры, заливают одним из вышеупомянутых дезрастворов на 2-3 часа с последующей влажной уборкой помещения с применением дезрастворов.
6. Культуры плесневых грибов обезвреживают автоклавированием в разных режимах: при 2 атм (132°) 20 мин; при 1,5 атм (1-20°) 30 мин.
7. Жидкий патологический материал (кровь, моча, мокрота, промывные воды) и фекалии, смешанные 1:1с водой, засыпают хлорамином или хлорной известью (200 г на 1 л) на 2 часа с последующей эвакуацией в канализацию.
8. Микотоксины чрезвычайно устойчивы к физическим и химическим воздействиям и не разрушаются при пастеризации, кипячении, автоклавировании, стерилизации сухим жаром при температуре до 210-300°; инактивируется 5% раствором NaOCl (гипохлората натрия) или насыщенным раствором перманганата калия.

Взятие и доставка патологического материала

При подозрении на микоз в зависимости от локализации патологического процесса может исследоваться: мокрота, промывные воды бронхов и гаймаровых пазух, гнойное и серозное отделяемое свищей, плевральный экссудат, спинномозговая жидкость, моча, фекалии, кожные и ногтевые чешуйки, отделяемое наружного слухового прохода и конъюнктивы глаза, кусочки органон и биопсированная ткань, кровь и др.

Мокроту, выделенную при откашливании, собирают в стерильную баночку с закручивающейся крышкой или стерильную чашку Петри. Предварительно больному необходимо обработать слизистую ротовой полости и зева одним из следующих

растворов: 2% раствор пищевой соды, буры, слабозеленый раствор марганцево-кислого калия, стерильный изотонический раствор хлорида натрия.

Промывные воды бронхов, гайморовых пазух, плевральный экссудат, спинномозговую жидкость собирают в стерильные пробирки.

Кровь на гемокультуру берут в количестве 5-10 мл из локтевой вены после тщательной обработки кожи в области локтевого сгиба.

Фекалии (последнюю порцию) собирают в небольшом количестве в стерильную баночку с закручивающейся крышкой.

Мочу (последнюю порцию) собирают после туалета наружных половых органов в количестве 10-15 мл в стерильные баночки.

Отделяемое свищей, в случае обильного выделения, можно собирать в стерильные пробирки. При незначительном количестве отделяемого, материал собирают тампоном, пастеровской пипеткой или бактериологической петлей.

Отделяемое наружного слухового прохода, конъюнктивы глаза собирают стерильным сухим тампоном.

Кожные чешуйки соскабливают скальпелем с поверхности очага поражения, а ногтевые - из глубоких слоев ногтевой пластинки. Чешуйки собирают в стерильную чашку Петри.

Кусочки органов и биопсированную ткань собирают в стерильные баночки. Одну пробу заливают 10% формалином для гистологии, вторую используют для микологического исследования.

К направляемым анализам прилагается сопроводительный документ, где указывается фамилия, имя, отчество, возраст, предполагаемый диагноз, номер истории болезни, наименование исследуемого материала.

Патологический материал транспортируется в **специальной** таре или металлических биксах. Спинномозговая жидкость доставляется в специальных термосах с температурой + 37° С. Поступивший в лабораторию материал может исследоваться в течение дня.

Микроскопическое исследование патологического материала

Патологический материал может исследоваться в нативных и окрашенных препаратах. Предметные и покровные стекла, предназначенные для приготовления микропрепаратов, должны храниться в смеси спирта с эфиром (1:1) для избежания загрязнения микрофлорой воздуха. Перед употреблением предметные и покровные стекла стерилизуют над пламенем горелки.

Микроскопия мокроты. Для приготовления нативных препаратов мокроту переносят в стерильную чашку Петри и рассматривают на черном фоне для обнаружения мелких частиц (комочков). Комочки могут быть гнойные, гнойно-слизистые, гнойно-кровянистые. Размеры комочков варьируют по величине в пределах 0,3-3 мм в диаметре, цвет их может быть серым, желтоватым, зеленоватым.

Для приготовления нативных микропрепаратов отдельные комочки переносят препаровальными иглами или бактериологической петлей в каплю спирта с глицерином, либо в каплю 10% раствора КОН. Покрывают покровным стеклом, слабо надавливают препаровальной иглой и микроскопируют при малом (1:80, окуляр 10х и объектив 8х) и большом (1:400, окуляр 10х и объектив 40х) увеличениях микроскопа.

Препараты из промывных вод, экссудата, а также желчи, мочи, желудочного сока, ликвора готовят из нативного осадка или из осадка полученного в результате

центрифугирования (при 1500 об/мин в течение 5 минут). Осадок петель или пастеркой переносят в каплю 10% раствора КОН на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и большом увеличении микроскопа. Для приготовления окрашенных препаратов исследуемые комочки или каплю осадка равномерно распределяют препаровальными иглами или предметным стеклом меньшего размера по поверхности стерильного предметного стекла до получения тонкого мазка. Полученный мазок подсушивают на воздухе, фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова (равные части 90° этилового спирта и эфира) в течение 3 -5 минут, либо троекратным фламбированием над пламенем горелки. Фиксированный мазок окрашивает по Граму. Окрашенный препарат микроскопируют с использованием иммерсионной системы микроскопа (1:900, окуляр 10х объектив 90х).

При микроскопии нативных препаратов обнаруживают цепочки конидии (иногда отдельные конидии), фрагменты мицелия, конидиеносцы. Клетки гиф мицелия имеют четкие контуры, гомогенное или вакуолизированное содержимое; конидии с гладкой или шероховатой (шипчатой) оболочкой. При микроскопии окрашенных препаратов обнаруживают грамположительные или граммотрицательные морфологические элементы гриба (гифы мицелия, конидиеносцы, отдельные конидии или цепочки конидий).

В гистологических препаратах можно обнаружить ветвящийся мицелий или отдельные фрагменты мицелия, конидии, иногда конидиеносцы. В зависимости от метода окрашивания, структурные элементы клетки гриба (стенки мицелия, конидий, цитоплазма) приобретают ту или иную окраску.

Контрольные вопросы: 1. Устройство микологической лаборатории. 2. Какие требования предъявляются к работе в микологической лаборатории? 3. Какие требования предъявляются к работе с возбудителями глубоких микозов? 4. Охарактеризуйте режим и технику безопасности при работе с грибами. 5. Как проводят взятие патологического материала для микологического исследования? 6. Как проводят микроскопическое исследование патологического материала?

Лабораторная работа 3 (2 ч).

Тема: Питательные среды для культивирования грибов. Приготовление сред.

Цель занятия – изучить состав основных питательных сред для культивирования грибов

Задачи работы:

1. Изучить состав основных питательных сред для культивирования грибов.
2. Изучить состав селективных питательных сред для культивирования грибов.
3. Изучить состав питательных сред для хранения культур грибов.

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: лабораторная посуда, питательные среды, автоклав, плитка.

Описание (ход) работы:

Среда Сабуро среда для первичного выделения грибов

Состав среды: глюкоза - 40 г; -пептон -10 г; -агар-15 г; дистиллированная вода - 1 л; - pH -5,6.

Компоненты необходимо смешать, вскипятить до растворения. Автоклавировать при 110-120°C - 15 минут. Охладить, разлить.

Модификация среды Сабуро с циклогексимином - это антибиотик, который подавляет рост быстрорастущих плесеней и дрожжей.

Модификация Эммонса - pH среды 6,5-7, что улучшает рост грибов:

- глюкоза - 20 мл; пептон - 1 г; агар - 20 г; сусло - 20 г; дистиллированная вода - 1 л.

Картофельно - декстрозный (глюкозный) агар для выделения и идентификации грибов

Состав среды -глюкоза- 10 г; картофельная мука - 39 г; дрожжевой экстракт - 2,5 г; - агар -15 г; дистиллированная вода 1 л

Картофельную муку варят в 500 мл воды. Добавляют остальные ингредиенты и дистиллированную воду. Хорошо смешивают, встряхивают до растворения. Полученную смесь фильтруют через марлю, автоклавируют при 110-120°C - 15 минут. Охлаждают и разливают в чашки.

Картофельно-сахарозный агар для выделения и идентификации грибов Состав среды: сахароза - 20 г; картофель - 200 г; агар - 20 г; - дистиллированная вода - 1 л.

Готовят также как картофельно-декстрозный агар.

Среда Чапека-Докса для выделения и идентификации *Aspergillus spp* Состав среды: NaNO_3 - 3 г; K_2HPO_4 -1 г; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 г; KCl - 0,5 г; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,01г; глюкоза - 30 г; агар-15 г; дистиллированная вода - 1 л.

Смешать все компоненты, вскипятить до растворения. Автоклавировать при 110-120°C 15 минут. Охладить и разлить в чашки.

1,5% водный агар для идентификации плесневых грибов Состав среды: агар - 15 г; водопроводная вода -1л. Агар поместить в воду, вскипятить до растворения. Автоклавировать при 110-120°C в течение 15 минут. Охладить, разлить.

Модификация.

Для стимуляции конидиообразования у *Fusarium* используют водный агар с гвоздичными листьями. Для этого высушенные и простерилизованные листья молодой гвоздики нарезают кусочками не более 1 см и помещают в застывший водный агар.

Кукурузно - декстрозный агар для идентификации дерматофитов (стимулирует образование пигмента у *T.rubrum*) Состав среды: кукурузная мука - 50 г; глюкоза - 5 г; глицерин - 30 мл; агар - 15 г; дистиллированная вода -1 л.

Способ приготовления как у кукурузного агара. **Кукурузный агар Борелли для идентификации дерматофитов (стимулирует образование пигмента у *T.rubrum*)** Состав среды: кукурузный агар - 17 г; сухое молоко - 7 г; -мед-10 г; дистиллированная вода -1 л. Метод приготовления как у кукурузно-декстрозного агара.

Агар Леоняна для идентификации плесневых грибов Состав среды: -мальтоза - 6, 25 г; сусло - 6,25 г; KH_2PO_4 - 1,25 г; дрожжевой экстракт - 1 г; MgSO_4 -0,625 г; пептон - 0,625 г; агар -20 г; дистиллированная вода -1 л; Все компоненты необходимо смешать,

вскипятить до полного растворения. Автоклавировать при 110-120°C -15 минут. Охладить и разлить в чашки.

Бульон Кристенсена для идентификации дерматофитов и некоторых дрожжей.

Основан на их уреазной активности (способность расщеплять мочевины).

Среда № 1. Состав среды: пептон -1 г; -NaCl - 5 г; -KH₂PO₄ - 2 г; феноловый красный - 8 г; дистиллированная вода - 800 мл.

Развести среду №1 (pH-6,9). Автоклавировать и охладить.

Приготовить среду № 2, простерилизовать и добавить к среде №1, разлить в чашки.

Среда № 2. Состав среды: мочевины - 20 г; глюкоза-1 г; -дистиллированная вода 100 мл.

Селективная среда для группы *p. Trichophyton* предназначена для идентификации дерматофитов по их питательным потребностям

Среда № 1. Казеиновый агар. Состав среды:

- казеин (с 10 % кислым гидролизатом) - 25 мл;
- глюкоза - 40 г;
- KH₂PO₄-1,8г; -MgSO₄-0,1 г;
- агар - 20 г;
- дистиллированная вода - 1 л.

Среда № 2. Селенитовый агар. Состав среды:

- глюкоза - 40 г; -NH₄NO₃-1,5г;
- KH₂PO₄- 1,8 г; -MgSO₄-0.1 г;
- агар - 20 г;
- дистиллированная вода -1 л.

Растворы витаминов:

- №1 тиамина гидрохлорида-0,01 г; дистиллированная вода -1 л;
- №2 инозитол 0,25 г; дистиллированная вода -1 л;
- №3 никотиновая кислота- 0,01 г; дистиллированная вода -1 л;
- №4 L-гистидин -0,15 г; -дистиллированная вода-1 л;

Методика приготовления: Среда № 1 и №2. Смешать компоненты, вскипятить до полного растворения, pH довести до 6,8. После чего автоклавировать при ПО -120°C 15 минут (готовые среды растворяют нагреванием).

Для растворов № 1-4: добавить 20 мл. раствора на 1 л. среды (раствором 1, 2,3 соответствует среда № 1, раствору 4 среда № 2), перемешать, автоклавировать 15 минут. Охладить, разлить.

Контрольные вопросы: 1. Какие питательные среды используют для культивирования плесневых грибов? 2. Какие питательные среды используют для культивирования дерматофитов? 3. Какие питательные среды используют для культивирования грибов рода *Candida*? 4. Какие питательные среды используют для хранения грибов?

Лабораторная работа 4 (2 ч).

Тема: Техника посева и культивирование грибов. Приготовление микроскопических препаратов.

Цель занятия – изучить технику посева и культивирования грибов

Задачи работы:

1. Освоить методы посева плесневых грибов
2. Освоить методы посева дрожжей
3. Изучить приемы анализа макро и микроморфологии культур грибов

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

микроскопы световые, спиртовые горелки, предметные и покровные стёкла, предметные и покровные стёкла, красители, микологические иглы, культуры грибов.. Мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска.

Описание (ход) работы:

При исследовании любого патологического материала на плесневую флору его засевают на плотную среду Сабуро или сусло с добавлением пенициллина и стрептомицина (100- 200 ед/мл среды). Посев производят в двух повторениях, учитывая различные температурные режимы выращивания грибов (+ 37° С и 28° С), всегда в 3 точки в центре чашки. Время инкубации 4-5 суток.

Одновременно с посевом патологического материала осуществляют контрольный посев воздуха на плесневую микофлору в помещениях лаборатории и палат, где находятся обследуемые больные. Пробы воздуха отбирают методом седиментации или аппаратом Кротова.

Мокроту (отобранные комочки) переносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой на поверхность среды Сабуро или сусла. Место посева отмечают карандашом с обратной стороны дна чашки Петри. Засеянные чашки Петри помещают в термостат крышкой вверх.

После инкубации засеянные чашки просматривают и при обнаружении спороншения определяют культуру гриба. В случае отсутствия спороншения гриб пересевают на дифференциальную среду Чапеки с целью дальнейшей идентификации.

Осадок промывных вод бронхов, гаймаровых полостей, экссудата, мочи, желудочного сока (нативный или после центрифугирования) забирают пипеткой и засевают в объеме 0,1 мл.

Фекалии разводят 1:10 (1 г фекалий и 9 мл жидкости) в жидкой среде Сабуро или жидком стерильном изотопическом растворе хлорида натрия, эмульгируют, отстаивают 10 мин для осаждения крупных частиц, засевают надосадочную жидкость в объеме 0,1 мл.

Отделяемое наружного слухового прохода и зева, взятое тампоном, сеют, тщательно проводя каждой стороной тампона по поверхности питательной среды. Можно засеивать смывы с тампонов. Для этого тампоны помещают в 10 мл жидкой среды Сабуро или жидкого сусла со стеклянными бусами и эмульгируют 10 мин, засевают 0,1 мл смыва с тампона газон, либо в три точки.

Кожные и ногтевые чешуйки помещают на поверхность питательной среды, тщательно прижимая их.

Осадок спинномозговой жидкости сеют на две чашки среды по 0,1 мл, а остаток спинномозговой жидкости засевают в среду обогащения (жидкая среда Сабуро или жидкое сусло), разлитую по пробиркам в объеме 5 мл. Засеянные чашки инкубируют как обычно, а пробирки с посевом на среде обогащения- при +28° С в течение 10 дней.

В случае наличия роста флоры на плотных средах культуру гриба определяют из этого посева, при отсутствии роста на Сабуро-агаре или сусло-агаре гриб изучают со среды обогащения. Для этого культуру гриба пересевают на дифференциальную плотную среду Чапека и в дальнейшем идентифицируют.

Из кусочка ткани органа (биопсия, аутопсия) делают отпечаток на поверхность плотной среды надрезанной стороной исследуемого кусочка в трех точках. Одновременно кусочки тканей помещают в 50 мл жидкой питательной среды.

Кровь, исследуют при подозрении на фугемию в двух-трех повторях. Засевают 5 или 10 мл крови, соответственно и 50 или 100 мл жидкой среды Сабуро с 2% глюкозы. Посевы выращивают при +37° С и +28° С в течение 10 дней. Первый просмотр посевов проводят через 5 дней, второй - через 10 дней. На пятые сутки можно наблюдать рост плесневого гриба в виде войлочного комочка на дне и поверхностной пленки. Грибницу пересевают на дифференциальную среду Чапека для определения рода и вида гриба. Если на 5-й день рост гриба не отмечается, посевы выдерживают до 10 дней и при отсутствии роста результаты исследования регистрируют как отрицательные.

Идентификация выделенных культур грибов

После выделения культур плесневого гриба их пересевают на дифференциальную среду Чапека для родового и, по возможности, видового определения. Идентифицируют 4-5-дневные культуры гриба со спороношением.

Как правило, используют культурально-морфологические критерии идентификации:

- 1) характер роста культуры гриба на агаровых средах (культуральная диагностика);
- 2) микроморфология гриба.

В затруднительных случаях используют дополнительные методы диагностики (изучение ферментативной активности, температурных особенностей роста некоторых грибов).

Макроморфология

Описывают структуру колонии (пушистая, войлочная, бархатистая, паутинистая, шерстистая, клочковатая, мучнистая и др.), поверхность (плоская, складчатая, бугристая, куполообразная, коремиеформная, зональная и др.), пигментацию колонии гриба и субстрата (различные оттенки зеленого, голубого, фиолетового, черного, серого и др.), наличие экссудата на поверхности колонии.

Микроморфология

Микроморфологию изучают по нативным препаратам, которые в зависимости от родовой принадлежности гриба готовят следующим образом: на предметное стекло наносят каплю жидкости для приготовления препаратов (равные части спирта, глицерина и воды); в нее помещают кусочек грибницы, вырезанный микологической лопаточкой из колонии и в виде треугольника с захватом центральной и периферической части, двумя препаровальными иглами расправляют вырезанный кусочек, с осторожностью во избежание образования пузырей воздуха. В некоторых случаях (мукор и ризопус) при приготовлении препарата грибницу расправляют на сухом предметном стекле, затем на нее наносят каплю жидкости и покрывают покровным стеклом.

Препараты просматривают под микроскопом при малом и большом увеличении. Изучают субстратный и воздушный мицелий, отмечают наличие или отсутствие септ (перегородок), обращают внимание на характер спороношения: конидиеносцы с конидиями и спорангии со спорангиоспорами. Конидиеносцы различны по своему

строению: от простых одиночных спороносных гиф до ветвистых древовидных образований.

Конидиеносцы располагаются по одиночке либо группами, заметно отличающиеся от вегетативных гиф мицелия, бесцветные или окрашенные, приподнимающиеся, прямостоящие, ниспадающие, стелющиеся. Они могут состоять, из одной клетки и из большого количества разных по форме и величине клеток, каждая из которых имеет свое наименование.

Контрольные вопросы: 1. Перечислите основные принципы идентификации культур грибов. 2. Перечислите основные макроморфологические признаки грибов, используемые для идентификации? 3. Перечислите основные микроморфологические признаки грибов, используемые для идентификации?

Лабораторная работа 5 (2 ч).

Тема: Изучение морфологии плесневых грибов. Идентификация плесневых грибов.

Цель работы: изучить и описать культуральные признаки плесневых грибов, изучить морфологические признаки плесневых грибов, определить род плесневых грибов, используя ключ Никитинского — Алеева.

Задачи работы:

1. Научиться описывать культуральные признаки плесневых грибов,
2. изучить морфологические признаки плесневых грибов,
3. Освоить приемы определения рода плесневых грибов, используя ключ Никитинского-Алеева.

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

микроскопы световые, спиртовые горелки, предметные и покровные стёкла, предметные и покровные стёкла, красители, микологические иглы, культуры грибов.. Мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска.

Описание (ход) работы:

1. Изучить культуральные признаки плесневых грибов. Большинство плесневых грибов, развиваясь на предметах окружающей среды пищевых продуктах, размножаются бесполым путем (оидиями, конидиями, спорангиоспорами). Поэтому на лабораторных занятиях рассматривают только способы бесполого размножения на примерах грибов — возбудителей порчи пищевых продуктов. Культуры этих грибов выращивают в чашках Петри на плотной питательной среде. Культуры в чашках не следует без надобности держать открытыми, так как споры грибов легко осыпаются и рассеиваются, что может привести к нежелательному заражению плесневыми грибами лаборатории, изучаемых культур и людей. При изучении отмечают: размер колоний, их форму, плотность, строение наружного края и центра, характер поверхности, цвет колоний, окраску субстрата и обратной стороны колоний, выделение капель жидкости (экссудата). На

плотных средах мицелиальные грибы образуют округлые или широко распространенные по поверхности, не врастающие в субстрат, пушистые, нитевидные, паутинообразные, ватоподобные или мучнистоподобные колонии. Вегетативный мицелий большинства видов не окрашен. Пигментирован только плодоносящий мицелий. Поэтому молодые колонии имеют белый или сероватый цвет. По мере развития органов плодоношения колонии приобретают желтый, розовый, бежевый, красный, зеленый, черный или другой цвет.

2. Изучение морфологических признаков плесневых грибов. Приготовление препаратов грибов для микроскопирования производят двумя обожженными и затем охлажденными препаровальными иглами. Отбирают небольшой кусочек мицелия вместе с плодоносящими гифами. Переносят его на хорошо обезжиренное предметное стекло в каплю смеси глицерина и этанола (1:1). Осторожно, не нарушая структуры мицелия, расправляют гифы иглами, после чего накрывают покровным стеклом и слегка прижимают. Препарат просматривают с объективом 40.

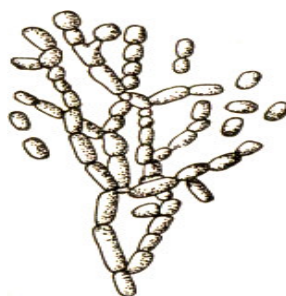
Для приготовления препарата гриба оидиум (*Oidium*) необходимо снять (слегка соскабливая) иглой его белый мицелий с субстрата.

При проведении микроскопического исследования следует установить многоклеточность мицелия и отсутствие специальных органов размножения. Гриб размножается оидиями, которые образуются на концах гиф путем их расчленения в виде бесцветных клеток прямоугольной или округло-прямоугольной формы. В препарате могут наблюдаться иногда цепочки нераспавшихся оидии.

Для приготовления препарата гриба мукор (*Mucor*) нужно взять его пушистый воздушный мицелий черновато-серого цвета и накладывать покровное стекло осторожно, без резкого броска, чтобы не раздавить спорангии —местилища спор.

При проведении микроскопического исследования выявить одноклеточное строение мицелия и органы размножения — спорангиеносцы. Рассмотреть их по всей длине, передвигая соответствующим образом препарат. Спорангиеносцы мукора, как правило, простые, неветвящиеся, отрастают от грибницы одиночно. Спорангии, сидящие на их верхушках (колонках), крупные, шарообразные, с массой спор, которые видны через тонкую прозрачную оболочку спорангия. Спорангиоспоры — одноклеточные, округлые или эллипсоидальные, гладкие, бесцветные или сероватого цвета.

В препарате всегда есть много свободно лежащих спор, выпавших из некоторых лопнувших спорангиев.



Oidium с оидиоспорами

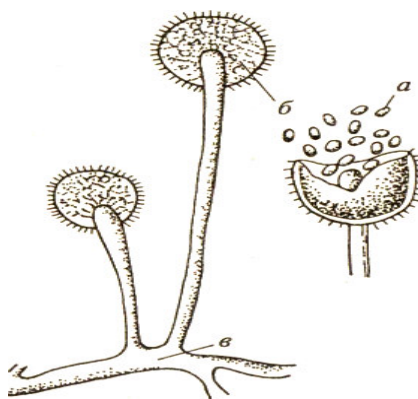
К мукоровым грибам относятся ризопус (*Rhizopus*), который отличается от мукора образованием так называемых ризоидов и столонов, которые служат для захвата новой площади.

Для приготовления препарата гриба аспергиллус (*Aspergillus*) необходимо взять воздушный окрашенный мицелий с края колонии.

При микроскопическом исследовании найти многоклеточные гифы и органы размножения — конидиеносцы. Конидиеносец по внешнему виду простой, одноклеточный, неветвящийся. На его конце имеется булавовидное вздутие, на котором расположены в один ярус бутылочковидные клетки стеригмы, а на них одноклеточные споры в виде цепочек — конидии. Верхушка конидиеносца с массой неосыпавшихся спор кажется плотной, плохо просвечивается, ее можно рассмотреть лишь при осыпании спор

Для приготовления препарата гриба пенициллиум (*Penicillium*) рекомендуется брать более молодую, зеленую часть грибницы, расположенную на границе с белым ее краем, заметно внедряясь в нее препаровальными иглами.

При микроскопическом исследовании найти многоклеточные гифы и органы размножения — конидиеносцы. Они представляют собой многоклеточные гифы, кистевидно разветвленные на концах. На концах ветвей расположены стеригмы (по 2 - 4), а на стеригмах — цепочки одноклеточных конидий, имеющих голубовато-зеленую окраску с различными оттенками. Для приготовления препарата гриба ботритис (*Botritis*) следует взять небольшой кусочек воздушной пушистой грибницы. На кладовать покровное стекло надо очень осторожно, чтобы не разрушить конидиеносцы, с которых легко осыпаются конидии. При микроскопическом исследовании выявить древовидно разветвленный конидиеносец, на концах ветвей которого кучками располагаются конидии — одноклеточные, сероватого цвета, овальной формы



Mucor:

а - спорангиоспоры; б – спорангий; в - гифа

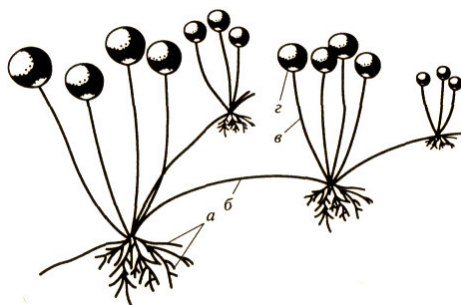
Для приготовления препарата гриба альтернария (*Alternaria*) необходимо взять грибницу в ее черных участках, заметно внедряясь иглами в глубь грибницы.

При микроскопическом исследовании найти многоклеточный мицелий и крупные многоклеточные темноокрашенные конидии округло-грушевидной или заостренно-вытянутой формы. Обратит внимание на то, что конидиеносцы-гифы, на которых находятся конидии, слабо развиты и мало отличаются от других вегетативных гиф (чаще они слегка пигментированы — серого или бурого цвета). Конидии образуются на таких конидиеносцах поодиночке или короткими цепочками. Конидии альтернарии часто септированные.

При изучении отдельных возбудителей плесневения пищевых продуктов и промышленных товаров необходимо уметь распознавать их, т. е. установить название, принадлежность к тому или иному классу, семейству, роду, виду.

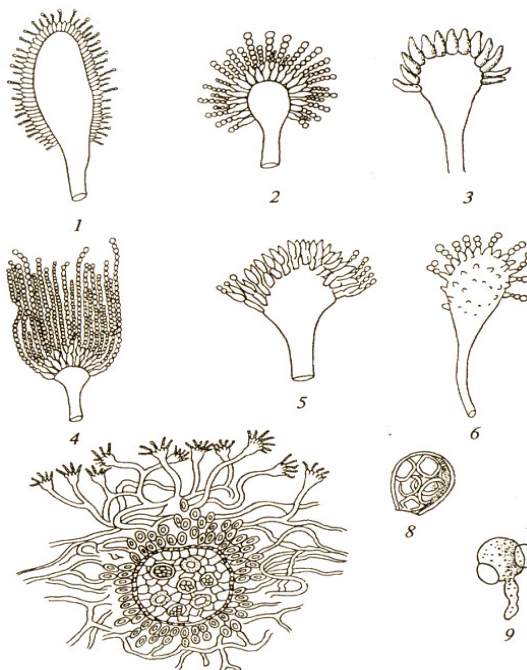
Товароведы пищевых продуктов и непродовольственных товаров чаще всего оперируют названием рода гриба.

Род гриба определяется по ключу Никитинского-Алеева.



Rhizopus:

a – ризоиды; *b* – столон; *c* – спорангиеносец; *d* – спорангий



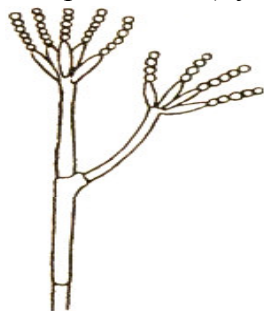
Aspergillus. Головки конидиеносцев: 1-6; 7 – дерновинка конидиеносцев и под ней клестокарпий, окруженный оберткой из толстостенных клеток; 8 – сумка со спорами; 9 – прорастание аскоспоры

Ключ для определения рода плесневого гриба

1. Грибы размножаются спорангиоспорами, находящимися внутри спорангиев.
2. Грибы размножаются конидиями, образующимися снаружи на особых конидиеносцах, реже — прямо на мицелии Спорангиеносцы, несущие спорангии, обычно простые, реже просто ветвящиеся. Спорангии все одинаковые.

Спорангиеносцы ветвящиеся. Спорангии двух видов: крупные на главной оси и мелкие (спорангиоли) на боковых ветвях.

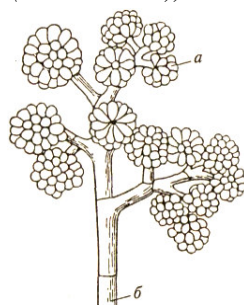
3. Спорангиеносцы одиночные, простые, иногда ветвящиеся. Спорангии мелкие или крупные, всегда однородные, бесцветные или окрашенные. Споры круглые или эллипсоидальные, гладкие, бесцветные или серого цвета (мукор (*Mucor*))



Penicillium. Одномутовчатое строение кониеносцев

Спорангиеносцы расположены кустиками, вырастающими на столонах из одного центра, с большими черными головками. Споры серого цвета, округло-яйцевидные, морщинистые. Ризопус (*Rhizopus*).

4. Кустовидные ветви расположены мутовчато на главной оси спорангиеносца в один или несколько ярусов. Места ответвления не раздуты. Споры цилиндрические и эллипсоидальные, бесцветные (тамнидиум (*Thamnidium*)).

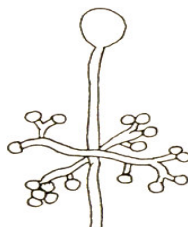


Botritis: а – конидии; б - конидиеносцев

5. Конидии образуются на особых конидиеносцах, отличных от обыкновенных вегетативных гиф.

Конидиеносцы или мало отличаются от обыкновенных гиф, или их нет вовсе, и конидии образуются прямо на мицелии.

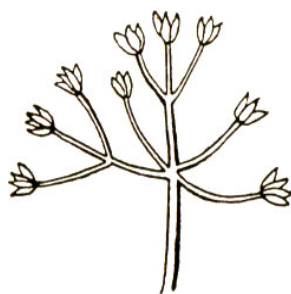
6. Конидиеносцы обильно ветвятся различным образом. Конидиеносцы не ветвятся или иногда ветвятся, но слабо. Ветвление простое, вильчатое или кустообразное.



Thamnidium

7. Ветвление древовидное. Ветвление кистевидное или многократно вильчатое, конидии располагаются цепочками, гладкие, бесцветные или окрашенные, округлые (пенициллиум (*Penicillium*))

8. Конидиеносцы древовидно разветвленные, большие. Ветви располагаются беспорядочно, конидии на концах ветвей развиваются кустиками, бесцветные, яйцевидные, гладкие (ботритис (*Botritis*))



Verticillium

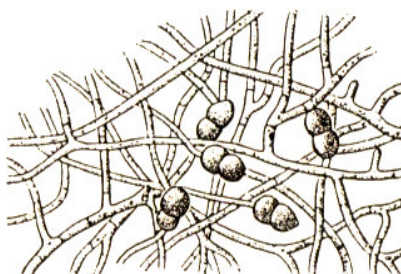
Конидиеносцы древовидно разветвленные. Ветви располагаются мутовчато. Конидии образуются пучками или поодиночке, эллипсоидальные или вытянуто-яйцевидные, бесцветные или слабоокрашенные (вертициллиум (*Verticillium*))

9. Конидиеносцы неветвящиеся, длинные, с кустиками больших грушевидных конидий на конце. Конидии двухклеточные, бесцветные или розового цвета. Колонии гриба желто-розового цвета (трихотециум (*Trichotecium*))

Конидиеносцы и конидии иной формы.

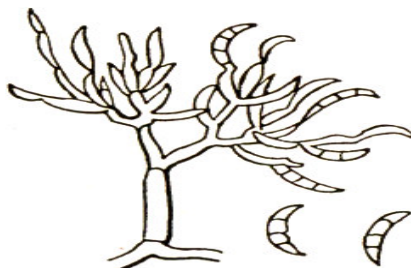
10. Конидиеносцы ветвятся. Ветвление простое, реже вильчатое. Простые (как исключение просто ветвящиеся) конидиеносцы имеют на конце булавовидное или пузыревидное вздутие, иногда такое вздутие отсутствует.

11. Конидии крупные, неправильной формы, усеяны бородавочками, расположены цепочками, окрашены в коричневый цвет. Колонии сначала пушистые, потом слизистые, с сильным неприятным запахом (акаулиум (*Acaulium*)).



Trichotecium

Конидии бесцветные, длинные, серпообразные, многоклеточные (с поперечными перегородками), иногда расположены цепочкой одна за другой или появляются прямо на мицелии. Колонии гриба часто окрашены в розовый цвет (особенно нижняя сторона) (фузариум (*Fusarium*))



Fusarium

12. Концы конидиеносцев булабовидно или пузыревидно раздуты и кругом покрыты стеригмами, несущими цепочки конидий.

Расширение на конце часто отсутствует, стеригмы располагаются только на вершине конидиеносцев, но не растут по сторонам. Конидии мелкие, округлые, гладкие, бесцветные, на стеригмах располагаются цепочками (цитромицес (*Cytromyces*)).

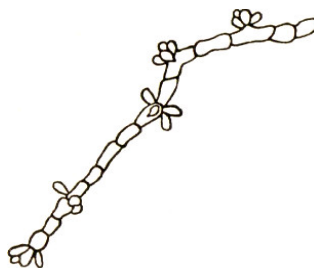
13. Стеригмы, покрывающие булабовидные вздутия, простые, неветвящиеся, несут цепочки конидий. Конидии округлые, гладкие или шиповатые, окрашенные или бесцветные (аспергиллус (*Aspergillus*))

14. Конидии образуются прямо на мицелии. Конидии образуются на конидиеносцах, мало отличающихся от обыкновенных гиф.

15. Конидиеносцы видны лишь при культуре в «висячей капле». Конидии легко рассыпаются. Места образования конидий видны в обычном микроскопическом препарате.

16. Одноклеточные конидии, бесцветные, веретеновидные или округло-удлиненные. Колонии слизистые, черные (дематимум (*Dematium*))

Конидии одноклеточные, яйцевидные, дрожжеобразные. Молодые колонии похожи на

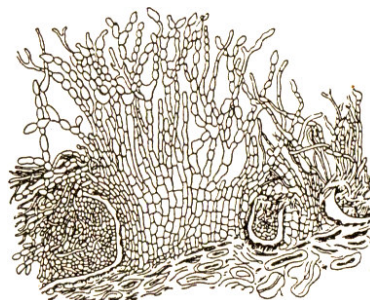


дрожжевидные, потом становятся лохматыми (монилия (*Monilia*))

Dematium

17. Конидии получают простым делением мицелия и легко отпадают, бесцветные, прямоугольные, иногда соединены в короткие цепочки (оидиум (*Oidium*))

Конидиеносцы длинные, многоклеточные. Конидии неправильной формы (длинные, округлые или лимонообразные), окрашены в светлый оливково-зеленый цвет (кладоспориум (*Cladosporium*))



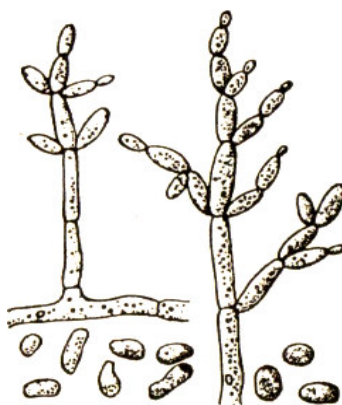
Monilia

18. На медленно растущих колониях нет настоящих конидиеносцев. Мелкие, блестящие, желто-коричневого цвета конидии образуются очень длинными цепочками на концах обыкновенных гиф (катенулария (*Catenularia*)).

Крупные, многоклеточные, округло-грушевидной или заостренно-вытянутой формы конидии образуются в одиночку или короткими цепочками на коротких боковых ветвях вегетативных гиф, играющих роль конидиеносцев (альтернария (*Alternaria*)).

Есть и другие грибы, не вошедшие в определитель, но встречающиеся на пищевых продуктах, среди них есть грибы, патогенные для человека, вызывающий аспергиллез легких.

Идентифицируйте грибы до рода, заполните таблицу и схематично зарисуйте органы спороношения.



Cladosporium

Таблица

Род плесневого гриба		
Номер п/п	Органы спороношения (рисунок)	Род гриба

Контрольные вопросы: 1. Каково строение тела гриба? 2. Какие признаки грибов называются культуральными? 3. Как приготовить препарат плесневых грибов? 4. Как размножаются грибы? 5. Какие типы спор бывают у грибов? 6. Чем различается строение конидиеносцев у разных плесневых грибов?

Лабораторная работа 6 (2 ч).

Тема: Противогрибковые препараты. Определение лекарственной чувствительности грибов.

Цель – изучить основные классы противогрибковых препаратов и способ определения чувствительности грибов к антибиотикам.

Задачи работы:

1. Изучить классификацию и механизм действия основных противогрибковых препаратов
2. Освоить методику определения антимикотической чувствительности.

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: микроскопы световые, спиртовые горелки, предметные и покровные стёкла, предметные и покровные стёкла, красители, микологические иглы, культуры грибов. Мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска.

Описание (ход) работы:

Нистатин — противогрибковый препарат полиенового ряда, используется в терапии кандидозов. Впервые выделен из *Streptomyces noursei* в 1950 году. **Фармакологическое действие.** Полиеновый противогрибковый антибиотик, высокоактивный в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*. В структуре антибиотика имеются двойные связи, обладающие высокой тропностью к стероловым структурам клеточной мембраны грибов, что способствует встраиванию молекулы препарата в мембрану клетки и образованию большого количества каналов, через которые осуществляется бесконтрольный транспорт электролитов; повышение осмолярности внутри клетки приводит к ее гибели. Резистентность развивается очень медленно. **Фармакокинетика.** Обладает слабым резорбтивным действием (практически не всасывается в желудочно-кишечном тракте). Выводится через кишечник. Не кумулирует. При местном применении практически не всасывается через слизистые оболочки.

Клотримазол (действующее вещество: 1-[(2-хлорфенил)дифенилметил]-1H-имидазол) — распространенное синтетическое противогрибковое лекарственное средство из группы производных имидазола для наружного и местного (в т.ч. интравагинального) применения. Торговые названия: «Амиклон», «Имидил», «Кандибене», «Кандид», «Кандизол», «Канестен», «Канизон», «Фунгинал», «Фунгицип», «Клотримазол» («Clotrimazolum GSK»), «Фунгин» (ветеринарный). **Фармакологическое действие.** Клотримазол — распространенный синтетический лекарственный препарат группы имидазольных противогрибковых препаратов для местного лечения кандидоза и других микозов. Препарат обладает широким спектром действия. Эффективен против дерматофитов, дрожжевых грибов и плесневых грибов (рода *Candida*, *Torulopsis glabrata*, рода *Rhodotorula*, *Malassezia furfur*), возбудителей разноцветного лишая, эритразмы, грамположительных (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium minutissimum*) и грамотрицательных бактерий (*Bacteroides*, *Gardnerella vaginalis*), *Trichomonas vaginalis*.

Кетоконазол - противогрибковый лекарственный препарат, производное имидазола. Торговые наименования: «Ветозорал», «Кетодин», «Кето Плюс», «Ливарол»,

«Микозорал», «Микокет», «Низорал», «Низорекс» «Ороназол», «Себозол», «Фунгинок», «Фунгистаб». В странах ближнего зарубежья также производится и продаётся под торговой маркой «Дермазол» (в России не зарегистрирована). Важными особенностями кетоконазола являются его эффективность при приеме внутрь, а также его влияние как на поверхностные, так и на системные микозы. Действие препарата связано с нарушением биосинтеза эргостерина, триглицеридов и фосфолипидов, необходимых для образования клеточной мембраны грибов. При приеме внутрь препарат хорошо всасывается. **Фармакологическое действие.** Противогрибковое средство, обладает активностью в отношении дерматофитов, дрожжевых грибов, диморфных грибов и эумицетов. Активен также в отношении стафилококков и стрептококков. Механизм действия заключается в ингибировании синтеза эргостерола мембраны грибов и нарушении проницаемости клеточной стенки. Неэффективен в отношении *Aspergillus*, *Zygomycetes*. Уменьшает образование андрогенов.

Итраконазол — лекарственное средство, обладающие противогрибковым действием широкого спектра. **Фармакологическое действие.** Синтетическое противогрибковое средство широкого спектра действия. Производное триазола. Подавляет синтез эргостерола клеточной мембраны грибов. Активен в отношении дерматофитов (*Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, *Epidermophyton floccosum*), дрожжевых грибов *Candida spp.* (включая *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*), плесневых грибов (*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.*, *Histoplasma spp.*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Fonsecaea spp.*, *Cladosporium spp.*, *Blastomyces dermatidis*). Эффективность лечения оценивается через 2-4 нед после прекращения терапии (при микозах), через 6-9 мес — при онихомикозах (по мере смены ногтей).

Флуконазол — распространенный синтетический противогрибковый препарат группы триазолов для лечения и профилактики кандидоза и некоторых других микозов. **Фармакологическое действие.** Противогрибковое средство, обладает высокоспецифичным действием, ингибируя активность ферментов грибов, зависящих от цитохрома P450. Блокирует превращение ланостерола клеток грибов в эргостерол; увеличивает проницаемость клеточной мембраны, нарушает ее рост и репликацию. Флуконазол, являясь высокоизбирательным для цитохрома P450 грибов, практически не угнетает эти ферменты в организме человека (в сравнении с итраконазолом, клотримазолом, эконазолом и кетоконазолом в меньшей степени подавляет зависящие от цитохрома P450 окислительные процессы в митохондриях печени человека). Не обладает антиадгезивной активностью. Активен при оппортунистических микозах, в т.ч. вызванных *Candida spp.* (включая генерализованные формы кандидоза на фоне иммунодепрессии), *Cryptococcus neoformans* и *Coccidioides immitis* (включая внутричерепные инфекции), *Microsporum spp.* и *Trichophyton spp.*; при эндемических микозах, вызванных *Blastomyces dermatidis*, *Histoplasma capsulatum* (в т.ч. при иммунодепрессии). Для профилактики грибковых инфекций у больных со злокачественными новообразованиями при лечении их цитостатиками или проведении лучевой терапии; при пересадке органов и в других случаях, когда подавлен иммунитет и имеется опасность развития грибковой инфекции.

Амфотерицин В — лекарственное средство, противогрибковый препарат. **Фармакологическое действие.** Полиеновый макроциклический антибиотик с противогрибковой активностью. Продуцируется *Streptomyces nodosus*. Оказывает

фунгицидное или фунгистатическое действие в зависимости от концентрации в биологических жидкостях и от чувствительности возбудителя. Связывается со стеролами (эргостеролами), находящимися в клеточной мембране гриба и встраивается в мембрану, формируя низкоселективный ионный канал с очень высокой проводимостью. В результате происходит выход внутриклеточных компонентов во внеклеточное пространство и лизис гриба. Активен в отношении *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.* и других грибов. Не действует на бактерии, риккетсии, вирусы. Исследования 2011 года выявили первичную причину антимикотического действия амфотерицина В, состоящую не в создании низкоселективного ионного канала, а заключающуюся в связывании одного с эргостеролом (и именно с ним, что обеспечивает снижение побочных эффектов при терапии), аналогичный (антимикотический) эффект наблюдается и у натамицина, не образующего каналы.

Методика определения чувствительности грибов к противогрибковым препаратам.

Чувствительность определяется методом диффузии в агар с помощью бумажных дисков, пропитанных противогрибковыми препаратами согласно инструкции научно-исследовательского центра фармакотерапии (2004).

Диски пропитаны препаратами в следующих концентрациях: амфотерицин В – 40 мкг, нистатин – 80 ЕД, клотримазол – 10 мкг, флуконазол – 40 мкг, итраконазол – 10 мкг, кетоконазол – 20 мкг и предназначены для определения чувствительности дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

Техника постановки анализа

1. Питательная среда. Рекомендуется использовать агаризованную среду Сабуро с рН не ниже 6,0. Для дисков с амфотерицином В, нистатином и клотримазолом может быть использована среда МПА

Среду расплавить на водяной бане, охлаждать до 50-60° С и разлить по 20 мл в чашки Петри. Если на поверхности среды есть конденсат, необходимо подсушить чашки со средой в термостате.

2. Приготовление инокулюма. Приготовить взвесь 24-48 часовой культуры гриба в изотоническом растворе хлорида натрия по оптическому стандарту мутности 5 ЕД (без пересчета на размер клетки гриба). Готовую взвесь развести изотоническим раствором хлорида натрия в 10 раз.

3. Инокуляция. Около 1-2 мл взвеси нанести на поверхность чашки с питательной средой и покачиванием чашки равномерно распределить взвесь по всей поверхности среды, затем пипеткой удалить избыток взвеси, и приоткрытые чашки подсушить при комнатной температуре 15 минут.

4. Наложение дисков. Диски расположить по поверхности агара на равном расстоянии друг от друга и плотно прижать к среде.

5. Преддиффузия. При использовании дисков с флуконазолом чашки оставить закрытыми на 30 минут на столе при комнатной температуре (до 20° С); при использовании дисков с итраконазолом и кетоконазолом чашки с дисками поместить в холодильник (2 – 6° С) на 1 час; при использовании дисков с амфотерицином В, нистатином и клотримазолом – в холодильник на 2 часа.

6. Инкубация. Чашки с дисками инкубировать в термостате при 25 – 27° С в течение 40 – 48 часов.

Интерпретация результатов по диаметру зоны подавления роста культуры

Противогрибные препараты в диске	Диаметр зон (мм) подавления роста культур		
	Устойчивых	Промежуточных (чувствительность зависит от дозы)	Чувствительных
Амфотерицин В	<14	-	≥14
Нистатин	<18	-	≥18
Клотримазол	<12	-	≥12
Флуконазол	≤19	20-28	≥29
Итраконазол	≤13	14-18	≥19
Кетоконазол	≤19	20-25	≥26

Контрольные вопросы. 1. Охарактеризуйте полиеновые антимикотические препараты. 2. Охарактеризуйте триазоловые антимикотические препараты. 3. Охарактеризуйте имидазольные антимикотические препараты. 4. Как определяется чувствительность грибов к антимикотическим препаратам?

Лабораторная работа 7 (2 ч).

Тема: Выделение грибов из природных субстратов. Выделение грибов из почвы.

Цель – изучить методы выделения грибов из почвы.

Задачи работы:

1. Изучить методы посева почвенной суспензии на селективные среды.
2. Изучить метод скошенной популяции на агаровой пластинке.
3. Изучить прямые и непрямые методы изоляции почвенных грибов.
4. Освоить метод прямого посева почвы.
5. Освоить метод прямых отпечатков почвенной пробы.
6. Освоить электростатический метод выделения грибов.
7. Освоить метод фумигации почвы.

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: микроскопы световые, спиртовые горелки, предметные и покровные стёкла, предметные и покровные стёкла, красители, микологические иглы, культуры грибов. Мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска.

Описание (ход) работы:

Выделение грибов из почвы.

Почва является местообитанием большинства грибов разных систематических групп. Грибы существуют в почве не только в форме органов спороношения и покоящихся структур, но и в жизнедеятельном, растущем и физиологически активном мицелии. Их роль в почве многообразна и значительна. Грибы, наряду с другими организмами, участвуют в разложении растительных и животных остатков, то есть в круговороте веществ в природе и создании почвенного плодородия. Почвенные грибы принимают прямое участие в питании высших растений, а также являются возбудителями их заболеваний. Микология почвы в настоящее время является составной частью почвенной микробиологии.

Микофлора почвы представлена всеми классами грибов: фикомицетами, аскомицетами, базидиомицетами, дейтеромицетами, а также так называемой группой *Mycelia sterilia*, развивающейся в почве в виде ризоморф и тяжелой мицелия. Некоторые виды грибов выделить обычными методами из почвы трудно, например виды сапролегниевых, базидиальных и т. д. Многие виды грибов не растут на обычно применяемых для их выделения из почвы средах. Поэтому для выделения и изучения почвенных грибов применяют кроме питательных сред, обычных для большинства видов сапрофитных грибов, элективные среды. При помощи специальных методов водной микологии можно выделить на «приманках» в воде многие виды сапролегниевых грибов, на средах, содержащих амебы, нематоды, личинки, яйца насекомых — грибы, питающиеся или паразитирующие на этих организмах. Многочисленные методы, применяемые при изучении почвенных грибов, можно разделить на две группы: методы изучения грибов непосредственно в почве (камеры обрастания и т. д.) и методы изучения выделяемых из почвы культур грибов. Часто используются методы обеих групп. При любых методах изучения почвенных грибов учитывают их наличие и количество, так как эти данные дают представление не только о распространении грибов, но и микофлоре почвы. Количество всех грибов и отдельных видов определяют числом спор или фрагментов мицелия в определенной навеске воздушно-сухой почвы, иногда выражают количество грибов по отношению к органическому веществу в почве. При количественных показателях грибов почвы определяют доминирующие их виды по частоте встречаемости и плотности популяции вида. Частота встречаемости представляет отношение числа образцов почвы, в которых данный вид был обнаружен, к общему числу изученных образцов, чем больше приближается отношение к единице, тем более доминирует данный вид гриба в почве при данных методах изучения. Под плотностью популяции понимают отношение общего числа изолятов данного вида к общему числу всех изоляторов в исследуемом образце. Виды грибов могут быть общими для всех или многих типов почвы или индикаторными для определенных типов почв или растительных ассоциаций. Выявлены отдельные виды грибов почвы, индикаторные к отдельным факторам, например, влажности. Наибольшее количество грибов находится в пахотном слое почвы (3—25 см), в более глубоких горизонтах число видов и их количество уменьшаются. Отдельные же виды находят в почве на глубине до 1 м и больше.

Грибную флору почвы составляют распространенные повсеместно виды в определенных эколого-географических условиях. К наиболее распространенным и типичным почвенным грибам относят виды родов *Trichoderma*, *Zygorhynchus*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* (например, *F. oxysporum*) и др. В почвах, лишенных богатого растительного покрова, микофлора представлена сравнительно однообразным и немногочисленным числом видов. Микофлора

окультуренных почв и почв с различным растительным покровом характеризуется наличием многочисленных и разнообразных видов грибов. В почве сохраняются споры и другие структуры многих паразитных грибов, например хитридального гриба — *Synchytrium endobioticum* — возбудителя рака картофеля, переноспоровых грибов, хранящихся в почве в виде ооспор, ржавчинных грибов, сохраняющихся в почве в виде телеитоспор, паразитных видов сумчатых грибов, как *Erysiphaceae* и *Sphaeriaceae*, сохраняющихся в виде перитециев в почве, головневых грибов и многих других облигатных и факультативных фитопатогенных видов грибов. Некоторые грибы не только сохраняются в почве, но и проходят там определенную часть цикла развития, например, прорастание хламидоспор головневых и зооспор фитофторы. По признаку размера плодовых тел грибы почвы могут быть представлены двумя основными группами: 1) макрофитами, имеющими крупные плодовые тела, которые образуются на поверхности почвы или в почве; 2) микрофитами, имеющими плодовые тела малых размеров или не имеющими их совсем. К наземным макрофитам относятся многочисленные виды базидиальных грибов — гименомицетов (*Agaricaceae*, виды *Hydnum*, *Clavaria*), гастеромицетов (дождевик *Lycoperdon* и др.). Из сумчатых — сморчковые (*Helvella*, *Verpa* и др.), дискомицеты (*Peziza* и др.). Многие из них встречаются преимущественно на лесных почвах и образуют микоризу с определенными породами лесных деревьев. В сосновом лесу обычны *Amanita muscaria*, *Macrolepiota procera*, *Suillus luteus*, *S. granulatum*; еловом — *Lactarius deliciosus*; лиственном — *Boletus scaber*, *B. versipellis*, *B. echinus*, *Amanita phalloides*, *Ceitaromyces odora*, *Lactarius subdulcis* и др. На луговой, почве обычны *Tricholoma*, *Hydrophorus*, *Marasmius oreades* (ведьмины кольца), *Psalliota campestris*, *Lycoperdon* и другие; на пастбищах — *Psalliota campestris*, *Volvaria semiglobosa*, *Boista plumbea*, *B. nigrescens*; на торфяных болотах — *Tricholoma arnillatum*.

Обработанная почва относительно бедна макрофитами, здесь встречаются отдельные виды *Leptoria*, *Pholiota*, *Psalliota*, *Campestris*, часто виды *Coprinus* и другие копрофильные. На песчаных почвах обычно распространены виды *Geaster*, *Phallus implephora*, *Thelephora terrestris*. На почвах пустынь, глинистых твердых почвах, «такырах», встречаются *Botrytea stevensii* и другие виды гастеромицетов. Они имеют плодовые тела древесиноподобной консистенции, пробивающие очень прочную почву. Из подземных почвенных макрофитов, которые характеризуются тем, что их зрелые плодовые тела не выходят на поверхность почвы, наиболее типичны из базидальных — *Hymenogastrellaceae*, *Hysterangiaceae*, некоторые *Sclerodermataceae*; из сумчатых виды — *Tuberaceae*, *Elaphomycetaceae*, *Terfeziaceae*; из фикомицетов — *Endogone*. Их плодовые тела в почве имеют форму неправильно округленных, массивных клубней, споры освобождаются после сгнивания плодового тела в почве. Изучению флоры почвенных микроскопических грибов посвящены многочисленные исследования в разных географических районах планеты. Флора представлена сотнями видов различных систематических групп. В северных районах наиболее распространены мукоровые — виды родов *Mucor*, *Absidia*, *Zygorrhynchus*, *Rhizopus*, *Mortierella* и других. Виды аспергиллов распространены преимущественно в южных районах, повсеместно распространены *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* и другие.

На состав микофлоры влияют тип почвы, климат, растительность, характер обработки почвы и многие другие факторы. Видовой и количественный состав грибов почвы зависит

от типа почвы, глубины горизонта, способа обработки (степени аэрации), кислотности, влажности, температуры, сезона года и от состава растительного покрова. В почвах, покрытых растительностью, микофлора представлена несколькими типами грибов: облигатными сапрофитными грибами, грибами, обитающими на корнях в качестве симбионтов (микоризных), и патогенными. Группа патогенных грибов включает условно-патогенные грибы и облигатные, которые после гибели растений могут расти на отмерших тканях питающего растения или образовывать в них покоящиеся структуры — склероции, хламидоспоры, утолщенного типа клетки и т. д. Кроме почвенных сапрофитов и корнеобитающих грибов в почвах встречаются ризосферные грибы, то есть растущие в почве ризосферы, и в почве, которая непосредственно прилегает к корням. На состав этих грибов влияют корневые выделения растений, отмершие во время вегетации клетки их корней. Трофические взаимоотношения различных видов почвенных грибов находятся в связи с корневой системой высших растений и органическим веществом почвы растительного, животного, микробного происхождения. Представители корнеобитающих грибов относятся к паразитам, сапрофитам, симбиотрофам, факультативным паразитам и сапрофитам, они используют ткани растений и корневые выделения, растительные остатки. Некорнеобитающие (ризосферные и почвенные) используют различные органические и минеральные вещества почвы. Максимальное количество грибов в почве ризосферы содержится в фазе цветения — начала созревания, то есть наибольшей физиологической активности растений. Число же грибов в почве ризосферы уменьшается по сравнению с почвой без растения, а количество их резко увеличивается. Таким образом, состав сапрофитных, корнеобитающих, патогенных, симбиотрофных и ризосферных почвенных грибов в значительной степени определяется характером растительности. Среди сапрофитных отмечены виды грибов, разлагающие определенные субстраты — целлюлозу, пектин, лигнин, насекомых, нематод, остатки легко-усваиваемых моносахаров и других органических веществ. В процессе разложения органических веществ почвы, состоящих из растительных и животных остатков, происходит смена ассоциаций грибов, а также других видов микроорганизмов — актиномицетов, бактерий, с которыми грибы почвы также взаимосвязаны.

Грибы, благодаря особенностям строения и метаболизма, играют большую роль в создании структуры почвы. Наиболее изучены из них виды *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Penicillium*. Гифы грибов способны адсорбировать на поверхности мелкие частицы почвы, образуя прочные агрегаты, что способствует обмену минеральной части почвы, превращению нерастворимых солей в растворимые, вымыванию некоторых элементов и т. д. Грибы часто принимают участие в начальных этапах гидролиза растительных полимеров, создавая условия для развития других микроорганизмов. С помощью системы окислительных ферментов грибы разлагают сложные трудноразлагающиеся соединения, например, лигнины. а также принимают участие в создании гумуса. Особо важное значение грибы почвы имеют в разложении целлюлоз, гемицеллюлоз и лигнина. Заселение и разложение грибами растительных субстратов в почве происходит в результате индукции соответствующих вне- и внутриклеточных ферментов. Наличие ферментов, трансформирующих полимеры растительных клеточных оболочек в мономеры, которые используются как продуцентами этих ферментов, так и другими организмами, является одним из существенных факторов формирования грибных ценозов в почве. Разложение растительных субстратов грибами в почве носит циклический и непрерывный характер, что обуславливает смену видового состава грибов

и их ассоциаций с другими почвенными организмами. Преобладающими компонентами оболочек клеток растений являются полисахариды (целлюлоза, гемицеллюлоза), лигнин и др., которые гидролизуются соответственно целлюлазами, гемицеллюлазами и другими ферментами до соответствующих мономеров. Гифальный тип роста большинства грибов является одним из примеров адаптации морфологической структуры к структуре субстрата, например, к целлюлозе, молекулы которой имеют нитевидную форму и соединены в пучки — мицеллы или фибриллы. При росте на клетчатке гифы часто располагаются вдоль фибрилл целлюлозы. Целлюлоза различными видами грибов разлагается постепенно. Глюкозные единицы от полимерной цепи целлюлазами грибов отщепляются или с нередуцированного его конца (экзогидролиз), или предварительно образуются целлюлозосахара, которые гидролизуются до глюкозы. При этом разные виды грибов гидролизуют целлюлозосодержащие растительные остатки неодинаково. Из высших грибов активными разрушителями целлюлозы являются базидиальные грибы, главным образом, порядка *Agaricales*, семейства *Polyporaceae* (виды родов *Polyporus*, *Fomes*, *Serpula* и другие), *Thelephoraceae* (виды родов *Ceriphora*, *Stereum*), *Agaricaceae* (виды родов *Pleurotus*, *Collybia*, *Pholiota*), *Hydnaceae* (виды родов *Hydnum*, *Irpex*). Из сумчатых грибов наиболее активно клетчатку в почве разрушают представители *Sphaeriales* — виды рода *Hypoxylon*, *Xylaria*, *Pezizales*, *Helotium*, *Chaetomium* и другие. Значительная роль в разрушении клетчатки принадлежит дейтеромицетам; наиболее активные виды *Trichoderma lignorum*, *Tr. koningi*, *Cladosporium herbarum* и многие другие темноцветные гифомицеты, виды родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Myrothecium verrucaria*, *Stachybotrys alternans* и т. д. Большинство штаммов разных видов и родов почвенных микромицетов способны расщеплять различные формы целлюлозы и природные целлюлозосодержащие субстраты. В кислых почвах процесс разложения наиболее активно осуществляется видами *Trichoderma*, *Penicillium*, в нейтральных и щелочных — *Stachybotrys*, *Cladosporium*, *Mycogone* и др.

Наиболее простым методом выделения целлюлозорастущих грибов из почвы является посев определенной навески почвы или объема почвенной взвеси в жидкую минеральную среду с фильтровальной бумагой или волокном хлопчатника в качестве единственного источника углерода. При этом субстраты наполовину или на одну треть погружаются в среду, и грибы растут в воздушной фазе субстрата. Наблюдают за ростом и выделяют грибы из визуально обнаруженных колоний, или с помощью микроскопа. При модификации этого метода комочки почвы или почвенную взвесь наносят на увлажненную минеральную среду в чашке Петри слой ваты или фильтровальной бумаги. Лигнин в почве разлагается главным образом базидиальными грибами и дейтеромицетами. Однако, дейтеромицеты, по имеющимся в настоящее время данным, представлены сравнительно незначительным числом видов, способных активно разлагать лигнин. Например, при изучении свыше 1500 штаммов разных видов родов *Mucor*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, выделенных из почвы, около 30 % не использовали лигнин осины в качестве единственного источника углерода, (около 5% давали обильный рост мицелия, не отличающийся от роста на среде с сахарозой). Разложение лигнина разными систематическими группами специфично. У штаммов видов *Mucor* преобладающими промежуточными продуктами являются альдегиды, кетоны, кислоты; у *Trichoderma* — кетоны, гидрооксибензойная и ванилиновая кислоты, у *Aspergillus* — кониферилвый альдегид, оксibenзальдегид, дегидрованилин, кетоны и кислоты; у штаммов видов родов *Penicillium* и *Fusarium* — спирты, фенолы, альдегиды и

кислоты. Одни виды содержат фенолазу (тирозиназу), катализирующую аэробное окисление моно- и о-диоксифенолов, другие — лактазу, катализирующую аэробное окисление полиоксифенолов и близких к ним соединений до хинонов. Лигнин осины активно разлагают штаммы *Aspergillus niger*, *Fusarium semitectum*, *Mucor racemosus*, *Penicillium funiculosum*, *P. diversum*, *P. cyclopium*, *Trichoderma lignorum*. Активными лигнинразрушающими видами, способными расщеплять также фенольные соединения, которые являются промежуточными продуктами разложения лигнина (п-оксибензальдегид, феруловая кислота, альдегид сиреневой кислоты, ванилин), являются виды *Alternaria*, *Chaetomella*, *Coniothyrium*, *Sphaeronema*, *Pyrenochaeta*. Некоторые базидиальные древоразрушающие виды грибов *Psaliota campestris*, *Marasmius peronatus*, *Polyporus versicolor*, *Clavaria gracilis* преимущественно разлагают лигнин древесины и лесной подстилки. Почвенные грибы принимают участие в процессах синтеза и разложения гуминовых кислот, главного компонента почвенного гумуса. Последний представляет комплекс многих сложных органических веществ растительного, животного и микробного происхождения: до 90% почвенного гумуса составляют гуминовые кислоты (50—80%) и полисахариды различного происхождения. Гуминовые кислоты представляют полимеры фенолов, индолов с аминокислотами, пептидами и другими соединениями. Многие грибы образуют меланины, фенолы, которые включаются в синтез гуминовых кислот, а отдельные виды грибов могут разлагать гуминовые кислоты, например, *Penicillium frequentans*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.* и другие. Таким образом, почвенные грибы являются составным компонентом биоценозов и принимают участие в круговороте веществ в природе при разложении органических веществ почвы, в образовании структуры почвы и ее плодородия. Они вступают в процессе жизнедеятельности в биотические, симбиотрофные, абиотические отношения как друг с другом, так и с другими организмами почвы.

Естественным местообитанием микроскопических грибов является почва. Наиболее распространенными почвенными микромицетами являются пенициллин, аспергиллы, фузарии, муковорые, триходерма для отдельных типов почв и географических зон. К почвенным грибам относятся также микоризные, съедобные, многие виды фитопатогенных грибов (головневые, ржавчинные, мучнисторосые, склеротиния и др.), которые часто не учитывают при исследованиях из-за отсутствия универсальных методов выявления и недостаточного селективного анализа. Грибы-антагонисты выделяют из почвы общепринятыми методами, наиболее приемлемые из которых изложены ниже.

Посев почвенной суспензии на элективные среды. Для выделения грибов из природных субстратов пользуются агаризованной минеральной средой Чапека или агаризованным пивным сусликом с pH 5,8—6,2 (7° по Баллингу). Время инкубации чашек 24—48 ч при температуре 26—28° С. Выросшие колонии грибов пересевают в пробирки с соответствующей средой и они служат исходным материалом для дальнейших исследований.

Метод скученной популяции на агаровой пластинке. Почвенную суспензию в разведениях 1:100, 1:1000 высевают на питательную среду, где образуются скученные колонии микроорганизмов. При этом создаются условия для проявления антагонистических свойств почвенной микрофлоры. Антагонистов обнаруживают по стерильным зонам вокруг колоний грибов.

Прямая инокуляция комочками почвы. Этот метод часто применяют в модификации: комочки почвы высевают на питательный агар, предварительно засеянный тест-культурой. Через 24—48 ч инкубации при температуре 26—28° С комочки почвы обрастают колониями грибов, вокруг которых образуются зоны задержки роста тест-организма.

Обогащение почвы. Почву, из которой предполагают выделить антагонист, обогащают микроорганизмами тех видов, по отношению к которым хотят получить антагонист. Через определенные сроки (бактерии — через сутки, грибы — через 3—5 сут) почву высевают в виде отдельных комочков на агаровые пластинки в чашках Петри, предварительно засеянные тем же микроорганизмом, который был использован для обогащения почвы.

В настоящее время методы изоляции почвенных грибов разделяют на **прямые (перенос отдельных спор или мицелия на питательную среду) и непрямые методы.** При использовании прямых методов грибы можно выделять с поверхности или из почвенных частиц, а также с любых субстратов (коры, семян, других растительных или животных материалов, находящихся в почве) непосредственно или после предварительной инкубации в условиях влажности в течение нескольких недель. Мицелий и споры грибов могут быть перенесены стерильными иглками под контролем микроскопа на питательную среду. Например, для аскомицетов и митоспоровых грибов - на среду Чапека, картофельно-глюкозный агар и др. Этот метод прямой изоляции решает основную проблему непрямого метода, так как изолированные грибы присутствуют в субстрате скорее как активно растущий мицелий, чем как покоящиеся формы. Основные непрямые методы, используемые для описания сообществ почвенных грибов, это: метод разведений или поверхностного посева, когда в обоих случаях используется почвенная суспензия, метод отмывки почвенных частиц и метод Уоркапа, когда выделение ведется из почвенных комочков. В методе разведений при помощи стерильной воды готовят серии разведений почвенной суспензии. Последующее поверхностное нанесение, при котором почвенная суспензия распределяется по поверхности питательной среды, методически - проще. Этот метод традиционно используется у нас в стране. Его основное неудобство в том, что быстро растущие грибы покрывают всю чашку. В модификации метода разведений, чаще используемого за рубежом, определенный объем конкретного разведения почвенной суспензии смешивают с определенным объемом питательной среды, которая имеет температуру около 40° С. Смесь наливают в чашки Петри и инкубируют. Цель этой модификации метода - получить рост отдельных колоний из спор или мицелия, которые могут быть выделены в чистые культуры. Метод разведений обычно используют для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) в образце.

В зарубежных исследованиях для определения разнообразия грибных комплексов путем выделения на твердые питательные среды часто используют метод отмывки почвенных частиц (soil washing techniques) [Widden, Parkinson, 1975; Wicklow, Whittingham, 1978; Baath, 1988 и др.]. Целесообразность применения этого метода обосновывают тем, что при выделении методом разведений выделение грибов происходит преимущественно из спор, а также преувеличивается присутствие ряда анаморф аскомицетов и представителей Mncorales за счет их высокой способности к споруляции [Frankland, 1998]. При использовании же метода отмывки, споры частично удаляются и могут быть с большей вероятностью выделены грибы, присутствующие в почвах в виде

мицелия, а также редкие, медленно растущие виды. Однако этот метод более трудоемок, требует специального технического оснащения для получения частиц определенной фракции, а также и существенно большего количества питательных сред [Bills, 1995]. Его рекомендуют для описания микобиоты подстилок [Bills, Polishook, 1992]. На самом же деле данные, полученные при отмывке почвенных частиц, достаточно часто сопоставимы с данными, получаемыми методом разведений [Amebrandt et al., 1987; Nordgren et al., 1985]. В первом случае чаще выделяются редкие виды и разнообразный стерильный мицелий (иногда до 30-40 % от общего числа видов) [Bills, 1995].

При использовании техники Уоркапа очень небольшое количество почвы (5-15 мг), без предварительного суспензирования в воде, распределяют в расплавленной питательной среде в чашках Петри. У нас в стране чаще выделение проводят при нанесении небольших почвенных комочков на поверхность застывшей питательной среды. Простота этой техники делает ее подходящей для сравнения большого числа образцов.

Для изоляции грибов из почв обычно следует добавлять антибиотики, такие как хлорамфеникол, пенициллин или стрептомицин, или подкислять среду, для того чтобы сделать ее селективной для грибов и подавить бактериальный рост. В каждом из вышеперечисленных методов рост колоний на питательных средах в чашках показывает присутствие грибов в какой-либо форме в почве. Однако не все микроорганизмы, присутствующие в образце, могут продуцировать колонии на чашке. Другая проблема описания грибных сообществ связана с тем, что в почве имеются представители разных эколого-трофических групп грибов. Поэтому применение различных селективных питательных сред может дать разное представление о составе почвенных грибных комплексов. Селективные среды используют для выделения специализированных по определенному субстрату групп грибов. В большинстве же микологических исследований для характеристики почвенных грибов используют ряд «неселективных» сред: сусло-агар, картофельно-декстрозный агар, среду Чапека [Bills, 1995]. Имеются и другие предложения. Например, Д. Паркинсоном [Parkinson, 1981] как наиболее универсальная среда для выделения почвенных грибов был рекомендован голодный (водный) агар. Большинство же авторов продолжают использовать вышеуказанные неселективные среды, так как они дают и возможность выделения разнообразных комплексов грибов, и одновременно на них удобно проводить первичное разделение на таксономические группы. В работах Т.Г. Мирчинк [Мирчинк др., 1982] показано, что в наибольшей степени этим условиям соответствует среда Чапека, на которой выделяются виды, аналогичные изолируемым на других стандартных питательных средах (сусло-, голодном агаре, среде Гетчинсона), но их первичная идентификация на среде Чапека намного проще. Видовое разнообразие отдельных трофических групп почвенных грибов может быть также выявлено при внесении различных субстратных приманок, например, целлюлозы, крахмала, хитина и др. [Методы экспериментальной микологии, 1973; Марфенина, 1987; Гузев, 1988; Методы..., 1991]. Однако при таком выделении выявляются более узкие по составу видов группы грибов.

Другие подходы используют, когда исследуют микроорганизмы, которые могут существовать в специфических условиях среды, например, при высоком уровне загрязнения. Для выявления таких грибов применяют питательные среды с добавками загрязнителей, например, тяжелых металлов, ксенобиотических веществ и т.п. Однако эти

приемы далеко не всегда показывают выявление специфических групп, по сравнению с выделяемыми на стандартных питательных средах.

Селективные методы также могут быть основаны на свойствах организма, иных чем питание. Например, хитридиевые грибы могут быть изолированы при помощи кусочков стерильного целлофана, так как они единственные среди грибов имеют подвижные споры, являясь при этом целлюлолитами.

Метод изоляции может дать представление, но не в состоянии описать полный состав грибов в почвах. Метод является только шагом в понимании роли грибов в природных экосистемах. Списки выявленных видов не говорят нам о количестве мицелия, его метаболической активности, реальном обилии различных видов, их форме и распределении внутри местообитаний. Другие методы направлены на то, чтобы представить, что грибы делают в почве *in situ*.

При прямом наблюдении *in situ* можно увидеть формы и объединения грибов в их местообитаниях, но крайне редко возможно идентифицировать их. При таких исследованиях могут быть использованы световой и электронный микроскопы. Для микроскопии отрезают кусочки заселенных грибами субстратов, а затем окрашивают. Такие подходы были использованы для исследования распространения грибов и бактерий на корнях растений. Микроскопическое наблюдение на поверхности может показать и взаимодействия между структурами, например, такие как взаиморасположение гиф на поверхностях.

Другим способом изучения является **изоляция грибов контактным методом из почв или с листьев на поверхность стекла**. Мицелий некоторых грибов дорастает до поверхности стекол, помещенных в почву. Стекла обычно оставляют на одном месте в течение нескольких недель, а затем вынимают и окрашивают (метод Росси-Холодного). Этот метод может показать присутствие в почвах мицелия базидиомицетов, идентифицируемого по наличию на мицелии пряжек, чьи культуры обычно теряются при выделении на агаровые среды.

Присутствие и распространение грибов на поверхности растений, могут анализироваться «методом отпечатков». Лист прижимается к поверхности агаровой среды, затем лист удаляют, а зараженную среду инкубируют в термостате. Прямое наблюдение методами, описанными выше, дало достаточно много информации о месте грибов в природных местообитаниях. Таким образом, были выделены 6 общих типов жизненных форм микробов: одноклеточные и подвижные (некоторые бактерии, зооспоры, простейшие), одноклеточные ограниченные и неподвижные (некоторые бактерии, все дрожжи), ограниченные мицелиальные колонии, лимитированные соседством колонизируемых частиц (*Penicillium*, *Streptomyces*), диффузный мицелий, не ассоциированный с конкретными субстратами (*Streptomyces*), мицелиальные тяжи и плазмодии, сгущенные на поверхности субстрата (*Myxomycetes*) [Carlile et al., 2001]. Данные о наличии этих типов могут быть полезны и при исследовании антропогенно нарушенных почв.

Выделение почвенных грибов в чистые культуры. Почвенные грибы — обширная и сложная экологическая группа организмов. Среди них имеются представители, поражающие насекомых, нематод, корни растений; многие виды развиваются на экскрементах животных, растительных остатках; известны грибы-микоризообразователи. Таким образом, большинству грибов, обитающих в почвах, свойственна приуроченность к определенному субстрату. Эту особенность широко

используют микологи при выделении некоторых видов и групп грибов в чистые культуры на питательные среды. Предложено большое количество питательных сред, содержащих различные источники углерода и азота.

Выделение грибов из почв. Для выделения грибов из почв обычно используют твердые (агаризованные) питательные среды с легкодоступными источниками углерода — сахарозой, глюкозой, декстрозой. К таким средам относятся агаризованная среда Чапека, картофельнодекстрозный агар, агаризованное пивное сусло. С помощью этих питательных сред обнаруживают и учитывают в основном быстрорастущие и обильноспороносящие таксоны.

Выделение грибов на селективные среды. При экологическом анализе микофлоры почв, т. е. учете грибов, приуроченных к определенным субстратам, применяют разные селективные питательные среды. Так, целлюлозоразрушающие грибы изолируют на питательные среды, содержащие целлюлозу (фильтровальную бумагу) или же синтетические среды с целлюлозой либо карбоксиметил-целлюлозой. Для выделения грибов на фильтровальную бумагу последнюю нарезают полосками, складывают продольными складками («гармошкой») и помещают в пробирки. Потом в каждую пробирку добавляют 2—3 мл жидкой среды Чапека или Гетчинсона без источника углерода и стерилизуют 30 мин при температуре 115° С. Грибы, способные разлагать лигнин, изолируют на питательные среды с лигнином. Для обнаружения в почве грибов, принимающих участие в разложении гумуса, к питательным средам прибавляют в качестве источника углерода и азота гуматнатрия. Эти же грибы можно выделять и на почвенный агар — вытяжку почвы с агаром. Для этого необходимое количество воздушно-сухой измельченной почвы (например, 500 г) заливают водой (1 л), настаивают сутки периодически взбалтывая, затем кипятят 30 мин и фильтруют через 1—2 слоя фильтровальной бумаги, после чего восстанавливают прежний объем жидкости, устанавливают нужный уровень pH однозамещенным фосфорнокислым калием, добавляют агар-агар (15—20 г), разливают в посуду и стерилизуют. Грибы, которые могут расти в условиях дефицита органических веществ, выделяют на голодный агар, который готовят из расчета 15—20 г агар-агара на 1 л воды. Предложены также питательные среды, предусматривающие выявление в почве определенных групп грибов. Так, например, виды *Fusarium* Link, ex Fr. выделяют на агаризованную среду, содержащую пентахлорнитробензол (0,5 г на 1 л среды). В почвах грибы находятся в ассоциациях с другими организмами. Поэтому для подавления роста некоторой сопутствующей флоры, например бактерий, питательные среды следует подкислять либо добавлять к ним антибиотики. Для этих целей используют соляную, серную, лимонную, фосфорную кислоты. Кислоты к средам добавляют до тех пор, пока pH пробной порции не достигнет значений 4,2—4,5. Более высокая кислотность может оказывать угнетающее действие на рост многих грибов. Среда обычно подкисляют перед добавлением агар-агара. Некоторые кислоты, например лимонную, добавляют после стерилизации, причем на каждые 5 мл среды прибавляют 1 каплю 50%-ного раствора кислоты. Кислоты можно заменить бенгальской розовой (кислотный ксантеновый краситель) в концентрации 1 : 15 000 [692] или антибиотиками. Применяют следующую дозировку антибиотиков: 1 000 000 ед. пенициллина растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды и к каждому литру питательной среды добавляют 2 мл полученного раствора; 1 000 000 ед. стрептомицина растворяют в 90 мл стерильной дистиллированной воды, после чего 4 мл раствора

прибавляют к 1 л питательной среды. Антибиотики добавляют к питательным средам после автоклавирования.

Метод почвенных разведений. Грибы изолируют из почв на питательные среды разными методами. Один из наиболее простых — метод почвенных разведений Ваксмана, заключающийся в посеве почвенной суспензии на питательные среды. Этим методом пользуется большинство микологов. Анализ микрофлоры почв методом почвенных разведений осуществляют следующим образом. Образцы почв, отобранные в зоне корневой системы растений (ризосфера) или на участках, лишенных растительности, просеивают через сито с отверстиями диаметром не более 4 мм между двумя листами стерильной бумаги. Затем между этими же листами бумаги смешивают образцы 2—3 проб и быстро готовят среднюю пробу. Обеспечивая максимум стерильности, смешанную почву взвешивают на технических весах, обычно по 10 г, в 3—4 повторностях, насыпая ее на стерильные кружки бумаги шпателем. Для каждого образца берут новый кружок бумаги, а шпатель обмывают водой, вытирают насухо, погружают в банку со спиртом и обжигают, проводя через пламя горелки. Навески почвы переносят в предварительно подписанные стерильные колбы содержащие по 90 мл стерильной воды, и в течение 5 мин встряхивают. Далее 1 мл суспензии переносят из колбы в стерильную пробирку с 9 мл стерильной воды и слегка взбалтывают. Таким же образом 1 мл суспензии из этой пробирки переносят в следующую пробирку и т. д. Из пробирки третьего или четвертого разведения 1 мл суспензии высевают в стерильные чашки Петри. Посев из каждой пробирки производят в 3 или 4 чашки. Затем в чашки Петри стерильно (над пламенем горелки) наливают по 10 мл расплавленной, охлажденной до 40° С агаризованной питательной среды, после чего ее перемешивают осторожным покачиванием, прежде чем остынет агар, и ставят в термостат для инкубации при температуре 23—25° С на 10—15 суток. Для более полного выявления видового состава почвенных грибов следует применять несколько различных агаризованных питательных сред, в том числе и сред, предусматривающих изолирование определенных экологических групп грибов. Засеянные водно-почвенной суспензией чашки Петри периодически просматривают, обычно начиная с третьих суток, и отдельные колонии грибов в случае их интенсивного разрастания отбирают в пробирки на агаризованную питательную среду. Окончательный учет проводят через 10—15 суток. При этом подсчитывают общее число выросших колоний, условно допуская, что каждая колония образовалась из одной споры или клетки гифы. Учет изолированных грибных зародышей (спор, фрагментов гиф) изложен ниже. Метод почвенных разведений Ваксмана удобен для характеристики грибной флоры почв разных типов, почв различных растительных ассоциаций, изучения влияния удобрений или других агротехнических мероприятий на видовой состав грибов.

Метод прямого посева почвы. Для выделения грибов методом прямого посева небольшие образцы почвы (0,005—0,015 г) берут из средней пробы стерильным ланцетом и смешивают с каплей стерильной воды на дне чашки Петри. В эту же чашку добавляют 8—10 мл охлажденной агаризованной питательной среды и частицы почвы равномерно распределяют по всей поверхности легким покачиванием чашки.

Метод прямых отпечатков почвенной пробы. Край пенополиуретанового цилиндра длиной 40 мм и диаметром 15 мм увлажняют агаризованной питательной средой, путем соприкосновения с ее поверхностью. Затем увлажненный край цилиндра прижимают к подсушенному почвенному образцу и этим же краем делают 10 последовательных отпечатков на поверхности питательной среды в чашках Петри,

которые ставят в термостат для инкубации. Метод прямых отпечатков почвенной пробы прост и легко выполним.

Электростатический метод выделения грибов. Метод основан на способности диэлектриков притягивать положительно заряженные мелкие частицы. Для этого из фторопласта изготавливают круглые пластинки диаметром 4 см, обрабатывают их антисептиком — метиловым спиртом, избыток которого удаляют стерильной фильтровальной бумагой. Подсушенные пластинки электризуют трением о стерильную фильтровальную бумагу. Наэлектризованные пластинки подносят к рассыпанному ровным слоем почвенному образцу не ближе 2—3 см, чтобы избежать притяжения крупных частиц. Притянутые к пластинкам мельчайшие частицы отпечатывают на агаризованных средах в чашках Петри. Электростатический метод дает возможность изолировать значительно большее число видов грибов, чем метод почвенных разведений.

Метод выделения грибов на растительные остатки. Метод выращивания грибов в условиях, приближенных к естественным. Измельченную стерню злаковых, головки цветков клевера и т. п. помещают в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу и стерилизуют. Затем на них высевает исследуемую почву и по мере появления колоний грибов отбирают последние на питательные среды. Метод предусматривает обнаружение в почвах многих медленно растущих грибов, в том числе и сумчатых.

Метод фумигации почвы. Этим методом рекомендуют изолировать сумчатые грибы. Он основан на применении веществ, обладающих значительной токсичностью и летучестью — формалин, метилбромид, хлорпикрин и др. Пары указанных ядохимикатов легко диффундируют в исследуемые образцы и вместе с тем быстро могут быть удалены из них проветриванием. Просеянную через сито почву помещают в стеклянную трубку, на поверхности которой имеется несколько отверстий. В трубку вводят нужную дозу ядохимиката и все отверстия закрывают резиновыми пробками, которые после нескольких часов экспозиции заменяют ватными. Обработанную таким способом почву высевает на агаризованную питательную среду. Дозировка ядохимиката и экспозиция зависят главным образом от типа почвы и вида гриба. Например, виды *Sordaria* Ces. et de Not. и *Thielavia* Zopf из песчаной почвы лучше всего выделяются при обработке ее метилбромидом в концентрации 0,6 мл на 1000 мг почвы с экспозицией 4 ч, а виды *Chaetomium* Kunze ex Fr. — при концентрации 0,6—0,8 мл.

Метод тепловой обработки почвы. Сумчатые грибы можно выделять также методом тепловой обработки почвы. Образцы почв прогревают паром при 60—65° С в течение 30 мин, помещают на агаризованную питательную среду непосредственно или выделяют грибы методом почвенных разведений Ваксмана. Методы выделения темноцветных гифомицетов посредством облучения УФ-лучами почвенной суспензии и грибов с крупными спорами посредством центрифугирования почвы трудоемки, требуют специального оборудования, ввиду чего ими редко пользуются.

Метод приманки. Приманки применяют для обнаружения в почве видов, которые не изолируются на питательные среды из-за угнетения их быстрорастущей флорой и выделения некоторых экологических групп грибов. В качестве приманки используют семена конопли, крылья насекомых, экскременты крыс, мышей, кроликов, рога и копыта животных, перья птиц и т. п. Суть этого метода заключается в следующем. Почву слегка увлажняют и рассыпают по дну стерильной чашки Петри. Затем сверху раскладывают простерилизованный субстрат — приманку. После чего чашки Петри помещают во влажную камеру, периодически просматривают и появившуюся грибницу отбирают в

пробирки на питательную среду. Для выделения из почв копрофильных грибов обычно используют экскременты животных, кератиноразрушающие грибы изолируют на обезжиренный стерильный волос, виды рода *Fusarium* — на стерильные ломтики картофеля. Обитающие в почве хитридиевые, сапролегниевые и другие грибы, образующие зооспоры, чаще всего выделяют на семена конопли, кусочки вареных яиц, мертвых насекомых и т. д. Осуществляют это следующим образом. В стерильные чашки Петри кладут по 10 г исследуемой почвы, заливают стерильной водой, добавляют приманку (желательно несколько разных видов) и ставят в термостат для инкубации. Другая группа методов предусматривает применение стеклотехники разной степени сложности для обнаружения и выделения грибов, находящихся в почве в активном состоянии. К ним относятся метод обрастания стекол Холодного, метод предметных стекол-ловушек Ля-Туш, методы решетчатых экранизирующих погруженных пластинок, капиллярных педоскопов, погруженных (иммерсионных) трубок Честерса. Кроме того, имеется ряд модификаций указанных выше методов, которые содержат лишь частичные видоизменения и сводятся в основном к покрытию разного рода стеклянных устройств питательной средой. Суть этих методов сводится к тому, чтобы в отверстия в стеклянных устройствах разной степени сложности смог проникнуть растущий мицелий гриба. Ввиду того что всеми перечисленными выше методами можно выполнить сравнительно небольшой объем работы и они не позволяют изолировать и идентифицировать отдельные виды грибов, мы на них не останавливаемся.

Контрольные вопросы. 1. Какие функции выполняют почвенные микромицеты? 2. Как проводят выделение грибов на селективных средах? 3. В чем суть метода выделения грибов с помощью почвенных разведений? 4. Охарактеризуйте метод выделения грибов с помощью прямых отпечатков почвенной пробы. 5. В чем суть электростатического метода выделения грибов? 6. Охарактеризуйте метод выделения грибов с помощью фумигации почвы.

Лабораторная работа 8 (2 ч).

Тема: «Экология грибов»

Цель работы: изучить экологические группы грибов

Задачи работы:

1. Ознакомиться с основными экологическими группами грибов
2. Изучить пределы чувствительности грибов к биотическим и абиотическим факторам

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска.

Описание (ход)работы

Гетеротрофный способ питания, характерный для грибов, обуславливает то, что их развитие в большей степени зависит от субстрата, на котором они развиваются. В связи с

высокими адаптивными возможностями грибы занимают самые разнообразные экологические ниши и играют значительную роль в биоценозах. При выделении экологических групп грибов учитывают как место их обитания, так и характер субстрата, который они используют для своей жизнедеятельности.

Почвенные грибы. В почве обитают представители практически всех отделов грибов. Одни из них находятся в ней постоянно - истинно почвенные грибы, другие попадают случайно с опадом листьев и растительными остатками, дождевыми и талыми водами, частицами пыли из воздуха и так далее. Случайно попавшие в почву грибы находятся в неактивном состоянии - в виде различного типа спороношений (конидий, телиоспор, склероциев) или в виде неактивного мицелия. Циклы развития этих грибов часто не связаны с почвой. Она служит только для их выживания и перезимовки (Гарибова, 2005).

В почве осуществляется основная функция грибов, как главных редуцентов в экосистемах суши. Представители почвенных сапротрофных микромицетов осуществляют важную экологическую функцию по разложению органических веществ, начиная от самых простых углеводов и кончая такими сложными биополимерами, как целлюлоза, хитин, лигнин и так далее. Сапротрофные микромицеты чрезвычайно разнообразны как в таксономическом отношении, так и по связи с разными субстратами и по приспособленности к факторам физической среды. Их образ жизни определяется характером обмена веществ, наличием разного рода приспособительных реакций, связанных с внешними условиями, устойчивостью к стрессовым воздействиям. Основным экологический фактор, определяющий разнообразие грибов, это тип субстрата как среда обитания.

В почвах одного типа, но под разными растительными ассоциациями, комплексы доминантных видов микромицетов могут быть резко различными. Например, в дерново-подзолистой почве под ельником доминирующими видами были *Aspergillus pullulans*, *Chrysosporium sulfureum*, *Mortierellaramanniana* и *Verticillium terrestris*, а в почве под березняком - *A. pulviscula*, *C. herbarum*, *Penicillium daleae* и *Trichoderma koningii* (Звягинцев, 2005).

Распределение грибов по профилю соответствует содержанию гумуса по горизонтам почвы. Для большинства почв характерно максимальное количество грибных зародышей в верхних гумусированных горизонтах и резкое снижение их числа и числа видов с глубиной. Большее число грибов в верхних горизонтах почв в первую очередь связано с большим содержанием органического вещества в этих горизонтах. С глубиной количество органического вещества убывает, одновременно снижается число грибных зародышей.

Установлено, что грибы могут развиваться в очень широких пределах значений pH, то есть как в сильнокислых, так и в щелочных почвах. Однако в связи с тем, что в кислых почвах грибы подвержены меньшей конкуренции со стороны бактерий, они развиваются там в большем числе, но большее разнообразие видов наблюдается в щелочных почвах. В видовом составе грибов кислых и щелочных почв существуют заметные различия, хотя ряд видов может быть общим. Только в кислых песчаных подзолах Англии выделены *Penicillium janthinellum*, *P. frequentans*, *Mortierella ramanniana*, только в щелочных карбонатных почвах выделены *Fusarium sambucinum*, *P. luteum*, *Thielavia* sp. (Мирчинк, 1988).

Из других факторов на грибное население почв значительно влияют температурные колебания в верхних слоях почвы. Большинство грибов - мезофилы, облигатные психрофилы описаны только среди дрожжевых грибов. Отношение к температуре определяет в значительной степени местообитание многих видов микромицетов или долю их популяций в сообществах в разные периоды года (Звягинцев, 2005).

К мезофилам относится гриб *Penicillium frequenetes*, обитающий в умеренной зоне, *Cladosporium cladosporioides*, обитающий как в умеренной зоне, так и далеко за ее пределами. Однако популяции этого вида, обитающие в разных зонах, имеют разные температурные границы роста и прорастания спор. Мезофилами также можно считать многие виды *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor* и многие другие.

К термофилам относятся многие организмы, выделяющиеся из саморазогревающихся торфов, такие, как *Chaetomium thermophila*, *Sporotrichum thermophila*, *Talaromyces emersonii*, *Thermoascus aurantiacus*, виды *Humicola*.

К термофилам и термотолерантным формам принадлежат многие виды *Aspergillus*. Так, популяция *A. terreus*, выделенная из пустынных почв Туркмении, имеет границы роста от 20 до 47 –С при оптимуме 37 –С (Мирчинк, 1988).

Водные грибы. Большая по объему группа грибов, связанная в своих местообитаниях с водой. Среди них виды - сапротрофы, живущие на растительных остатках, попавших в водную среду, паразиты водных животных, водорослей, высших водных растений. Причем водные грибы известны как в пресных, так и морских водоемах. К водным грибам относятся, например, сапролегниевые грибы, а также из многих таксономических групп.

Среди грибов, обитающих в водных экосистемах, выделяют две большие категории: постоянные обитатели водной среды и иммигранты, появляющиеся в водоемах периодически, с приуроченностью к определенным сезонам или без таковой.

Грибы первой группы (зооспоровые, водные гифомицеты) весь жизненный цикл проводят в воде и играют существенную роль в трофических сетях водоемов. Грибы второй группы - терригенные - неоднородны по своей приспособленности к существованию в водной среде, среди них есть неактивные формы, со временем исчезающие, и активные (Терехова, 2007).

В результате многолетних микологических исследований водных экосистем И.А. Дудка (1985) предложила разделять водные грибы на виды-резиденты, составляющие активное ядро гидромикобиоты, определяющее участие в функционировании гетеротрофного блока биогидроценоза, и транзитные виды.

На формирование состава микобиоты в водных экосистемах оказывают влияние степень трофности среды обитания, весь комплекс продукционно-биологических процессов, особенности гидродинамики и гидрохимии, наличие соответствующих организмов-хозяев для паразитирующих и субстратов для сапротрофных видов.

Наличие у многих микромицетов, постоянно выделяющихся из водоемов, способности образовывать широкий спектр внеклеточных ферментов, свидетельствует о возможности активно участвовать в деструкции органического материала в водной среде. Так, среди выделенных с погруженной в воду древесины и листьев грибов 18 видов были активными продуцентами амилазы, ксиланазы, целлюлазы, протеазы, пероксидазы и липазы; 5 видов разлагали хитин, 8 - выделяли тирозиназу и лакказы (Parton, 1988). Отмечают высокую целлюлозолитическую активность у штаммов видов *Trichoderma*,

Aspergillus niger и *Penicillium miszynsky*, выделенных из водных местообитаний (Horper, 1995).

Микроскопические грибы могут прямо или косвенно влиять на активность и развитие других гидробионтов. Пути воздействия могут быть различными - от прямого паразитирования до опосредованного влияния через изменения среды обитания, путем выделения биологически активных метаболитов. Среди грибных экзометаболитов известно большое количество токсичных компонентов.

Г. Нейш и Г. Хьюз (1984) отмечали на рыбе *Fusarium culmorum*, *Phoma herbarum*. Л. Воронин (1987) сообщает о высокой частоте встречаемости на теле микромицетов из родов *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma*.

Таким образом, многие виды терригенных микромицетов длительно и активно развиваются в воде, образуют спороношения, включаются в пищевые цепи водных экосистем, участвуя в деструкции органического материала в воде и донных отложениях.

При изучении процессов микробиологической деструкции веществ в водоемах наряду с бактериями должен учитываться вклад водных грибов: запасы грибной биомассы значимы, а высокая частота встречаемости, ферментативная и антибиотическая активность микроскопических грибов дают основания судить о грибах как важном элементе водных экосистем, способном изменять окружающую среду (Терехова, 2007).

Процесс формирования новых эколого-трофических групп грибов продолжается и в настоящее время. Возникающие в процессе деятельности человека новые материалы (стекло, пластмассы, бумага, различные, сложные по составу промышленные материалы, нефтепродукты и так далее), приводят к тому, что грибы адаптируются к этим специфическим субстратам, осваивают их и, таким образом, формируют новые эколого-трофические группы

Контрольные вопросы: 1. Назовите и охарактеризуйте основные экологические группы грибов. 2. Назовите пределы чувствительности грибов к биотическим факторам. 3. Назовите пределы чувствительности грибов к абиотическим факторам.

Лабораторная работа 9 (2 ч).

Тема: «Прикладная микология»

Цель работы: изучить основные направления использования грибов человеком.

Задачи работы:

1. Изучить пищевое применение грибов. Съедобные грибы и ядовитые.
2. Изучить применение грибов в медицине.
3. Изучить применение грибов в качестве пестицидов.
4. Изучить техническое применение грибов.
5. Изучить роль грибов в разрушение деревянных конструкций.

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска.

Пищевое применение. Съедобные грибы. Например, сыроежки, белые, грузди и др., после обработки используются в пищу. Для пищевых целей грибы выращивают как сельскохозяйственные культуры или собирают в естественных местах произрастания. Собираание грибов, или «грибная охота» является популярным во многих странах видом промысла, активного отдыха или хобби.

В пищевой промышленности находят применение различные микроскопические грибы: многочисленные дрожжевые культуры имеют важное значение для приготовления алкоголя и различных спиртных напитков: вина, водки, пива, кумыса, кефира, а также в хлебопечении. Плесневые культуры с давних пор применяются для изготовления сыров (рокфор, камамбер), а также некоторых вин (херес).

Ввиду того, что в грибах велико содержание хитина, их питательная ценность невелика, и они трудно усваиваются организмом. Однако пищевая ценность грибов заключается не столько в их питательности, сколько в высоких ароматических и вкусовых качествах, поэтому их применяют для приправ, заправок, могут быть сушёные, соленые, маринованные грибы, а также грибы в виде порошков.

Ядовитые грибы.

Бледная поганка (*Amanita phalloides*). Например, многие мухоморы, обычно не применяются в пищевых целях, однако некоторые люди используют отдельные их виды после специальной обработки (преимущественно многократное вываривание). Однако такая обработка не всегда приводит к желаемому результату, всё зависит от размера дозы и характера поглощённых токсинов, а также от массы человека и его индивидуальной восприимчивости, возраста (в целом для детей грибы гораздо опаснее, нежели для взрослых).

Применение в медицине. Некоторые виды грибов продуцируют важные вещества (в том числе антибиотики). Грибы и препараты из них широко применяются в медицине. Например, в восточной медицине используют цельные грибы — рейши (ганодерма), шиитаке, кордицепс и др. В народной медицине используются препараты из белого гриба, весёлки, некоторых трутовиков и др. видов. В списке официальных препаратов содержатся многочисленные препараты из грибов:

- из чаги, спорыньи;
- вещества, извлечённые из культуральной среды пеницилловых и других грибов (используют при производстве антибиотиков).

Применение в галлюциногенных целях. Некоторые виды грибов содержат психоактивные вещества и обладают психоделическим эффектом, поэтому у древних народов они применялись в различных обрядах и инициациях, в частности, мухоморы употребляли шаманы некоторых народов Сибири. Американские индейцы издавна использовали эффекты псилоцибин-содержащих грибов наряду с психоактивными препаратами мескалина из кактусов.

Применение в качестве пестицидов. Препараты на основе микромицетов. Многие грибы способны к взаимодействию с другими организмами посредством своих метаболитов, или прямо инфицируя их. Применение сельскохозяйственных пестицидных препаратов из некоторых таких грибов рассматривается как возможность управлять численностью вредителей сельского хозяйства, таких, как насекомые-вредители, нематоды, или другие грибы, повреждающие растения.

В качестве биопестицидов используют, например, энтомопатогенные грибы (например, препарат Боверин из *Beauveria bassiana*, другие препараты из *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella*, *Paecilomyces fumosoroseus* и *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium lecanii*). Мухомор издавна использовался как инсектицид.

Техническое применение. Широкое распространение нашло производство лимонной кислоты на основе **а основе биотехнологии — микробиологического синтеза биотехнологии — микробиологического синтеза.**

Разрушение деревянных конструкций.

Грибы-древоразрушители вызывают быструю деструкцию древесных материалов, строений и изделий, поэтому рассматриваются в лесной фитопатологии как патогенные.

Контрольные вопросы: 1. Назовите съедобные и ядовитые грибы. 2. Какие вещества продуцируемые грибами используют в медицине? 3. Назовите продуцентов. Какие вещества продуцируемые грибами используют в пищевой промышленности? 4. Какие грибные биопестициды были разработаны для сельского хозяйства.