

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.14 Микология

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	4
1.1. Лекция № 1. Введение в микологию.	4
1.2. Лекция № 2. Строение вегетативного тела грибов. Споры грибов.	7
1.3. Лекция № 3-4. Размножение грибов	11
1.4. Лекция № 5. Физиология грибов.	14
1.5. Лекция № 6. Вторичный метаболизм грибов.	18
1.6. Лекция № 7-8. Генетика грибов.	21
1.7. Лекция № 9-10. Принципы микологической систематики и номенклатуры	26
1.8. Лекция № 11-12. Экология грибов.	32
1.9. Лекция № 13. Медицинская микология.	36
1.10. Лекция № 14. Ветеринарная микология.	45
1.11. Лекция № 15. Прикладная микология.	50
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	54
2.1. Лабораторная работа № ЛР-1. Устройство микологической лаборатории. Забор, хранение и транспортировка материала для микологического исследования.	54
2.2. Лабораторная работа № ЛР-2. Питательные среды для культивирования грибов. Приготовление сред.	58
2.3. Лабораторная работа № ЛР-3. Техника посева и культивирование грибов. Приготовление микроскопических препаратов.	60
2.4. Лабораторная работа № ЛР-4. Изучение морфологии плесневых грибов. Идентификация плесневых грибов.	63
2.5. Лабораторная работа № ЛР-5-6. Биология дрожжей. Выделение элективной культуры дрожжей. Изучение морфологии дрожжей.	71
2.6. Лабораторная работа № ЛР-7. Определение роста и биосинтетической активности грибов.	78
2.7. Лабораторная работа № ЛР-8. Ферменты грибов. Определение протеолитической, гемолитической и фосфолипазной активности грибов.	86
2.8. Лабораторная работа № ЛР-9. Изучение антибиотических свойств грибов. Определение токсигенности плесневых грибов.	88
2.9. Лабораторная работа № ЛР-10-11. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы. Изучение влияния температуры на развитие плесневых грибов. Определение влияния концентрации глюкозы в среде на развитие плесневых грибов. Определение влияния pH среды на грибы. Изучение действия УФ-лучей на грибы.	90
2.10. Лабораторная работа № ЛР-12. Систематика низших грибов. Отделы Oomycota, Hyphochytridiomycota, Chytridiomycota и Zygomycota	92
2.11. Лабораторная работа № ЛР-13. Отделы Ascomycota и Basidiomycota, Deuteromycota	99
2.12. Лабораторная работа № ЛР-14. Лихенизированные грибы и миксомицеты	118
2.13. Лабораторная работа № ЛР-15-16. Выделение грибов из природных субстратов. Выделение грибов из почвы. Выделение водных грибов.	128
2.14. Лабораторная работа № ЛР-17-18. Грибы как возбудители болезней растений	146
2.15. Лабораторная работа № ЛР-19. Грибы как возбудители болезней человека и животных	153
2.16. Лабораторная работа № ЛР-20. Микробиологическая диагностика микозов.	161

2.17. Лабораторная работа № ЛР-21. Идентификация грибов рода <i>Candida</i>.	171
Тест на хламидоспоры. Тест ассимиляции и ферментации углеводов.	
2.18.Лабораторная работа № ЛР-22. Противогрибковые препараты.	174
Определение лекарственной чувствительности грибов.	
2.19. Лабораторная работа № ЛР-23. Практическое использование грибов	177

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

Лекция №1

Тема: «Введение в микологию» (2 часа).

Вопросы лекции:

1. Микология как наука. Микология в общей системе наук, взаимосвязь ее с фитопатологией, медициной, техникой, другими биологическими дисциплинами и т.д.
2. Краткая история развития микологии.
3. Грибы: место в системе живого мира, происхождение и эволюция

Краткое содержание

1. Микология как наука.

Микология - это наука, изучающая строение, свойства, распространение грибов, их роль и значение в жизни и хозяйственной деятельности человека.

Микология возникла как отрасль ботанической науки, и за сравнительно небольшой период времени она выросла в самостоятельную науку, имеющую свой предмет исследования.

Современная микология объединяет несколько взаимосвязанных отраслей, а именно: общую микологию, медицинскую, фитопатологическую, водную, почвенную, техническую и др.

Различные разделы и направления микологии находятся в диалектическом единстве и составляют фундамент общей микологии, которая непрерывно пополняется новыми научными данными, полученными в результате глубоких научных исследований. Грибы находят все более широкое практическое применение. Наряду с традиционными и наиболее древними процессами использования дрожжей в спиртовой, винодельческой, хлебопекарской промышленности созданы новые отрасли с использованием различных видов грибов. В сыроварении для приготовления особых сортов сыров используются виды пенициллиев.

Все более расширяется применение культивируемых съедобных грибов. Особенно значительны успехи в использовании отдельных видов грибов при получении антибиотиков, витаминов, различных органических кислот, стероидных препаратов и многих других физиологически активных соединений.

Эффективность практического использования грибов базируется на знании процессов их жизнедеятельности на различных уровнях и ее регуляции.

2. История развития микологии.

Знания о высших грибах, образующих крупные плодовые тела, уходят к давним истокам развития человечества, искавшего в них средство пропитания. Древней культуре принадлежат и знания о ядовитых грибах, а также о свойствах грибов вызывать галлюцинации. Микроскопические грибы издавна использовались для приготовления пива, вина, сыра, а в Восточной Азии - для приготовления пищи. До начала XIX века грибы причислялись к растениям, и потому история изучения грибов до этого времени была связана с историей ботаники. К 1650 году были зарисованы и описаны уже около 1600 высших грибов. Плесневые грибы были зарисованы Робертом Гуком (1635-1703) и Марчелло Мальпиги (1628-1694). Основателем научной микологии считают П. А. Микели (1679-1737). Он обнаружил споры у грибов, обитающих на листьях, наблюдал расположение спор по четыре, высевал эти споры, наблюдал их прорастание и развитие мицелия (1719). Он ввел названия грибов *Mucor*, *Aspergillus*, *Tuber*, *Polyporus*, которые используются до сих пор. Одним из первых широко известных систематиков грибов был Христиан Гендрик Персоон (рис.). Персоон описал, помимо шляпочных грибов, также и

микроскопические грибы, среди которых были паразиты растений. Другим известным систематиком XIX столетия был Элиас Магнус Фриз (1794-1878).

Грибные корни, или микориза, были открыты Альбертом Б.Франком (1839-1900) в 1885 году, а два года спустя Франк уже различал микоризу букоцветных, хвойных и других деревьев как эктотрофную, и эндотрофную микоризу у орхидей и вересковых.

Проявление у грибов полового процесса впервые было достаточно отчетливо показано К. Г. Эренбергом. На описанном им в 1818 году фикомицете *Syzygites megalocarpus* (*Sporodinia grandis*) он открыл конъюгацию двух воздушных гиф и образование зигоспор (1820). Это открытие стало общеизвестным после того, как де Бари и М. Воронин (1860-1864) подтвердили его последующими исследованиями. Антеридии и оогонии сапролегниевых были описаны в деталях де Бари уже в 1852 году. Также де Бари приписывается открытие половых органов у аскомицетов. В 1866 году он видел первые клеточные ядра грибов. Дальнейшее развитие генетики грибов последовало после признания общей клеточной теории.

Решающие процессы перехода клеточных ядер из антеридия в аскогон были открыты английским ботаником Робертом Гарпером (1862-1949) на грибе *Sphaerotheca* (1895). Образование пар ядер (дикарионов) и их деление после конъюгации описал Клауссен на грибе Ругопета (1907). Определение ядер в мицелии базидиомицетов оказалось возможным благодаря методу окраски ядер железным гематоксилином. Гетероталлизм (раздельнополость) мицелия муковок у *Mucor mucedo* и *Sporodinia grandis* открыл американский миколог Альберт Ф. Блексли (1904, 1906). Выявлению сложных жизненных циклов и их различию у базидиомицетов обязаны Гансу Книпу (1881-1930).

В собственно генетические исследования были взяты только дрожжи *Saccharomyces* и грибы *Aspergillus* и *Neurospora*. Исследования, которые в конечном итоге привели к бактериальной генетике, были проведены на красной плесени хлеба — *Neurospora crassa*. Б. О. Додж (1928) был первым, кто получил плодоносящие гибриды *Neurospora*, а Билл и Татум выбрали *Neurospora crassa* в качестве объекта мутационной генетики и генетики скрещивания (1941, 1945).

3. Грибы: место в системе живого мира, происхождение и эволюция

Грибы - большая группа эукариотных гетеротрофных организмов с абсорбционным (осмотрофным) способом питания, включающая, по данным разных авторов, от 100 000 до 250 000 видов.

Как сапротрофы, грибы важнейшие организмы, поддерживающие функционирование цикла углерода. Они одни из немногих организмов, способных разрушать лигнин.

Грибы – важнейшие патогены растений и животных. Более 70% всех болезней у растений вызывают грибы

С использованием грибов получают многие традиционные продукты

Грибы широко используются в современных биотехнологических производствах.

Грибы – важнейшие биodeграданты материалов и контаминанты продуктов, напитков и кормов

Со времён К. Линнея ("Система природы", 1735) грибы традиционно относили к царству растений, куда этот великий систематик поместил их не без значительных сомнений. Однако уже в XIX веке многие ботаники указывали на значительные отличия грибов от растений, и Э. Фриз в 1831 г. предложил выделить грибы в самостоятельное царство живого мира. Но у большинства биологов как в XIX, так и в первой половине XX века этот новый взгляд на грибы поддержки не нашёл.

Современные материалы по биохимии и физиологии, ультраструктуре клетки, составу и строению клеточной оболочки грибов позволяют с большой степенью вероятности считать, что грибы по своему строению, характеру обмена и способу питания

занимают промежуточное положение между животными и растениями и имеют признаки, как тех, так и других. Отсюда можно предположить, что грибы выделились в самостоятельный ствол живого мира ещё до разделения живых организмов на животных и растения и представляют отдельную эволюционную (филогенетическую) линию эукариот. На этом основании грибы сейчас рассматривают как самостоятельное царство живого мира *Mycota*, *Mycetalia*, или *Fungi*, занимающее промежуточное положение между царствами животных и растений.

Древность происхождения грибов подтверждается данными по сравнительному изучению цитохромов С в различных группах организмов. Согласно этим данным время дивергенции грибов и животных определяется примерно в 1,1 млрд. лет. При таком подходе наиболее вероятно происхождение грибов от разных групп первично бесцветных жгутиковых организмов - *Flagellatae*, обитавших в первичном океане. Таким образом, грибы в целом рассматриваются как полифилетическая группа.

Царство настоящих грибов *Fungi*, или *Mycota*, включает четыре отдела: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota* (табл. 3). В некоторых системах в это царство в ранге самостоятельного отдела *Mycophycophyta* добавляются лишайнизированные грибы (лишайники).

Таким образом, постоянно пересматриваются и устанавливаются новые критерии по систематике и филогении грибов

Царство *Stramenopila* (*Chromista*)

Отделы: *Oomycota*

Hyphochytridiomycota

Labyrinthulomycota

Царство *Protozoa* (*Protists*, *Protoctists*)

Отделы: *Plasmodiophoromycota*

Dictyosteliomycota

Acrasiomycota

Myxomycota

Царство *Fungi* (*Eumycota*)

Отделы:

Chytridiomycota

Образуют подвижные споры называемые зооспорами

Зигота. Мейоз происходит в покоемся спорангии, Септа отсутствует

Около 500 видов (Возбудители рака картофеля, оспы кукурузы, паразиты водорослей. Водных грибов, беспозвоночных. Растений)

Glomeromycota

Образуют споры содержащие сотни ядер; неизвестно полового размножения, септа отсутствует

Арбускулярные микоризные грибы – более 150 видов образуют эндомикоризу с около 300000 видами растений (травянистые)

Zygomycota

Образуют бесполое споры – спорангиоспоры в спорангии

Мейоз происходит в зигоспоре, септа отсутствует

Около 600 видов, мушкетеры, ризопусы и т.д., сапротрофы и патогены

– *Ascomycota*

> 30000 видов (включая *Deuteromycetes* - анаморфные грибы еще 30000 видов)

• Образуют бесполое споры - конидии

- Мейоз проходит в асках (сумках), Септа простая перфорированная
- Сморчки, трюфели; дрожжи, пенициллы, аспергиллы, триходермы, ботритис – сапротрофы и патогены, микоризообразователи

– Basidiomycota

- Мейоз происходит в базидиуме, конидии, Перфорированная специализированная долиповая септа,
- Около 25000 видов, съедобные, ядовитые грибы, сапротрофы, микоризообразователи (эктомикориза у древесных), патогены – ржавчинные, головневые

Иерархическая классификация

- ✓ Царство Fungi
- ✓ Отдел Basidiomycota
- ✓ Класс Basidiomycetes
- ✓ Порядок Agaricales
- ✓ Семейство Agaricaceae
- ✓ Род *Agaricus*
- ✓ Вид: *Agaricus campestris* L.

Agaricus bisporus (Lange) Imbach

- Lange первым описал этот гриб как *Coprinus bisporus*
- Imbach позднее перевел этот вид в род *Agaricus*

Лекция №2. Строение вегетативного тела грибов (2 ч.)

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

врастает 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 немиелиальные 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, — ризомиелий пронизывающий субстрат. Ризомиелий можно рассматривать как зачаточный мицелий, эволюционную ступень к настоящему неклеточному мицелию (рис. 5-3). При образовании ризомиелия может развиваться только одна клетка, содержащая ядро, которая в дальнейшем становится центром образования ризомиелия и развития репродуктивных органов. Это моноцентрический ризомиелий. Если у особи имеется несколько центров образования ризомиелия и, соответственно, несколько центров формирования репродуктивных органов — это полицентрический ризомиелий.

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 Rhizochytridiomycota, 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 ретикуломом. 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 ретикула. 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 ретикуломом. 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 вздутости, содержащие капли жира, функция запаса 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.

4. 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 удлинёнными клетками, расположенными более рыхло, чем параплектенхима. У грибов ещё отмечают палисадную «ткань», которую напоминает гимениальный слой в плодовых телах некоторых сумчатых грибов, когда ещё сумки находятся в незрелом состоянии, но это чисто внешнее сходство.

Лекция №3-4. Размножение грибов (4 ч.)

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 телеоморф) 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 (телеоморф) — *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 (ложе, 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 свои 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 **дикариотичного** 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 гаметагиях. Различают **изогамиию** — слияние подвижных морфологически сходных гамет и **гетерогамиию** — 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 плазмогамия, 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 разноядерность, — 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 №5. Физиология грибов (2 ч.)

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 аминоадипиновую 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 амилаз.

Лекция №6. Вторичный метаболизм грибов (2 ч.)

Вопросы лекции:

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

Литература

Основная

- Мюллер Э., Леффлер В. Микология. - Москва, Мир, 1995. - 343 с.

Дополнительная

- Безбородова А.М., Астапович Н.И. Секреция ферментов у микроорганизмов. - М. Изд-во "Наука", 1984.
- Справочник по экспериментальной микологии. - Киев. Наукова Думка. 1982.
- Шиврина А.Н. Биологически активные вещества высших грибов. - Л., Изд-во "Наука", 1965. - 199 с.

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 Mucogales 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 удастся 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, цефалоспорин 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 C_1 -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 трихотеченов – 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 удастся 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 №7-8. Генетика грибов (4 ч.)

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 зигомикетов 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 неклоточным 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 сахаромикетов, 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 №9-10. Принципы микологической систематики и номенклатуры (4 ч.)

Вопросы лекции:

1. Систематика грибов
2. Общая характеристика царства грибов и грибоподобных организмов
3. Хитридиомицеты
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 коррективы, 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*);

- Гиfoxитриевые (*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 осмотрофное 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. Хоуксворта: «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 хитридиомицеты 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:

- *Entomophthoromyconina*
- *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 (от греч. ἄσκος — сумка), 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 беспозвоночных, грызунов и более крупных животных: оленей 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 соматогами, 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 гетероталличными, 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 булавовидную 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 №11-12. Экология грибов (4 ч.)

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 ана- морфными 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 отсутствии 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, причем 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.

Лекция №13. Медицинская микология (2 ч.)

Вопросы лекции:

1. Возбудители поверхностных микозов
2. Возбудители глубоких микозов
3. Возбудители оппортунистических микозов

Краткое содержание

1. Возбудители поверхностных микозов. Поверхностные микозы поражают кожу, ее придатки и слизистые оболочки. Эти инфекции начинаются на поверхности наружных покровов, а возбудитель не проникает глубже базальной мембраны эпидермиса. Широко распространенными поверхностными микозами являются дерматофитии, разноцветный лишай и поверхностный кандидоз. К редким поверхностным микозам относятся белая и черная пьедра, а также черный лишай (*Tinea nigra*). Кроме того, очень многие грибы могут быть возбудителями инфекций ногтей - онихомикозов. Дерматофитии, разноцветный лишай и пьедра контагиозны. **Дерматофиты.** Дерматофиты - грибы из родов *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton* - являются возбудителями дерматофитии. Этими инфекциями, по разным данным, поражено от одной трети до половины населения земного шара. Из 40 с лишним известных видов дерматофитов в нашей стране наиболее часто встречаются три *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* и *Microsporum canis*. **Экология и эпидемиология.** Дерматофитии распространены повсеместно. По среде обитания и источнику инфекции все дерматофиты делятся на три группы: антропофильные (например, *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*), зоофильные (например, *M. canis*, *T. verrucosum*) и геофильные (например, *M. gypsum*). Источником вызываемых ими инфекций является, соответственно, человек

или больное животное или почва. Предполагается, что предки всех дерматофитов обитали в почве. Дерматофиты устойчивы к действию факторов окружающей среды. В частности, их споры в высушенном состоянии сохраняют способность к прорастанию в течение многих месяцев. **Морфология и физиология.** Мицелий дерматофитов светлый, равномерно септирован и, как правило, однороден. Для части видов характерны особые разновидности мицелия, используемые в идентификации и нередко позволяющие определить вид. К таковым относят: спиральные гифы, типичные для *T. mentagrophytes*, гифы, ветвящиеся наподобие оленьих рогов, типичные для *T. schoenleinii*, гребешковые (с боковыми выростами) гифы; ракетковидные (утолщенные на одном конце и напоминающие теннисную ракетку) гифы, характерные для *Microsporum* spp. **Факторы патогенности.** Отличительным свойством патогенных для человека дерматофитов является кератинофилия - способность разрушать и утилизировать кератин. Для этого дерматофиты используют особые ферменты - кератиназы. Антропофильные виды способны перерабатывать только человеческий кератин, а зоофильные — и разных животных. Используя направленный рост гиф и кератиназы, грибы прорастают в роговой слой эпидермиса, роговые структуры волос и ногтей. **Антигенные свойства.** Дерматофитии, вызванные зоофильными видами, сопровождаются более выраженными воспалительными реакциями. Среди инфекций, обусловленных антропофильными видами (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*), характерны аллергические компоненты (трихофитиды). Наиболее частый возбудитель дерматофитий *T. rubrum*, по-видимому, обладает меньшими антигенными свойствами и поэтому вызывает инфекции хронического течения со слабо выраженными воспалительными явлениями. Для оценки сенсибилизации макроорганизма к антигенам распространенных дерматофитов используются внутрикожные пробы с трихофитином. **Иммунитет.** Защитные факторы макроорганизма, среди которых основными считают ненасыщенный трансферрин плазмы, комплемент, опсонизирующие антитела и фагоцитоз нейтрофилами, препятствуют вовлечению глубоких тканей. Поэтому дерматофиты, за редкими исключениями, никогда не проникают далее базальной мембраны эпидермиса. **Лабораторная диагностика.** Патологический материал: чешуйки кожи, волосы, фрагменты ногтевой пластинки, перед микроскопированием подвергают «просветлению», т.е. обработке раствором щелочи. Это позволяет растворить роговые структуры и оставить в поле зрения только массы гриба. Диагноз подтверждается, если в препарате видны нити мицелия или цепочки артроконидий. В лабораторной диагностике дерматофитии волосистой части головы учитывают также расположение элементов гриба относительно стержня волоса. Если споры расположены снаружи (характерно для видов *Microsporum*), такой тип поражения называется эктотрикс, а если внутри - то эндотрикс (характерно для видов *Trichophyton*). Окончательная идентификация дерматофитов проводится по морфологическим особенностям. При необходимости проводятся дополнительные тесты (уреазная активность, образование пигмента на специальных средах, потребность в питательных добавках и др.). Для быстрой диагностики микроспории используется также люминесцентная лампа Вуда, в лучах которой элементы гриба в очагах микроспории дают светло-зеленое свечение.

Возбудители разноцветного лишая и других поверхностных микозов. Разноцветный лишай поражает до 10% населения и областях с умеренным климатом, встречаясь значительно чаще в жарких странах. Возбудителем инфекции является дрожжевой гриб из отдела *Basidiomycota* – *Malassezia furfur* (син. *Pityrosporum orbiculare*). Это липофильный гриб, заселяющий кожу преимущественно на участках, богатых кожным салом. Для культивирования *M. furfur* также используется оливковое масло, помещенное на поверхности среды Сабуро. *M. furfur* поражает самые верхние части эпидермиса, как правило не вызывая воспалительной реакции. При микроскопии

патологического материала видны скопления почкующихся клеток и короткие гифы. Под лампой Вуда очаги разноцветного лишая дают желтое свечение. Белая и черная пьедра - это тропические инфекции волосистой части головы, которые не встречаются в нашей стране. Побудителем трихоспороноза или белой пьедры являются разные виды рода *Trichosporon*. Это дрожжевые грибы из отдела *Basidiomycota*. Черный лишай (*Tinea nigra*) — тропическая инфекция поверхностных слоев эпидермиса, которую вызывает плесневой темнопигментированный гриб *Hortaea wemeckii*. В лечении перечисленных поверхностных микозов используют преимущественно местные противогрибковые средства разных классов.

Возбудители подкожных микозов. Подкожными называются те грибковые инфекции, которые поражают дерму и более глубокие мягкие ткани, лежащие под кожей, а иногда - и костную ткань. Эти инфекции объединяет механизм инфицирования - так называемая травматическая имплантация возбудителя. Непременным условием заражения является нарушение целостности кожного барьера при различных травмах, занозах, повреждениях ног при ходьбе разутым. Возбудитель, источником которого является почва или растения, вносится в подкожные мягкие ткани насильственно. К группе подкожных микозов относят хромомикоз, споротрихоз, эумицетому и феогифомикоз. Все эти инфекции не контагиозны. **Возбудители хромомикоза.** Возбудителем хромомикоза может быть любой из 5 видов темнопигментированных плесневых грибов: *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea compacta*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* и *Rhinocladiella aquaspersa*. Эти почвенные грибы встречается в странах с преимущественно тропическим и субтропическим климатом. Инфекция представляет хроническое заболевание, сопровождающееся появлением на коже узелков или узлов, зачастую с бородавчатой (веррукозной) поверхностью, напоминающей цветную капусту. Характерным для хромомикоза является наличие в патологическом материале и гистопатологических препаратах так называемых склеротических телец (5-12 мкм в диаметре) - особой переходной формы гриба. Культура возбудителей вырастает довольно медленно, в течение не менее 2 нед. Идентификацию проводят по особенностям морфологии. **Возбудитель споротрихоза** Возбудителем споротрихоза (болезнь садовников) является диморфный гриб *Sporothrix schenckii*, обитающий в почве и на поверхности растений, различных сортов древесины. Инфекция может ограничиваться только кожей, распространяться по лимфатическим путям или переходить в генерализованную форму. Характерны узелки, сначала возникающие в месте произошедшей травмы, а затем по ходу лимфатических сосудов. В лабораторной диагностике основным является культуральный метод. *S. schenckii* растет быстро, на кровяном агаре при 37°C плесневая форма переходит в дрожжевую. В гистопатологических препаратах обнаруживают так называемые «астероидные» тельца. Существуют и серологические способы диагностики (латекс-агглютинация, иммунодиффузия). **Возбудители эумицетомы** Эумицетомы, или истинная мицетомы - это подкожная инфекция, вызываемая несколькими видами грибов. Помимо эумицетомы, выделяют и актиномицетому, вызываемую не грибами, а бактериями-актиномицетами. Выделяют 8 главных возбудителей эумицетомы, из которых в наших широтах чаще встречается *Pseudallescheria boydii*. Последний вид широко распространен в почве и относится к отделу *Ascomycota*, образуя органы половой стадии в культуре. При эумицетоме, как правило, наблюдается опухолевидное образование на стопе, обусловленное абсцессами и отеком мягких тканей в данной области. Деформация усиливается при вовлечении суставов и костей. На поверхность кожи открываются дренирующие синусы (свищи) из абсцессов. В отделяемом из свищей обнаруживают особые «зерна», содержащие элементы гриба. **Возбудители феогифомикоза** Подкожный феогифомикоз, или феогифомикотический абсцесс вызывается разными

темнопигментированными грибами из родов *Altemaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Exophiala* и др. В лабораторной диагностике используется микроскопия и идентификация выделенной культуры возбудителя. **Лечение и профилактика подкожных микозов.** В лечении подкожных микозов используют системные противогрибковые препараты, в основном из класса триазолов - итраконазол. При эумицетоме и феогифомикозе требуется хирургическое вмешательство. Специфическая профилактика не проводится. Профилактические мероприятия сводятся к защите кожи от повреждений у работников ряда профессий (садовники, шахтеры, лесорубы и др.)

2. Возбудители глубоких микозов. К глубоким микозам относят инфекции, при которых поражаются внутренние органы и ткани. Глубокие микозы в большинстве являются инвазивными, т. е. при них, в отличие от поверхностных микозов, возбудитель разрушает ткани организма, омываемые кровью. Термин «системные» микозы характеризует инфекцию в пределах одной системы органов, при входных воротах в той же системе (пищеварительной, дыхательной, мочевыделительной). Выделяют также диссеминированные микозы, при которых глубокие органы поражаются в результате гематогенной диссеминации возбудителя. Все глубокие микозы условно делятся на две большие группы: респираторные эндемические (вызываются особой группой возбудителей) и оппортунистические (вызываются множеством условно-патогенных грибов). Глубокие микозы не контагиозны, от человека к человеку не передаются.

Возбудители респираторных эндемических микозов. Респираторными эндемическими микозами называют группу инфекций, обусловленных диморфными грибами, обитающими в почве определенных географических областей, и респираторным механизмом заражения (через вдыхание конидий). В организме человека возбудители переходят из инфекционной плесневой формы в неинфекционную, но инвазивную дрожжевую. В этой форме возбудители являются внутриклеточными патогенами и выживают при незавершенном фагоцитозе. Большинство случаев инфекций проявляется как острая пневмония, и у лиц с сохранным иммунитетом имеет абортное течение. Прогрессирование с тяжелым исходом наступает обычно на фоне иммунодефицита, в частности - при ВИЧ-инфекции. Возможно развитие диссеминированного процесса с поражением внутренних органов и кожи. Не исключается первичное поражение кожи, особенно у работающих с культурой гриба. Возбудителями респираторных эндемических микозов являются *Histoplasma capsulatum* (вызывает гистоплазмоз), *Blastomyces dermatitidis* (бластомикоз), *Paracoccidioides brasiliensis* (паракокцидиоидоз), *Coccidioides immitis* (кокцидиоидоз), *Penicillium marneffei* (пенициллиоз). Все эти грибы относятся к III группе патогенности, а по уровню биологической угрозы для персонала лабораторий - к 3 группе. Несмотря на то, что инфекции, вызванные данными возбудителями, не передаются от человека к человеку, возможно заражение при работе с культурой, в связи с чем используется особое оборудование.

Возбудителем гистоплазмоза является *Histoplasma capsulatum* (отдел Ascomycota). *H. capsulatum* - диморфный гриб, вырастающий в мицелиальной форме на среде Сабуро при комнатной температуре. В течение 2-3 нед. вырастают небольшие пушистые светлые колонии, иногда с рыжеватой или коричневой обратной стороной. При микроскопии выделенной культуры виден мицелий с грушевидными или округлыми микроконидиями и толстостенными макроконидиями, покрытыми бугорками. При пересеве на кровяной агар при 37°C гриб переходит в дрожжевую форму и дает светлые гладкие колонии. В микропрепарате культуры видны почкующиеся клетки. Факторы патогенности. Патогенность *H. capsulatum* во многом обуславливается способностью возбудителя противостоять лизису при фагоцитозе и размножаться внутри макрофагов. Дрожжевая форма *H. capsulatum* термотолерантна и обладает способностью изменять кислотность

внутренней среды фагоцита, что позволяет ей выжить. Одним из факторов патогенности является альфа-1,3-глюкан клеточной стенки.

Возбудителем бластомикоза (болезнь Джилкрайста) является диморфный гриб *Blastomyces dermatitidis*. При выделении на среде Сабуро при комнатной температуре светлые мицелиальные колонии созревают за 2 нед., а иногда и дольше. При изучении культуры под микроскопом виден мицелий с округлыми микроконидиями, расположенными на коротких конидиеносцах или просто по сторонам гиф. В старых культурах появляются хламидоконидии. В дрожжевой форме, при пересеве на кровяной агар при 37°C, образуются светлые гладкие или сморщенные колонии, а при микроскопии видны почкующиеся клетки. Факторы патогенности. Среди факторов патогенности *B. dermatitidis* также находится альфа-1,3-глюкан клеточной стенки. Значение придается и фосфолипидной фракции клеточной стенки, играющей роль эндотоксина. Фактором патогенности, участвующим в адгезии (адгезин) за счет связи с человеческими рецепторами комплемента CR3, и основным антигеном, вызывающим клеточные и гуморальные реакции, является антиген WI-1. Иммунодиагностика. В диагностике бластомикоза используется кожный тест с бластомицином, имеющий малую специфичность. К серологическим методам относятся тесты иммунодиффузии и фиксации комплемента, причем последний часто дает перекрестные реакции с антигенами других возбудителей (гистоплазмином и кокцидиоидином). Более совершенным является разработанный недавно иммуноферментный тест.

Возбудителем паракокцидиоидоза (болезнь Лютца-Спландоре-Алмейды, южноамериканский бластомикоз) является диморфный гриб *Paracoccidioides brasiliensis*. При выделении на среде Сабуро при комнатной температуре светлые плесневые колонии *P. brasiliensis* созревают за 3 нед. и более. Вначале колонии морщинистые и кожистые, позднее они покрываются коротким пушком мицелия, темнеют. Дрожжевая форма, образующаяся на кровяном агаре при 37°C, представлена гладкими, нередко складчатыми колониями. При микроскопии в плесневой форме виден мицелий с микроконидиями, расположенными по сторонам гиф или на коротких конидиеносцах, а в старых культурах - и хламидоконидии. При изучении под микроскопом колоний дрожжевой форме можно увидеть характерные толстостенные материнские клетки с отпочковывающимися от них единичными или множественными дочерними. В последнем случае картина напоминает морской штурвал. Среди факторов патогенности *P. brasiliensis* также находится альфа-1,3-глюкан, а также бета-глюканы клеточной стенки. Важным фактором патогенности является белок gr43 (рецептор к ламинину), за счет которого происходит адгезия к базальной мембране в организме человека. Интересным фактором является эстроген-связывающий комплекс *P. brasiliensis*. Действие эстрогенов препятствует переходу гриба в инвазивную дрожжевую форму, что связывают с устойчивостью взрослых женщин к паракокцидиоидозу. Иммунодиагностика. Кожный тест с паракокцидиоидином имеет малое практическое значение в диагностике. Среди серологических тестов используются реакции иммунопреципитации (диффузия в агаре) и фиксации в агаре, разработаны иммуноферментные тесты.

Возбудитель кокцидиоидоза (лихорадка долин, ревматизм пустынь), одной из наиболее опасных грибковых инфекций, является *Coccidioides immitis*. В культуре *Coccidioides immitis* растет только в плесневой форме. Белые пушистые с характерными проплешинами колонии *C. immitis* созревают быстро, в течение 5-10 дней. При изучении культуры под микроскопом виден мицелий, чередующийся с бочкообразными легко отделяющимися артроконидиями. Работа с культурой *C. immitis* представляет значительную опасность и ведется в особых кабинетах со специальным оборудованием. В тканях макроорганизма, отделяемом, мокроте и спинномозговой жидкости можно обнаружить тканевую форму *C. immitis*, так называемые сферулы. Это округлые тельца

от 10 до 80 мкм в диаметре, с толстыми стенками. Внутри сферул находится множество эндоспор, подобных спорангиоспорам *Zygomycota*. Факторы патогенности. Своими патогенными свойствами *C. immitis* во многом обязан малому размеру легко вдыхаемых артроконидий, в организме человека превращающихся в сферулы. Сферулы растут и разрушаются, при этом высвобождаются сотни эндоспор. Сферулы защищены оболочкой, устойчивой к фагоцитозу. У возбудителя имеются экзоферменты - протеиназы. Как и у *P. brasiliensis*, у *C. immitis* есть гормон-связывающий белок, что связывают с меньшей заболеваемостью женщин. Иммунодиагностика. В диагностике кокцидиоидоза используется кожный тест с кокцидиоидином, а из серологических методик - реакции иммунопреципитации, фиксации комплемента и латекс-агглютинации.

Возбудителем эндемического пенициллиоза является гриб из широко распространенного рода *Penicillium* - *Penicillium marneffei*, отличающийся диморфизмом. Морфология и физиология. При выделении на среде Сабуро при комнатной температуре в течение нескольких дней вырастают серые пушистые колонии, позднее дающие красноватый пигмент. При созревании конидий колонии приобретают сине-зеленый оттенок. При изучении мицелиальных колоний под микроскопом определяются признаки, характерные для грибов из рода *Penicillium*: конидиеносец, расположенные на нем конидиогенные клетки - фиалиды 1 и 2 порядка, а на последних — цепочки округлых конидий. Сочетание конидиеносца, конидиогенных клеток и конидий напоминает метелку (лат. *penicillium*). Культивирование при 37°C позволяет получить гладкие дрожжевые колонии. Дрожжевая форма представлена округлыми клетками, которые не почкуются, но размножаются делением. Лечение и профилактика респираторных эндемических микозов

3. Возбудители оппортунистических микозов

Глубокими оппортунистическими микозами называется группа инфекций, вызванных условно-патогенными грибами, развивающихся на фоне тяжелого иммунодефицита и приводящих к поражению висцеральных органов и глубоко лежащих тканей. Характерным фоном для развития глубоких оппортунистических микозов является нейтропения (существенное снижение числа нейтрофильных лейкоцитов). Как правило, нейтропения носит ятрогенный характер, вследствие химиотерапии или радиотерапии гемобластозов, опухолей, аутоиммунных заболеваний. На фоне неэффективного фагоцитоза при нейтропении возбудителем микоза может стать практически любой гриб, способный выживать при температуре и кислотности внутренней среды человека. Именно этим обуславливается широкий перечень возбудителей оппортунистических микозов. Многие возбудители это распространенные почвенные плесневые грибы, споры которых постоянно находятся в воздухе. Механизм заражения в данном случае респираторный. Другой распространенный механизм заражения - ятрогенный: внесение спор возбудителя через кровь при загрязнении систем переливания крови, медицинского инструментария, внутрибольничное загрязнение операционных и ожоговых ран, перевязочного материала. При достаточной массе возбудителя во время гематогенного заражения инфекция с абсцессами внутренних органов развивается и без иммунодефицита. Часть оппортунистических микозов являются ВИЧ-ассоциированными инфекциями: криптококкоз, некоторые формы кандидоза и аспергиллеза.

Возбудителями кандидоза является около 20 видов дрожжевых грибов из рода *Candida* (несовершенные дрожжи из отдела *Ascomycota*). Основные виды-возбудители кандидоза: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*. Заболевание распространено повсеместно. Кандидоз отличается от остальных оппортунистических микозов тем, что это - преимущественно эндогенная инфекция. Главный возбудитель кандидоза, *C. albicans* и многие другие болезнетворные виды *Candida* постоянно или временно обитают на слизистых оболочках или кожи человека, наиболее часто - в

кишечнике. Экзогенное инфицирование встречается реже. Некоторые виды *Candida* загрязняют пищевые продукты. В последнее время участились случаи ятрогенного заражения: при загрязнении систем переливания крови, через хирургические инструменты, руки медперсонала и т.д. Морфология и физиология. *Candida* spp. растут быстро, в среднем за 48 ч. и дают типичные гладкие, светлые дрожжевые колонии. Факторы патогенности. *C. albicans* - это наиболее изученный и плане патогенных свойств возбудитель микозов. По наличию фактором патогенности *C. albicans* превосходит все прочие виды *Candida*. Факторы патогенности *C. albicans* можно условно разделить на 3 группы: изменчивость и значительную лабильность морфо-физиологических свойств клетки, рецепторы адгезии и литические ферменты. Изменчивость *C. albicans* обеспечивается многими генетическими и регуляторными механизмами и позволяет выживать в разных условиях (температура, кислотность, содержание кислорода, питательных веществ). *C. albicans* единственный в своем роде и вообще среди возбудителей микозов вид, существующий в диплоидном состоянии. В зависимости от условий среды *C. albicans* переходит от дрожжевой формы к плесневой и обратно (полиморфизм), меняет общий фенотип (феномен переключения) или структуру поверхности, т.е. рецепторы и антигены. Среди рецепторов *C. albicans* имеются факторы адгезии: к фибриногену, ламинину, фибронектину, факторам системы комплемента. Это обеспечивает, во-первых, возможность быстрого прикрепления, а затем и инвазии, а во-вторых, «антигенную мимикрию», т.е. предоставление этих рецепторов факторам иммунитета человека. Описано не менее 9 протеиназ *C. albicans* (есть и у других видов), способных разрушать кератин, белки эндотелия и соединительной ткани, факторы плазмы крови, комплемента и фрагменты иммуноглобулинов. *C. albicans* имеет также фосфолипазы, разрушающие фосфолипиды клеточных мембран, гиалурунидазу и гемолитический фактор. В последнее время среди факторов патогенности выделяют и такие свойства, как устойчивость к противогрибковым средствам: способность к их ускоренному выведению, изменению или амплификации внутриклеточной мишени.

Острые кандидозы слизистых оболочек и кандидный дисбактериоз возникают вскоре после лечения антибиотиками широкого спектра действия. Тяжелые и хронические формы кандидоза развиваются на фоне иммунодефицита. При этом на фоне только Т-клеточного иммунодефицита (при ВИЧ-инфекции и некоторых первичных иммунодефицитах) развиваются преимущественно поверхностные формы кандидоза: хронический кандидный стоматит, эзофагит, вагинит, распространенный кандидоз кожи и слизистых оболочек. Глубокий кандидоз с поражением кишечника, легких и почек развивается на фоне нейтропении при инвазии *Candida* со слизистых оболочек. Диссеминированные формы кандидоза с поражениями разных органов могут возникнуть и без нейтропении, как экзогенная инфекция при загрязнении грибами *Candida* (как правило, более редкими видами, а не *C. albicans*) систем переливания крови в стационаре, или игл и шприцев у инъекционных наркоманов. Факторы иммунитета при кандидозе хорошо изучены. Распознавание и захват клеток гриба осуществляется макрофагами и нейтрофилами при опсонизации факторами комплемента и антителами или непосредственно (только макрофагами) с помощью маннозо-связывающего рецептора. Секреторные антитела класса IgA препятствуют адгезии гриба к слизистым оболочкам. В уничтожении клеток *Candida* участвуют как окислительные, так и неокислительные механизмы. Регуляция иммунного ответа осуществляется Т-лимфоцитами хелперами обоих подклассов, Т-супрессорами, гамма/дельта клетками и естественными киллерами. Дефект любой из этих систем может приводить к хроническим формам поверхностного кандидоза, а выраженная недостаточность фагоцитоза - и к глубокому кандидозу. *C. albicans* имеет способности к иммуномодуляции и дисрегуляции иммунного ответа за счет динамической экспрессии маннанных и белковых антигенов.

Лабораторная диагностика. В микробиологической диагностике кандидоза в настоящее время ориентируются на выделение его главного (более 80% всех случаев) возбудителя *C. albicans*. Простейшим методом является проростковая проба: способность *C. albicans* образовывать зачатки истинных грибов на среде с сывороткой в течение 3 ч. Разработаны тесты быстрой идентификации: хромогенные среды (*C. albicans* на них дает пигмент), быстрое определение антигенов и ферментов в течение часа и другие. Идентификация других видов ведется преимущественно по спектру усваиваемых сахаров. Для этого выпущены специальные тест-системы и панели для автоматических анализаторов. Серодиагностика кандидоза малоэффективна в связи с распространенным носительством грибов рода *Candida*. Используются тесты иммунопреципитации, иммуноферментные и латекс-агглютинация. Иммунологическая диагностика включает определение маннанового антигена в крови (латекс-агглютинация) при диссеминированном кандидозе. В последние годы в диагностике глубокого кандидоза используется также газожидкостная хроматография, определяющая компоненты клеточной стенки грибов D-маннозу и арабинитол. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) используется только в диагностике глубоких форм кандидоза в связи с распространенным носительством *Candida*.

Лечение и профилактика. В настоящее время в лечении глубокого кандидоза применяются инъекционные полиеновые антибиотики (амфотерицин В), а также препараты из класса азолов (флуконазол, итраконазол, кетоконазол). К данным препаратам разные виды *Candida* чувствительны неодинаково.

Возбудители аспергиллеза. К возбудителям аспергиллеза относят несколько видов несовершенных плесневых грибов из рода *Aspergillus*. Наиболее часто ими являются следующие виды *Aspergillus*: *A. fumigatus*, реже *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, еще реже *A. glaucus*, *A. nidulans* и другие, всего 15 условно патогенных для человека видов. Факторы патогенности. Среди факторов патогенности аспергилл выделяют инвазивный рост, способность выживать во внутренней среде человека и наличие ферментов-протеиназ, в частности кератиназы и эластазы, способной разрушать эластические волокна легких. *A. flavus* является токсигенным, выделяя экзотоксины (афлотоксины, или флавотоксины). Патогенез и иммунитет. Попадание спор *Aspergillus* на слизистые оболочки дыхательных путей само не приводит к разрушению тканей. Прорастание спор контролируется макрофагами, и локальная недостаточность их функции позволяет колонизацию слизистой. При СПИД описана особая изолированная форма инфекции – аспергиллез бронхов. Нейтропения различного происхождения - основная причина развития инвазивных и диссеминированных форм аспергиллеза. При достаточном числе нейтрофилов проникшие грибы *Aspergillus* могут колонизировать, без инвазии, поверхности измененных в результате предшествовавшего патологического процесса тканей, а также существующие (придаточные пазухи носа), или сформировавшиеся в результате другого заболевания полости. Так развивается аспергиллема. Контакт с антигенами *Aspergillus* может привести к развитию аллергии - инфекционно-зависимой бронхиальной астме (реакции гиперчувствительности I типа), экзогенному аллергическому альвеолиту (реакции IV типа) и аллергическому бронхолегочному аспергиллезу (реакции I и III, а возможно, и IV типа). Гифы *Aspergillus* обладают свойством прорастать стенки сосудов, вызывая тромбозы, кровотечения. В части случаев инвазивного аспергиллеза легких наступает гематогенная диссеминация - в головной мозг, почки, сердце, кости, кожу и другие органы. Диссеминация может возникать не только из очагов в легких, но и при травматической имплантации возбудителя - через кожу, роговицу глаза, при оперативных вмешательствах. Грибы рода *Aspergillus* вызывают также кератомикозы, возникающие вследствие травмы глаза, и отомикозы - поражения наружного слухового прохода.

Возбудители мукороза Возбудители мукороза относятся к порядку Mucorales из отдела Zygomycota. Ими являются условно-патогенные виды *Rhizopus arrhizus*, *Absidia corymbifera* (главные виды), некоторые грибы из родов *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Saksnaea*, и другие. **Факторы патогенности** Главным фактором патогенности является быстрый инвазивный рост. Возбудители обладают способностью прорастать стенки сосудов, образовывать тромбы и эмболы, вызывая ишемические некрозы окружающих тканей. Патогенез и иммунитет. Мукороз - это типичная оппортунистическая инфекция, поражающая лиц с иммунодефицитом. Это больные тяжелым, сопровождающимся кетоацидозом, сахарным диабетом, больные гемобластозами, перенесшие трансплантацию органов, другие пациенты, получающие пролонгированное лечение кортикостероидами, цитостатиками. Возможны внутрибольничные вспышки. Мукороз желудочно-кишечного тракта встречается в основном у детей из развивающихся стран с недостаточным питанием, больных квашиоркором, пеллагрой, амёбной дизентерией.

Возбудитель криптококкоза. Возбудителем криптококкоза (европейский бластомикоз, болезнь Буссе-Бушке) является дрожжевой гриб *Cryptococcus neoformans*. Теломорфа *C. neoformans* находится в отделе Basidiomycota. Выделяют два биовара возбудителя: *C. neoformans* var. *neoformans* и *C. neoformans* var. *gattii*, имеющих разные теломорфы. Заражение происходит при вдыхании содержащихся в пыли мелких клеток гриба, лишенных капсулы, а возможно и базидиоспор совершенной формы. Возможно заражение и другими путями: через поврежденную кожу или слизистые оболочки. Надежного скринингового теста для диагностики криптококкоза нет, поэтому точные сведения о заболеваемости криптококкозом, с учетом стертых форм, отсутствуют. **Факторы патогенности.** Главным фактором патогенности является мукополисахаридная капсула. С ее помощью возбудитель противостоит фагоцитозу, и подавляет образование ряда цитокинов, в частности фактора некроза опухолей. Кроме того, *C. neoformans* образует фермент, которого нет у всех остальных болезнетворных грибов: фенолоксидазу, также считаемую фактором патогенности. **Патогенез и иммунитет.** Больных криптококкозом можно разделить на две группы: с иммунодефицитом (в основном это ВИЧ-инфекция) и внешне здоровые лица. У последних заболевание часто протекает благоприятно, имеет стертую клиническую картину. Криптококкоз считается СПИД-индикаторным заболеванием. Защита организма от криптококковой инфекции представлена прежде всего клеточным иммунитетом (Т-лимфоциты и макрофаги). Поэтому тяжелые и диссеминированные формы криптококкоза встречаются у больных с клеточным иммунодефицитом: при ВИЧ-инфекции, и у пациентов, получающих кортикостероидные и цитостатические препараты, при лимфомах, саркоидозе, аутоиммунных заболеваниях.

Лекция №14. Ветеринарная микология (2 ч.)

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, мукоморикоз, 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, риноспоридиоз, кандидомикоз, аспергиллез, мукоморикоз);
- 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 волосяных 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

Lymphangitis 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*) *farcininosus 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

Кокцидиоидомикоз - (кокцидиоидоз, кокцидиоидная 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 неблагополучных 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 Джиллькрайста) — 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 - (торулес, 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 15. Прикладная микология (2 ч).

Вопросы лекции:

1. Вред, приносимый грибами
 - Болезни растений.
 - Болезни животных и человека.
 - Повреждение промышленных материалов и изделий.
2. Использование грибов человеком
 - Грибы — продуценты биологически активных веществ.
 - Пищевые и кормовые грибы
 - Использование грибов в агрокультуре.

Краткое содержание

1. Вред, приносимый грибами

Болезни растений. В не нарушенных человеком фитоценозах вред, наносимый грибами травянистым и древесным растениям, невелик; более того, они выполняют важные функции регуляторов численности сочленов фитоценозов. Иная картина наблюдается в посевах сельскохозяйственных культур (агроценозах) и лесных массивах, испытывающих антропогенное воздействие. Такие растительные сообщества часто подвержены массовым заболеваниям (эпифитотиям), которые, если не проводить специальных защитных мероприятий (посев и посадка устойчивых сортов, обработка семян и вегетирующих растений химическими веществами — фунгицидами и др.), могут вызвать гибель всей популяции. Причины массовых болезней связаны с нарушением человеком природных факторов, регулирующих взаимоотношения растений и их паразитов.

1. Вместо сложных многовидовых фитоценозов, в которых случайно распределены различные по степени восприимчивости к тому или иному грибу виды, в сельскохозяйственных посевах и лесных посадках преобладают чистые культуры одного вида или даже сорта растений, на которых вирулентный для них вид или штамм паразита развивается с быстротой лесного пожара.

2. Вместе с растениями, интродуцированными в новые регионы, туда попадают и их паразиты, которые могут перейти на местные растения, не обладающие выработанными в процессе коэволюции механизмами устойчивости к этим паразитам.

3. Пахотная культура, применение удобрений и другие агротехнические приемы привели к коренным изменениям условий существования почвенных микроорганизмов. Упала численность базидиальных грибов, мицелий которых, как было уже сказано, ингибирует развитие сумчатых и несовершенных грибов — основных паразитов растений. Они не только увеличили свою численность, но и повысили патогенные свойства по отношению к растениям, становясь возбудителями корневых гнилей и других болезней растений.

4. Высокая рекреационная нагрузка на лесные массивы (вытаптывание и уплотнение почвы, приводящее к снижению аэрации корней), наличие вредных веществ — ксенобиотиков — в воздухе и почве снижают природные механизмы устойчивости к болезням.

Массовые болезни растений приводили к голоду и гибели населения в местах, где выращивалась одна пищевая культура. Так, в 40-х гг. XIX в. из-за неурожая картофеля, вызванного фитофторозом, умерло от голода или эмигрировало за океан большинство населения Ирландии, а через сто лет такое же бедствие — гибель 2 млн жителей — случилось в Бенгалии вследствие поражения риса гельминтоспориозным ожогом листьев. Грибные болезни растений, в частности ржавчина, сыграли решающую роль в

перемещении центра выращивания кофе из Юго-Восточной Азии (Индия, Цейлон) в Южную Америку. На Западном побережье США рак каштанов, вызванный сумчатым грибом *Cryphonectria parasitica*, привел к изменению ландшафтов — каштановые леса сменились кустарниковыми зарослями.

Болезни животных и человека. Здесь сложилась та же ситуация, что и с грибными болезнями растений. Долгое время важнейшими грибными болезнями домашних животных и человека были дерматомикозы, поражающие кожу, ногти и волосы. От них очень страдал скот, часто заболели комнатные животные, от которых болезни переходили и на людей. В последние годы благодаря применению противогрибных сывороток, разработанных известным микологом А.Х. Саркисовым, удалось снизить урон от дерматомикозов в животноводстве, а современные химические средства борьбы с грибными болезнями (фунгициды) позволяют успешно бороться и с поверхностными микозами человека. Однако значительно возросла роль внутренних — *глубоких микозов*. Их вызывают широко распространенные и всегда встречающиеся в быту грибы — дрожжевые из родов *Candida* и *Cryptococcus* и мицелиальные *Rhizopus*, *Aspergillus* и др. (оппортунистические инфекции). Их споры могут попасть в организм человека через дыхательные пути, ранки, половые органы. Если эти грибы способны расти при температуре человеческого тела (37°C) и имеют набор ферментов, необходимых для разрушения клеточного содержимого, они могут паразитировать в теле человека. Однако, не являясь специфическими паразитами, прошедшими длительную коэволюцию с хозяевами, они не способны противостоять действию иммунной системы, и поэтому организм здоровых людей легко справляется с ними. Если же иммунная система ослаблена, что может быть вызвано ухудшением качества среды обитания (загрязнением окружающей среды), психологическими стрессами и вирусными болезнями, такими, как СПИД, гепатит и др., глубокие микозы могут приводить к чрезвычайно тяжелым болезням, часто с летальным исходом. Глубокие микозы вышли на одно из первых мест среди причин гибели ВИЧ-инфицированных

Повреждение промышленных материалов и изделий. Обладая обширным набором ферментов, грибы могут развиваться на разнообразных субстратах и при благоприятных условиях (температура и влажность) вызывать быстрое их разрушение. На первом месте среди таких грибов стоят ксилотрофы, разрушающие древесину. Эти грибы играют важную экологическую роль, разрушая мертвые части деревьев и освобождая связанный в них углерод. Однако они являются бичом для деревянных строений. Особенно опасна группа кортициевых базидиомицетов (с лепешкообразными плодовыми телами), которые чрезвычайно агрессивны и очень быстро превращают деревянные изделия в труху. Для их развития необходима высокая влажность воздуха, поэтому они сильно поражают деревянные полы в деревенских домах, в которых отсутствуют хорошо проветриваемые подвалы, а также бани, сваи мостов на границе вода-воздух и другие строения. Для защиты деревянных шпал на железных дорогах проводится дорогостоящая пропитка их защитными химическими веществами.

Грибы освоили и другие материалы, такие, как кожа и ее заменители, стекло, бумага, даже углеводородное топливо. Ежегодно во всем мире затрачивают огромные средства для борьбы с ними, создают специальные режимы хранения в библиотеках, архивах, чтобы препятствовать развитию грибов. Невосполнимый ущерб наносят грибы раритетам (старинным манускриптам, например) и произведениям искусства (картинам, фрескам, историческим зданиям). Специальные лаборатории, в которых изучают грибы, вызывающие биокоррозию, и разрабатывают методы защиты от них, созданы на заводах, в научно-исследовательских институтах, крупных библиотеках.

2. Использование грибов человеком

Грибы — продуценты биологически активных веществ. Вследствие разнообра-

зия первичных и вторичных метаболитов, высокой активности ферментов грибы в последние годы стали важнейшими объектами биотехнологии.

Многие грибы являются продуцентами различных лекарственных веществ, таких, как: 1) антимикробные препараты — антибиотики. Как известно, первым антибиотиком, выделенным английским микробиологом А. Флемингом, был продукт гриба *Penicillium* — *пенициллин*. Этот антибиотик произвел революцию в фармакологии, так как позволил лечить ранее неизлечимые болезни: гангрену, сепсис, перитонит и др.; 2) иммуномодуляторы. Некоторые из них (иммуносупрессоры) подавляют иммунную систему млекопитающих и поэтому широко используются при пересадке чужеродных органов, которые иммунная система организма без обработки подобными веществами отторгает. Таков циклоспорин, получаемый из грибов рода *Tolypocladium*. Другие, например полисахариды многих базидиомицетов (иммуноактиваторы), наоборот, стимулируют интенсивность иммунного ответа на микробную инфекцию; 3) противосклеротические препараты (*ловастатин* и другие продукты многих грибов), ингибирующие биосинтез холестерина и тем самым препятствующие отложению холестерина на кровеносных сосудах; 4) противораковые вещества — полисахариды в плодовых телах некоторых трутовых и агариковых грибов (главным образом ксилотрофов); 5) соединения, ингибирующие активные радикальные процессы в клетках, в том числе облученных, — каротиноиды, ликопины, фенолы и др., продуцируемые многими грибами в очень высоких концентрациях; 6) гормональные вещества. Алкалоиды некоторых грибов, например спорыньи, издавна используют для получения гормональных препаратов; 7) *хитин* — полифункциональное лекарственное вещество. Он обладает гораздо более высокими адсорбционными свойствами, чем активированный уголь, высокой рано- и ожогозаживляющей способностью. Все эти и другие препараты получают из разных видов грибов промышленными методами.

Многие грибы используют для получения активных ферментов, разрушающих биополимеры. Так, древоразрушающие базидиомицеты - источники активных *целлюлоз* и *пероксидаз*, обладающих способностью разлагать целлюлозу и лигнин. Их использование очень важно для целлюлозно-бумажной промышленности, так как позволяет заменить выделение и деградацию этих веществ химическими методами и избавиться от ядовитых отходов производства, загрязняющих окружающую среду (целлюлозная промышленность остается одним из самых грязных производств). Генно-инженерными методами гены, контролирующие эти ферменты, переносят из базидиальных грибов в более быстро растущие и технологически более удобные микромицеты (дрожжи и др.). Пектиназы (разлагают пектин), протеазы (разрушают белки), липазы (разрушают липиды) грибов широко используются в пищевой и легкой промышленности для осветления овощных и фруктовых соков, как добавки к моющим средствам и др. Из грибов традиционно получают органические кислоты — лимонную, итаконовую и др. Фитопатогенные грибы оказались активными продуцентами фитогормонов, таких, как *гиббереллины*, *фузикокинины*. Эти вещества регулируют ростовые процессы у растений, направляя их в нужную для паразита сторону. Сейчас ими обрабатывают сельскохозяйственные растения для получения более крупных плодов, ускорения роста и других целей.

Пищевые и кормовые грибы. Среди этих грибов наиболее важны представители двух групп. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Их способность в процессе брожения перерабатывать сахара в спирт и углекислый газ издавна используют в производстве многих пищевых продуктов, прежде всего хлеба, вина и пива, а также в спиртовом производстве. Благодаря быстрому размножению (клетки почкуются каждые 60-100 минут) и накоплению биомассы многие виды дрожжей выращивают для получения богатых питательными веществами кормов (белково-витаминный концентрат, БВК). Плодовые тела сумчатых и базидиальных макромицетов. Один из наиболее любимых населением

России природных продуктов, который используют в свежем, сушеном и консервированном виде. Однако их использование в пищу не безопасно и может привести к тяжелым отравлениям, часто с летальным исходом. Во-первых, многие виды грибов содержат токсины, описанные ранее, и недостаточно знающий собиратель может спутать ядовитые грибы с внешне похожими на них съедобными. Во-вторых, в отличие от высших растений, адсорбирующих почвенные растворы корневой системой, грибы всасывают питательные вещества всем вегетативным телом (мицелием), о чем уже было сказано. Поэтому они активно накапливают в мицелии и плодовых телах находящиеся в окружающей среде токсические продукты (радионуклиды, тяжелые металлы, пестициды и т.д.). В связи с этим употребление в пищу вполне съедобных грибов, которые собраны в местах экологически неблагоприятных может привести к тяжелым отравлениям. Поэтому во многих промышленно развитых странах дикорастущие грибы вообще не собирают. Гораздо более безопасно использовать в пищу съедобные грибы, выращенные в искусственных условиях. Наиболее широко культивируется гумусовый сапротроф *шампиньон двуспоровый*, который разводят более чем в 70 странах. Его культивирование включает несколько этапов: стерильное выращивание грибницы; внесение ее в специально приготовленные компосты, в которых грибница разрастается, охватывая весь объем субстрата; покрытие компоста нестерильной почвой (плодоношение индуцируют почвенные микроорганизмы), в которой при определенных температуре и влажности развиваются плодовые тела. Современные технологии позволяют получать с 1 м² почти 30 кг грибов при пяти урожаях в год, что значительно превышает выход продукции растениеводства и животноводства. Кроме шампиньона широко выращивают грибы-ксилотрофы, развивающиеся в природе на мертвой древесине: *летний и зимний опенок*, *вешенка*, *японский гриб шиитаке* и др. Их можно культивировать на отходах деревообрабатывающей (обрубки, опилки лиственных пород), легкой и пищевой промышленности (хлопковые очесы, подсолнечная лузга др.) и сельского хозяйства (солома). Это удешевляет их производство и попутно решает важную народно-хозяйственную задачу — утилизацию промышленных, сельскохозяйственных и коммунальных отходов. После снятия урожая грибов эти отходы обогащены мицелиальным белком, в них частично или полностью разрушены трудноусвояемые или токсичные биополимеры (целлюлоза, лигнин), поэтому они могут быть использованы в качестве добавок в корм скоту или для удобрений, что создает замкнутый цикл безотходного производства — идеал промышленной экологии. Большое достоинство грибов-ксилотрофов — их лекарственные свойства, описанные выше.

Использование грибов в агрокультуре. Важный прием, широко применяемый в современных сельскохозяйственных и лесотехнических технологиях, — микоризация растений (заражение культурами микоризных грибов). Этот прием повышает приживаемость, урожайность и устойчивость растений. Многие грибы — паразиты сельскохозяйственных вредителей (насекомых, нематод), возбудителей грибных болезней (микофилы) и сорных растений используются как альтернатива пестицидам — в качестве биологических средств защиты растений. Для этого созданы микробиологические производства, в которых накапливают споры грибов, используемых в дальнейшем для опрыскивания посевов, обработки семян или внесения в почву.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ

ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: Устройство микологической лаборатории. Забор, хранение и транспортировка материала для микологического исследования.

Цель занятия – ознакомиться с устройством микологической лаборатории, правилами забора и транспортировки материала для микологических исследований.

Задачи работы:

1. Изучить устройство и правила работы в микологической лаборатории.
2. Познакомиться 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 стёкла, 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;
- препаратную;
- 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*, *Trichosporium 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 °С) 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 матрацы 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 алергизации 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, слабый розовый раствор марганцево-кислого калия, стерильный изотонический раствор хлорида натрия.

Промывные воды бронхов, гаймаровых 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 препаратными 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 петлей или пастеркой переносят в каплю 10% раствора КОН на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и большом увеличениях 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 трехкратным 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 (шиповатой) оболочкой. При микроскопии окрашенных препаратов обнаруживают грамположительные или грамотрицательные 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 2 (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; - рН -5,6.

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

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

Модификация Эммонса - рН 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; - KH_2PO_4 - 2 г; феноловый красный - 8 г; дистиллированная вода - 800 мл.

Развести среду №1 (рН-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;

- KH_2PO_4 -1,8г; - MgSO_4 -0,1 г;

- агар - 20 г;

- дистиллированная вода - 1л.

Среда № 2. Селенитовый агар. Состав среды:

- глюкоза - 40 г; - NH_4NO_3 -1,5г;

- KH_2PO_4 - 1,8 г; - MgSO_4 -0.1 г;

-агар - 20 г;

- дистиллированная вода -1 л.

Растворы витаминов:

-№1 тиамин 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, рН 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 3 (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 ($+37^{\circ}\text{C}$ и 28°C), 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 спороношения определяют культуру гриба. В случае отсутствия спороношения 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 изотоническом 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 газоном, 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 $+28^{\circ}\text{C}$ 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 $+37^{\circ}\text{C}$ и $+28^{\circ}\text{C}$ 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, посеvy 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 увеличениях. Изучают субстратный и воздушный мицелий, отмечают наличие или отсутствие септ (перегородок), обращают внимание на характер спороношения: конидиеносцы с конидиями и спорангии со спорангиеспорами. 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, прямо-стоящие, 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 4 (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.

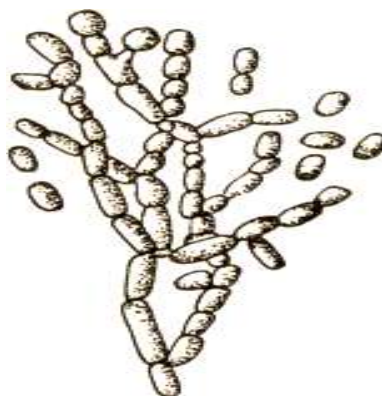
Для приготовления препарата гриба оидиум (*Oidium*) необходимо снять (слегка соскабливая) иглой его белый мицелий с субстрата.

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 — вместилища 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, высыпающихся 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.

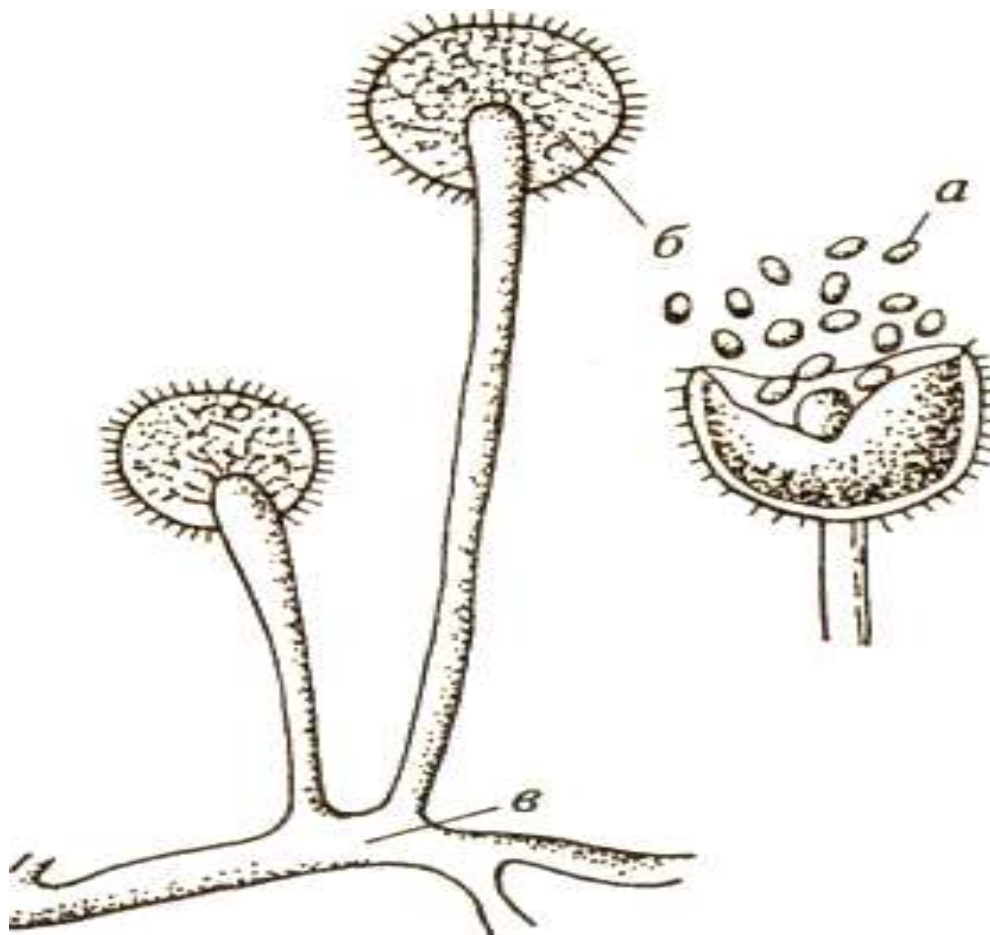
Для приготовления препарата гриба аспергиллус (*Aspergillus*) необходимо взять воздушный окрашенный мицелий с края колонии.

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 кладывать покрывное 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

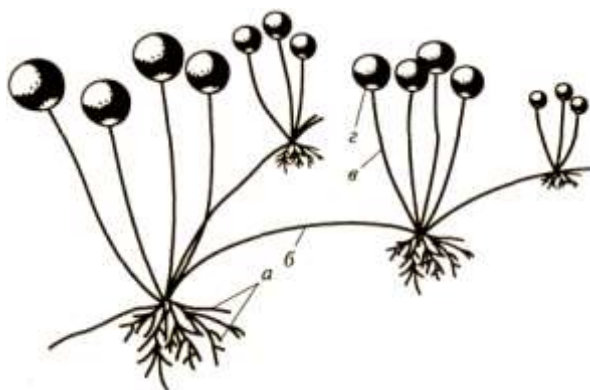
Для приготовления препарата гриба адтернария (*Alternaria*) необходимо взять грибницу в ее черных участках, заметно внедряясь иглами в глубь грибницы.

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 альтернрии 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.

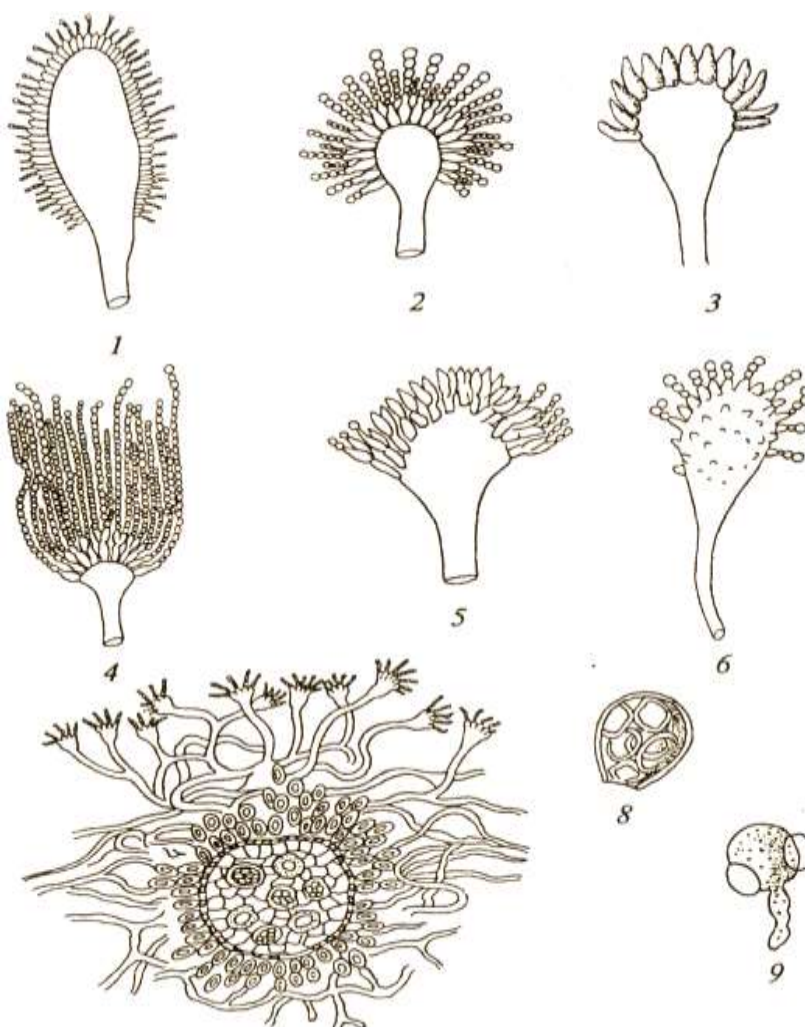
Товароведы пищевых продуктов и непродовольственных товаров чаще всего оперируют названием рода гриба.

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*)).

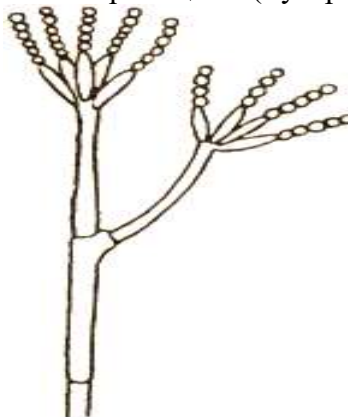


Рис. 18. *Penicillium*. Одномутовчатое строение кониеносцев

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*)).

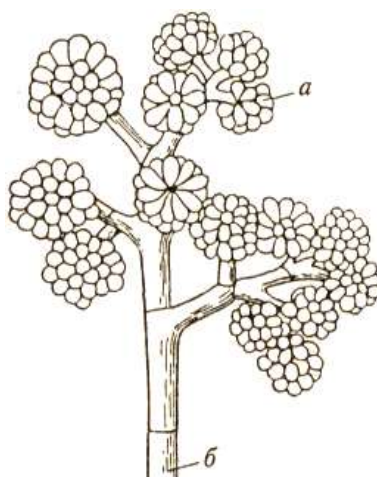
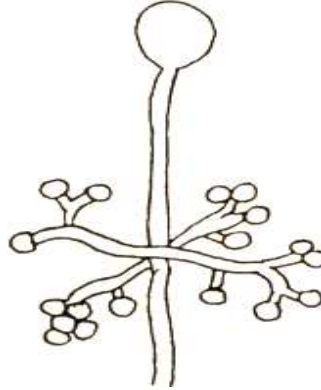


Рис.. *Botritis*: а — конидии; б - конидиеносцев

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.

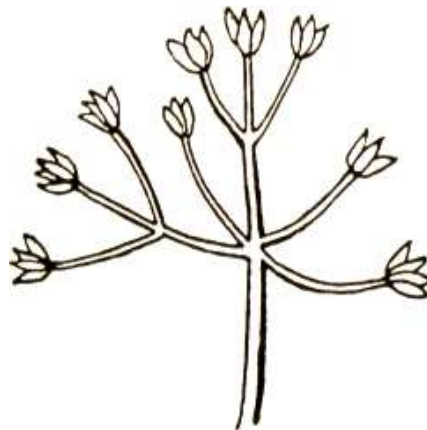
6. Конидиеносцы обильно ветвятся различным образом. Конидиеносцы не ветвятся или иногда ветвятся, но слабо. Ветвление простое, вильчатое или кустообразное.



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

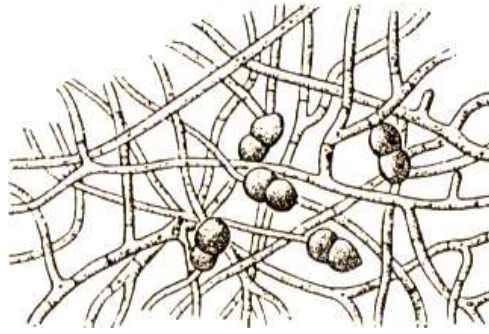
Конидиеносцы древовидно разветвленные. Ветви располагаются мутовчато. Конидии образуются пучками или поодиночке, эллипсоидальные или вытянуто-яйцевидные, бесцветные или слабоокрашенные (вертициллиум (*Verticillium*))

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 булабовидное 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*)).

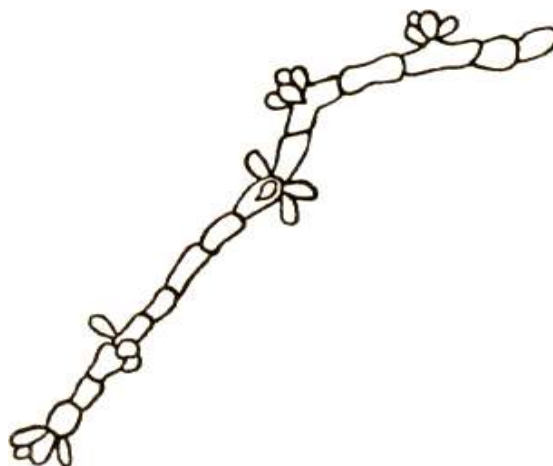
13. Стеригмы, покрывающие булабовидные вздутия, простые, неветвящиеся, несут цепочки конидий. Конидии округлые, гладкие или шиповатые, окрашенные или бесцветные (аспергиллус (*Aspergillus*))

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*))

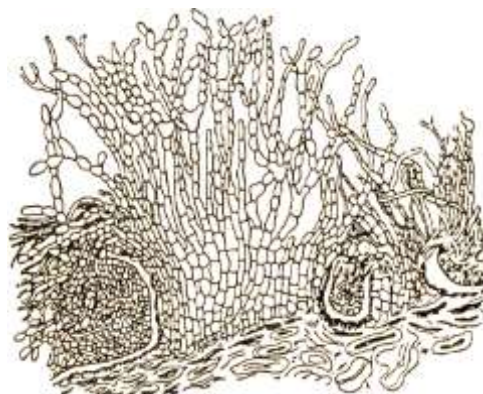
Конидии одноклеточные, яйцевидные, дрожжеобразные. Молодые колонии похожи на дрожжевидные, потом становятся лохматыми (монилия (*Monilia*))



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*))



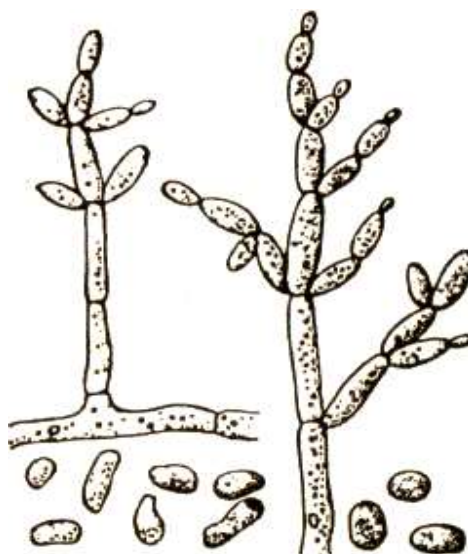
Monilia

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.

Студент должен идентифицировать грибы до рода, заполнить табл. и схематично зарисовать 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 5-6 (4 ч).

Тема: Биология дрожжей. Выделение элективной культуры дрожжей. Изучение морфологии дрожжей.

Цель занятия – изучение биологических свойств дрожжей

Задачи работы:

1. Освоить методы выделения элективной культуры дрожжей.
2. Изучить морфологию дрожжей.
3. Освоить методы изучения и окраски внутриклеточных включений у дрожжей

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:

Дрожжи в виде достаточно обособленной таксономической группы грибов относились к классу аскомицетов до середины XX в. В середине XX в. японский миколог Исао Банно доказал, что дрожжи могут быть отнесены к двум классам грибов: аскомицетам и базидиомицетам. Это была целая революция в классификации дрожжей.

Традиционно аскомицетовые грибы разделяли на два класса: голосумчатые (*Hemiascomycetes*) и настоящие аскомицеты или плодосумчатые (*Euascomycetes*). Голосумчатые аскомицеты не образуют плодовых тел, аски у них располагаются непосредственно на мицелии, или в виде одиночных клеток. Плодосумчатые аскомицеты образуют аски внутри или на поверхности плодовых тел.

Разделение на семейство и роды проводилось на основании способа вегетативного размножения: делением клетки и почкованием.

Аскомицетовые дрожжи. Аскомицетовые дрожжи подразделяются на три класса: *Archiascomycetes*, *Hemiascomycetes* и *Euascomycetes*. Рассмотрим только отдельных представителей аскомицетовых дрожжей, которые часто встречаются в открытой среде на пищевых продуктах, или часто используются в пищевой промышленности.

Класс *Archiascomycetes*, порядок *Schizosaccharomycetales*, вид *Schizosaccharomyces* (рис. 1).

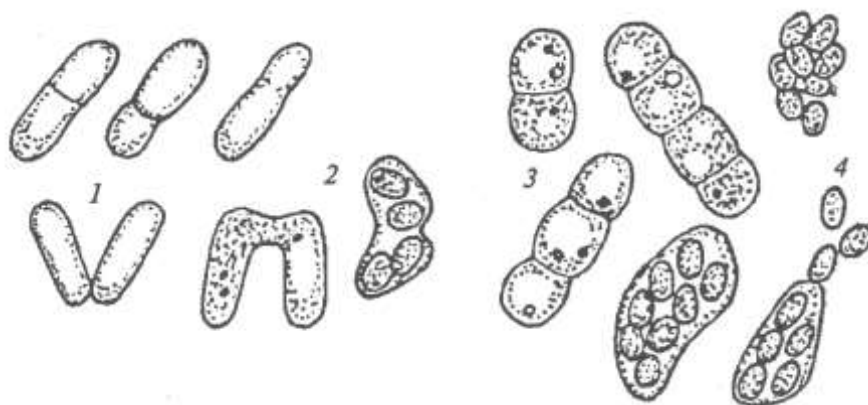


Рис. 1. *Schizosaccharomyces*:

1,2 - *S. pombe*; 3,4 - *S. octosporus*; 1, 3 - вегетативно делящиеся клетки; 2, 4 - аски со спорами

У *Schizosaccharomyces* клетки имеют форму от круглых до цилиндрических. Вегетативное размножение осуществляется делением клетки пополам. Могут образовывать истинные гифы, которые распадаются на артроспоры. Аски образуются после копуляции клеток. Аскоспоры бывают круглые или овальные, от 4 до 8 в одной аске. *Schizosaccharomyces* - активные бродильщики, используются в бродильной промышленности, преимущественно в странах с жарким климатом.

Другие представители этого класса являются облигатными высокоспециализированными паразитами растений.

Класс *Hemiascomycetes*, семейство *Saccharomycetacea*, вид *Citeromyces* (рис. 2). Клетки этого вида дрожжей сферические до эллипсоидальных. Вегетативное размножение осуществляется истинным многосторонним почкованием. Мицелия не образуют. Сбра-

живают сахара. Встречаются в пищевых продуктах с высоким содержанием сахара: фруктовых сиропах, сгущенном молоке и т. п.

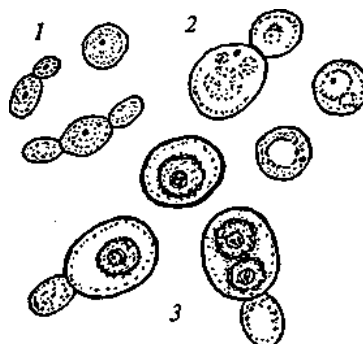


Рис. 2. Citeromyces:

1,2 – гаплоидные и диплоидные почкующиеся клетки; 3 – аски с аскоспорами.

Вид *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 3) имеет овальные или круглые, иногда удлинённые клетки. Вегетативное размножение осуществляется многосторонним почкованием. Иногда образуют примитивный псевдомицелий. Аски образуются преимущественно из вегетативных диплоидных клеток, аски бывают круглые или овальные, образуется 1 ...4 аскоспоры в аске. Все виды активно сбраживают сахара. Дрожжи этого рода с давних времен используются в виноделии и других отраслях промышленности. В связи с их широким использованием они изучены более детально, чем другие дрожжи. Систематика их многократно пересматривалась.

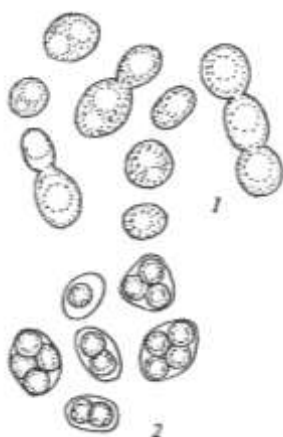


Рис. 3. Saccharomyces cerevisiae:

1 - почкующиеся клетки; 2 - аски со спорами.

Центральный вид - *Saccharomyces cerevisiae* - известен в десятках синонимах, которые в настоящее время рассматриваются как производственные расы, но не самостоятельные виды.

Zygosaccharomyces (рис. 4) имеет круглые и овальные клетки. Вегетативное размножение осуществляется многосторонним почкованием. Асками становятся зиготы, которые образуются непосредственно после конъюгации отдельных клеток. Аскоспоры

круглые или овальные, гладкие, 1 ...4 в аске. Активно сбраживают сахара. Большинство способно развиваться в субстратах с высокими концентрациями сахара — до 80 %. Встречаются в меде, вареньях, сахарных сиропах, концентрированном соке, сухофруктах и т.п., вызывая их порчу. В природе встречается в нектаре цветов на поверхности винограда.

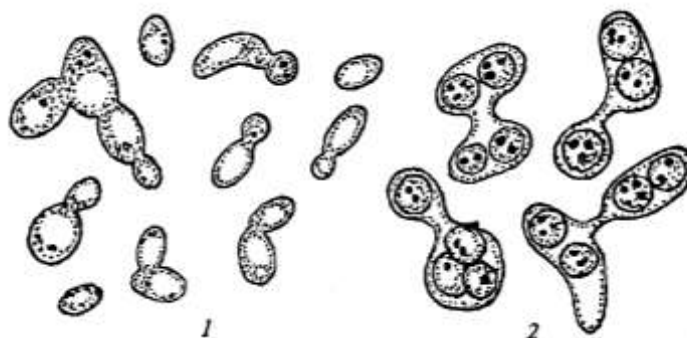


Рис. 4. *Zygosaccharomyces*:

1 — почкующиеся клетки; 2 — азитотические аски с аскоспорами

Семейство *Saccharomycodaceae*, вид *Hanseniaspora* (рис. 5) имеет мелкие, лимоновидные, овальные клетки. Вегетативное размножение осуществляется биполярным почкованием на широком основании. В аски превращаются непосредственно вегетативные клетки. В аске образуются 1 ...4 шляпковидные или круглые аскоспоры; сбраживают сахара, абсолютно нуждаются в инозите и пантотеновой кислоте. В природе встречаются на сочных сахаристых плодах, на винограде, вызывают порчу бродильных производств.

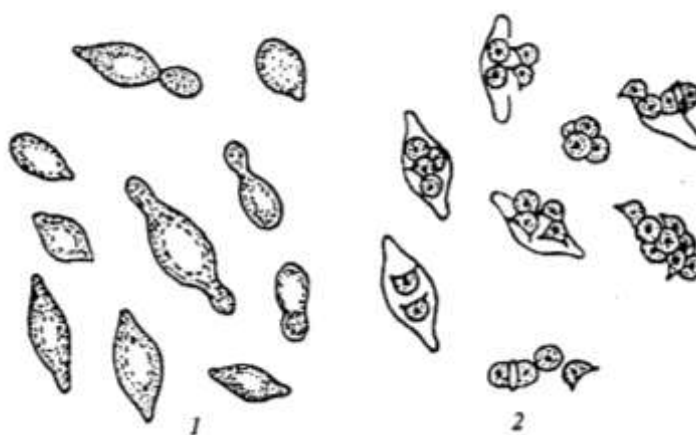


Рис. 5. *Hanseniaspora*:

1 - апикулянтные клетки с биполярным почкованием; 2 - аски со спорами.

Еще один вид этого семейства *Saccharomycodes* имеет крупные клетки (до 20 мкм в длину), лимоновидные или удлинненно-овальные. Вегетативное размножение осуществляется биполярным почкованием на широком основании. Аски образуются непосредственно из вегетативной клетки. В аске бывает 2 или 4 аскоспоры. Сбраживают сахара. Известен всего один вид *Saccharomycodes ludwigii* (рис. 6).

В природе встречается на поверхности плодов, в самозабродивших плодовых и ягодных соках. В виноделии часто вызывает порчу процессов брожения.

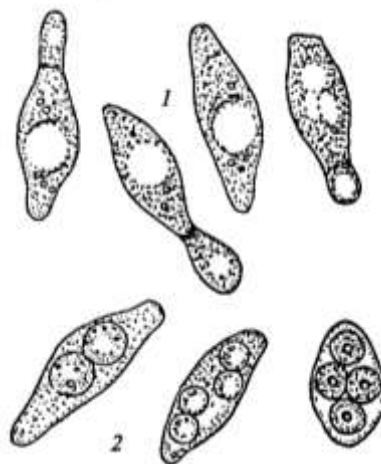


Рис. 6. *Saccharomycodes ludwigii*:

1 — апикулятные клетки с биполярным почкующимся делением; 2 — аски со спорами, попарно копулирующими непосредственно в аске.

Наиболее формальным, сборным и несовершенным родом является род *Candida*, в который входит 15 аскомицетовых видов дрожжей. Виды рода *Candida* имеют круглые, овальные или удлинённые, иногда яйцевидные, треугольные или серповидные клетки. Вегетативное размножение осуществляется истинным почкованием, иногда образуют псевдомицелий. Род кандида самый крупный среди дрожжевых грибов и включает в себя около 200 видов несовершенных аскомицетовых дрожжей. Среди кандиды есть патогенные виды.

Базидиомицетовые дрожжи. Базидомицетовые дрожжи имеют мицелиальную и одноклеточную почкующиеся стадии развития. Идентификация их довольно сложна. К базидиальным дрожжам отнесены классы ржавчинных грибов (*Urediniomycetes*), головневых грибов (*Ustilaginomycetes*) и класс *Hymenomycetes*. Ржавчинные и головневые грибы являются паразитами многих сельскохозяйственных растений.

Из класса головневых грибов интересен вид *Malassezia*, который является комменсалом человека и теплокровных животных, обитающим на поверхности кожи и на волосном покрове. Этот гриб может вызывать различные заболевания кожи. Клетки *Malassezia* овальные, удлинённые, грушевидные, ламповидные. Вегетативное размножение осуществляется монополярным почкованием на широком основании. После отделения почки на клетке остается рубец в виде валика. При развитии на коже образует мицелий с гроздьями бластоспор.

К базидеомицетовым дрожжам, которые известны только в виде одноклеточных форм относятся *Rhodotorula* (рис. 7), которая образует красные, розовые, оранжевые или белые и кремовые колонии на агаризованной среде. Клетки родоторулы круглые, овальные, удлинённые, у некоторых видов веретеновидные и сигаровидные. Вегетативное размножение осуществляется многосторонним или полярным почкованием. Могут образовывать псевдомицелий. Не бродят.

Задание №1. Выделение элективной культуры дрожжей.

Многие дрожжи являются возбудителями спиртового брожения - процесса разложения сахара с образованием этилового спирта и углекислого газа. Дрожжи

являются сапрофитами. Среди них есть факультативные анаэробы и аэробы. Оптимальная температура их развития 25...30°C, оптимальное значение pH среды 4... 6. Получение элективной культуры дрожжей основано на способности их расти в сахаросодержащих субстратах со слабокислой реакцией и на их устойчивости к этиловому спирту.

Цель работы: получение и изучение элективной культуры дрожжей.

Оборудование и инструменты: стерильные пробирки с поплавком с жидкой питательной средой для культивирования плесневых грибов и дрожжей, изюм или виноград, бактериальная петля, предметные стекла, покровные стекла, краситель, иммерсионное масло.

Методика выполнения

1. В пробирку с поплавком с жидкой питательной средой для культивирования плесневых грибов и дрожжей с поплавком внести пинцетом 2...3 ягоды винограда или изюма. Пробирку закрыть и поместить в термостат при температуре 25...30°C.

2. На следующем занятии выявить накопление дрожжей по наличию в питательной среде осадка и характерных продуктов их жизнедеятельности. Отметить наличие осадка, указывающего на размножение в среде микроорганизмов. Образование углекислого газа установить по накоплению газа в поплавке. Наличие углекислого газа можно обнаружить в виде пены на поверхности среды. Образование спирта обнаруживают по алкогольному запаху забродившего сусла, который усиливается при нагревании.

3. Определить накопление дрожжей микроскопическим путем. Микроскопировать осадок, образовавшийся в сусле, приготовив из него препарат типа «раздавленная капля».

Задание 2. Изучение морфологии дрожжей.

Цель работы: изучить культуральные признаки дрожжей, морфологические признаки дрожжей, выявить наличие почкующихся клеток; определить полноценность дрожжевой клетки, выявив наличие гликогена, волютина, жира, определить наличие живых и мертвых клеток в препарате дрожжей.

Оборудование и инструменты: чашки Петри с колониями дрожжей, пекарские, пивные дрожжи, забродившие пищевые продукты, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, спирт с глицерином (1:1), красители, лупы, биологический микроскоп.

Методика выполнения

1. Изучение культуральных признаков колоний дрожжей. Описать колонии дрожжей на плотной питательной среде и представить результаты в табл. 1.

Таблица 1.

Культуральные признаки дрожжей.

Признаки	Номер колонии			
	1	2	3	4
Размер				
Цвет				
Форма				
Поверхность				
Консистенция				
Прозрачность				
Изменение цвета вокруг колонии				

Край колонии				
Структура				
Характер блеска				
Профиль колонии				

2. Изучение морфологических признаков колоний дрожжей. Форма вегетативных клеток дрожжей разнообразная: округлая, овальная, яйцевидная, цилиндрическая, лимоновидная и др. Дрожжи наряду с круглыми и овальными клетками могут образовывать длинные клетки псевдомицелия. Многие дрожжи размножаются почкованием. При почковании на поверхности клетки образуется маленький бугорок - почка, который постепенно увеличивается до размеров материнской клетки. При одновременно или последовательно формирующихся почках на разных сторонах материнской клетки происходит множественное или многостороннее почкование. Размножение делением осуществляется за счет образования поперечной перегородки - септы.

2.1. Приготовить препарат дрожжей «раздавленная капля». При микроскопировании с объективом 40 определить форму дрожжевой клетки и зарисовать. Выявить почкующиеся клетки и зарисовать их. Результаты занести в табл. 2.

Таблица 2.

Форма клеток и почкование дрожжей

Номер п/п	Форма клетки (рис)	Почкование (рис)

2.2. Приготовить окрашенные препараты дрожжей. Выявить гликоген, волютин. Результаты записать в табл. 3.

Таблица 3.

Внутриклеточные включения дрожжевых клеток.

Номер колонии	Наличие гликогена	Наличие волютина	Наличие жира

Окраска гликогена

На чистое предметное стекло наносят небольшую каплю суспензии микроорганизмов и к ней добавляют такую же каплю раствора I_2 в KI (7 г I_2 и 20 г KI на 100 мл дистиллированной воды). Сверху помещают покровное стекло, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат просматривают. После этого рассматривают препарат с масляной иммерсией. Наличие в клетке зернышек бурого цвета, крапинок и капелек свидетельствует о присутствии гликогена.

Окраска волютина

А. На обезжиренное стекло наносят тонкий мазок, сушат его на воздухе, фиксируют над пламенем и окрашивают карболовым фуксином Циля. Через 0,5-1 мин. Промывают препарат водой, обесцвечивают 20-30 с. 1% раствором H_2SO_4 , промывают, дополнительно 20-30 с окрашивают метиленовым синим, промывают, промокают и смотрят с иммерсионной системой. Гранулы волютина окрашены в красный цвет на фоне синей цитоплазмы.

Б. Для выявления волютина на фиксированный жаром препарат дрожжей наливают 1...2 капли метиленовой сини. Через 3 мин препарат ополаскивают водой и накрывают покровным стеклом. Сбоку под стекло подводят каплю 1%-ного раствора серной кислоты, которая обесцвечивает все части клетки, кроме волютина. При микрокопировании волютин можно обнаружить в виде капель сине-фиолетового цвета; протоплазма имеет голубой цвет.

Окраска жира

А. Для простой окраски жира на предметное стекло помещают каплю дрожжевой эмульсии, приливают каплю раствора Судана III и дают препарату немного постоять. Под микроскопом протоплазма клетки бесцветна, а жир красного цвета.

Б. На предметное стекло наносят небольшую каплю 40%-ного раствора формалина. Петлей в нее вносят культуру микроорганизма. Формалин убивает клетки и разрыхляет их оболочки. Через 5 мин в эту же каплю добавляют небольшую каплю метиленового синего, а спустя 10 мин - каплю Судана III (растворимого в жире красителя, индикатора жироподобных веществ). Образовавшуюся общую каплю накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и микрокопируют препарат с иммерсией. Цитоплазма клеток окрашивается в синий цвет, включения жира - в розово-оранжевый.

2.3. Приготовить препараты дрожжевых клеток, окрашенные метиленовой синью. Определить наличие живых и мертвых клеток, а также количество почкующихся клеток. Результаты записать в табл. 4. Окрашенные клетки дрожжей являются мертвыми.

Таблица 4.

Мертвые и живые клетки в препаратах дрожжей.

Номер колонии	Наличие мертвых клеток, %	Наличие почкующихся клеток, %

Контрольные вопросы

1. Какой формы бывают клетки дрожжей?
2. Каковы размеры клетки дрожжей?
3. Как размножаются дрожжи?
4. При каких условиях у дрожжей образуются споры?
5. Как выявить в клетках дрожжей гликоген, волютин, жир?
6. Как приготовить препарат дрожжей для их прижизненного микроскопического исследования?
7. Что такое спиртовое брожение, и каково его биологическое значение для дрожжей?

Лабораторная работа 7 (2 ч).

Тема: Определение роста и биосинтетической активности грибов.

Цель – изучить особенности роста и биосинтетической активности грибов.

Задачи работы:

1. Изучить особенности роста грибов на питательных средах.
2. Освоить методику определения биосинтетической активности 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:

Рост — процесс, сопровождающийся увеличением биомассы гриба благодаря увеличению размеров и числа клеток.

Увеличение размеров клеток и их числа происходит в результате сложных, последовательно изменяющихся как общих для организмов, так и видоспецифических процессов метаболизма в жизненном цикле грибов. Особенность метаболических процессов обусловлена генетическими свойствами грибного организма, условиями культивирования, обычно сочетанием этих свойств. Реакция на изменение условий культивирования, компонентов питательной среды, pH, температуры, степени аэробности и другие может сопровождаться изменением морфологии и процессов метаболизма в пределах генотипа или негенетической изменчивостью, обуславливающей возникновение мутантов, новых рас и форм. У большинства грибов верхушечный рост происходит благодаря растяжению внутренней оболочки верхушечной клетки, непрерывному притоку к ней протоплазмы и синтезу в ней материалов клеточной оболочки вновь образуемых клеток.

Скорость роста гиф у разных видов грибов неодинакова, она зависит от их генетических особенностей, а также от условий культивирования. Но скорости роста грибы бывают быстрорастущие и медленно- или ограниченнорастущие. Например, быстрорастущая головная гифа *Neurospora crassa* за 1 ч достигает 5 мм длины. Кроме линейного роста головного гифы, гифы обладают способностью ветвиться и вновь ответвленные участки гифы — к последующему верхушечному росту. Таким образом, уровень роста у многих грибов бывает весьма высоким, удваивание числа клеток гиф у быстрорастущих видов как *Neurospora*, *Trichoderma*, некоторых видов *Mucorales* может происходить при благоприятных условиях на протяжении 1—2 ч. Ограниченный рост наблюдается у многих видов пенициллов при культивировании на среде Чапека, являющейся одной из диагностических сред для грибов этого рода.

В связи с верхушечным ростом клетки грибной гифы неоднородны по ее длине. Растущий коней гифы богат цитоплазмой, содержит митохондрии, активен в отношении процессов образования клеточной стенки, в нем повышено содержание РНК и белка, щелочной фосфатазы, которая участвует в процессах фосфорилирования.

Клетки предделяющегося участка наиболее активны в отношении роста, а клетки, лежащие за ними, лишены функционирующей протоплазмы, которая устремляется к верхушке, и содержат много вакуолей. Физиологическая роль вакуолизированных клеток заключается в способности их выталкивать протоплазму к верхушечной клетке, аккумулировать резервные вещества, многие из которых обладают высоким осмотическим давлением, что, по-видимому, и обеспечивает выталкивание цитоплазмы через пору в поперечной перегородке.

Предверхушечные клетки содержат гликоген, который, очевидно, гидролизует, и в виде сахаров поступает в верхушечную клетку и используется для синтеза клеточной оболочки. Дрожжеподобный рост характеризуется для большинства дрожжей образованием почки, которая, достигая размеров основной клетки, отпочковывается, у некоторых видов рост происходит путем деления или деления и почкования. Рост плазмодимальных грибов — миксомицетов — характеризуется образованием новой

протоплазмы, увеличением всей ее массы, хотя не все части плазмодия однородны. Каждая из вновь образуемых клеток или комочек протоплазмы способны размножаться и давать начало новому организму.

Рост грибов может происходить путем увеличения числа особей, т. е. как популяций индивидуальных клеток или путем удлинения гиф, их разветвления, т. е. как многоклеточного организма со свойственной ему в той или иной степени выраженной дифференциацией.

В зависимости от условий культивирования многие мицелиальные грибы могут расти почкованием и, наоборот, дрожжеподобные — мицелием. Кроме этого, многие грибы при погруженном культивировании способны образовывать конидии, клетки, подобные оболочкам склероциев, т. е. проявлять более или менее выраженную морфологическую дифференциацию, которую необходимо учитывать при характеристике роста грибов.

Методы измерения роста. Рост измеряется увеличением размеров клеток, их массы, объема в определенное время, т. е. рост при определенных условиях культивирования является функцией времени.

Наиболее эффективными условиями для максимального накопления биомассы, определенного метаболита, особенно внеклеточного, часто является использование генетических особенностей продуцента и физиологических условий культивирования. Морфологические особенности грибов, апикальный рост и система ветвления гиф, ценоцитический тип септирования характеризуют качественную неоднородность, различную метаболическую активность клеток гиф в процессе роста, морфогенетической дифференциации, репродукции.

Возрастная разнокачественность клеток гиф наиболее четко выражена при поверхностном росте колонии на агаризованных питательных средах, значительно менее при определенных условиях в периодической погруженной культуре и наиболее однотипны клетки гиф в непрерывной. Несмотря на то, что мицелиальные грибы были первыми организмами, культивируемыми в погруженных условиях, к настоящему времени вопрос качественных и количественных критериев оценки ростовых процессов и связанной с ними биосинтетической активности у них разработан в значительно меньшей степени, чем у бактерий и дрожжей.

Морфологические параметры роста гифальных грибов. Спора — орган полового и бесполого размножения грибов, различных способов образования. Как и хламидоспоры, гены хламидоспорного типа клетки. Склероции до их прорастания относятся к покоящимся формам жизненного цикла грибов. В них почти отсутствуют ростовые процессы и очень низкая активность метаболизма. При прорастании спор (конидий, спорангиоспор, сумкоспор, базидиоспор) отмечают интенсивность прорастания спор, размеры ростковой трубки и длины ее до первой перегородки. Затем исследуется рост гифы — длина и ширина главной гифы, время образования перегородок до появления ветвления первого порядка, размеры гиф и число клеток ветвлении второго, третьего и т. д. порядков.

Дифференциация клеток мицелия с возрастом и истощением отдельных источников питания и энергии заключается в изменении ширины, длины клеток гиф, наличия так называемых фрагментов «эвакуированного» мицелия, т. е. образования нежизнеспособных клеток, из которых содержимое через поры перегородок перемещено в другие клетки.

Цикл развития грибов при культивировании — от прорастания споры до процесса образования репродуктивных органов — у разных видов неодинаков и зависит от многих факторов. При росте колонии обычно образуемые споры не прорастают; при погруженном периодическом культивировании образуемые споры (особенно видов *Aspergillus*,

Penicillium, *Trichoderma*, *Fusarium* и др.) нередко сразу прорастают мицелием и дают один или несколько генераций репродуктивного процесса. При этом изменяются размеры и число спор разных генераций репродуктивного процесса и продолжительность цикла развития. Соотношение мицелиального, спорового или дрожжеподобного типов роста в культуре зависит от условий культивирования и свойств грибного организма. Многим грибам свойственен диморфизм, т. е. способность роста в гифальной или дрожжеподобной форме.

Фазы роста грибов. 1. Прорастание спор включает; а) набухание — увеличение их объема вследствие превращений эндогенных и экзогенных субстратов и начальных процессов метаболизма, т. е. синтеза нуклеиновых кислот, белков. Обычно продолжительность фазы 4—8 ч в зависимости от свойств культуры гриба и условий культивирования; б) образование ростковой трубки до первой перегородки или определенной ее длины у грибов с несептированным мицелием до появления ветвления. 2. Лагфаза — фаза начального роста мицелия (ветвления). Как и у одноклеточных организмов в зависимости от условий продолжительность различна. Период замедленного роста мицелия (ветвления). Период замедленного роста связан с индукцией соответствующих ферментов, комплекс которых зависит от источников питания и энергии. Продолжительность лагфазы в значительной мере зависит от качества инокулюма, степени его предварительной адаптации к данным условиям среды, генетической однородности посевных спор, интенсивности их прорастания и других факторов. 3. Фаза ускоренного роста, когда уровень роста мицелия увеличивается не постоянно. 4. Фаза экспоненциального (неуклонного и равномерного) роста продолжается до истощения одного из лимитирующих рост субстратов или факторов среды, или образования в процессе роста метаболитов, ингибирующих рост. Характеризуется наиболее активными метаболическими процессами, связанными с синтезом веществ грибного организма. 5. Фаза старения. Характеризуется спадом метаболических процессов, связанных с ростом, истощением питательной среды, образованием и накоплением вторичных продуктов метаболизма в клетке и среде, спорообразованием, явлениями автолиза мицелия, выражающимися в снижении массы мицелия, а также морфологической его дифференциацией, связанной с образованием хламидоспорового типа клеток, полых клеток, иногда образованием протопластов и реже лизисом отдельных клеток.

Продолжительность той или иной фазы роста зависит от видовых особенностей гриба, условий культивирования, среды, густоты инокулюма, степени аэрации и др. Показателями роста является длительность лаг- (Lag) или начальной фазы, скорость роста, урожайность или биомасса мицелия к концу опыта. Продолжительность лагфазы (адаптивной фазы) может быть сокращена или она может отсутствовать при наличии оптимальных условий — источников питания, температуры, pH среды. Стационарная фаза может быть также сокращена или увеличена в зависимости от цели опыта добавлением питательных веществ, введением ингибиторов одних систем, стимуляторов других, изменением температуры, pH среды, добавлением окислителей или восстановителей и других факторов.

Наиболее простые способы определения уровня (быстроты) роста — определение линейного роста и числа клеток или биомассы.

Линейный рост определяется измерением увеличения диаметра колонии на плотной среде, обычно в чашках Петри, через определенные промежутки времени. В некоторых случаях измерение производят в специальных пробирках с горизонтальным застывшим слоем плотной среды равномерной толщины. Измерение производят от места посева до зоны конца роста мицелия.

Однако уровень распространения мицелия на плотной среде не является показателем общего роста мицелия — ветвления гиф, т. е. увеличения биомассы гриба. Этот метод определения мало пригоден для изучения пригодности разных компонентов среды, т. к. более сильное распространение по поверхности субстрата может иметь место на средах с менее пригодными субстратами. Он применяется при использовании благоприятной среды для изучения влияния других факторов — температуры, ингибиторов и других. Метод позволяет учитывать количество ветвления гиф, уровень роста боковых гиф (ветвление), перенос питательных компонентов от отдельной гифы к растущему концу и т. д.

Определение роста и активности метаболизма включает разнообразное число биохимических методов определения активности процессов, связанных с ростом. Однако рост мицелия, т. е. увеличение числа клеток, не всегда коррелирует с биосинтетической активностью, а в некоторых случаях отмечается обратная зависимость. Наиболее четко коррелирует с ростом мицелия содержание белка, нуклеиновых кислот, активность дыхания, потребления источников питания и выделения в среду различных метаболитов, ферментов. Определение метаболической активности необходимо для характеристики фаз роста гриба при различных способах культивирования, реакции на изменение субстрата или действия других факторов. Скорость роста выражается временем, необходимым для удвоения числа клеток, у грибов она может быть выражена временем образования верхушечных клеток гифы и ее ветвлений (из каждой апикальной клетки образование новой) или из внесенной конидии при посеве новых клеток при дрожжеподобном типе роста, спорообразовании.

Скорость роста зависит от влияния внешних факторов и изменения внутриклеточной организации, активности различных ферментных систем, вызывающих ее увеличение или уменьшение. Коэффициент размножения ($K_{размн}$) — отношение числа новых клеток на одну внесенную, образованных в течение 1 ч, устанавливают при немиецелиальном типе роста грибов. Например, при погруженном культивировании некоторых видов фузариев, пенициллов, аспергиллов и других грибов рост происходит почти полностью путем образования новых конидий, мицелиальная фаза сводится до минимума. В этом случае возможно определение коэффициента размножения с некоторой поправкой на число клеток в гифах мицелия.

Коэффициент роста (K_p) представляет отношение числа клеток на использованный источник энергии (сахар).

Молярный коэффициент роста ($M_{кр}$) представляет более точное выражение коэффициента роста; он показывает отношение числа образовавшихся клеток или их сухой массы (мг) на 1 мкмоль субстрата. При обратном отношении, т. е. числа мкмолей вещества на определенное число клеток, возможно выразить потребность одной клетки и определенного их урожая. Молярный коэффициент роста позволяет также установить связь между интенсивностью роста и накоплением источников энергии. Это имеет значение для регулирования роста с целью получения продуктов брожения или биосинтеза метаболитов.

В настоящее время разными учеными предложены многочисленные уравнения зависимости удельной скорости роста и многочисленных факторов. Кинетические модели основываются на знании процессов метаболизма, ферментных систем, метаболитов и факторов активирующих или ингибирующих отдельные его звенья. Особенно это необходимо при культивировании с целью сверхсинтеза определенного продукта метаболизма, при котором известными факторами ограничивают функцию систем не связанных или с биосинтезом метаболита или инактивирующим его и создаются условия для его максимального биосинтеза.

Методы математического моделирования позволяют установить характер связи между входными и выходными параметрами процесса роста и биосинтетической активности грибов, которые обычно включают главнейшие процессы: кинетику роста, образование продуктов метаболизма, автолиз биомассы, инактивации известны продуктов метаболизма, потребления отдельных компонентов питательной среды, изменения рН среды, температуры и другие.

Определяется зависимость роста от таких факторов как концентрация в среде лимитирующих рост субстратов, ингибирующих или стимулирующих метаболитов, значение рН, концентрации биомассы и других. Однофакторные кинематические уравнения определяют зависимость скорости роста микроорганизмов от одного фактора, многофакторные — от нескольких параметров.

Рост мицелиальных грибов дублируется при постоянной скорости и единица роста могут быть выражены математической зависимостью. Удлинение отдельной гифы идет при постоянной скорости линейного роста, а в сумме линейный рост — экспоненциален. Ростовую гифальную единицу определяют как отношение между общей длиной гиф и количеством гифальных кончиков в культуре.

$$\text{Единица роста} = \frac{\text{Общая длина гиф или мицелия}}{\text{количество апексов}}$$

Наблюдение обычно проводится на мицелии видов дейтеромицетов, муковых и некоторых других, который имел общую длину 1,5—3,5 мм. Боковые ветвления обычно образуются ниже перегородки гифы или рядом с ней, и их развитие может разделяться на 3 фазы. Первая продолжается 10 мин, в течение которой веточки удлиняются экспоненциально с очень большой скоростью. С увеличением скорости роста наступает вторая фаза, при которой гифы достигают постоянной скорости линейного роста, продолжается около 44 мин после начала ветвления. В этом случае линейная скорость роста боковых ветвлений была на 31% ниже, чем у главных гиф. С наступлением третьей фазы устанавливается постоянная скорость роста апикальных и боковых ветвлений.

Кинетика роста колонии. Радиус колонии грибов и длина неразветвленной гифы возрастают линейно от времени (при постоянном уровне Кр) и определяются следующим уравнением:

$$R_1 = R_0 + K_p (t_1 - t_0),$$

где R_1 — радиус колонии или длина гиф в данное время $|t_1|$ R_0 — радиус колонии при t_0 ; K_p — константа уровня роста.

Уровень роста рассчитывается по измерениям, проведенным через определенные промежутки времени (от 9 до 18 час, через каждые час 15 мин). Первоначально рост колонии и прорастающих спор устанавливают фотографированием растущей на пленке культуры под микроскопом через каждые 15 мин с последующим измерением размеров в пленке при увеличении $\times 300$, $\times 650$. Для разных видов грибов время удваивания длины ростковой трубки прорастающей споры различно, но, как правило, оно меньше, чем время для удваивания длины гифы. Исследования структуры, локализации компонентов в грибной клетке и их физиологической функции проводят на клеточном и молекулярном уровнях. В соответствии с этим изучают: 1) интактные, или растущие клетки мицелия; 2) гомогенаты их в соответствующих буферных или молярных растворах; 3) клеточные оболочки, получаемые при разрушении клеток грибов; 4) компоненты клеток грибов и включения — протопласты, митохондрии, рибосомы и другие, обычно получаемые путем дифференциального центрифугирования; липиды, полифосфаты, гликоген, обычно определяемые цитохимическими методами и дифференциальным центрифугированием; 5)

растворимые компоненты, в том числе такие высокомолекулярные соединения как нуклеиновые кислоты, белки и другие, находящиеся в надосадочной жидкости при центрифугировании.

Используя intactные клетки мицелия или спор грибов, изучают влияние различных факторов среды, кинетику ферментативных процессов, идентификацию промежуточных продуктов и другие вопросы.

Приготовление экстрактов спор для определения активности ферментов в них проводят следующим образом: один грамм увлажненных, промытых спор при 4°C растирают в 2 г смоченного песка, разбавляют до 10 мл в 0,05 М фосфатного и 0,05 М сахарозного буфера, pH=7,4, приблизительно около пяти минут, центрифугируют 10 мин при 1200 об/мин, но для более полного освобождения от клеток до 10 000—100 000 g, надосадочная жидкость используется для определения ферментов в непрорастающих спорах. Аналогичным образом получают экстракты в различные периоды времени при прорастании спор (конидий) и росте мицелия. Песок предварительно промывают кислотой, тщательно промывают водой, ступка и песок также перед употреблением для растирания охлаждаются.

Биосинтетические процессы нерастущим мицелием изучаются при условиях острого недостатка питательных веществ (голодания) или ингибирования роста хлорамфениколом, температурой, анаэробизмом и другими факторами. Гомогенность растущего мицелия зависит от многих факторов: способов культивирования, способности гриба к мицелиальному или дрожжеподобному росту в определенных условиях, скорости и уровня роста и многих других. Следует отметить, что чем в большей степени выражен мицелиальный рост, тем более гетерогенны клетки гиф мицелия.

Синхронные культуры характеризуются одновременным делением клеток. Синхронизация достигается путем воздействия определенными факторами, химическими, физическими, которые задерживают деление клеток, но не их рост, при устранении действия которых наступает одновременное деление клеток популяции. К числу факторов, задерживающих деление клеток, можно отнести самые разнообразные — температура, субстраты, мутантные штаммы и др. Метод применяется с успехом в бактериологии, при изучении дрожжей, дрожжеподобных, редко мицелиальных грибов. Изучение локализации химических компонентов клетки также проводится с использованием многих современных методов исследования. Из них наиболее общими и широко применяемыми являются дифференциальное центрифугирование гомогенатов грибных клеток и цитохимический метод.

Дифференциальное центрифугирование предполагает предварительное разрушение клеток гифы. Этот процесс у грибов представляет значительные трудности в связи с устойчивостью их оболочек к разрушению. Существует ряд методов разрушения клетки применяемых в микробиологии и других биологических исследованиях. Клеточные оболочки могут быть разрушены путем ферментативного переваривания их и получения протопластов, при воздействии ультразвука, путем попеременного замораживания и оттаивания, при осмотическом шоке или путем плазмолиза, путем механического растирания мицелия с кварцевым или стеклянным песком. Последний метод для разрушения гиф грибов применяется наиболее часто, он дает довольно высокий процент разрушения клеток, в то время как другие методы дают сравнительно низкий процент разрушения клеток.

Растирание клеток грибов в определенных навесках мицелия производят на холоду (4—5°C), с определенными объемами буферных или молярных растворов, состав которых и концентрации часто устанавливаются экспериментально. Например, при получении из разрушенных клеток гиф митохондрий, разрушение обычно производят в 0,25—0,88 М

растворах сахарозы или маннита (у грибов, гидролизующих сахарозу), раствор буферируют при определенном значении pH органическими кислотами.

Биосинтетическая активность гриба, в самом общем представлении, определяется количеством веществ, потребленных на образование единицы биомассы или определенного метаболита за единицу времени. Следовательно, она тесно связана с процессами роста, многими физиолого-биохимическими процессами жизнедеятельности гриба. Например, чем меньше, затрачено питательных веществ для образования биомассы или метаболита в единицу времени, тем выше биосинтетическая активность. Рост и биосинтетическая активность зависят от пригодности отдельных, компонентов среды.

Пригодность различных источников питания (и других факторов) для гриба выражается не только уровнем роста мицелия, но и зависит от времени его максимального накопления. При росте на средах с более пригодными источниками углерода, как правило, отсутствует или сводится до минимального времени lag-фаза или фаза адаптации и максимальная масса мицелия наступает в более раннем возрасте культуры. Обычно пригодность источников углерода определяют по массе мицелия на единицу использованного источника углерода, по количеству вещества, непосредственно включенного в мицелий (если это можно определить). Уровень превращения источника углерода определяют по так называемому «экономическому коэффициенту», который представляет собой отношение сухой массы мицелия (в г, мг) в определенном объеме среды к количеству потребленного источника углерода (в г, мг) за определенное время, иногда выраженное в процентах. Экономический коэффициент зависит от особенностей вида гриба, возраста культуры, условий культивирования — состава среды, аэрации, способа выращивания. Наиболее высокий экономический коэффициент при минимальном выделении углекислоты и растворимых метаболитов в среду. Следовательно, уровень роста мицелия и использования источника углерода тесно связан с процессами дыхания, аэробного и анаэробного окисления субстрата. Интенсивность этого процесса определяется отношением количества выделенной углекислоты и поглощенного кислорода, называемым «дыхательным коэффициентом», также иногда выражаемым в процентах:

$$\frac{\text{CO}_2 \text{ мл}^3}{\text{O}_2 \text{ мл}^3} \cdot 100.$$

При постановке опытов в аппарате Варбурга могут изучаться клетки, их гомогенаты, неклеточные экстракты. В клетках определяют эндогенное дыхание, т. е. способность окислять различные субстраты. При определении «субстратного дыхания», т. е. способности клеток к окислению различных субстратов (окислительной способности клеток), проводят предварительное истощение субстрата эндогенного дыхания. С этой целью мицелий фильтруется, промывается несколько раз буферным раствором или солевой средой, затем определенная навеска помещается в солевую среду без источника углерода и фосфатный буфер (или иной, установленный экспериментально), pH=7,0 и в течение длительного времени инкубируется при усиленной аэрации (до 40 ч), фильтруется и используется для опыта в виде целых клеток или полученных из них митохондрий и других фракций. Активность субстратного дыхания также определяют по разнице между количеством поглощенного кислорода в определенное время при окислении субстрата и без субстрата.

Окисление субстрата должно сопровождаться биохимический анализом образуемых в процессе окисления продуктов реакции, что позволяет определить характер превращения субстрата. Скорость поглощения кислорода выражается коэффициентом

Qo2, показывающим количество поглощенных микролитров кислорода за определенное время на единицу клеточной массы. Аналогичный коэффициент рассчитывается на поглощенную углекислоту. Кроме «дыхательного коэффициента» и скорости поглощения кислорода, можно использовать и другие показатели для характеристики метаболизма: Qo2 (N) — количество азота, поглощенного в определенное время. Qo2 (P) — то же, рассчитанного на 1 мг (мкг) фосфора клеток. Qo2 (C) — то же, рассчитанного на 1 мг (или мкг) углерода в клетках. Qo2 — то же, рассчитанного на одну клетку. Применение этих показателей при изучении грибов возможно в случае дрожжеподобного типа роста или подсчета живых клеток при росте септированных гиф, или измерении числа ветвлений и уровня удлинения в препаратах культуры с несептированными гифами (например, мукоральных грибов). Некоторые показатели могут быть использованы для характеристики процессов метаболизма на разных фазах роста грибов и при биосинтезе определенных метаболитов. Это отношение:

1) общего азота/сухой массе 2) РНК/ДНК
 3) потребленного кислорода / глюкозе 4) потребленного кислорода / общему или белковому азоту
 5) содержание метаболита в клетке / общему биосинтезу и другие.

Скорость образования метаболита или продуктивность мицелия выражается количеством вещества, образованного в определенное время, рассчитанного на единицу биомассы или белка. При определении количества вещества учитывают суммарный синтез, т. е. количество, образованное в мицелии и культуральной жидкости. Формулу для определения скорости флавиногенеза у *Candida guillier-mondii*, вероятно, можно применять для определения скорости биосинтеза других метаболитов у мицелиальных грибов:

$$PФ = \frac{PФ_2 - PФ_1}{BМ_2 - BМ_1} \cdot M,$$

где рф — скорость биосинтеза; РФ2 — общее содержание метаболита (суммарный синтез) в конце культивирования; РФ1 — то же в начале культивирования; БМ2 — биомасса в конце культивирования; БМ1 — то же в начале культивирования; М — удельная скорость роста.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте особенности роста грибов на питательных средах.
2. Как определяют биосинтетическую активность грибов?

Лабораторная работа 8 (2 ч).

Тема: Ферменты грибов. Определение протеолитической, гемолитической и фосфолипазной активности грибов.

Цель – изучить методы определения ферментов грибов.

Задачи работы:

1. Освоить методику определения гемолитической активности.

2. Освоить метод определения протеолитической активности
3. Освоить методику определения фосфолипазной активности.

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

Описание (ход) работы:

Гемолитическая активность определяется по методике Биргера М.О. (1982). На 5% кровяной агар засевают суточную культуру грибов. После 24 часов инкубации при 37°C проводят учет результатов по наличию или отсутствию вокруг колоний прозрачной зоны (зоны полного просветления среды).

Фосфолипазную активность (ФЛА) определяют по методике Т.С. Богомоловой (1990). Для этого чистую культуру гриба высевает методом секторного посева на чашки с плотной средой Сабуро с добавлением яичного желтка так, чтобы получить изолированные колонии. Посевы инкубируют при 37°C в течение трех суток. Затем проводят измерение диаметра выросших колоний и диаметра зоны помутнения среды вокруг колоний штаммов, проявивших фосфолипазную активность. Рассчитывают показатель фосфолипазной активности $K_{ФЛА}$, равный отношению диаметра зоны помутнения среды к диаметру колонии. Результаты интерпретируют следующим образом: $K_{ФЛА} > 2$ - высокая ФЛА, $1,5 < K_{ФЛА} < 2$ - умеренная ФЛА, $K_{ФЛА} < 1,5$ - низкая ФЛА.

Протеолитическую активность определяют по убыли альбумина после инкубации с исследуемыми штаммами грибов биуретовым методом.

К 0,5 мл взвеси микроорганизмов добавляют 1 мл 1%-ного раствора альбумина в К-фосфатном буфере (рН=7,5), перемешивают и инкубируют 30 мин при 37°C. Реакцию останавливают на льду. Затем осаждают клетки центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. После чего, 1 мл супернатанта смешивают с 2-мя мл биуретового реактива. После 10 мин экспозиции при комнатной температуре, для созревания окраски, измеряют оптическую плотность полученного раствора ($\lambda=550$ нм, объем кюветы 2 мл) против биуретового реактива. Контроли получают смешиванием 0,5 мл супернатанта с 1 мл изотонического раствора NaCl (контроль 1) и 1 мл 1%-ного раствора альбумина с 0,5 мл изотонического раствора NaCl (контроль 2). Активность протеазы рассчитывают по формуле:

$$A_{пр} = 10 \times (1 - (D_0 - D_{k1}/D_{k2}))/t \times D_m,$$

где D_0 – оптическая плотность в опыте;

D_k – оптическая плотность в контроле;

D_m – оптическая плотность взвеси микроорганизмов;

t – время инкубации.

Контрольные вопросы

1. Что такое гемолитическая активность грибов?
2. Что такое фосфолипазная активность грибов и как проводят ее изучение?
3. Что такое протеолитическая активность грибов и как проводят ее изучение?

Лабораторная работа 9 (2 ч).

Тема: Изучение антибиотических свойств грибов. Определение токсигенности грибов.

Цель – изучить методы определения продукции грибами антибиотиков и токсинов

Задачи работы:

4. Освоить метод агаровых блоков
5. Освоить методику определения токсических свойств чистых культур микроорганизмов.

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:

Для выявления микробов-антагонистов и изучения их антибиотической активности существуют методы, основанные на способности антибиотиков диффундировать в агаризованную среду.

Метод агаровых блоков заключается в следующем. Поверхность питательного агара, пригодного для развития испытуемого организма и образования антибиотического вещества, засевают сплошным "газоном" антагониста. После того как организм хорошо разовьется и образует антибиотическое вещество, которое диффундирует в толщу агара (для бактерий — 4—5 суток, для грибов — 6—8, для актиномицетов — 8—10 суток), стерильным пробочным сверлом вырезают агаровые блоки и переносят их на поверхность другой агаровой пластинки в чашке Петри, предварительно засеянной тест-организмом. После инкубации в термостате (время инкубации зависит от скорости роста тест-культуры) вокруг агаровых блоков образуются зоны отсутствия роста тест-организма в том случае, если антибиотическое вещество, выделяемое исследуемым организмом, угнетает рост тест-микроба). По диаметру зон судят об антибиотической активности изучаемого организма.



Зоны угнетения роста тест-организма вокруг блоков с антагонистами. Спектр антимикробного действия антагониста удобно определять с помощью следующих

методов. На питательный агар в чашки Петри высевают в виде штриха испытуемый организм. К выросшему микроорганизму подсевают перпендикулярно или в виде окружности тест-организмы. По другой модификации вырезают большой блок среды с культурой испытуемого антагониста и ставят в центр агаровой пластинки на чашке Петри. Тест-микробы подсевают штрихами по радиусам к блоку испытуемой культуры (рис.). Чашки инкубируют в термостате в течение 3—7 суток при 28—30°. Максимальное действие антибиотика проявляется на том организме, развитие которого начинается на большем расстоянии от блока.

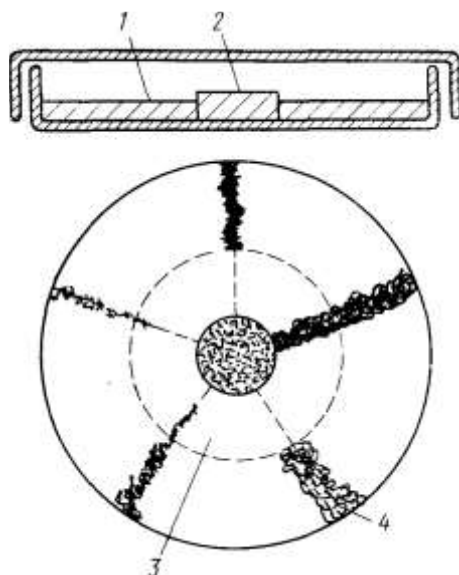


Рис. Схема опыта по определению антимикробного спектра актиномицета-антагониста: 1 — среда для развития тест-организмов; 2 — агаровый блок с антагонистом; 3 — зона диффузии антибиотика; 4 — штрих тест-организма.

Определение токсических свойств

чистых культур микроорганизмов. Для определения токсичности выделенных из почвы культур микроорганизмов их предварительно выращивают в жидких питательных средах в покое или на качалке. Определение токсичности культуральной жидкости производят у бактерий на 2—3-й день, у актиномицетов на 5—10-й день, у грибов на 7—10-й день роста. В качестве тестов для определения токсинов используют семена различных растений. Токсичность микроорганизмов определяют методом замочки семян.

Отфильтрованную культуральную жидкость разливают в стаканчики на 100 мл, отбирают по 20—50 семян растений, замачивают их в каждом сосуде на 24 ч. Для контроля семена замачивают на тот же срок в водопроводной воде и в стерильной питательной среде. Те и другие семена раскладывают на 89 увлажненной вате с фильтровальной бумагой в чашках Петри. Все чашки увлажняют равным количеством водопроводной воды. Токсичными считают культуры микроорганизмов, вызывающие либо снижение всхожести семян, либо угнетение развития проростков и корней более чем на 30% по сравнению с контролем.

Контрольные вопросы.

1. Какие антибиотики продуцируют грибы?
2. Какие токсины продуцируют грибы?
3. Как определяется способность грибов продуцировать антибиотики?
4. Как определяется способность грибов продуцировать токсины?

Лабораторная работа 10-11 (4 ч).

Тема: Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы. Изучение влияния температуры на развитие плесневых грибов. Определение влияния концентрации глюкозы в среде на развитие плесневых грибов. Определение влияния pH среды на грибы. Изучение действия УФ-лучей на грибы.

Цель – изучить влияние факторов внешней среды на грибы.

Задачи работы:

1. Освоить метод изучения влияния температуры на развитие плесневых грибов
2. Освоить метод определения влияния концентрации глюкозы в среде на развитие плесневых грибов
3. Освоить метод определения влияния pH среды на грибы

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:

Изучение влияния температуры на развитие плесневых грибов

Цель работы: определить оптимальную температуру роста плесневого гриба.

Оборудование и инструменты: чашки Петри с питательной средой для культивирования плесневых грибов, препаровальные иглы, флакон со смесью спирта и глицерина, чашки Петри или пробирки с культурой плесневого гриба.

Методика выполнения лабораторной работы. Сделать посев на чашки Петри (уколом в трех местах) спор плесневого гриба. Поместить чашки Петри в термостаты с разной температурой вверх дном. На следующем занятии измерить диаметр выросших колоний плесневых грибов и определить интенсивность роста. Показателем влияния температуры на развитие гриба служат диаметр колоний, выросших на агаризованной среде, отсутствие или наличие спороношения, а также степень спороношения, которая обычно устанавливается по величине окрашенной зоны колоний и интенсивности окраски. Результаты внести в табл. По результатам исследований сделать вывод, какая температура является оптимальной для роста данного плесневого гриба.

Таблица 4.1**Выявление оптимальной температуры роста и спороношения плесневых грибов**

Название плесневого	Показатель интенсивности развития (диаметр колонии, мм)	Температура выращивания, °C			
		5	20	30	40

Примечание. Для заполнения таблицы использовать следующие обозначения: +++ обильное спороношение, ++ умеренное спороношение; + слабое спороношение.

Определение влияния концентрации глюкозы в среде на развитие плесневых грибов

Цель работы: определить оптимальную концентрацию глюкозы в среде для развития плесневых грибов.

Оборудование и инструменты: четыре пробирки с питательным бульоном; одна контрольная (без добавления глюкозы) и три с добавлением 20, 40 и 60 % глюкозы, культура плесневого гриба, пробирка с физиологическим раствором для приготовления суспензии спор плесневого гриба.

Методика выполнения лабораторной работы. 1. Для выполнения лабораторной работы могут быть использованы любые плесневые грибы (пеницилл, аспергилл и др.) и любая среда, пригодная для роста плесневых грибов, в которую добавляется 20, 40 и 60 % глюкозы. Среда разливается в пробирки, оставляется одна контрольная пробирка без глюкозы.

1. В пробирки засеять споры плесневого гриба и поставить в термостат при температуре 24 °C.

2. На следующем занятии оценить рост плесневого гриба по интенсивности развития грибницы и спорообразования (обычно по окраске воздушного мицелия).

Результаты записать в табл. По результатам исследований сделать вывод.

Таблица 4.5**Влияние концентрации глюкозы в среде на развитие плесневого гриба**

Плесневый грибок	Показатель интенсивности развития	Концентрация глюкозы, %			
		0	20	40	60
	Мицелий				
	Спороношение				

Примечание. Для заполнения таблицы использовать следующие обозначения: +++ обильный рост; ++ умеренный рост; + слабый рост; - отсутствие роста.

Определение влияния pH среды на грибы

Цель работы: определить влияние pH среды на развитие грибов.

Отношение микробов к реакции среды очень разнообразно. Каждый вид микроорганизмов развивается в определенных пределах значений pH среды. При минимальном и максимальном значении pH жизнедеятельность микроорганизмов протекает очень медленно, при оптимальном — наиболее интенсивно. При значении pH ниже минимального и выше максимального жизнедеятельность микроорганизмов

прекращается и наблюдается даже их отмирание. Для большинства плесневых грибов и дрожжей наиболее благоприятной является слабокислая среда, для бактерий — нейтральная.

Оборудование и инструменты: четыре пробирки с питательным бульоном с разным значением pH (3, 5, 7, 9) культуры грибов на агаризованной питательной среде, пробирка с физиологическим раствором для приготовления суспензии.

Методика выполнения лабораторной работы.

1. Приготовить питательную среду в пробирках с разными значениями pH: 3, 5, 7, 9.
2. Сделать посев суспензии грибов в каждую пробирку и поставить в термостат при температуре 25 °С.
3. На следующем занятии произвести оценку интенсивности роста изучаемых грибов по степени мутности среды после тщательного перемешивания содержимого пробирок.

Результаты записать в табл. По результатам исследований сделать вывод.

Развитие грибов при разных значениях pH среды				
Культуры бактерии	Интенсивность развития бактерий			
	Значения pH среды			
	3	5	7	9

Примечание. Для заполнения таблицы использовать следующие обозначения: +++ обильное развитие; -ч- умеренное развитие; + слабое развитие; - отсутствие роста.

Контрольные вопросы

1. Как устанавливается влияние температуры на изучаемый микроорганизм?
2. В каких пределах температуры развиваются плесневые грибы?
3. Как устанавливают влияние pH среды на грибы?
4. В каких пределах значений pH развиваются бактерии, дрожжи и плесени?

Лабораторная работа 12 (2 ч).

Тема: Систематика низших грибов. Отделы Oomycota, Hyphochytridiomycota, Chytridiomycota и Zygomycota

Цель — изучить систематику низших грибов отделов Oomycota, Hyphochytridiomycota, Chytridiomycota и Zygomycota.

Задачи работы:

1. Изучить отдел Oomycota,
2. Изучить отдел Hyphochytridiomycota
3. Изучить отдел Chytridiomycota
4. Изучить отдела Zygomycota

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:

В царство Хромиста — *Chromista* наряду с бурыми, золотистыми, желто-зелеными водорослями и некоторыми протистами, согласно современной систематике, включены также 3 отдела грибов, считающихся грибоподобными организмами, или псевдогрибами.

Входящие в эти отделы виды, в том числе «грибы», относятся по современным представлениям к вторично бесцветным, потерявшим хлорофилл организмам, составляющим **подцарство Разножгутиковые — *Heteroconta***.

В отделе *Oomycota* целлюлоза в клеточной стенке отсутствует. Запасное вещество — полисахарид миколаминарин.

Представители отделов Гифохитридиевые — *Hyphochytridiomycota* и Лабиринтуловые - *Labyrinthulomycota* обитают в водной среде. Это сапротрофы или паразиты водных организмов.

Отделы и классы грибоподобных организмов

Отделы	Классы	Примеры
<i>Hyphochytridiomycota</i>	<i>Hyphochytridiomycetes</i>	<i>Anisopidium ectocarpi</i> - паразитирует на бурых водорослях рода <i>Ectocarpus</i>
<i>Labyrinthulomycota</i> или сетчатые слизевики	<i>Labyrinthulomycetes</i>	<i>Labyrinthula macrocystis</i> - паразитирует на водорослях <i>Macrocystis</i>
<i>Oomycota</i>	<i>Oomycetes</i>	<i>Pythium debaryanum</i> <i>Phytophthora infestans</i> , ложномучнисторосяные – <i>Peronospora</i> , <i>Plasmopara</i> , <i>Bremia</i>

Гифохитридиевые — *Hyphochytridiomycota* — водные грибы, в основном внутриклеточные паразиты зеленых и бурых водорослей, других водных грибов и беспозвоночных животных. Немногие из них живут сапротрофно на растительных остатках в воде или влажной почве. Вегетативное тело микроскопических размеров представляет собой голый протопласт; у некоторых видов образуется зачаточный мицелий без собственных ядер — ризомицелий. Подвижные стадии (зооспоры, гаметы) с одним передним перистым жгутиком.

Из возбудителей болезней растений широко известен возбудитель оспы кукурузы *Physoderma zeae maydis*, который зарегистрирован в жарких, тропических регионах, первоначально в Индии, откуда, по-видимому, был завезен в Северную Америку. В 1935 году был обнаружен на Кавказе, в окрестностях города Поты. Гриб поражает листья и листовые влагалища кукурузы, вызывая их отмирание. На пораженных участках хорошо заметны ярко-зеленые пятна с черными язвочками. В их черных тканях содержится масса бурых крупных цист. При прорастании крышечка цисты отскакивает и зооспоры освобождаются.

В природе зрелые цисты обычно прорастают в воде, скапливающейся на листьях и в пазухах листьев кукурузы.

Представители отдела *Labyrinthulomycota* — сапротрофы и паразиты, встречающиеся на водных (чаще морских) растениях. Вегетативное тело (трофическая стадия) представляет собой эктоплазматическую слизистую сеть или систему ходов, по поверхности или внутри которой скользят отдельные клетки, лишенные собственной оболочки. Такая структура называется **сетчатым плазмодием**, или **филлоплазмодием**. В цикле развития присутствуют двужгутиковые зооспоры. Жгутики — гетероморфные и гетероконтные (передний перистый, задний — гладкий).

ОТДЕЛ ООМИКОТА - ООМУСОТА

Подвижные стадии (зооспоры) — двужгутиковые с гетероморфными и гетероконтными жгутиками (передний — перистый, задний — гладкий). Жгутики могут быть латеральными, но при этом перистый направлен вперед, а гладкий — назад. В клеточных стенках грибов этого отдела присутствует преимущественно полисахаридный комплекс (глюкан—целлюлоза), иногда — небольшое количество хитина (порядок *Leptomyetales*).

Бесполое размножение осуществляется двужгутиковыми зооспорами, а у немногих видов — конидиями.

В классе Оомицеты выделяют 9 порядков. В основу деления положены особенности строения мицелия, зооспорангиев и ооспор. Возбудители болезней растений представлены в 2 порядках: Пероноспоровые — *Peronosporales* и Сапролегниевые — *Saprolegniales*.

Грибы, из класса **Оомицеты** имеют хорошо развитый, ветвящийся несептированный мицелий. Оболочка клетки оомицетов, в отличие от других

При благоприятных условиях ооспоры прорастают, образуя органы бесполого размножения, чаще всего зооспорангии с зооспорами, снабженными двумя жгутиками. Зооспоры осуществляют первичное заражение. Повторное распространение происходит летними зооспорангиями, которые прорастают зооспорами. У ряда Оомицетов бесполое размножение происходит конидиями, т.е. летними бесполыми спорами, которые прорастают мицелием.

Порядок Сапролегниевые — *Saprolegniales*. Порядок включает одно **семейство** — **сапролегниевые** *Saprolegniaceae*. Представители этого семейства встречаются чаще всего в качестве сапротрофов в воде или во влажной почве, реже — как паразиты растений или животных. Мицелий у них слабоветвящийся неклеточный, имеет вид нежного белого, хорошо заметного пушка и прикрепляется к субстрату короткими ризоидами. На концах гифов мицелия формируются зооспорангии.

Половые органы — оогоний и антеридий — формируются на концах боковых ответвлений гиф. В результате образуется ооспора, прорастающая после периода покоя в зооспорангий, или в гифу с зооспорангием на конце.

Виды рода сапролегния — *Saprolegnia* живут обычно в воде на трупах насекомых и других животных, иногда на икре рыб, па мальках, ослабленных или пораженных рыбах и т.п.

Некоторые виды рода *афаномицес* — *Aphanomyces* паразитируют на корнях высших растений, на водорослях, на ракообразных животных.

Aphanomyces cochlioides — факультативный паразит, обитающий в почве, поражает преимущественно ослабленные всходы сахарной свеклы. Обычно заболеванию подвергается надземная часть подсемядольного колена, иногда оно охватывает также черешки и семядоли. Пораженная ткань вначале приобретает водянистую серо-зеленую окраску, затем утончается, в ней образуется перетяжка темно-бурого или черного цвета.

Порядок Пероноспоровые — *Peronosporales* делят на три семейства: питиевые, пероноспоровые и альбуговые (цистоповые).

Семейство питиевые (*Pythiaceae*). Представители этого семейства развиваются в условиях высокой влажности. По паразитическим свойствам это в основном факультативные паразиты с сапротрофным образом жизни, способные поражать главным образом ослабленные растения. Наиболее вредоносным видом является *Pythium debaryanum*, вызывающий поражение всходов многих сельскохозяйственных культур (свеклы, салата, капусты, редиса, табака), и грибы рода *Phytophthora* - возбудители болезней, известных под названием фитофторозов (фитофтороз картофеля, томатов и т.д.).

Зооспорангии грибов рода *Pythium* формируются непосредственно на концах ветвей грибницы, не отличающихся от вегетативных гиф и способных расти и ветвиться после образования зооспорангиев. В отличие от других пероноспоровых, они вызревают и освобождаются от зооспор, не отрываясь от несущих зооспорангиеносцев.

Представители рода *фитофтора* — *Phytophthora* имеют многоядерный хорошо развитый мицелий. Симподиально ветвящиеся зооспорангиеносцы отличаются по внешнему виду от гиф вегетативного мицелия. Зооспорангии бывают лимоновидной, яйцевидной и шаровидной формы.

Род *Phytophthora* включает более 70 видов. В пределах этого рода четко проявляется определенная эволюция паразитизма. Некоторые виды могут длительное время жить в почве как сапротрофы на растительных остатках. При благоприятных условиях они временно переходят к паразитизму на растениях. Паразит проникает в растение обычно через поврежденную поверхность. Таким образом, эти виды рода *Phytophthora* можно отнести к типичным факультативным паразитам.

Для других видов этого рода характерен более высокий уровень паразитизма. Гриб проникает через устьица в живые клетки растения, и там его мицелий распространяется по межклетникам. Питательные вещества гриб получает при помощи гаусторий.

Особую опасность представляет *P. infestans*, вызывающий болезнь картофеля, томатов и некоторых других пасленовых. Фитофтороз поражает и ботву, и клубни картофеля. Мицелий гриба распространяется по межклетникам, а гаустории проникают в клетки растения. Пораженные ткани начинают отмирать, а паразит переходит в соседние, живые участки. На поверхности листа на границе живой и мертвой тканей появляется беловатый пушок - скопления зооспорангиеносцев, или конидиеносцев, выступающих из устьиц. Зооспорангиеносцы симподиально ветвятся, несут лимоновидные зооспорангии, которые отделяются и переносятся ветром на новый лист или с каплями дождя попадают через почву на клубни.

В зависимости от температуры зооспорангии могут прорасти или в зооспоры, или в гифы. В последнем случае по способу прорастания зооспорангии превращаются в конидии. Это явление обычно наблюдается при температуре выше 15 °С.

Образование спорангиеносцев, прорастание зооспорангиев и заражение растений происходят главным образом в ночные часы.

Гриб гетероталличен, поэтому для образования ооспор необходимо взаимодействие мицелиев двух типов. Сохраняется гриб в пораженных клубнях в форме мицелия или в виде ооспор в растительных остатках.

Болезнь наносит большой ущерб картофелеводству. Фитофтороз может уничтожить до 50% урожая, а иногда и больше. Кроме картофеля, возбудитель поражает томаты.

На картофеле паразитирует еще один вид рода - *P. erythrosetptica*. Это возбудитель розовой гнили клубней. Из других представителей рода значительной вредоносностью обладает *P. sacorum* - возбудитель увядания земляники. На табаке в странах с жарким климатом распространена *P. parasitica*, вызывающая также болезни тропических растений (папайи, хлебного дерева, какао, пальмы и т. д.).

Семейство пероноспоровые (*Peronosporaceae*) или ложномучнисторосые грибы - облигатные паразиты, вызывающие у растений болезни, известные под названием ложных мучнистых рос.

Для ложных мучнистых рос характерны следующие особенности.

1. Мицелий их развивается всегда внутри растения, распространяясь по межклетникам зараженной ткани. В клетки заходят только специальные отростки мицелия - гаустории, извлекающие из них воду и питательные вещества,

2. На поверхность пораженной ткани выходят только боковые ответвления мицелия, называемые зооспорангиеносцами, если на концах образуются зооспорангии, или конидиеносцами, если образуются конидии (т.е. споры, прорастающие мицелиальным ростком, а не зооспорами). И конидиеносцы и зооспорангиеносцы выходят на поверхность ткани всегда через естественные отверстия - устьица, поэтому при поражении листьев - почти всегда на нижнюю сторону листа.

3. Конидиеносцы (зооспорангиеносцы) ложномучнисторосых грибов резко отличаются от вегетативных гиф и имеют характерное ветвление - дихотомическое или моноподиальное.

4. Ложные мучнистые росы проявляются в основном на надземных частях растения - преимущественно на листьях, но также и на побегах, органах плодоношения (соцветиях и ягодах винограда, стручках капусты и др.).

5. Типичный признак ложных мучнистых рос - белый, реже свинцово-серый мучнистый налет на нижней стороне листьев (рис.13). На верхней стороне листа в местах поражения заметны желтоватые, красноватые или другого цвета, в зависимости от культуры и сорта, пятна.

6. Распространение ложных мучнистых рос (повторные заражения) осуществляются бесполым спороношением (конидиями или зооспорангиями). Отчленившиеся от конидиеносцев конидии прорастают мицелиальным ростком (ростковой трубкой), отчленившиеся от зооспорангиеносцев зооспорангии - зооспорами (реже ростковой трубкой).

7. Сохраняются (зимуют) возбудители ложных мучнистых рос ооспорами, которые образуются внутри пораженной ткани и остаются в почве или на ее поверхности с растительными остатками, сохраняя жизнеспособность до двух-трех лет. При поражении многолетних или вегетативно размножающихся растений может зимовать и мицелий в пораженных побегах, луковицах, корнеплодах, куда он проникает диффузно из пораженных листьев.

В семействе пероноспоровые грибы выделяют следующие роды: *Peronospora*, *Plasmopara*, *Sclerospora*, *Bremia*.

Для грибов рода ***Peronospora*** характерно дихотомическое ветвление конидиеносцев и прорастание конидий мицелиальным ростком. Грибы рода *Peronospora* вызывают ложные мучнистые росы на капусте, табаке, сое, луке и других культурах.

Для грибов рода ***Plasmopara*** характерно моноподиальное ветвление конидиеносцев, а конидии прорастают зооспорами. Виды этого рода облигатные паразиты. Грибы рода *Plasmopara* вызывают ложные мучнистые росы на винограде (милдью), хмеле, подсолнечнике и других культурах. Для грибов рода ***Sclerospora*** характерно следующее. Спорангиеносцы короткие, толстые, с короткими разветвлениями на вершине. Зооспорангии при прорастании дают 1-4 зооспоры. Грибы этого рода поражают лишь растения из семейства злаковых (мятликовых), в том числе такие важные сельскохозяйственные культуры, как пшеница, рожь, кукуруза, просо, сорго, могар, сахарный тростник и другие, вызывая заболевания склероспороз.

Для грибов рода ***Bremia*** характерно дихотомическое разветвление конидиеносцев. Конечные ветви лопастевидно расширенные, со стеригмами по краям расширения. Грибы

рода *Bremia* поражают растения из семейства сложноцветных, в частности салата, сафлора, артишока и др.

Семейство **альгубовые** (цистоповые) включает один род *Albugo*, все виды которого, являясь облигатными паразитами, поражают различные органы растений. На всех пораженных органах растений возникают обильные, разной формы и размера вздутые пустулы (подушечки) ярко-белого цвета. Болезни растений, вызываемые видами этого семейства, обычно называют *белой ржавчиной*. Род *Albugo* (*Cystopus*) паразитирует в основном на растениях семейства крестоцветных (капустных). Гриб *A. tragopogonis* паразитирует на растениях семейства сложноцветных (полынь, василек, амброзия). Гриб *Albugo* паразитирует на батате, вызывая белую ржавчину (*Albugo ipomaeae-panduratae*).

ЦАРСТВО НАСТОЯЩИЕ ГРИБЫ – MYCOTA, ИЛИ FUNGI

Царство Настоящие грибы - Mycota (Fungi) объединяет виды различающиеся по строению вегетативного тела, способам размножения, распространению в природе и образу жизни. Основой вегетативного тела этих грибов является мицелий, представляющий собой систему тонких ветвящихся гиф, находящихся на поверхности субстрата или внутри пего. Обычно мицелий имеет большую общую поверхность, через которую путем осмоса происходит всасывание пищи.

Подразделение грибов на отделы основано на комплексе признаков, главными из которых являются характер развития спор полового размножения, типы полового и бесполого размножения, число и строение жгутиков (для видов грибов, имеющих в цикле развития зооспоры), состав полисахаридов клеточных стенок, характер клеточных перегородок — септ. Два отдела — Хитридиомикота — *Chytridiomycota* и зигомикота — *Zygomycota* — имеют вегетативное тело, состоящее из неклеточного мицелия; у грибов других отделов Аскомикота — *Ascomycota*, Базидиомикота - *Basidiomycota* и группы анаморфных грибов -- вегетативное тело состоит из клеточного мицелия.

ОТДЕЛ ХИТРИДИОМИКОТА - CHYTRIDIOMYCOTA

Отдел Хитридиомикота включает один класс Хитридиомицеты — *Chytridiomycetes*. В цикле развития грибов этого класса имеются подвижные стадии с одним гладким бичевидным жгутиком, направленным назад. В полисахаридный состав клеточной стенки входит комплекс (хитин + β -глюкан). В пределах группы прослеживается эволюция таллома от голой плазменной массы амебоида, через одноклеточные формы с ризомицелием к хорошо развитому неклеточному мицелию. Половой процесс — холо-, изо-, гетеро- и оогамия, бесполое размножение осуществляется с помощью одножгутиковых зооспор.

Представители класса связаны в основном с водной средой обитания. Большинство из них — паразиты водорослей, водных грибов, беспозвоночных. Есть наземные почвенные виды, паразитирующие на высших растениях в условиях повышенной влажности. Значительно меньшую часть составляют сапротрофы, поселяющиеся в воде на растительных и животных остатках.

В состав класса включают 6 порядков, выделяемых в основном по уровню организации таллома и типу полового процесса. Основные порядки: *Chytridiales*, *Blastocladales*, *Monoblephariales*.

Фитопатогенные виды в основном представлены в порядке **Хитридиевые**

Порядок Хитридиевые — *Chytridiales*. Важнейшие представители порядка Хитридиевые — это возбудитель черной ножки капустной рассады *Olpidium brassicae* и возбудитель рака картофеля *Synchytrium endobioticum*. Данные грибы — облигатные внутриклеточные паразиты, они заражают молодые растения и ткани подземных частей растений. Развитие болезней наблюдается в условиях повышенной влажности почвы. Черная ножка капустной рассады проявляется на разных стадиях развития рассады: от

проростков до образования нескольких листьев. Корневая шейка у пораженных растений размягчается, чернеет, ткань загнивает. Растения теряют тургор, желтеют, погибают. Обычно образуются очаги погибших растений.

Цикл развития *Olpidium brassicae* состоит из следующих фаз: зооспора проникает в эпидермальную клетку растения и превращается в плазмодий; плазмодий увеличивается в размере, становится многоядерным,

К хитридиомицетам относится гриб *Olpidium brassicae*, вызывающий черную ножку капустной рассады и гриб *Synchytrium endobioticum*, вызывающий рак картофеля.

Под *Synchytrium* отличается от рода *Olpidium* тем, что вместо одного зооспорангия развивается от пяти до девяти, скученных вместе (сорус).

Важнейший вид рода - *Synchytrium endobioticum* вызывает на клубнях образование бугристых наростов или опухолей, напоминающих губку или цветную капусту. Образование раковых наростов начинается с глазков клубней. По мере разрастания они увеличиваются в размерах, нередко значительно превышая величину самих клубней, постепенно буреют, чернеют и распадаются. Под воздействием паразита клетка разрастается, а соседние клетки эпидермиса и мякоти клубня начинают усиленно делиться, причем оболочки их одревесневают.

Паразит внутри клетки увеличивается в размерах, затем одевается двухслойной оболочкой и превращается в так называемую л е т н ю ю ц и с т у. Она прорастает, образуя сорус из 5-7 или даже 9 зооспорангиев, в каждом из которых содержится 300 зооспор. Зооспоры выходят из зооспорангиев и заражают другие клетки клубня.

В течение лета образование зооспор может происходить неоднократно. Осенью в клубнях образуются покоящиеся цисты с толстыми одревесневшими оболочками. Они зимуют в клубнях и могут очень долго сохраняться в почве (до 20 лет) и при благоприятных условиях прорастают, образуя зооспоры (без соруса).

Хитридиомидеты сохраняются покоящимися спорами - цистами.

ОТДЕЛ ЗИГОМИКОТА (ZYGOMYCOTA)

Зигомицеты объединяют 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. Отдел Зигомикота считается парафилетической или полифилетической группой, точное систематическое положение входящих в него видов 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.

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.

Используются как продуценты различных веществ, наиболее интенсивно — в Японии. *Rhizopus stolonifer* применяется для получения фумаровой кислоты, *R. oryzae* — спиртов, *Blakeslea trispora* — β -каротина, *Phycomyces blakesleeanus* и различные виды *Rhizopus* используются для получения медицинских препаратов.

Контрольные вопросы.

1. Охарактеризуйте представителей отдела Oomycota
2. Охарактеризуйте представителей отдела Hyphochytridiomycota.
3. Охарактеризуйте представителей отдела Hytridiomycota.
4. Охарактеризуйте представителей отдела Zigomycota.

Лабораторная работа 13 (2 ч).

Тема: Отделы Ascomycota и Basidiomycota, Deuteromycota.

Цель – изучить представителей отделов Ascomycota и Basidiomycota, Deuteromycota.

Задачи работы:

1. Изучить общую характеристику отдела Ascomycota
2. Изучить общую характеристику отдела Basidiomycota
3. Изучить общую характеристику отдела Deuteromycota

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:

Ascomycota

Аскомицеты - одна из самых больших групп грибов, включающая 30 000 видов. Для сумчатых грибов характерен многоклеточный (септированный) мицелий. В состав их клеточной стенки входят полисахариды хитин и β -глюкан. как у хитридиомицетов, у части видов, объединяемых в класс Гемиаскомицеты -маннан и β -глюкан.

Основной признак грибов отдела - формирование в результате полового процесса

асков с аскоспорами.

В цикле развития многих аскомицетов большое значение имеет бесполое размножение. Оно осуществляется при помощи конидий, которые образуются на гаплоидном мицелии экзогенно на конидиеносцах разного строения.

Конидиальное спороношение служит для массового расселения аскомицетов. Обычно конидии образуются на живых растениях, а аскоспоры (за немногими исключениями) - после отмирания растения или его частей в конце вегетации либо после перезимовки.

По месту формирования сумок, особенностям их строения и результатам молекулярно-генетических исследований во многих системах грибов **отдел Аскомикота подразделяют на следующие классы:**

- Археаскомицеты — *Archaeascomycetes* (syn. *Taphrinomycetes*);
- Гемияскомицеты, Голосумчатые — *Hemiascomycetes* — плодовые тела отсутствуют, сумки прототуникатные, образующиеся непосредственно на мицелии или при слиянии одиночных клеток;
- Настоящие сумчатые — *Ascomycetes* (syn. *Euascomycetes*) — сумки эутуникатные — унитуникатные, реже прототуникатные, образуются внутри или на поверхности плодовых тел;
- Локулоаскомицеты — *Loculoascomycetes* (syn. *Dothideomycetes*) сумки эутуникатные — битуникатные, образуются в особых полостях (локулах), возникающих в сплетении мицелия — аскостроме, или псевдотеции.

Аскомикота включает около 75% всех описанных видов грибов. В настоящее время к сумчатым грибам относят также несовершенные (анаморфные, митотические) грибы — дейтеромицеты (в традиционном смысле), характеризующиеся сходным строением вегетативных структур и клеточной стенки при отсутствии в цикле развития сумок и наличии только конидиальной (бесполой) стадии — анаморфы. В эту же группу включают **лихенообразующие симбиотрофные грибы**, составляющие почти четверть видов Аскомикота. В ряде систем грибов (в классических учебниках) и до настоящего времени лишайники рассматриваются в качестве самостоятельного отдела - *Lichenes*, или *Mycophyta*.

КЛАСС АРХЕАСКОМИЦЕТЫ - ARCHAEASCOMYCETES (syn. TAPHRINOMYCETES)

Класс выделен на основании сравнения результатов секвенирования нуклеиновых кислот. Это наиболее древняя группа грибов, являющаяся исходной для остальных Аскомикота. Сумки у представителей этого класса эутуникатные. Плодовые тела отсутствуют. Группа разнородна по морфологии: некоторые виды одноклеточные, другие образуют как одиночные клетки, так и многоклеточные гифы.

Практический интерес для фитопатологии представляют три порядка: Сахаромицетовые. Тафриновые и Протомицетовые. Порядок Сахаромицетовые включает в основном дрожжевые грибы - сапротрофы. В порядок Тафриновые объединены грибы, паразитирующие в растениях, в порядок Протомицетовые - развивающиеся на дикорастущих растениях.

Порядок Сахаромицетовые - Saccharomycetales. В порядок Сахаромицетовые объединяют формы, отличающиеся строением вегетативного тела. Мицелий у них или нитчатый с перегородками, непочкующийся, или вначале нитчатый, а затем распадающийся и почкующийся.

Зигота развивается при слиянии двух отростков мицелия или двух отдельных свободноживущих клеток. Аски образуются как одиночные клетки.

Большинство сахаромицетов — сапротрофы, обитающие на поверхности плодов и вегетативных частей растений, в нектаре цветков, в почве. Отдельные виды паразитируют

на растениях. Так, *Spermophthora gossypii* встречается на волокне в нераскрытых коробочках хлопчатника, *Endomyces mali* — один из возбудителей гнили яблок.

Большое практическое значение имеет семейство Сахаромицетовые — *Saccharomycetaceae*, в котором представлены дрожжи — возбудители спиртового брожения и продуценты кормового белка.

Порядок Тафриновые - *Taphrinales*. В порядок Тафриновые входит одно семейство тафриновые — *Taphrinaceae* и один род тафрина — *Taphrina*.. Он объединяет около 100 видов грибов паразитов высших растений, вызывающих гипертрофию и деформации пораженных органов.

Порядок тафриновые (*Taphrinales*) являются облигатными паразитами с узкой специализацией, вызывают на высших растениях образований галлов, "ведьминых метел", деформацию листьев, различные уродства. Плодовые тела отсутствуют. Бесполое размножение у грибов этого рода отсутствует, аскоспоры способны почковаться. Аски этих грибов образуются непосредственно на мицелии плотным слоем, расположенным под кутикулой пораженных органов растения. Мицелий грибов располагается по межклетникам и в клетках тканей растений-хозяев. У многих видов мицелий зимующий, сохраняющийся из года в год в трещинках коры, в стеблях и почках пораженных растений.

Заражение происходит гаплоидными аскоспорами. Разрастаясь по тканям, гифы проникают между эпидермисом и кутикулой. Здесь происходит расчленение на двухъядерные клетки, в которых между ядрами происходит кариогамия. В верхней части клеток возникает гифальный вырост, в который перемещается диплоидное ядро. Постепенно вырост разрывает кутикулу и превращается в сумку, оказывающуюся на поверхности зараженного органа.

Тафриновые поражают в основном плодовые косточковые. Заболевания проявляются в нарушении нормального развития зараженных органов и в возникновении в них различных уродств.

Установлено, что возникновение деформаций у зараженных растений связано со способностью тафриновых грибов выделять вещества, вызывающие интенсификацию синтеза фитогормонов самими растениями-хозяевами. Тафриновые выделяют такие фитогормоны, как β -индолилуксусная кислота и вещества типа цитокининов, которые усиливают их синтез.

Среди возбудителей болезней персика наиболее опасным является тафрина деформирующая (*T. deformans*), распространенная почти по всему земному шару. Болезнь носит название курчавость листьев персика. Листья, зараженные грибом при распускании почек, недоразвиваются, увеличиваются почти в 2 раза по сравнению с незараженными, жилки остаются укороченными. Особенно сильно разрастаются те листья, которые находятся в нижней части однолетних побегов. Важно отметить, что возбудитель курчавости способен заразить только молодые листья.

Помимо листьев, деформирующая тафрина заражает стебли и плоды. Стебли при этом желтеют, искривляются и утолщаются. Плоды на зараженных побегах недоразвиваются и деформируются. У них появляются тканевые разрастания и они, как и листья, опадают.

Сливовая тафрина (*T. pruni*) поражает сливу, вишню, алычу, а также терн и черемуху. Ее гифы, возникающие при прорастании отпочковавшихся аскоспор, проникают через цветоножки в завязь и при благоприятных условиях - повышенной влажности и температуре 17-19°C - во время цветения через две недели или через месяц после заражения вызывают появление уродливых плодов. У зараженных плодов (покрытых беловатым восковидным налетом - сумчатым спороношением) разрастается перикарпий, косточка и зародыш не образуются и вместо них возникает обширная полость.

Порядок Протомицетовые – *Protomycetales*. Среди грибов этого порядка много возбудителей болезней дикорастущих растений. Эндогенно формирующийся мицелий расположен в межклетниках тканей растения-хозяина. В мицелии образуются крупные шаровидные или продолговатые хламидоспоры с гладкой оболочкой. Хламидоспоры зимуют. Весной из них развиваются аски с аскоспорами. Аскоспоры после выхода из асков копулируют, затем прорастают ростком диплоидного мицелия, проникающим в ткань растения. Паразитические грибы порядка Протомицетовые стимулируют образование опухолей на стеблях, черешках листьев, жилках растений-хозяев.

В состав порядка входят следующие роды: протомицес — *Protomyces*, протомикопсис — *Protomycopsis* и волкартия - *Volkartia*. Наиболее распространенный паразит — *Protomyces macrosporus*, вызывающий на листовых черешках сныти образование желваков.

КЛАСС ЭУАСКОМИЦЕТЫ - EUASCOMYCETES **НАСТОЯЩИЕ СУМЧАТЫЕ, или ПЛОДОСУМЧАТЫЕ**

Сумки грибов этого класса имеют однослойную оболочку и формируются на поверхности или внутри плодовых тел - клейстотециев, перитециев или апотециев.

У грибов класса Эуаскомицеты различают три типа настоящих плодовых тел: клейстотеции, перитеции и апотеции.

В клейстотециях содержатся только аски, располагающиеся беспорядочно или в пучке. Созревшие аскоспоры освобождаются из клейстотеция пассивно в результате постепенного разрушения оболочек асков и плодового тела или активно выбрасываются через разрывы их оболочек. Клейстотеции всегда располагаются на мицелии.

В перитеции аски расположены чаще всего пучком, отходящим от его основания. Аскоспоры из перитециев выбрасываются через отверстие, лишь у немногих видов наблюдается их пассивное выделение со слизью.

Созревшие апотеции широко открыты, обычно они блюдцевидной или чашевидной формы. На их верхней стороне располагается слой асков или парафиз, называемый гимением. Аскоспоры выбрасываются из апотеция активно.

В пределах класса плодосумчатых выделяют три группы порядков - плектомицеты, пиреномицеты и дискомицеты, различающихся между собой по таким признакам, как форма и строение плодового тела, характер расположения в нем сумок, характер высвобождения из них аскоспор.

Плектомицеты

Группа порядков плектомицеты (или клейстомицеты).

Плодовое тело клейстотеций, замкнутое, шаровидной формы. Освобождение аскоспор пассивное.

Порядок называют также **эвроциевые (*Eurotiales*)** или аспергилловыми (*Aspergillales*), к которым относятся сумчатые стадии грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium*, вызывающих главным образом плесени на семенах, а также гнили плодов при хранении. Поскольку преобладающей стадией этих грибов является конидиальная (сумчатая стадия развивается редко), *Aspergillus* и *Penicillium* чаще относят к несовершенным грибам (анаморфным грибам).

Пиреномицеты

Группа порядков пиреномицеты - *Pyrenomycetidae*

Плодовые тела - перитеции, реже клейстотеции - в них сумки расположены пучком или слоем. Освобождение аскоспор активное.

К пиреномицетам относятся следующие порядки, имеющие практическое значение: Микроасковые, Мучнисторосые или Эризифовые, Спорыньевые или Клавицепсовые, Диапортовые, Гипокрейные, Сферейные.

Порядок **Микроасковые - *Microascales***. Плодовые тела темноокрашенные

перитеции, в которых беспорядочно располагаются прототуникатные сумки. Перитеции образуются на поверхности субстрата или частично погружены в него. Аскоспоры освобождаются пассивно, выходят из перитеция с каплями слизи.

Некоторые представители наносят большой ущерб сельскому и лесному хозяйству.

Ceratocystis paradoxa - возбудитель ананасной болезни сахарного тростника. Гриб поражает и многие другие тропические культуры: какао, бананы, кофе, ананас, пальму, а также кукурузу и др.

Порядок эризифовые – Erysiphales - или Мучнисторосые.

Плодовое тело клейстотеций, сумки расположены пучком, освобождение аскоспор активное в результате набухания сумок и разрыва оболочки клейстотеция.

Эризифовые грибы - облигатные паразиты, вызывающие у растений болезни, называемые мучнистыми росами. В отличие от ложных рос, вызываемых пероноспоровыми грибами, их часто называют "настоящими мучнистыми росами".

Для настоящих мучнистых рос характерны следующие особенности.

1. Многоклеточный мицелий мучнистых рос развивается поверхностно (экзофитно) по отношению к субстрату; внутрь субстрата, в эпидермальные клетки, заходят только гаустории, с помощью которых гриб осуществляет питание.

2. Типичный признак проявления мучнистых рос - белый мучнистый налет на листьях (как на верхней, так и на нижней стороне), на побегах, плодах или других органах растения. Налет состоит из поверхностно развивающегося мицелия и бесполого конидиального спороношения - коротких прямых конидиеносцев и расположенных на них конидий, соединенных в цепочки. Конидии одноклеточные, овальные или бочонковидные, бесцветные. Обилие конидий придает налету порошащий мучнистый вид (отсюда и название "мучнистая роса").

3. Распространение гриба и повторное заражение растений происходит конидиями, которые способны давать за лето несколько поколений. Таким образом, степень развития мучнисторосых грибов зависит от того, насколько будут благоприятны условия для развития конидиальной стадии.

Род Эризифе (Erysiphe) - придатки простые, сумок в клейстотеции несколько.

Род Микросфера (Microsphaera) - придатки дихотомически разветвленные, сумок много.

Род Унцинула (Uncinula) - придатки на концах закручены спирально, расположены главным образом в верхней части клейстотеций пучком, сумок несколько. К этому роду относится возбудитель мучнистой росы винограда, или оидиума (пепелица) – *U. necator*.

Род Подосфера (Podosphaera) - придатки дихотомически разветвленные, сумка одна.

Род Сферотека (Sphaerotheca) - придатки простые, сумка одна.

6. Все мучнисторосые грибы - обязательные паразиты с узкой филогенетической специализацией. Многие из них приурочены к возрастнo-мoлoдым тканям растения (мучнистая роса яблони и др.).

7. Мучнистые росы в отличие от ложных рос могут развиваться в широких пределах относительной влажности воздуха. Сухая и жаркая погода, как правило, усиливает развитие настоящих мучнистых рос, так как в связи с потерей тургора растения становятся более восприимчивыми.

Наиболее распространены и вредоносны следующие мучнистые росы: мучнистая роса злаков, оидиум винограда, мучнистая роса яблони; из тропических культур наиболее вредоносной является мучнистая роса манго, папайи и других культур.

К группе порядков пиреномицетов относятся также **порядки гипокрейные, диапортовые, сферийные и спорыньевые**. Грибы этих порядков образуют плодовые тела **перитеции** с выводным отверстием на вершине, шаровидные или грушевидные,

одинокими или собраны по несколько штук в строму. Оболочка перитециев темная, почти черная, но может быть светлая или яркая.

К порядку **гипокрейнные - Hypocreales** относятся грибы рода *Nectria* и *Gibberella*, конидиальные стадии которых патогенны для растений. Гриб *Nectria galligena* вызывает обыкновенный рак яблони, гриб *Gibberella* - различные формы фузариоза хлебных злаков и кукурузы.

Порядок **диапортовые - Diaportales** включает грибы родов *Glomerella* и *Valsa*, представляющих собой сумчатые стадии возбудителей некоторых антракнозов (фасоли, яблони и др.) и цитоспороза плодовых деревьев.

Порядок **сферийные - Sphaeriales** включает в основном сапротрофные виды. Из возбудителей болезней растений следует указать на гриб *Polystigma rubrum*, вызывающий полистигмоз, или красную пятнистость листьев сливы.

Порядок клавипсовы, или спорыньевые - Clavicipitales

У грибов порядка Клавипсовые белые или светлые, реже темноокрашенные перитеции. Они погружены в яркоокрашенную или светлую строму мягкой или мясистой консистенции. Аскоспоры всегда нитевидные, расположены в асках параллельными пучками, выбрасываются поочередно.

К порядку **спорыньевые, или клавипсовы (Clavicipitales)**, относится гриб *Claviceps purpurea* - возбудитель спорыньи ржи и других злаков. На пораженных спорыньей растениях в соцветиях хорошо заметны склероции, имеющие вид рожков черно-фиолетового извета. Они представляют зимующую стадию гриба. Из склероциев после перезимовки развиваются головчатые стромы желтого или красноватого цвета с погруженными в них перитециями. Прорастание склероциев происходит при температуре 10-20°C, которая должна держаться довольно долго. Таким путем достигается строгая согласованность цикла развития паразита с фазами развития растения-хозяина - выбрасывание аскоспор происходит в период массового цветения злаков. После выбрасывания из перитециев аскоспоры разносятся ветром и попадают на растения. Заражение происходит через рыльце или меристематические ткани у основания завязи.

Через несколько дней после заражения на растениях развивается конидиальная стадия гриба. В завязи образуется плотная масса мицелия, покрытая слоем конидиеносцев, образующих огромное количество мелких конидий, погруженных в капли "медвяной росы". Она имеет неприятный запах и содержит большое количество сахаров. Привлеченные ею насекомые переносят конидии на здоровые растения. Конидии могут распространяться не только насекомыми, но и каплями дождя, при трении колосьев друг о друга под действием ветра, при стекании капель "медвяной росы" с пораженных колосьев, а после ее высыхания конидии могут переноситься ветром.

Склероции могут распространяться и человеком (при уборке урожая с зерном и т.д.).

К этому порядку относится род *Eriophthora*, вызывающий чехловидную болезнь злаков *E. typhina*.

У возбудителя чехловидной болезни злаков *E. typhina* строма имеет форму чехла, охватывающего верхнюю часть стебля. На поверхности чехла видны мелкие конидии. В июле—августе конидиальная строма утолщается, становится оранжевой и в ней развиваются перитеции. Гриб заражает многолетние злаки — ежу сборную, овсяницу, полевицу и др. Болезнь приносит большой ущерб при культуре трав на семена.

К группе порядков пиреномицеты относятся сумчатые стадии грибов рода *Phylospora tuscanensis* - возбудитель красной гнили сахарного тростника. Сумчатая стадия представлена перитециями, погруженными полностью в ткани растения, и наружу выходит только гладенькое отверстие перитеция. В плодовых телах образуется множество сумок, перемешанных с парафизами. Сумки слегка утолщенные наверху, размером 70-90 × 13-18 мк.

Дискомицеты

Группа порядков дискомицеты (*Discomycetidae*)

Плодовые тела дискомицетов – апотеции дисковидной формы с ножкой или без нее. Сумки расположены на поверхности или внутри апотеция в виде плотного геминиального слоя. Аскоспоры освобождаются активно.

В цикле развития дискомицетов отсутствует конидиальная стадия.

В составе дискомицетов выделяют четыре порядка. Возбудители болезней растений в основном распределяются между порядками -фацидиевые и гелоциевые.

Порядок Фацидиевые (*Phacidiales*). Апотеции грибов этого порядка погружены в ткань листа, сначала закрытые, затем раскрываются в виде узкой щели.

Типичные представители - грибы *Lophodermium*, вызывающие пятнистость листьев манго (*Lophodermium mangiferae*), опадение хвои сосны, (*Lophodermium pinastri* и др. виды).

Род коккомицес - *Coscomyces*. Повсеместно распространен представитель этого рода *C. hiemalis* - сумчатая стадия возбудителя коккомикоза косточковых культур *Cylindrosporium hiemale*. Патоген образует два вида конидий - микро- и макроконидии.

Порядок Гелоциевые (*Helotiales*) или Леотиевые - *Leotiales*. Апотеции грибов этого порядка обычно на более или менее удлинённых ножках, развиваются из склероциев после периода их покоя. Сюда относятся грибы рода *Sclerotinia* или *Whetzelinia*.

СЕМЕЙСТВО СКЛЕРОТИНИЕВЫЕ – *SCLEROTINIACEAE*

Грибы рода *Scierotinia* вызывают у растений болезни, известные под названием склеротиниозов. *Sclerotinia sclerotiorum* известен как возбудитель белой гнили различных сельскохозяйственных культур. Он встречается на корнях свеклы, моркови, петрушки, арахиса, на стеблях подсолнечника, томата, фасоли, гороха, на плодах огурцов, кабачков и многих других культур, на соцветиях подсолнечника, на клубнях картофеля, батата и др.

Развитие гриба сопровождается характерными внешними признаками. Поверхность растения покрывается относительно плотным, войлочным, чисто-белым воздушным мицелием гриба, на котором через несколько дней начинают образовываться склероции в виде более плотных и в начале чисто-белых мицелиальных скоплений 3-5 мм в диаметре. Склероции образуются в больших количествах, группами или рассеянно. Пораженная ткань размягчается и разрушается. Склероции бывают шаровидные или продолговатые, от 0,5 до 4 см в диаметре. Так, в корзинках подсолнечника образуются склероции, заполняющие всю корзинку и имеющие сетчатый вид. Конидиальное спороношение у *Sclerotinia sclerotiorum*, как и у других видов рода склеротиния, отсутствует. При прорастании склероция образуются блюдцевидные, дискообразные или бокаловидные, довольно крупные апотеции на ножках. Сумки образуются открыто на вогнутой поверхности апотеция. Созревшие в сумках аскоспоры вызывают первичное заражение растений. Дальнейшее распространение грибов происходит только при помощи мицелия - обрывками его или чаще при прямом контакте больных растений со здоровыми.

Порядок Пецииевые – *Pezizales*. У грибов этого порядка плодовые тела – апотеции – сильно различаются размерами от мелких (диаметр 1мм) до крупных (в диаметре до 10 см), в цикле развития есть и конидиальная стадия.

Семейство Пецииевые – *Pezizaceae*. Главный род – *Peziza* объединяет около 100 видов, встречающихся преимущественно в лесах, во влажной почве. Некоторые являются разрушителями древесины.

КЛАСС ЛОКУЛОАСКОМИЦЕТЫ (*LOCULOASCOMYCETES*)

Локулоаскомицеты отличаются от других аскомицетов тем, что сумки у них развиваются не в типичных перитециях, а в строноподобных образованиях, называемых

аскостромами или псевдотециями. Сумки формируются в особых полостях - локулах, образующихся в мицелиальных стромах.

Сумчатая стадия развивается сапротрофно на растительных остатках и обеспечивает первичное заражение растений. Паразитирующей и обеспечивающей дальнейшее распространение инфекции у локулоаскомицетов грибов является конидиальная стадия.

Среди представителей класса следует выделить порядки: **Мириангиевые, Дотидейные, Плеоспоровые и Гистериальные.**

Порядок Мириангиевые - *Myriangiales*. Видное место занимает семейство мириангиевые - *Myriangiaceae*. К нему относится род элсиное - включает виды, паразитирующие на растениях - *Elsinoe fawcettii*. Возбудитель парши (бородавчатости) цитрусовых.

Болезнь проявляется на молодых листочках, только что вышедших из почек. Вначале образуется светло-желтое пятно, ткань вскоре приподнимается и принимает форму бородавки. Поражаются побеги, плоды. Известна и конидиальная стадия *Sphaceloma fawcettii*.

E. veneta - возбудитель антракоза малины, развивается на листьях и побегах, образуя на них серые пятна с пурпурной каймой. Патоген встречается в основном в конидиальной стадии *Gloeosporium venetum*.

Порядок Дотидейные - *Dothidiales*. Наиболее вредоносные возбудители болезней относятся к родам микосферелла и дидимелла.

Виды рода микосферелла - *Mycosphaerella* вызывает белую пятнистость листьев у культурных растений. Так, *M. fragaria* - возбудитель белой пятнистости листьев земляники. На пораженных листьях появляются белые пятна с пурпурной каймой. Летом развивается конидиальная стадия *Ramularia tulasnei*, зимуют - псевдотеции.

Вид *M. sentina* - сумчатая стадия возбудителя белой пятнистости груши - *Septoria piricola*; *M. ribis* - сумчатая стадия возбудителя белой пятнистости, или септориоза, смородины - *Septoria ribis*; *M. citri* вызывает темную пятнистость цитрусовых и др.

К роду дидимелла *Didymella* - относится сумчатая стадия возбудителей аскохитоза огурца, - аскохитоза гороха. В цикл развития входит несовершенная стадия *Ascochyta cucumeris*, *A. pisi*.

Порядок Плеоспоровые - *Pleosporales*. Псевдотеции у рода *Venturia* и *Mycosphaerella*, как правило, погружены в ткань питающего растения, имеют шаровидную или грушевидную форму. Сумки вытянутой формы - булавовидные, цилиндрические или почти грушевидные. часто согнутые, во многих случаях с псевдопарафизами (остатками межсумочной ткани), имеющими вид тонких нитей. Сумкоспоры двуклеточные, по созреванию - желтовато-зеленоватые или оливково-бурые (Рис. 17).

Среди плеоспоровых много паразитов высших растений. К ним относятся роды **вентурия, офиоболус, *Leptosphaeria*** и др.

К роду вентурия - *Venturia* относятся возбудители болезней плодовых - парши яблони и груши. Паршу яблони вызывает *V. inaequalis*, паршу груши *V. pirina*. Эти грибы поражают листья, побеги, плоды. На пораженных органах образуются бархатистые оливковые пятна конидиального спороношения. Конидиальная стадия является паразитической. Псевдотеции образуются на опавших листьях, аскоспоры в них созревают весной и вызывают первичное заражение растений.

Род **офиоболус *Ophiobolus*** представляет вид *Ophiobolus graminis*, вызывающий корневую гниль пшеницы и ячменя. У пораженных растений темнеют и загнивают корни, чернеет основание стебля. Псевдотеции гриба развиваются у основания стебля. Гриб развивается на растительных остатках в почве, а также на многолетних дикорастущих злаках, например, пырее.

Род ***Leptosphaeria*** - возбудитель лептосфериоза риса, кукурузы, кольцевой

пятнистости сахарного тростника и др. заболеваний.

Представители **порядка Гистериальные - Hysteriales** сапротрофные виды, развивающиеся главным образом на отмерших веточках древесных и кустарниковых растений.

Базидиомицеты

Базидиомицеты - высшие грибы с многоклеточным мицелием. Среди базидиомицетов есть паразиты растений (например, широко распространенные и очень опасные для сельскохозяйственных растений головнёвые и ржавчинные грибы), многочисленные почвенные сапротрофы - шляпочные грибы (например, шампиньоны). К базидиомицетам относятся и микоризообразователи (белый, подберезовик, и другие лесные грибы).

Есть среди базидиальных грибов и сапротрофы на древесине - это многочисленные трутовики - активные разрушители древесины и валежника.

У гетероталличных, т.е. раздельнополых, базидиомицетов образовавшиеся на базидиях базидиоспоры несут разные половые знаки (+ и -).

Базидиоспоры производят первичное заражение растений. При этом в одних случаях, например у ржавчинных грибов, заражение осуществляют одиночные базидиоспоры, в результате чего развивается первичный гаплоидный мицелий, и в дальнейшем, при слиянии двух вегетативных клеток гаплоидного мицелия, гриб переходит в дикариофазу, в которой в основном и протекает его жизнь; в других случаях, как у головневых грибов, почкующиеся базидиоспоры (или клетки самой базидии) сначала попарно копулируют, а уже затем заражают растения. При этом гриб развивает дикариотический мицелий и вся его жизнь проходит практически в дикариофазе, как у ржавчинных грибов.

Базидия может быть одноклеточной — это **холобазидия** или состоять из двух частей: нижней расширенной — **гипобазидии** и верхней — **эпибазидии**. Эпибазидия представляет собой вырост гипобазидии и часто состоит из двух или четырех частей. В этом случае ее называют гетеробазидией. Если базидия разделена поперечными перегородками на четыре клетки, по бокам которых формируются базидиоспории, ее называют *фрагмобазидией*. Фрагмобазидии обычно образуются из толстостенных покоящихся клеток — телиоспор, Урединиомицеты и Устилягиномицеты.

Классы и подклассы отдела Basidiomycota

Класс	Подкласс
<i>Basidiomycetes</i>	Homobasidiomycetidae
<i>Ustilaginomycetes</i>	Heterobasidiomycetidae
<i>Urediniomycetes</i>	

Класс БАЗИДИОМИЦЕТЫ - BASIDIOMYCETES

Класс Базидиомицеты делится на 2 подкласса.

1. **Подкласс Гомобазидиомицеты — Homobasidiomycetidae** объединяет грибы с неразделенной одноклеточной булавовидной или цилиндрической базидией — холобазидией, развивающейся непосредственно из производящей ее и затем разрастающейся клетки.

2. **Подкласс Гетеробазидиомицеты — Heterobasidiomycetidae** представлен грибами со сложной базидией — гетеробазидией, состоящей из эпи- и гипобазидий. В данном случае материнская клетка базидии обычно не разрастается, а дает вырост, в который переходят гаплоидные ядра; затем этот вырост может делиться с помощью перегородок.

Подкласс гомобазидиомицеты, или холобазидиомицеты

(HOMOBASIDIOMYCETIDAE)

Среди представителей подкласса Гомобазидиомицеты наиболее распространены грибы, объединенные в группу **порядков гименомицеты**. Для них характерны крупные плодовые тела, развивающиеся на многолетнем мицелии. Базидии располагаются плотным гимениальным слоем на плодовых телах.

В зависимости от формы и строения плодового тела гименомицеты подразделяют на два порядка: **афиллофоровые (Aphillophorales)** и **агариковые (Agaricales)**.

Для афиллофоровых характерны плодовые тела различной формы и консистенции и преимущественно трубчатый гименофор. Гименофор агариковых в основном пластинчатый, а плодовые тела разделены на шляпку и ножку.

Почти все гименомицеты - сапротрофы, но среди них есть и полупаразитные формы, вызывающие гнили стволов и корней у древесных пород. К гименомицетам относятся, в частности, все трутовые грибы (настоящий и ложный трутовик на лиственных по родах, серо-желтый трутовик на дубе, белый домовый гриб и др.). К ним относятся все шляпочные, в том числе и съедобные грибы, большинство из них являются микоризообразователями.

Группа афиллофороидные гименомицеты. Плодовые тела афиллофоровых имеют различную форму и консистенцию. В зависимости от особенностей строения плодового тела выделяют порядки, из которых наиболее важное значение для фитопатологии имеют Телефоровые, Рогатиковые и Полипоровые или Трутовиковые.

Порядок Телефоровые - Thelephorales. Плодовые тела грибов этого порядка имеют вид паутинистых или кожистых пленок, часто обволакивающих субстрат. Наиболее вредоносные виды относятся к роду стереум.

Stereum purpureum - возбудитель "млечного блеска" плодовых, при котором листья приобретают молочный или свинцово-серый оттенок. Этот гриб - раневой паразит. Млечным блеском поражаются в основном ослабленные деревья. Плодовые тела гриба образуются чаще всего на мертвой древесине плодовых деревьев.

Группа порядков агарикоидные гименомицеты.

Порядок Болетовые - Boletales. В состав порядка входят многочисленные виды съедобных и микоризообразующих грибов, часть из них - обитатели леса.

К микоризным грибам относится представитель этого порядка белый гриб - *Boletus edulis*.

Многие агариковые - почвенные сапротрофы, не связанные с древесными породами и живущие на лугах, на полях и т.д.

В качестве патогенов растений заслуживает внимания род армилляриелла - *Armillariella*, или опёнок. Он включает вид *A. mellea*, вызывающий белую корневую и другие гнили многих древесных пород, в том числе плодовых культур.

К телиомицетам относят грибы, у которых базидии перегородчатые, но развиваются из толстостенной покоящейся клетки - телиоспоры, плодовые тела отсутствуют.

Подкласс гетеробазидиомицеты

(HETEROBASIDIOMYCETIDAE)

Грибы подкласса Гетеробазидиомицеты имеют сложную многоклеточную базидию - гетеробазидию, разделенную на две части: нижнюю расширенную - гипобазидию и верхнюю - эпибазидию. Эпибазидия состоит из 2-4 клеток и отделена перегородкой от

гипобазидии. Плодовые тела у гетеробазидиомицетов студенистой консистенции, реже - сухие, напоминающие корочки, подушечки.

КЛАСС УСТИЛЯГИНОМИЦЕТЫ - USTILAGINOMYCETES

У представителей этого класса базидии образуются из характерных толстостенных спор — устоспор, в которых происходит кариогамия. Класс включает 2—7 порядков, из которых практически наиболее важен порядок Головневые — Ustilaginales. состоящий, по данным «Dictionary of the Fungi» (2001), из 14 семейств.

В этот класс включают также небольшой порядок экзобазидиальные — Exobasidiales.

Порядок Экзобазидиальные — Exobasidiales. В порядке Экзобазидиальные базидии формируются непосредственно на мицелии. Плодовые тела отсутствуют. Ранее грибы этого порядка относили к гименомицетам.

Все экзобазидиальные грибы — паразиты цветковых растений. Мицелий этих грибов развивается в вегетативных частях растений-хозяев и вызывает гипертрофию тканей. Чаще всего экзобазидиальные грибы заражают растения из семейства вересковых - Экзобазидиум брусничный – *Exobasidium vaccinii*.

Под эпидермисом растений брусники прямо на мицелии образуется слой параллельно расположенных базидий, которые затем разрушают эпидермис. На каждой базидии 2 или 4 (реже 6 или 8) одноядерные базидиоспоры, которые распространяются ветром и заражают новые растения. В начале или середине лета листья, а иногда и молодые стебли брусники, деформируются: зараженные участки листьев разрастаются, поверхность участков на верхней стороне листьев становится вогнутой и приобретает красную окраску; на нижней стороне листьев пораженные участки выпуклые, снежно-белые. Деформированный участок становится толще (в 3—10 раз по сравнению с нормальными листьями).

Иногда деформируются стебли: они утолщаются, искривляются и становятся белыми. Изредка поражаются и цветки.

Важным паразитом чайного куста является *E. vexans*, приносящий большой ущерб плантациям чая.

Порядок головнёвые - Ustilaginales. Головнёвые грибы - узкоспециализированные паразиты, вызывающие у растений болезни. известные под названием головня, для большинства из них характерен диффузный тип паразита - мицелий пронизывает все органы и ткани растения. Проявляются головневые чаще на репродуктивных органах - завязях, соцветиях. Органы растения, пораженные грибом, как правило, полностью разрушаются и превращаются в темную плотную порошащую массу, состоящую из огромного числа спор, носящих название устоспор (телиоспор) головневых спор. Этими спорами головневые распространяются и сохраняются. Прорастая, телиоспоры образуют базидию с базидиоспорами, которые у некоторых головневых грибов способны почковаться. Затем базидиоспоры попарно копулируют и, прорастая дикариотическим мицелием, заражают растения.

Головневые грибы паразитируют главным образом на зерновых - пшенице, ячмене, ржи, сорго, кукурузе, просе и др. Из овощных культур головней поражается, лук.

Название отдельных видов головни, как правило, связано с особенностями проявления внешнего вида. Пораженные части растения выглядят как обугленные или покрытые сажой. Поэтому заболевания, вызываемые головневыми грибами, носят название "головня": твердая, пыльная, стеблевая, пузырчатая и т.д.

В зависимости от строения базидий и расположения на ней базидиоспор. Базидиоспоры располагаются пучком на базидии. Порядок Головневые делят на два семейства – устилягиновые и тиллециевые.

В семейство устилягиновые – Ustilaginaceae – объединены виды грибов с четырехклеточной базидией. На каждой клетке образуется по одной базидиоспоре. Наибольший интерес представляют 3 рода: устилага, сороспориум и сфацелотека

Для **семейства тиллециевых – Tilletiaceae** характерна одноклеточная базидия. Сюда относятся рода: тиллеция, уроцистис, энтилома.

Род энтилома – Entiloma. *E.camissianum* var. *pratense* заражает тимофеевку. *E.dactylidis* - ежу сборную.

По типам заражения (фазам, в которые происходит заражение, и источникам инфекции) все головневые грибы можно разделить на четыре основные группы.

1. Заражение растений происходит в *период прорастания семян*: а) за счет спор, находящихся на поверхности семян; б) за счет спор, находящихся в почве; в) за счет спор или кусочка мицелия, находящихся под пленкой (у пленчатых культур).

2. Заражение происходит в *период цветения*.

3. Заражение возможно в *течение всей вегетации* (в период активного роста растений).

4. Заражение происходит в *период выходящего колоса*. В таблице 7 приведен перечень основных видов головни на хлебных злаках и других культурах с указанием типа, по которому происходит заражение. Как видно из таблицы, у большинства видов головни заражение происходит в период прорастания семян за счет спор, находящихся на поверхности. Все эти виды проявляются уже в период созревания зерна, и телиоспоры попадают на семена во время обмолота (у твердой, карликовой, стеблевой, пузырчатой головни), либо несколько раньше, незадолго до уборки, если головневая масса может пылить в поле (пыльная головня овса, черная головня ячменя и др.).

Заражение растений в период цветения происходит только у пыльной головни пшеницы и пыльной головни ячменя: проросток приникает в завязь. В период колошения колоски, пораженные этими видами головни, полностью разрушаются, превращаясь в пылящую головневую массу. Споры, рассеиваясь ветром, попадают на цветки здоровых растений (на рыльце пестика) и прорастают в фрагмобазидию (базидиоспоры у этих видов головни не образуются, а половой процесс осуществляется слиянием клеток самой базидии). Клетки фрагмобазидии попарно копулируют и, прорастая, формируют дикариотический мицелий, который и осуществляет заражение. Достигнув завязи, гриб приостанавливает свое развитие. Зерно формируется нормально и ни внешне, ни по товарным качествам не отличается от здорового, но для семенных целей оно уже непригодно. При посеве такого зерна разовьется больное растение, на котором весь колос, кроме центрального стержня, превратится в пылящую головневую массу в период цветения.

Заражение растений возможно в течение всей вегетации, это характерно для пузырчатой головни кукурузы. Телиоспоры могут находиться на поверхности зерна или в почве. В течение всей вегетации заражаются молодые растущие ткани. На пораженных органах появляются вздутия вначале небольшие, позже увеличивающиеся в размерах. Сначала они покрыты беловатой пленкой, которая позже разрывается, обнаруживая пылящую черную массу спор.

В колосе поражаются не все зерна, а, как правило, бывает поражено 1-5 колосков. В незрелом колосе, не ломая его, трудно обнаружить индийскую головню, так как зараженные семена скрыты колосковыми чешуйками. При созревании больные колоски раскрываются больше здоровых, наружные и внутренние чешуйки раздвигаются и становятся видны зерна, пораженные головней. При небольшом сотрясении пораженные зерна выпадают из колосков, заражая почву.

Источником инфекции в поле являются телиоспоры, сохраняющиеся в почве или приставшие к поверхности здоровых семян.

Биологической особенностью возбудителя индийской головни является то, что телиоспоры прорастают после периода покоя (5-6 мес) и заболевание в первый год может не проявиться, но споры могут сохраняться жизнеспособными в почве больше 4 лет. Иногда болезнь заметна в год посева. Для РФ индийская головня - карантинный объект.

КЛАСС УРЕДИНИОМИЦЕТЫ - UREDINIOMYCETES

Грибы класса Урединиомицеты имеют разделенные перегородками базидии, которые вырастают из толстостенной покоящейся клетки телиоспоры. Плодовых тел у них нет. Урединиомицеты паразиты насекомых и растений. Их разделяют на два порядка - Септобазидиальные — *Septobasidiales*, виды которого паразитируют на щитовках, и Ржавчинные - *Uredinales*, представители которого являются облигатными паразитами высших растений.

Порядок ржавчинные (*Uredinales*). Ржавчинные грибы - возбудители болезней, называемых ржавчинами. Симптомы поражения растений - пустулы (подушечки), ржавые, ржаво-бурого цвета. Отсюда название всей группы грибов этого порядка - ржавчинные грибы.

Все ржавчинные грибы - облигатные паразиты с узкой филогенетической специализацией. Для многих из них характерно наличие в пределах одного и того же вида нескольких специализированных форм, приуроченных к одному или нескольким видам растений.

Ржавчинные поражают: все хлебные злаки, кукурузу, сорго, сахарный тростник, бобовые, хлопчатник, подсолнечник, свеклу, грушу, смородину, кофейное дерево и др.

Цикл развития ржавчин очень сложен. Для большинства ржавчин в цикле развития необходимо наличие промежуточного хозяина.

Рассмотрим цикл развития *стеблевой*, или *линейной*, *ржавчины злаков* (*Puccinia graminis*). Злак является основным растением-хозяином, а барбарис - промежуточным.

Зимуют ржавчинные в телиостадии (телиоспорами). Прорастающие телиоспоры образуют базидиальное спороношение - базидии с разными по знаку (+ и -) базидиоспорами.

Базидиоспоры вызывают первичное заражение листьев барбариса. На листьях барбариса с верхней стороны появляются спермогонии (пикниды), содержащие мелкие одноклеточные споры – спермации, пикноспоры. Спермации и спермогонии возникают на одноядерном мицелии гриба. При их созревании из отверстий выделяется сладковатая жидкость, привлекающая насекомых, переносящих споры гриба на другие листья барбариса.

Спермации и образующий их мицелий относятся к различным половым группам. Для дальнейшего развития гриба необходимо, чтобы содержимое двух различных спермаций соединилось друг с другом. Соединение мицелиев различных полов происходит насекомыми, которые переносят споры одного пола в спермогонии другого пола. Кроме того, на одном и том же листе прорастают пикноспоры разных знаков и могут подрастать друг к другу. Во всех случаях происходит соединение ядер двух различных полов, в результате которого образуется двухъядерный мицелий. Однако слияние ядер не происходит, а начинается двухъядерная, или дикариотическая, стадия гриба. Двухъядерный мицелий располагается под спермогониями внутри листа барбариса и в конце концов формирует на нижней стороне под спермогонием вместилище для двухъядерных спор - так называемый эций, внутри которого образуются эциоспоры (рис. 18). Эции имеют вид округлых или продолговатых чашечек. Эциоспоры округлой формы, одноклеточные и окрашены в ярко-желтый цвет. После созревания эция вскрывается, высыпаются эциоспоры. Эциоспоры производят новые заражения, попадая на стебли злаков. На них и начинается основное развитие паразита, развивается летняя стадия, или урединиастадия.

паразита. На стеблях образуются продолговатые пустулы, заполненные спорами гриба - урединиоспорами. Урединиоспоры одноклеточные, с тонкой оболочкой, оранжевые, яйцевидной формы, расположенные на бесцветных ножках. Урединиоспоры разносятся ветром, дождем, насекомыми, вызывая новые заражения.

Урединиастадия - самая массовая стадия ржавчинных грибов. За лето она может дать несколько поколений урединиоспор, которые попадая на соседние растения при благоприятных внешних условиях, вызывают массовое поражение хлебов (эпифитотию).

При наступлении неблагоприятных условий на месте урединиоспор на том же двухъядерном мицелии образуются двухклеточные с темной толстой оболочкой телиоспоры. Телиоспоры служат для перезимовки гриба. Они зимуют на стерне злаков. Перезимовавшие телиоспоры прорастают в базидию с базидиоспорами. Для продолжения развития гриба необходимо, чтобы базидиоспора попала на листья барбариса. При прорастании на листе барбариса из каждой базидиоспоры развивается спермогоний, или пикнида. Поскольку базидиоспоры относятся к двум половым группам (две к одному полу, две к другому), спермогонии также относятся к двум половым группам.

Таким образом, полный жизненный цикл возбудителя стеблевой ржавчины складывается из пяти следующих друг за другом спороношений: 1) спермогонии, или пикниды, с развивающимися в них спермациями (пикноспорами); 2) эции с эциоспорами; 3) урединии с урединиоспорами; 4) телии с телиоспорами; 5) базидии с базидиоспорами. Виды ржавчинных грибов, имеющих в своем цикле развития все указанные типы спороношения, относят к формам с полным циклом развития. У многих ржавчинных грибов некоторые типы спороношений отсутствуют. Их называют неполными формами. Как указывалось, эти спороношения могут развиваться на одном растении у однохозяйных видов и на различных у разнохозяйных видах. Следовательно, вид *Russinia graminis* относится к полным разнохозяйным видам ржавчинных грибов (рис. 19).

К разнохозяйным ржавчинам относятся, например: линейная, или стеблевая, ржавчина злаков (промежуточный хозяин - барбарис), ржавчина кукурузы (промежуточный хозяин - кисличка) и др.

По такому неполному или, как его еще называют, - сокращенному циклу развивается, например, желтая ржавчина пшеницы. Весь цикл ее развития складывается только из урединиистадии, которой она распространяется и перезимовывает. Но обязательным условием для этого является наличие озимых посевов пшеницы, т.е. живых зимующих растений, на которых ржавчина могла бы сохраниться в виде уредомицелия. Перезимовавший мицелий весной образует новые уреинипустулы с урединиоспорами, которые и будут осуществлять заражение. Сначала инфекция попадает на соседние растения, а затем при помощи ветра может распространиться и на яровые посевы пшеницы.

По такому же сокращенному циклу могут развиваться и другие листовые ржавчины хлебных злаков - бурая ржавчина пшеницы, бурая ржавчина ржи, карликовая ржавчина ячменя (в районах, где есть посевы озимые этих культур). Параллельно с сокращенным циклом у этих ржавчин может проходить и полный цикл развития (при наличии промежуточника).

Разнохозяйные ржавчины, способные развиваться не только по полному, но и по сокращенному циклу, при котором они обходятся без промежуточного хозяина, называют необязательно разнохозяйными.

Старые и новые названия типов спороношения и спор

По ранее принятой терминологии	По современной терминологии
Эцидий	Эций
Эцидиоспора	Эциоспора
Уредопустула	Урединия

Уредоспора	урединиоспора
Телиопустула	Телия
Телейтоспора	телиоспора

Основные роды ржавчинных грибов следующие.

Род Puccinia. Телиоспоры двуклеточные. Подушечки телиоспор темные, покрытые эпидермисом или разрывающие его. Грибы рода Puccinia вызывают стеблевую ржавчину злаков, бурую листовую ржавчину пшеницы, обыкновенную ржавчину кукурузы и сорго, ржавчину подсолнечника, свеклы и др.

Род Uromyces. Телиоспоры одноклеточные, на длинных ножках. Грибы рода Uromyces вызывают ржавчину гороха, бобов, фасоли и др.

Род Hemiliae относят ржавчину кофейного дерева (H.vastatrix). Возбудитель развивается в основном в урединиостадии.

Порядок ржавчинных грибов делят на семейства на основании строения телиоспор, строения и особенностей развития эциев, специализации в отношении растений-хозяев. Важнейшие семейства ржавчинных – Pucciniaceae и Melampsoraceae (табл.9).

Для грибов семейства пукциНИЕВЫЕ - Pucciniaceae характерны одиночные, не соединенные друг с другом телиоспоры.

У пукциНИЕВЫХ телиопустулы закладываются под эпидермисом, По мере формирования телиоспор эпидермис разрывается, и они выходят на поверхность пораженных органов.

У грибов рода пукциния - Puccinia телиоспоры двуклеточные.

У грибов рода уромицес - Uromyces телиоспоры одноклеточные.

Для грибов семейства мелаМПСОРОВЫЕ характерно наличие одноклеточных телиоспор; они не одиночные, а сросшиеся друг с другом.

У грибов рода Melampsora телиоспоры срастаются боковыми стенками, образуя плотную корочку. Это корочка состоит из одноклеточных темноокрашенных спор. M. lini - возбудитель ржавчины льна.

У грибов рода кронаРЦИУМ - Cronartium (сем. кронаРЦИЕВЫЕ – Cronartiaceae) телиоспоры собраны в цепочки, срастающиеся друг с другом и образующие столбики, или колонки, которые расположены на поверхности пораженного органа. C.ribicola - возбудитель столбчатой ржавчины смородины.

Дейтермицеты

Отдел объединяет грибы с многоклеточным мицелием, размножающиеся только бесполом путем — конидиями (стадия анаморфы); половые, т. е. совершенные стадии развития у них отсутствуют. К этому отделу относят виды, полностью утратившие способность к образованию асков или базидий (телеоморф), а также те, у которых высшие формы спороношения неизвестны.

Несовершенные грибы имеют многоклеточный хорошо развитый мицелий, но развивается только в гаплоидной стадии. Распространяются и сохраняются они бесполом конидиальным спороношением.

Половое спороношение отсутствует, у некоторых видов встречается сумчатое спороношение (например, род Penicillium или Aspergillus), но оно развивается настолько редко, что не играет существенной роли в цикле развития этих грибов.

К несовершенным относят также грибы, не имеющие никакого спороношения, а встречаются только в виде стерильного (бесплодного) мицелия и размножаются только вегетативно.

Несовершенные грибы - самая многочисленная группа возбудителей болезней. Большинство из них - необязательные паразиты и необязательные сапротрофы, поэтому заболевания в основном проявляются на ослабленных растениях.

При поражении растений несовершенные грибы вызывают: увядание, образование пятнистостей на надземных вегетативных органах, цветках, плодах, гнили, язвы и др.

Конидиальное спороношение несовершенных грибов - основной диагностический признак заболеваний, вызываемых этими грибами.

В настоящее время современная система анаморфных (несовершенных грибов) включает 3 класса: Гифомицеты – *Hyphomycetes*, Целомицеты – *Coelomycetes*, Агономицеты - *Agonomycetes* (Стерильные мицелии – *mycelia sterilia*).

Порядок Гифомицеты - *Hyphomycetales*.

Порядок гифомицеты из класса *Hyphomycetes* объединяет виды, у которых конидиальное спороношение гифомицетов развивается прямо на грибнице или мицелиальных стромах и выходит на поверхность субстрата в виде налёта. Конидиеносцы могут быть короткие или длинные, простые или разветвленные, конидии - одноклеточные и многоклеточные, овальные, эллипсоидальные, нитевидные, веретенообразные или иной формы, окрашенные или бесцветные. Среди гифомицетов есть грибы – продуценты антибиотиков, ферментов. Их широко используют в микробиологической промышленности. Грибы, паразитирующие на насекомых-вредителях и фитопатогенных грибах, используют в борьбе с болезнями и вредителями растений.

Гифомицеты подразделяются на 4 семейства, различающихся по характеру распределения и окраске конидиеносцев и конидий: монилиевые, демаидевые, стильбелловы и туберкуляриевые.

У представителей семейства **Монилиевые - *Moniliaceae*** мицелий, конидиеносцы конидии бесцветные, иногда конидии могут быть окрашены, но мицелий и конидиеносцы бесцветные всегда.

Семейство включает множество родов и видов. Охарактеризуем основные из них.

Род монилия - *Monilia*. Мицелий у грибов этого рода эндогенный, выступает на поверхность в виде плотных пучков гиф. Конидии формируются в виде цепочек, а затем распадаются на отдельные клетки. Наиболее вредоносные виды – *M. fructigena*, *M. cinerea*, *M. mali* - вызывают соответственно плодовую гниль семечковых, серую плодовую гниль косточковых и монилиальный ожог яблони.

Род Ботритис (*Botrytis*) - конидиеносцы древовидно разветвленные, конидии одноклеточные, овальные, собранные на концах конидиеносцев в головки. Грибы рода *Botrytis* вызывают серую гниль капусты, винограда, цитрусовых, коробочек хлопчатника, початков кукурузы и других сельскохозяйственных культур (*B. cinerea*), серую шейковую гниль лука (*B. allii*) и др.

Род Вертицилл (*Verticillium*) - конидиеносцы мутовчато-разветвленные, конидии одноклеточные, эллипсоидальные, вначале бесцветные, затем коричневые. Грибы этого рода - один из основных возбудителей увядания хлопчатника, клещевины, подсолнечника, овощных, а также плодовых и ягодных культур,

Род Тиелавиопсис (*Thielaviopsis*) - в цикле развития две стадии: конидиеносцы бесцветные, по форме напоминают ламповое стекло, внутри образуются эндоконидии бесцветные, цилиндрические, и темноцветные, бочонковидные или цилиндрические хламидоспоры с толстыми стенками, развиваются цепочками на концах гиф. Грибы рода Тиелавиопсис вызывают черную корневую гниль различных растений, встречающихся во всех районах земного шара. Этот вид поражает более 100 видов растений, особенно страдают от него табак, хлопчатник, арахис, бобовые и другие культуры.

Род Пенициллиум (*Penicillium*). Конидиеносцы этого рода на вершине кистевидноразветвленные, конидии в цепочках. Фитопатогенные виды являются

возбудителями голубой и зеленой плесени плодов цитрусовых, коробочек хлопчатника, луковиц и семян многих растений. Большое значение имеют представители рода, синтезирующие биологически активные вещества – антибиотики.

Род Аспергиллус (*Aspergillus*). Конидиеносцы шаровидные или булабовидновздутые, конидии в цепочках. Фитопатогенные виды вызывают плесени: *A.niger* – возбудитель черной плесени на различных субстратах. Представители рода широко используются в микробиологической промышленности для получения органических кислот (лимонной) и ферментов.

Род Триходерма (*Trichoderma*). Конидии у грибов этого рода шаровидные, собраны в головки. Отдельные виды вызывают гнили. Некоторые виды (*T.lignorum*) используются в биологической борьбе с фитопатогенными грибами.

Род трихотециум – *Trichothecium*. У грибов этого рода конидии двухклеточные, бесцветные; конидиеносцы простые, удлинённые. Наиболее известен сапротроф *T. gaseum* - обычная розовая плесень.

У грибов семейства **демациевые – *Dematiaceae*** мицелий, конидиеносцы и конидии темноокрашенные: оливковые, коричневые, бурые, черные. В отдельных случаях (виды рода церкоспора и др.) конидии могут быть почти бесцветными. Семейство включает несколько видов, вызывающих опасные болезни растений.

Род кладоспорium – *Cladosporium*. Конидиеносцы у грибов этого рода слабо разветвленные, в виде пучков, конидии одноклеточные или с 1-2 перегородками, овальные, окрашенные. Фитопатогенные виды *C.fulvum* - пятнистости на листьях томата, *C.cuscutae* - возбудитель бурой пятнистости плодов огурца.

Род фузикладииум – *Fusicladium*. Для грибов этого рода характерны короткие конидиеносцы с 1-2 перегородками, конидии вначале одноклеточные, затем двухклеточные, яйцевидные, грушевидные. Представитель рода *F.dendriticum* является конидиальной стадией вида из класса Аскомицеты – *Venturia inaequalis* — возбудителя парши яблони. Гриб заражает листья, плоды и побеги.

Род Церкоспора - *Cercospora* - конидиеносцы в пучках, окрашены в оливковый или коричневатый цвет, конидии длинные, почти нитевидные, или веретенообразные, светлые, иногда почти белые, с несколькими поперечными перегородками. *Cercospora* - возбудитель церкоспороза свеклы, *C.arachidicola* - арахиса, *C.musae* - банана, *C.maydis* - кукурузы, *C.oryzae* - риса и других культур.

Род Гельминтоспорий - *Helminthosporium* - конидиеносцы окрашенные, с перегородками, выходят из устьиц пучками. Конидии темноцветные, прямые или слегка изогнутые, цилиндрические, веретеновидные или обратнобулабовидные, с несколькими поперечными перегородками. К важнейшим представителям рода относятся возбудители болезней злаков, называемых гельминтоспориозами.

Род Дрекслера - *Drechslera* имеет конидиеносцы продолговатые, цилиндрические или обратнобулабовидные. Конидии бледно-оливковые или бесцветные. Наиболее важные представители: *D.graminea* (син. *Helminthosporium gramineum*) возбудитель полосатой пятнистости ячменя, *D.terres* (син. *A.terres*) возбудитель сетчатой пятнистости ячменя.

Род Пирикулярия - *Piricularia* - конидиеносцы простые или ступенчатые, окрашенные. Конидии обратногрушевидные или веретеновидные, дымчатого цвета, с несколькими поперечными перегородками. *P.oryzae* - возбудитель пирикулярриоза риса, сахарного тростника, *P.grisea* - возбудитель пирикулярриоза проса.

У грибов семейства **туберкуляриевые – *Tuberculariaceae*** - конидиальное спороношение представлено в виде подушечек различной окраски. Конидии разнообразны по окраске, форме и строению. Наиболее опасные патогены относятся к родам фузариум и туберкулярия.

Род Фузариум - *Fusarium* - конидии многоклеточные, бесцветные, серповидноизогнутые. Грбы этого рода имеют два вида конидий – макро- и микроконидии. Грибы рода *Fusarium* вызывают фузариоз пшеницы, льна, кукурузы, риса, хлопчатника, *F.oxysporum*, *F.musarum* возбудитель фузариоза банана ("Панамская болезнь"), *F. oxysporum f. batatas* - возбудитель фузариоза батата и других культур. Фузариоз может проявляться в виде корневой гнили.

Род туберкулярия - *Tubercularia*. Для его представителей характерны яркие, чаще красные конидиальные подушечки, выступающие через разрывы коры ветвей. Конидии одноклеточные, светлые, яйцевидно-цилиндрические. Конидиеносцы простые. Представляет интерес *T.vilgaris*, вызывающий усыхание и отмирание побегов смородины, вишни, березы. Конидиеносцы семейства стильбелловые – *Stilbaceae* соединены в коремии. Главный род - графиум – *Grafium*. У видов этого рода конидии погружены в слизь. Распространяются они с помощью воды и насекомыми. *G. ulmi* - возбудитель голландской болезни вязов.

Порядок меланкониевые (Melanconiales). У грибов, относящихся к порядку меланконииальные из класса **Coelomycetes** (по современной классификации) конидиеносцы собраны на основании, имеющем вид бугорка, подушечки или диска. Такое спороношение называют ложем. Обычно ложе погружено в субстрат и сверху прикрыто кутикулой, эпидермисом, или перидермой растения-хозяина, которые при созревании разрываются. Меланкониевые включают два близких между собой рода грибов *Colletotrichum* и *Gloeosporium*. Конидиеносцы в том и другом случае короткие, расположенные скученно. Конидии бесцветные, одноклеточные продолговато-яйцевидные, цилиндрические и серповидные, часто с капельками масла. Род *Colletotrichum* отличается от рода *Gloeosporium* тем, что имеет темноокрашенные щетинки (выросты) на конидиальном ложе. Род *Gloeosporium* щетинок не имеет,

Род сфацелома – *Spahaceloma*. Наиболее известен *S.fawsettii* - возбудитель парши цитрусовых. Гриб широко распространен и встречается повсюду, где культивируют лимон и апельсин.

Порядок сферопсидальные - *Sphaeropsidales* (пикнидиальные - *Pycnidiales*). В сферопсидальные из класса **Coelomycetes** (по современной классификации) объединены несовершенные грибы, у которых конидии образуются в пикнидах. Пикниды мелкие, шаровидной или грушевидной формы, и почти полностью погружены в субстрат, на поверхность пораженной ткани выходят только устья пикнид с небольшим выводным отверстием. Конидии (пикноспоры, стилоспоры) формируются в пикнидах на небольших, отходящих от стенок пикниды конидиеносцах, и при созревании отчлениваются от них. Окраска пикнид у сферопсидальных грибов от светлой до темной, почти черной. Они могут быть мягкими и твердыми. Конидии бесцветные или окрашенные, овальные, нитевидные, и др. По строению конидии одноклеточные и многоклеточные. Форма и строение конидий - основные признаки, по которым пикнидиальные грибы разделяются на роды. Пикнидиальные, поражая самые различные органы - листья, побеги, скелетные ветви, могут вызвать разнообразные симптомы заболеваний: пятнистость, увядание, засыхание. Для всех пикнидиальных характерным диагностическим признаком является наличие на пораженных органах пикнид в виде темных бугорков или точек.

Род Фома - *Phoma* - пикниды шаровидные, эллипсоидальные, приплюснутые, погружены в субстрат. Конидии бесцветные, реже слегка желтоватые, одноклеточные, разнообразной формы от яйцевидных до цилиндрических. Конидиеносцы простые, расположены радиально или отсутствуют. *P.betae* - возбудитель фомоза свеклы, фомоза капусты, моркови, томата. Болезни вызываемые грибами рода Фома называются фомозами.

Род Сферопсис - *Sphaeropsis* - пикниды шаровидные, яйцевидные темноокрашенные пикноспоры. Наиболее вредоносен возбудитель черного рака плодовых

деревьев – *S.malorum*. На листьях яблони он вызывает появление коричневых пятен, на которых к осени образуются пикниды. На цветках и подушечках поражение напоминает ожог, на плодах - черную гниль. На скелетных сучьях и штамбе постепенно разрастаются красно-бурые вдавленные пятна. Со временем кора становится похожей на обугленную и отмирает, обнажая черную древесину. Дерево погибает через 3-4 года.

Род Аскохита - *Ascochyta* - конидии от цилиндрических до веретеновидных, бесцветные, с одной, реже с двумя перегородками. Грибы этого рода - паразиты, вызывающие пятнистости различных частей - растений, варьирующие по форме и окраске. Болезни, вызываемые ими, называют аскохитозами: аскохитоз гороха, бобов, кунжута, клеверины, хлопчатника, табака и других культур.

Род Диплодия - *Diplodia* - конидии от сероватого до темно-коричневого цвета, в массе желто-коричневые. Форма конидий - эллипсоидальная, двухклеточные. Наиболее известен *D.zaeae* - возбудитель диплодиоза кукурузы, или сухой гнили кукурузы. Диплодиоз поражает кенаф, батат, цитрусовые и др.

Род Септория - *Septoria* - конидии веретеновидные, цилиндрические, игольчатые, прямые или изогнутые, бесцветные, с различным числом перегородок и без них. Септория является широко распространенным родом, поражает сою, томаты, батат, цитрусовые и др., *S.podorum* – возбудитель септориоза пшеницы.

Род Цитоспора - *Cytospora* - пикниды многокамерные, образуются в сторомых, погруженных в ткань субстрата. Конидии мелкие, слегка изогнутые. Эти грибы вызывают широко распространенное заболевание косточковых – цитоспороз, или усыхание. Один из возбудителей этого заболевания – *C.rubescens* (syn. *C.leucostoma*). Цитоспороз вызывает гибель всего растения, а не только усыхание его отдельных ветвей. Цитоспороз семечковых вызывает *C.scheltzeri* (syn. *C. capitata*).

КЛАСС АГОНОМИЦЕТЫ – AGONOMYCETES (MYCELIA STERILIA)

Грибов, не развивающих споронии, немного. В цикле развития имеются только грибница и склероции. Такие грибы называют также **Стерильные (бесплодные) мицелии - *Mycelia sterilia***.

Род склеротий - *Sclerotium*. Грибы этого рода вызывают гниль растительных тканей - корней сахарной свеклы, стеблей кукурузы, подсолнечника, арахиса. При поражении растений грибом *Sclerotium* все части растения становятся серовато-черными от обильного образования черных мелких склероций, отчего болезнь называют угольной гнилью. Гриб паразитирует на кукурузе, сорго. Склероции этого гриба чаще прорастают мицелием.

Возбудитель южной склероциальной гнили *S.rolfsii* поражает арахис, томаты, табак, фасоль и другие растения.

Род ризоктония - *Rhizoctonia*, *Rhizoctonia* – возбудитель черной ножки рассады капусты, *Rhizoctonia solani* вызывает черную паршу картофеля, гнили всходов сахарной свеклы, хлопчатника и других сельскохозяйственных культур.

Контрольные вопросы.

1. Охарактеризуйте основные признаки грибов отдела Аскомикота.
2. На какие классы подразделяются аскомицеты?
3. Охарактеризуйте класс археаскомицетов как возбудителей болезней растений.
4. Охарактеризуйте класс эуаскомицетов как возбудителей болезней растений.
5. Охарактеризуйте класс дискомицетов как возбудителей болезней растений.
6. Охарактеризуйте класс локулоаскомицетов как возбудителей болезней растений.
7. Охарактеризуйте порядок *Ustilaginales*.
8. Охарактеризуйте жизненный цикл твердой, пыльной, стеблевой и пузырчатой головни.

9. Охарактеризуйте порядок Uredinales.
10. Охарактеризуйте жизненный цикл стеблевой или линейной, ржавчины злаков

Лабораторная работа 14 (2 ч).

Тема: Лихенизированные грибы и миксомицеты

Цель – изучить систематику лишайников и миксомицетов.

Задачи работы:

1. Изучить морфологию, физиологию, размножение и экологию лишайников.
2. Изучить морфологию, физиологию, размножение и экологию миксомицетов.

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

Описание (ход) работы:

Лишайники

Лишайники - симбиотические ассоциации грибов (**микобионт**) и микроскопических зелёных водорослей и/или цианобактерий (**фотобионт**, или **фикобионт**); микобионт образует слоевище (таллом), внутри которого располагаются клетки фотобионта. Группа насчитывает более 26 000 видов.

Первые описания известны из «Истории растений» Теофраста, который указал два лишайника — *Usnea* и *Rocella*, которую уже тогда использовали для получения красящих веществ. Теофраст предполагал, что они представляют собой наросты деревьев или водоросли. В XVII веке было известно только 28 видов. Французский врач и ботаник Жозеф Питтон де Турнефор в своей системе выделил лишайники в отдельную группу в составе мхов. Хотя к 1753 году было известно свыше 170 видов, Карл Линней описал только 80, охарактеризовав их как «скудное крестьянство растительности», и включил вместе с печёночниками в состав «наземных водорослей».

Началом **лихенологии** (науки о лишайниках) принято считать 1803 год, когда ученик Карла Линнея Эрик Ахариус опубликовал свой труд «*Methodus, qua omnes detectos lichenes ad genera redigere tentavit*» («Методы, с помощью которых каждый сможет определять лишайники»). Он выделил их в самостоятельную группу и создал систему, основанную на строении плодовых тел, в которую вошли 906 описанных на то время видов.

Первым на симбиотическую природу в 1866 году на примере одного из видов указал врач и миколог Антон де Бари. В 1867 году ботаник Симон Швенденер распространил эти представления на все виды. В том же году русские ботаники Андрей Сергеевич Фаминцын и Осип Васильевич Баранецкий обнаружили, что зелёные клетки в лишайнике - одноклеточные водоросли. Эти открытия были восприняты современниками как «удивительнейшие».

Сегодня лихенология является самостоятельной дисциплиной, смежной с микологией и ботаникой.

Традиционная систематика лишайников оказывается во многом условна и отражает, скорее, особенности их строения и экологии, чем родственные отношения внутри группы, тем более что основывается она только на микобионте, а фотобионт сохраняет свою таксономическую самостоятельность. Классифицируют лишайники по-разному, но в настоящее время рассматривают их как экологическую группу, уже не придавая им статуса таксона, поскольку независимость происхождения разных групп лишайников не вызывает сомнений, а группы, входящие в состав лишайников, помещают туда же, что и родственные микобионту грибы, не образующие лишайников. Для обозначения лишайников используют биномиальную номенклатуру, названия соответствуют названию микобионта.

Микобионты лишайников, как и их фикобионты, являются полифилетической группой.

Лишайники - это симбиотические организмы, тело которых (таллом) образовано соединением грибных (**микобионт**) и водорослевых и/или цианобактериальных (**фотобионт**) клеток во внешне кажущемся однородным организмом.

Лишайники, состоящие из гриба одного вида и цианобактерии (сине-зелёной водоросли) (**цианолишайник**, например, *Peltigera horizontalis*) или водоросли (**фиколишайник**, например, *Cetraria islandica*) одного вида, называют **двухкомпонентными**; лишайники, состоящие из гриба одного вида и двух видов фотобионтов (одной цианобактерии и одной водоросли, но никогда не двух водорослей или двух цианобактерий), называют **трёхкомпонентными** (например, *Stereocaulon alpinum*). Водоросли или цианобактерии двухкомпонентных лишайников питаются автотрофно. В трёхкомпонентных лишайниках водоросль питается автотрофно, а цианобактерия, по-видимому, питается гетеротрофно, осуществляя азотфиксацию. Гриб питается гетеротрофно ассимилятами партнёра(ов) по симбиозу. Единого мнения о возможности существования свободноживущих форм симбионтов в настоящее время не достигнуто. Имелся опыт выделения всех компонентов лишайников в культуру и последующая реконструкция исходного симбиоза.

Из известных видов грибов в образовании лишайников участвует около 20 %, в основном это аскомицеты (~98 %), остальное базидиомицеты (~0,4 %), некоторые из них, не имея полового размножения, формально относятся к дейтеромицетам. Существуют также актинолишайники, в которых место гриба занимают мицелиарные прокариоты актиномицеты. Фотобионт в 85 % представлен зелёной водорослью, встречаются 80 видов из 30 родов, наиболее важным из которых является *Trebouxia* (входит в состав более чем 70 % видов лишайников). Из цианобактерий (в 10—15 % лишайников) участвуют представители всех крупных групп, кроме *Oscillatoriales*, наиболее распространён *Nostoc*. Часты гетероцистные формы *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix* и *Fischerella*. В талломе лишайника клетки цианобионта могут структурно и функционально модифицироваться: увеличивается их размер, изменяются форма, уменьшается количество карбоксисом и количество материала оболочек, замедляется рост и деление клеток.

Отношения фотобионта и гриба можно описать как контролируемый паразитизм со стороны последнего. Контакт между компонентами лишайника может быть различен:

- нет прямого контакта,
- через поверхности,
- гриб посредством гаусторий проникает в тело водоросли.

Во взаимоотношениях компонентов наблюдается тонкий баланс, так, деление клеток фотобионта согласовано с ростом гриба. Микобионт получает от фотобионта питательные вещества, производимые тем в результате фотосинтеза. Гриб же создаёт водоросли более оптимальный микроклимат: защищает её от высыхания, экранирует от ультрафиолетового излучения, обеспечивает жизнь на кислых субстратах, смягчает действие ряда других неблагоприятных факторов. Из зелёных водорослей поступают многоатомные спирты, такие как рибит, эритрит или сорбит, которые легко усваиваются грибом. Цианобактерии поставляют в гриб в основном глюкозу, а также азотсодержащие вещества, образуемые благодаря осуществляемой ими фиксации азота. Потоки веществ из гриба в фотобионт не обнаружены.

Лишайники окрашены в широком диапазоне цветов: от белого до ярко-жёлтого, коричневого, сиреневого, оранжевого, розового, зелёного, синего, серого, чёрного.

По внешнему виду различают лишайники:

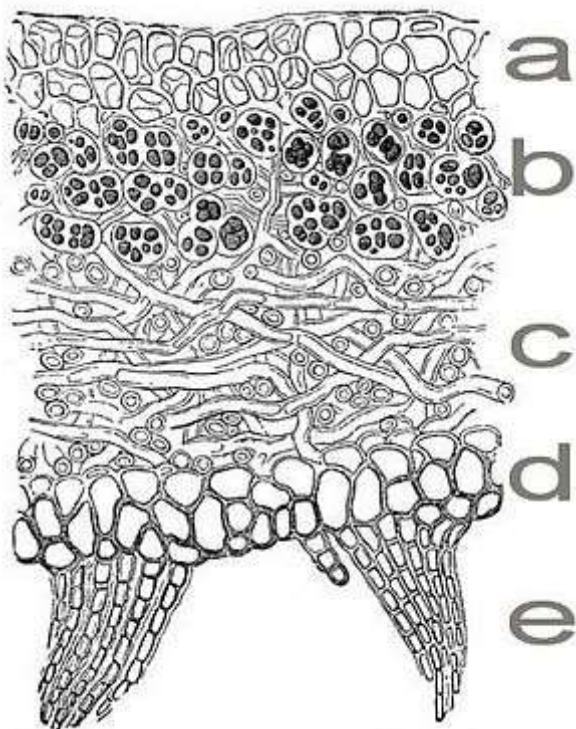
- **Накипные, или корковые.** Таллом таких лишайников представляет собой корочку («накись»), его нижняя поверхность плотно срастается с субстратом и не отделяется без значительных повреждений. Накипные лишайники могут жить на крутых склонах гор, деревьях и даже на бетонных стенах. Иногда такие лишайники развиваются внутри субстрата и снаружи совершенно не заметны.

- **Листоватые.** Листоватые лишайники имеют вид пластин разной формы и размера, они более или менее плотно прикрепляются к субстрату при помощи выростов нижнего коркового слоя.

- **Кустистые.** У наиболее сложных с точки зрения морфологии кустистых лишайников таллом образует множество округлых или плоских веточек. Такие лишайники могут расти как на земле, так и свисать с деревьев, древесных остатков, скал.

Это деление не отражает филогенетические связи, существует много переходных форм между ними. Ханс Трасс разработал шкалу жизненности лишайников, отражающую

условия их существования и основывающуюся на степени развитости таллома и способности к половому размножению.



Строение гетеромерного лишайника на примере *Sticta fuliginosa*: а — корковый слой, b — гонидиальный слой, с — сердцевина, d — нижняя кора, е — ризины.

Тело лишайников (таллом) представляет собой переплетение грибных гиф, между которыми находится популяция фотобионта. По внутреннему строению лишайники разделяют на:

- **гомеомерные** (*Collema*), клетки фотобионта распределены хаотично среди гиф гриба по всей толщине таллома;
- **гетеромерные** (*Peltigera canina*), таллом на поперечном срезе можно чётко разделить на слои.

Лишайников с гетеромерным талломом большинство. В гетеромерном талломе верхний слой — *корковый*, сложенный гифами гриба. Он защищает таллом от высыхания и механических воздействий. Следующий от поверхности слой — *гонидиальный*, или *альгальный*, в нём располагается фотобионт. В центре располагается *сердцевина*, состоящая из беспорядочно переплетённых гиф гриба. В сердцевине в основном запасается влага, она также играет роль скелета. У нижней поверхности таллома часто находится *нижняя кора*, с помощью выростов которой (*ризин*) лишайник прикрепляется к субстрату. Полный набор слоёв встречается не у всех лишайников.

Как и в случае двухкомпонентных лишайников, водорослевый компонент — *фикобионт* — трёхкомпонентных лишайников равномерно распределён по таллому, либо образует слой под верхней корой. Некоторые трёхкомпонентные цианолишайники образуют специализированные поверхностные или внутренние компактные структуры (*цефалодии*), в которых сосредоточен цианобактериальный компонент.

Биохимические особенности

Большинство внутриклеточных продуктов, как фото-(фико-), так и микобионтов не являются специфичными для лишайников. Уникальные вещества (внеклеточные), так называемые *лишайниковые*, формируются исключительно микобионтом и накапливаются в его гифах. На сегодня известно 854 таких веществ, например, усниновая кислота, мевалоновая кислота^[15]. Нередко именно эти вещества оказываются решающими в формировании окраски лишайника. Лишайниковые кислоты играют важную роль в выветривании, разрушая субстрат.

Водный обмен

Лишайники не способны к регуляции водного баланса, поскольку у них нет настоящих корней для активного поглощения воды и защиты от испарения. Поверхность лишайника может удерживать воду на короткое время в форме жидкости или пара. В сухих условиях вода быстро теряется на поддержание метаболизма и лишайник переходит в фотосинтетически неактивное состояние, при котором вода может составлять не более 10 % массы. В отличие от микобионта, фотобионт не может долго находиться без воды. Сахар трегалоза играет важную роль в защите жизненно важных макромолекул, таких как ферменты, мембранные элементы и ДНК. Но лишайники нашли способы предотвращения полной потери влаги. У многих видов наблюдается утолщение коры, чтобы обеспечить меньшую потерю воды. Способность поддерживать воду в жидком состоянии очень важна в холодных районах, поскольку замёрзшая вода не пригодна для использования организмом.

Время, которое лишайник может провести высушенным, зависит от вида, известны случаи «воскрешения» после 40 лет в сухом состоянии. Когда поступает пресная вода в форме дождя, росы или влажности, лишайники быстро переходят в активное состояние, возобновляя метаболизм. Оптимально для жизнедеятельности, когда вода составляет от 65 до 90 процентов от массы лишайника. Влажность в течение дня может изменяться в зависимости от темпов фотосинтеза, как правило, она наиболее высока с утра, когда лишайники смачиваются росой.

Рост и продолжительность жизни

Описанный выше ритм жизни является одной из причин для очень медленного роста большинства лишайников. Иногда лишайники растут всего лишь на несколько десятых миллиметра в год, в основном менее чем на один сантиметр. Другой причиной медленного роста является то, что фотобионт, составляя нередко менее 10 % объёма лишайника, берёт на себя обеспечение микобионта питательными веществами. В хороших условиях, с оптимальными влажностью и температурой, например в туманных или дождливых тропических лесах, лишайники растут на несколько сантиметров в год.

Ростовая зона лишайников у накипных форм находится по краю лишайника, у листоватых и кустистых — на каждой верхушке.

Лишайники являются одними из самых долгоживущих организмов и могут достигать возраста нескольких сотен лет, а в некоторых случаях — более 4500 лет, как например ризокарпон географический (*Rhizocarpon geographicum*), живущий в Гренландии.

Размножение

Лишайники размножаются вегетативным, бесполом и половым путём. Особи микобионта размножаются всеми способами и в то время, когда фотобионт не размножается или размножается вегетативно. Микобионт может, как и другие грибы, также размножаться половым и собственно бесполом путём. Половые споры в зависимости от того, относится микобионт к сумчатым или базидиальным грибам, называются аско- или базидиоспорами и образуются соответственно в асках (сумках) или базидиях.

Апотеции лишайника

При размножении аскомицетные лишайники образуют плодовые тела, которые можно разделить на две большие группы: апотеции и перитеции:

- **Апотеций** представляет собой обычно округлое ложе. На ложе находятся сумки между неспороносными окончаниями гиф, образуя открыто расположенный слой, называемый *гимениумом*;

- **Перитеций** имеет более или менее сферическую, почти закрытую структуру, внутри которой находятся аски, аскоспоры освобождаются через поры в плодовом теле.

Микобионт может также производить бесполое *пикноспоры* (*пикноконидии*), созревающие в *пикнидиях* — это сферические или грушевидные мешочки, встроенные в ложе плодового тела и представляющие собой специализированные гифы. Пикнидии часто узнаются как черноватые точки на ложе. Пикноконидии высыпаются и дают начало новому таллому. Пикнидии образуют гифы, которые гаусториями проникают в клетки водорослей. Важную роль в узнавании и селекции фотобионта могут играть лишайниковые вещества и лектины.

Все споры в размере не более нескольких тысячных долей миллиметра. Они распространяются по воздуху и могут, в случае достижения ими более высоких слоёв атмосферы, перемещаться на большие расстояния, а иногда и по всему миру, колонизируя таким образом даже изолированные субстраты.

Вопрос о том, каким образом заново возникает новое сообщество мико- и фотобионта, раскрыт ещё не до конца. Микобионт, прежде чем объединиться со свободным фотобионтом, должен отыскать его и поставить под свой контроль. И то, и другое происходит по-видимому тогда, когда оба партнёра находятся в изголодавшемся состоянии и остро нуждаются в питательных веществах. Даже в лаборатории только в таких условиях можно из двух отдельных организмов создать единый.

Многие кустистые и листоватые лишайники в благоприятных условиях дают специализированные структуры вегетативного размножения, состоящие из клеток водорослей, оплетённых гифами гриба:

- **Изидии** — это выросты таллома в виде булавки, пуговицы, листочка или мелкой веточки. При воздействии ветра, воды, даже лёгкого прикосновения они отрываются;

- **Соредии** образуются внутри лишайника, затем выходят наружу и разрываются, распыляя содержимое, представляющее собой т. н. *диаспоры*, как правило, объединённые в небольшие пачки, при увеличении проявляются зернистость или мучнистость их поверхности.

Изидии и соредии распространяются с ветром, дождём и животными. При попадании на подходящий субстрат прорастают, давая начало новому лишайнику.

Вегетативное размножение также может осуществляться неприспособленными специально для этого фрагментами таллома.

Экология

В связи с очень медленным ростом лишайники могут выжить только в местах, не заросших другими растениями, где есть свободные площади для фотосинтеза. На влажных участках они зачастую проигрывают мхам. Кроме того, лишайники проявляют повышенную чувствительность к химическому загрязнению и могут служить его индикаторами^[17]. Устойчивости к неблагоприятным условиям способствует невысокая скорость роста, наличие различных способов извлечения и накопления влаги, развитые механизмы защиты.

Лишайники, как правило, предъявляют скромные требования к потреблению минеральных веществ, получая их, большей частью, из пыли в воздухе или с дождевой водой, в связи с этим они могут жить на открытых незащищённых поверхностях (камни, кора деревьев, бетон и даже ржавеющий металл). Преимуществом лишайников является терпимость к экстремальным условиям (засухе, высоким и низким температурам (от -47 до $+80$ градусов по Цельсию, около 200 видов обитают в Антарктике), кислой и щелочной среде, ультрафиолетовому излучению). В мае 2005 года проводились эксперименты на лишайниках *Rhizocarpon geographicum* и *Xanthoria elegans*, показавшие, что эти виды по крайней мере в течение примерно двух недель смогли продержаться вне земной атмосферы, то есть в крайне неблагоприятных условиях^[18].

Многие лишайники специфичны к субстрату: одни хорошо развиваются только на щелочных породах, например, известняке или доломите, другие на кислых, не содержащих извести силикатных породах, таких как кварц, гнейс и базальт. Лишайники-эпифиты также предпочитают определённые деревья: выбирают кислую кору хвойных или берёзовых или основную ореховых, клёна или бузины. Ряд лишайников сам выступает в качестве подложки для других лишайников. Нередко формируется типичная последовательность, в которой различные лишайники нарастают друг на друга. Есть виды, которые постоянно живут в воде, например, *Verrucaria serpuloides*.

Лишайники, как и другие организмы, образуют сообщества. Примером лишайниковых ассоциаций является сообщество *Cladonio-Pinetum* — лишайниковые сосновые леса.

•

Роль в почвообразовании

Лишайники выделяют кислоты, способствующие растворению субстрата, и тем самым участвуют в процессах выветривания. Вносят существенный вклад в процессы почвообразования. Лишайники — одни из «пионеров» биоценозов — являются, как правило, первыми организмами, заселяющими субстрат в процессе первичной сукцессии.

На скалах и утёсах лишайники являются важными первоначальными организмами. Они крепятся к поверхности горной породы или даже проникают внутрь. При этом сильно меняют внешний вид горных пород, особенно их цвет, и образуют вокруг себя углубления. Например, когда представители рода *Verrucaria* поселяются на известняке, тот покрывается чёрными углублениями перитециев — плодовых тел лишайника. После их отмирания поверхность породы густо усеяна ямками. Затем в них появляется зелёный слой водорослей. Несмотря на редкость этих видов, они играют важную роль в выветривании и почвообразовании, часто повсеместно охватывая скалы. Лишайники не делают различий между естественными и искусственными субстратами, покрывая стены, крыши, заборы, надгробия и другие постройки.

Лишайники и животные

Особенно важна роль лишайников в жизни животных в условиях Крайнего Севера, где растительность редка, в зимние месяцы они составляют около 90 % от рациона оленей. Особенно важен для оленей ягель (олений мох) (*Cladonia*), который они при помощи копыт достают даже из-под снежного покрова. Лоси также используют этот источник питания. Способность потреблять лишайники обусловлена наличием фермента *лихеназы*.

Для многих личинок бабочек, таких как представители рода *Eilema*, лишайник служит основным продуктом питания, их гусеницы кормятся исключительно на них. Кроме того, лишайник поедается беспозвоночными, такими как улитки, насекомые и клещи, использующими его в той или иной мере. Так же можно упомянуть *сеноедов* и личинок *Mycobates parmelia* с маскировочной окраской под цвет своего лишайника *Xanthoria parietina*.

Лишайниковая растительность используется многими животными как место обитания и укрытие от хищников. В больших количествах на них живут клещи и насекомые, одним из важных мест обитания они служат для тихоходок. Гусеницы различных ночных бабочек имеют окраску под цвет лишайника, другие подражают также и его очертаниям.

Многие птицы используют лишайники, особенно листоватые и кустистые формы, для гнездования, как например, бурокрылая ржанка (*Pluvialis dominica*), выющая гнёзда на представителях родов *Cladonia* и *Cetraria*.

Использование

Пищевой и кормовой объект

Блюдо из съедобного лишайника бриории Фремонта (*Bryoria fremontii*)

Лишайники служат кормом домашним животным, например, Ягель (*Cladonia*) и Исландский мох — традиционный корм северных оленей^[19].

Лекарственные препараты[править | править код]

С давних пор используются лишайники и как лечебное средство, на это указывал ещё Теофраст. Известно, что *Lobaria pulmonaria* использовалась в Средневековье против лёгочных болезней.

Лишайники находят применение в народной медицине, они содержат также широкий спектр ингредиентов, представляющих интерес для фармацевтики. Например, цетрария исландская (*Cetraria islandica*) добавляется в средства от кашля, в уснее (*Usnea*) был обнаружен антибиотик усниновая кислота, применяемый для лечения кожных и других болезней. Полисахариды (саркома-180) интересны для онкологов.

Лихеноиндикация

Лишайник *Usnea filipendula* растёт только в местах с очень высоким качеством воздуха

Лишайники являются организмами-индикаторами (биоиндикаторы) для определения условий окружающей среды, в частности, качества воздуха (*лихеноиндикация*). Высокая чувствительность лишайников к загрязнениям вызвана тем, что взаимодействие его компонентов легко нарушить. Из воздуха или с дождём поступают без всяких препятствий в лишайник вместе с питательными и токсичные вещества, это происходит потому, что лишайники не имеют никаких специальных органов для извлечения влаги из

субстрата, а поглощают её всем талломом. Поэтому они особенно уязвимы к загрязнению воздуха.

Первые сообщения о массовой гибели лишайников в областях промышленно развитых городов появились во второй половине XIX века. Основной причиной являлось увеличение содержания диоксида серы в воздухе. Между тем, использование серных фильтров на промышленном оборудовании и каталитических нейтрализаторов в автомобилях способствовало улучшению качества воздуха, так что сегодня лишайники в больших городах встречаются часто.

При «пассивном мониторинге» учитывается частота встречаемости лишайников в какой-то местности, по которой делается вывод о качестве воздуха здесь. При «активном мониторинге» наблюдают конкретный вид лишайника (часто это *Hypogymnia physodes*), который высаживают в исследуемом месте, и по воздействию на него окружающей среды (понижение жизнеспособности, изменение окраски таллома, гибель) судят о её качестве. Лихеноиндикация предназначена для длительных исследований.

В районах с интенсивным сельским хозяйством велико внесение удобрений, азотные соединения из которых распространяются с водой, делая реакцию почвы слабоосновной. Это ведёт к исчезновению видов лишайников, которые предпочитают кислые почвы. Лишайники служат также показателями наличия в воздухе токсичных тяжёлых металлов, накапливающихся в тканях, которые в итоге могут привести к гибели лишайника. Накапливают лишайники и радиоактивные вещества. Поэтому они могут быть использованы для контроля за радиоактивными осадками после атмосферных ядерных испытаний.

Лихенометрия

Благодаря тому, что лишайники долго живут и растут с постоянной скоростью, по ним можно определить возраст породы (отступление ледника или время постройки нового здания) (лихенометрия). Чаще всего для этой цели используются жёлтые лишайники рода *Rhizocarpon*. Так, в 1965 году с помощью этого метода был определён средний возраст монументов на острове Пасхи (почти 500 лет). Этот метод, однако, не всегда точен из-за несоразмерного роста лишайника и не является бесспорным, а потому должен использоваться только тогда, когда нельзя прибегнуть к радиоуглеродному анализу.

Красители

Долгое время из лишайников литорального рода *Roccella* и вида *Pertusaria corallina* получали ценный пурпурный краситель. Карл Линней упоминал в своём «*Plantae tinctoriae*» («Растения красящие») шесть лишайников-красителей. Краситель и химический индикатор лакмус также получают экстракцией из *Roccella*.

Evernia и *Parmelia* применяются в Шотландии и Скандинавии для окрашивания шерсти и ткани, с их помощью могут быть достигнуты особенно приятные жёлтые и коричневые тона. Также интересно применение лишайника *Xanthoparmelia camtschadalis* (неверный, но часто используемый синоним — *Parmelia vagans*) жителями Нижнего Поволжья для окрашивания пасхальных яиц.

Прочее применение

Ядовитые вульпиновые кислоты из *Letharia vulpina* использовались раньше как отравы для лисиц и волков.

Из некоторых лишайников, таких как дубовый мох (*Evernia prunastri*) и *Pseudevernia furfuracea*, получают душистые вещества, применяемые в парфюмерии.

Cladonia stellaris в больших количествах импортируется из Скандинавии и служит для изготовления модели дерева или декоративных венков.

МИКСОМИЦЕТЫ

Миксомицеты (лат. *Mycetozoa*, от греч. *μύκητος* — «гриб» и *ζωον* — «животное» или *Мухомycota* от *μύξα* — «слизь» и *μύκητος*) — тип слизевиков (грибоподобных организмов), входящий в состав супергруппы амёбозои. Насчитывает около 1000 видов.

Общие сведения

На определённой стадии жизненного цикла все миксомицеты имеют вид плазмодия или псевдоплазмодия. Классы *Mухomycetes* и *Protosteliomycetes*, имеющие плазмодий, относят к плазмодиальным (неклеточным) слизевикам, а *Dictyosteliomycetes*, которые имеют псевдоплазмодий — к клеточным. У большинства видов он виден невооружённым глазом и способен двигаться. Из плазмодия или псевдоплазмодия формируются спороношения, которые часто напоминают внешним видом плодовые тела грибов. Споры прорастают подвижными клетками — зооспорами или миксамёбами, из которых различными путями образуется плазмодий или псевдоплазмодий.

Слизевики — гетеротрофы. Зооспоры, миксамёбы и плазмодии способны питаться осмотротрофно (всасыванием питательных веществ через клеточную мембрану) и (или) путём эндоцитоза (захватывать внутрь клетки пузырьки с частицами пищи).

Все миксомицеты свободноживущие и живут в наземных местообитаниях.

Классификация

Ведущим методом в систематике миксомицетов остаётся морфологический анализ признаков спороносных структур.

В настоящее время к миксомицетам относят 4 класса и два рода, не включённые в класс:

- *Dictyosteliomycetes* — Диктиостелиомицеты
- *Mухomycetes* — Собственно слизевики
- *Protosteliomycetes* — Протостелиомицеты
- Роды *incertae sedis*
- *Pseudodidymium*
- *Semimorula*

Строение и развитие

Вегетативное тело миксомицетов представлено плазмодием, то есть голой многоядерной клеткой. Это масса цитоплазмы с большим количеством (до нескольких миллионов) ядер, прозрачная или непрозрачная, бесцветная или жёлтая, красная, фиолетовая, чёрная и др.

У большинства видов плазмодий имеет вид сети из переплетающихся и сливающихся трубочек с веерообразным краем со стороны, куда он движется. Размеры плазмодия у разных видов различны. У некоторых он микроскопический, у некоторых — неограниченного размера и вырастает, как правило, до сантиметров или десятков сантиметров, иногда до метров. Плазмодий способен к активному амёбообразному движению: в направлении движения появляются протоплазменные выросты, а с противоположной стороны они втягиваются. Скорость движения плазмодия от 0,1 до 0,4 мм в минуту.

Миксомицеты сапротрофны. Их плазмодии живут в тёмных сырых местах, богатых органическими веществами: в пустотах и расщелинах гнилых пней и колод, под корнями, опавшими перегнивающими листьями. В это время для плазмодия характерно движение к темноте, сырости и источникам пищи.

Питается он, поглощая из субстрата питательные вещества, захватывая бактерии, микроскопических животных, споры грибов, и быстро увеличивается в размерах.

После периода вегетативного роста, когда исчерпываются питательные вещества в окружающей среде, плазмодий выползает на свет, на поверхность пня или листовой

подстилки. Здесь он образует спороношения, которые содержат огромное количество спор. Часто эти спороношения напоминают миниатюрные грибы, на основании чего миксомицеты традиционно относили к царству грибов (Kirk et al., 2001). Однако это сходство чисто поверхностное: миксомицеты отличаются от грибов рядом биохимических и ультраструктурных признаков, отсутствием клеточной стенки у вегетативного тела, характером питания и некоторыми другими особенностями.

Процесс превращения плазмодия в спороношение в простейшем случае заключается в том, что плазмодий, не меняя формы, одевается перепончатой или хрящевой оболочкой, и внутри образуются споры. Такое спороношение называется плазмодиокарп. Он похож на плоскую лепёшку или подушечку, иногда имеет неправильную форму. У многих видов спороношение более сложное: плазмодий разделяется на много частей и каждая превращается в спорангий. В состав спорангия входит округлое или вытянутое образование (споротека), содержащее споры и капиллиций — систему нитей в виде сети или каркаса. Споротека, как правило, покрыта оболочкой (перидием) и сидит на ножке. У некоторых видов спорангии на ранней стадии развития сливаются в единое образование, обычно довольно крупных размеров (до десятков сантиметров), одетое общей оболочкой. Такое спороношение называется эталием, а при неполном слиянии спорангиев — псевдоэталием. Для некоторых родов миксомицетов характерно присутствие в основании спороношений кожистых плёночек — гипоталлуса.

При созревании спор оболочка спороношения (перидий) разрывается, и споры рассеиваются по воздуху. У многих миксомицетов распространению спор содействует капиллиций (система особых нитей, содержащаяся в спороношении); у разных миксомицетов он имеет различное строение и его признаки важны для систематики. Благодаря различным утолщениям на своей поверхности нити капиллиция способны к гигроскопическим движениям, при которых споровая масса разрыхляется и разбрасывается (Горленко и др., 1980).

Споры представляют собой микроскопически малые шаровидные клетки, бесцветные или окрашенные, одетые твёрдой оболочкой — гладкой или различным образом скульптурированной. Размеры, окраска и строение оболочки спор — это существенные признаки при определении миксомицетов, как и строение спороношения в целом.

В сухом виде споры могут сохраняться без изменений иногда в течение десятков лет, но, попав во влажный субстрат, быстро прорастают. При этом из разрыва их оболочки или, у некоторых видов, через поры выходят одна или несколько зооспор с двумя гладкими жгутиками неравной длины или амёбы (миксамёбы). Они могут превращаться друг в друга в зависимости от влажности и размножаться делением. Затем происходит половой процесс, то есть попарное слияние зооспор или миксамёб. В результате образуется зигота, из которой развивается новый плазмодий. Он опять уходит в тёмные и влажные места, и процесс начинается сначала.

Распространение

Многие виды миксомицетов являются космополитами. Однако некоторые из них, особенно виды, обитающие в тропиках и пустынях, имеют ограниченные ареалы. Наибольшее видовое богатство наблюдается в широколиственных лесах умеренной зоны и в мезоксерофильных лесах Средиземноморья. В умеренных поясах обоих полушарий миксомицеты чаще всего живут в лесах, встречаясь в виде плазмодиев или спороношений в течение лета, а иногда с ранней весны и до поздней осени. Но многие виды обнаруживают сезонность в своём развитии. Так, некоторые виды образуют спороношения только весной и прекращают спорообразование в середине лета, у других спорообразование начинается летом и продолжается вплоть до листопада. Многие виды миксомицетов обитают на крупных остатках древесины и опаде. Их плодовые тела

обычно хорошо заметны в природе. Это во многом объясняет тот факт, что в большинстве микологических работ приводятся сведения главным образом о видах, связанных с этими субстратами. В то же время виды, обитающие на коре живых деревьев и на помёте растительноядных животных, часто имеют мелкие и плохо заметные в природе спорофоры и, как правило, не учитываются.

Значение

В последние десятилетия интерес к этим организмам возрос благодаря многочисленным цитологическим, биохимическим, биофизическим и генетическим исследованиям, в которых слизевики использовались как модельные организмы.

Изучение миксомицетов имеет большое значение для эволюционных и филогенетических построений, а также для систематики грибов и протистов. Миксомицеты рода *Physarum* используются для конструирования модельных биологических компьютеров.

Миксомицеты активно поедают бактерии, играя значительную роль в регуляции численности и состава бактериальной флоры почв (Madelin, 1983).

Таксономия миксомицетов базируется главным образом на морфологических признаках плодовых тел (спорофоров), которые относительно легко гербаризируются и поддаются количественному учёту. Присутствие вида в природе оценивается по наличию спорофоров на изучаемой площади или в образцах субстратов. Эти особенности миксомицетов и уникальная для протистов комбинация в жизненном цикле микроскопических амёб, плазмодиев и часто хорошо заметных спорофоров, позволяют использовать их в качестве модельного объекта для синэкологических и географических исследований.

Наряду с традиционным отбором спорофоров миксомицетов в полевых условиях, их можно получать в лаборатории, используя метод влажных камер. Его преимуществом является возможность легко стандартизировать условия культивирования и выявлять даже плохо заметные в природе виды в любое время года.

Контрольные вопросы.

1. Что собой представляют лишайники?
2. Каково строение лишайников? На какие группы по морфологии делят лишайники?
3. Как размножаются лишайники?
4. Какую роль в природе играют лишайники?
5. Как человек использует лишайники?
6. Что такое миксомицеты? Как их классифицируют?
7. Охарактеризуйте строение и жизненный цикл миксомицетов.
8. Как размножаются миксомицеты?
9. Какую роль в природе выполняют миксомицеты?

Лабораторная работа 15-16 (4 ч).

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

Цель – изучить методы выделения грибов из почвы и из природных водоемов.

Задачи работы:

1. Изучить методы посева почвенной суспензии на элективные среды.

2. Изучить метод скученной 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 выделения грибов на растительные остатки.
8. Освоить метод фумигации почвы.
9. Освоить метод выделения грибов с корней растений и других растительных остатков.
10. Освоить метод водных смывов и метод приманки.
11. Изучить функции микромицеты в водоемах.
12. Изучить видовой состав и адаптации грибов, обитающих в пресных водоемах
13. Изучить видовой состав и адаптации грибов, обитающих в морских водоемах
14. Освоить метод «приманок».

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 имеющих 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 обычным *Amanita muscaria*, *Macrolepiota procera*, *Suillus luteus*, *S. granulatum*; еловом — *Lactarius deliciosus*; лиственном — *Boletus scaber*, *B. versipellis*, *B. echinatus*, *Amanita phalloides*, *Ceitybe 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, «такрыках», 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 — *Hymenogastraceae*, *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*, *zygorthynchus*, *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 Ceriophora, 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, гидрооксibenзойная и ванилиновая кислоты, у *Aspergillus* — кониферилловый 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-оксibenзальдегид, 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, мучнисторосяе, 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 высевает 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 [Методы экспериментальной микологии, 1973; Методы..., 1991]. 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 отделяют 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, скупенные на поверхности субстрата (*Mycomycetes*) [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 почвы. 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 (виды *Penicillium* Link ex Fr., *Aspergillus* Micheli ex Fr. и др.).

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 рН 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 рН 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 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 отвивают 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 высевают исследуемую почву и по мере появления колоний грибов отвивают 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 высевают 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 отвивают 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.

Выделение грибов с корней растений и других растительных остатков. Метод водных смывов. Большинство почвенных грибов аккумулируется вблизи корней

растений. С поверхности корней растений и почвы, находящейся в непосредственной близости от них, грибы обычно изолируют методом водных смывов. Этот метод пригоден и для выделения грибов с поверхности опавших листьев, валежника и других растительных остатков. С корней или других растительных остатков осторожно стряхивают почву, ножницами, предварительно погруженными в банку со спиртом и обожженными над пламенем горелки, разрезают корни на отрезки 3—5 см, которые стерильным пинцетом переносят (обычно по 3—4 отрезка) в заранее подписанные колбы, содержащие по 100 мл стерильной воды, и встряхивают в течение 5 мин. Затем по 1 мл полученной суспензии высевают в чашки, предварительно приготовив нужное разведение. Суспензию 3-го или 4-го разведения разливают в 3 или 4 чашки Петри по 1 мл в каждую, заливают расплавленной, но охлажденной агаризованной питательной средой и перемешивают легкими покачиваниями до остывания агара. После этого чашки Петри ставят в термостат для инкубации. Оставшуюся в колбе водную суспензию почвы осторожно отфильтровывают через предварительно взвешенный и надписанный бумажный фильтр, который высушивают до постоянной массы для определения сухой массы почвы, смытой с поверхности корней. В колбу с корнями повторно вливают 100 мл стерильной воды, с которой поступают так же, как и с первой порцией. Обычно делают 5—10 смывов. На питательные среды в чашки Петри чаще всего высевают разведения 1-го, 5-го и 10-го смывов. Основная масса грибных зародышей отделяется с корней в первые смывы. После 10 смывов грибных зародышей на поверхности корней остается мало. Метод водных смывов с растительных остатков прост, удобен и позволяет без особого труда выделять большое количество грибов разных видов.

Метод получения спор сухоспоровых сумчатых грибов. Выделение в чистые культуры аскоспор сумчатых грибов, плодовые тела которых развиваются на поверхности или внутри растительных и каких-либо других тканей, например на корнях растений, затруднено сильным инфицированием образцов бактериями, сапрофитными быстрорастущими грибами и другими организмами. Стерилизация образцов химическими веществами или пламенем, как правило, убивает и исследуемые объекты, а многократная промывка стерильной водой обычно не дает желательных результатов. Предложен метод получения спор сухоспоровых сумчатых грибов с последующим перенесением их на питательные среды, рассчитанный на виды грибов с активным спороотделением, плодовые тела которых снабжены отверстием. Этим методом можно получать также споры базидиальных грибов с открытым гименофором и односпоровые культуры разных видов грибов. Метод не пригоден для выделения грибов, споры которых погружены в слизь или плодовые тела лишены отверстия. Для проведения опыта необходимо брать свежие образцы со зрелыми плодовыми телами. Поверхность образцов (корни, листья или другие объекты) осторожно очищают от растительных остатков и частичек почвы стерильным пинцетом. На дно стерильных чашек Петри или Коха диаметром 10—18 см ставят несколько маленьких чашечек для тканевых культур диаметром 4—5 см, сняв предварительно с них крышки (крышки маленьких чашечек можно разместить в других больших чашках). Маленьких чашечек ставят столько, сколько может поместиться в больших. Исследуемые образцы с плодоношениями грибов (корни, листья, стебли растений) кладут так, чтобы каждый образец лежал на краях маленьких чашечек, не дотрагиваясь до дна, для предохранения его от засорения. При этом плодовые тела аскомицетов обязательно должны располагаться отверстиями вниз. Экскременты животных следует раскладывать на стерильную сетку с крупными отверстиями — металлическую или лучше волосную, положенную на чашечки. Образцы накрывают 2—3 слоями кружков или полосок стерильной фильтровальной бумаги, увлажненной стерильной водой из пипетки. Чашку Коха или Петри накрывают крышкой. Параллельно закладывают опыт без увлажнения фильтровальной бумаги, но для повышения

относительной влажности воздуха в одну из чашечек наливают стерильную воду. Если маленьких чашечек для тканевых культур нет, можно использовать стерильные предметные стекла. В этом случае на дно больших чашек кладут предметные стекла, на которые помещают стерильные палочки, а на них — исследуемые образцы. Рекомендуется использовать стеклянные палочки. Наносить тонкий слой питательной среды на дно маленьких чашечек или на предметные стекла нежелательно, потому что на нее могут попасть споры быстрорастущих грибов, засоряющие поверхность. Через определенный промежуток времени (3—48 ч, в зависимости от целей опыта) снимают крышку чашки Коха или Петри, вынимают маленькие чашечки, ставят их на столик микроскопа и под малым увеличением находят одиночные споры. Под эти же образцы можно помещать другие маленькие чашечки, повторяя процесс несколько раз, если нас интересует продолжительность высыпания спор с плодовых тел. Затем иглу прокалывают над огнем, охлаждают, погружая в питательную среду, и под контролем микроскопа, коснувшись увлажненным кончиком иглы поверхности споры, переносят ее на питательную среду в пробирку или чашку Петри. Вокруг спор часто образуются капли воды, которые необходимо удалить, так как взять споры на кончик иглы с капли воды трудно. Для этого чашки со спорами на несколько минут оставляют открытыми под стеклянным колпаком. При выделении спор базидиальных грибов с открытым гименофором плодовые тела или частички плодовых тел кладут гименофором вниз на края маленьких чашечек, а в одну из чашечек наливают воду. Если плодовые тела базидиальных грибов большие, то чашки Петри или Коха накрывают не крышками, а стеклянным колпаком или цилиндром. Маленькие плодовые тела раскладывают на сетку. Гименофор мягких плодовых тел не должен сминаться. Ножку плодовых тел перед закладыванием опыта необходимо удалить. Предложенный метод можно использовать для получения односпоровых культур гифальных грибов, у которых споры опадают пассивно, особенно видов *Penicillium*, *Aispergillus* и др. Грибы выращивают на питательных средах в чашках Петри крышкой вниз. На дно крышки ставят открытые маленькие чашечки или предметные стекла. После того как образуются колонии и спороношение грибов, чашку необходимо слегка встряхнуть, чтобы споры упали в чашечки. Споры стерильно иглой переносят на питательную среду, под малым увеличением микроскопа.

Выделение водных грибов.

Водоемы составляют значительную часть поверхности планеты Земля, только поверхность океанов и морей равняется 3/4 ее. Организмы, населяющие водоемы, составляют сложную, разнообразную и вместе с тем обособленную экологическую группу. Гидробиология — наука, изучающая состав, численность, биологию, закономерности развития водных организмов.

Грибы, обитающие в различных пресных и соленых (морских) водоемах, относятся преимущественно к низшим, а также классам сумчатых, дейтеромицетов, реже базидиомицетов. Это, так же как и почвенные грибы весьма гетерогенная в таксономическом, биолого-физиологическом отношениях экологическая группа. Многие виды грибов, главным образом низших, преимущественно образующих зооспоры, являются более или менее постоянным компонентом биоценозов пресных и соленых вод. Подвижные зооспоры представителей типичных водных низших грибов способствуют обнаружению и использованию органических субстратов водоемов. Значительно обособленной является флора типичных водных гифомицетов, представители которой обнаруживаются как погруженных в воду скелетонизированных листьях древесных растений и кустарников. Большинство типичных водных гифомицетов характеризуются

своеобразной морфологией конидий, они обычно разветвлены, имеют лучеобразные отростки (обычно четыре), выходящие из одной точки. Считают, что эта форма конидий благоприятствует длительному пребыванию их в толще воды во взвешенном состоянии и препятствует их оседанию. У многих сумчатых водных грибов сумкоспоры вытянуты в виде длинных нитей, их концы окружены слизью или имеют слизистые оболочки, что также способствует прикреплению к питательному субстрату и пребыванию во взвешенном состоянии в толще воды.

Водные грибы принимают участие в круговороте веществ в водоемах, в процессах разложения и минерализации органических веществ разнообразного происхождения. Многие их представители паразитируют на рыбах и других животных и на водорослях, вызывая нередко эпидемии и эпифитопии заболеваний, что может приводить к значительной их гибели и нарушению трофических звеньев водоемов, снижению их продуктивности. Многие виды водных грибов являются агрессивными агентами биологических повреждений водных сооружений, приборов, материалов, сырья.

Водная микология изучает распространение, экологию, биологические особенности разных видов грибов. Микофлора водных грибов, как отмечалось выше, включает виды почвенных грибов, адаптированных в водной среде в определенных фазах роста и развития; специфические виды водных грибов, которые способны в активной форме размножаться в воде (например, зооспоровые фикомицеты); виды грибов, поражающие представителей зоо- и фитопланктонов различных водоемов; виды заселяющие погруженные в воде растительные субстраты.

Грибы пресных водоемов. Качественный и количественный состав грибов пресных водоемов изменяется в зависимости от температуры, времени года, содержания органических веществ в источнике, типа источника. Как правило, грибов больше в прибрежной зоне и стоячих водах, чем в текучих водах рек и ручьев. Фикомицеты, образующие зооспоры, являются наиболее типичными представителями микофлоры в озерах, реках, ручьях и т. д. Они распространены на значительной глубине (до 2-х метров), но преобладающие виды различные в зависимости от места, глубины и времени взятия пробы. Наиболее богата флора водных грибов в прибрежной зоне, уменьшаясь с глубиной примерно в 2—3 раза и больше. Наличие органических веществ и изменение содержания катионов имеет важное значение для уровня развития флоры хитридиальных грибов в различных водоемах, особенно в маргинальной части. В водах рек и ручьев наряду с фикомицетами встречаются многие виды гифомицетов, которые разлагают листья, стебли растений, целлюлозу, хитин и другие компоненты этих растительных остатков. Флора водных грибов водоемов и прибрежных зон) сходна. Водные грибы встречаются не только в постоянных водоемах (реки, ручьи, озера, пруды и т. д.), но также во временных скоплениях вод. Например, при весеннем таянии снега, во время дождей, при орошении земель.

Состав флоры водных грибов зависит от особенностей питания, наличия кислорода и других факторов. Например, в прудах и озерах встречаются виды, которые поражают водоросли, представителей насекомых, погибшие организмы и их наружные покровы (хитинразрушающие). В зоо- и фитопланктоне встречаются грибы, поражающие планктонных животных, рачков и их яйца (гриб *Leptolegnia candida*), они часто вызывают их массовые заболевания и гибель. Инфекция распространяется преимущественно зооспорами; на дафниях обычно поселяются *Pythium daphnidearum* и виды *Aphanomyces*.

Многие другие виды — *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces*, *Pythium*, *Leptomit*, *Allomyces* — поражают взрослых особей рыб и амфибий и их яйца. Чаще поражаются рыбы, ослабленные воздействием других факторов.

Грибы, поражающие фитопланктон, паразитируют на диатомовых и других водорослях и встречаются на разной глубине водоемов, например, некоторые *Chytridiales*

до 30 м. На сине-зеленых водорослях часто паразитирует *Rhizosipnon anabaenae*, его паразитизм зависит от уровня концентрации кислорода в воде, при низком его содержании паразитизм усиливается, так как ухудшаются условия произрастания водоросли. Погруженные в воду веточки, плоды, листья и другие субстраты также заселяются различными видами водных грибов. Грибы встречаются в водах горячих источников, например, различные зооспоровые фикомицеты (*Achlya*, *Pythium* и др.); на сфагновых болотах (*Achlya*, *Pythium*, *Allomyces*); в водах соленых и кислых озер и прудов (*Olpidium*, *Longicollum*, *Rhizophlyctis*, *Hardari*, *Saprolegnia monoica*, *Achlya flagellata*, *A. racemosa*); на стенах портовых сооружений, находящихся под водой (*Mucor*, *Penicillium*, *Pythium*, *Saprolegnia*). В водах кислых озер вулканического происхождения (в Японии) с повышенной концентрацией минеральных солей встречаются *Saprolegnia monoica* v. *acidamica*, *Achlya flagellata*, *A. racemosa*. Пресноводные виды порядков *Chytridiales*, *Leptomitales*, *Saprc-geniales* распространены на разнообразных субстратах мертвых растений и животных остатках. Отдельные представители *Plasmodiophorales* являются облигатными паразитами водных и полуводных покрытосеменных. Число видов и частота встречаемости пресноводных видов грибов снижается к северу от экватора, например, виды *Monoblepharis* преобладают в более холодных водах, виды *Allomyces* в тропиках и субтропиках. Большинство пресноводных грибов распространены повсеместно.

Грибы морских вод. Большинство грибов, распространенных в морских водах, являются сумчатыми, хотя встречаются и хитридиевые, плазмодиофоровые, лабульбениевые, большей частью это свободно плавающие, сопрофобные грибы.

Среди морских сумчатых грибов имеются сапрофитные формы, развивающиеся на древесине и рыболовных снастях, и паразитные — на видах крупных морских водорослей. Морские грибы — сапрофиты обитают на погруженных в воду растительных остатках, погибших морских растений и животных, органических загрязнений, древесине, гниющих крупных водорослях, морских растениях, грунтах и илах литеральной и sublitterальной зоны, в солевых озерах и песках, периодически подвергающихся затоплению морской водой. Паразитные морские грибы обитают на представителях морской фауны — на губках, креветках, крабах, моллюсках, рыбах; на представителях морской флоры — различных видах микро- и макроскопических водорослей. Наряду с облигатными паразитами многие представители морских грибов являются факультативными, они поражают ослабленных воздействием других факторов, морских животных и растений. На погруженных в морскую воду древесных остатках выделены *Cladosporium*, *Chaetomium*, *trichoderma*, *Gymnoascus*.

В морских водоемах, особенно прибрежных зонах, распространены *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Эти виды могут встречаться и на глубине до 4000 м. Флора морских водоемов характеризуется наличием дрожжей и дрожжеподобных грибов. Дрожжей больше в верхних слоях воды водоема, в прибрежной части, чем в открытом океане. Дрожжи в жизнеспособном состоянии встречаются также на глубине до 4000 м. Грибы распределяются микрозонами, послойно на определенной глубине. Определенный видовой состав, протяженность и характер микрозон изменяются в зависимости от глубины, температуры, солености и других факторов. Устойчивость морских грибов к солености неодинакова. Однако они проявляют значительную адаптацию, иногда довольно стойкую. Например, некоторые наземные представители сумчатых и дейтеромицетов, обычно растущие при низкой солености среды, быстрее адаптируются к высокой, чем морские грибы к росту при более низкой солености. Паразитные грибы поселяются на живых организмах. Например, *Estrogella* — на диатомовых, *Coenomyces consuens* и *Phyllachlorella oceanica* — на плавающих водорослях. По сравнению с пресноводными, морские грибы распространены более

ограниченно. На рост и распространение водных грибов оказывают прямое и косвенное влияние многие физико-химические факторы — природа субстрата, свет, кислород и т. д.

Способность водных грибов использовать определенный субстрат является, как и для других экологических групп грибов, одним из регулирующих факторов заселения его отдельными их видами. Наиболее специфическими субстратами для сапрофитных видов грибов является клетчатка, пектин и хитин. Известны отдельные виды, специфичные к определенному субстрату. Например, *Rhizophlyctis losea* активно разрушает целлюлозу и ее производные, виды *Asterophlyctis*, *Polychytrium*, *Cytriumyces*, *Karlingiomyces asterocystis* — хитин.

Для многих сапролегниевых грибов наблюдается специфический хемотаксис зооспор к определенным субстратам, хлоридам (CaCl_2 , MnCl_2) и аминокислотам незначительной концентрации. У *Achlya* sp. наблюдается положительный хемотаксис к выделению гормонов у женских гаметангиев и отсутствие его у зигот, мейоспор и зооспор этого гриба. Свойство положительного хемотаксиса к определенным субстратам лежит в основе элективного метода культивирования водных грибов с помощью субстратных «приманок». Водные фикомицеты предпочитают использовать органические источники азота, а многие виды гифомицетов из текучих водных источников — преимущественно нитратный и аммонийный азот.

Отношение водных грибов к свету неодинаково, особенно при образовании органов размножения. Например, у *Saprolegnia ferax* голубой и зеленый части спектра подавляют полностью образование зачатков оогониев, а красный — частично. Белый свет слабо влияет на рост и образование покоящихся спор *Blastocladiella emersonii* и *B. britanica*. Косвенное значение света для водных грибов связано с благоприятным влиянием его на рост других компонентов фитопланктона, например, на рост водорослей. Считают, что весной при слабом развитии водорослей в водоемах они больше поражены грибами, чем при обильном их росте летом.

Влияние температуры особенно проявляется в образовании зооспор и массовом размножении зооспоровых и водных гифомицетов в определенное время года. Многие из них растут при пониженной температуре воды (обычно при 10—20°C). Способностью к росту при пониженной температуре обуславливается обычно обильный рост гифомицетов в водоемах, водопроводных сооружениях, трубах на предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности и др.

Многие виды водных грибов, развивающиеся в более глубоких водах, в придонных отложениях и илах, адаптируются к пониженному содержанию кислорода в среде. В то же время многие виды проявляют выраженную потребность в кислороде, например *Apodachlya*, *Sapromyces*. Виды *Monoblepharis*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhipidium*, *Gonopodya*, *Blastocladiella*, *Pyrenopeziza*, *Macrochytrium* способны расти и развиваться при низких концентрациях кислорода. Нередко, в зависимости от концентрации кислорода в воде, зооспоры мигрируют с более нижних слоев в верхние и наоборот. Отдельные виды грибов распространены преимущественно в озерах с кислыми водами, другие — со щелочными, а многие могут распространяться в пределах широкой амплитуды кислотности среды водоемов.

Водные грибы разнообразны и по способу питания, среди них встречаются, как отмечалось, облигатные паразитные, сапрофитные и факультативные виды. Среди хитридиальных (*Chytridiales*) встречаются облигатные паразиты (поселяются чаще в водорослях, реже — на беспозвоночных и рыбах) и сапрофиты, или факультативные паразиты (поселяются на растительных и животных остатках, погруженных в воду). Грибы порядка *Monoblepharidales* преимущественно сапрофиты, растут главным образом на остатках (веточках) древесных растений, преобладают в стоячих водоемах с притоком свежей воды.

Сапролегниевые, преимущественно сапрофиты или факультативные паразиты, поражают остатки растительного и животного происхождения, паразитируют на икре, рыбах, некоторых других животных. Эти грибы выделяют в культуру, используя в качестве «приманок» мертвых личинок, взрослых насекомых, червей, кусочки мяса, белок вареного куриного яйца и т. д.

Водные гифомицеты (дейтеромицеты) часто встречаются в проточных, хорошо аэрируемых водоемах, растут главным образом на гниющих или скелетизированных листьях древесных пород или их веточках, погруженных в воду. Конидий их много в пене и пленке, образуемых часто на поверхности воды.

Водные грибы — это разнообразная и в то же время в определенной степени специфическая экологическая группа с широкой амплитудой адаптации к росту и развитию в различных типах водоемов. Их деятельность является одним из активных звеньев в общем процессе круговорота веществ в водной среде. Существует ряд методов выделения водных грибов.

Метод «приманок» заключается в том, что определенный субстрат, являющийся приманкой, в специальных приборах погружается на разную глубину водоема или в пробу воды из него. По истечении определенного времени (от нескольких недель до 2—3 месяцев) на поверхности субстрата-приманки развивается мицелий гриба или его пустулы. Из них выделяют гриб в чистую культуру или определяют его прямым микроскопированием. В качестве приманок используют плоды яблок, груш, шиповника, слив, веточки древесных растений, семена льна, конопли, пыльцу растений, насекомых, целлофан, льняные ткани и т. д. Например, хитридиальные хорошо растут на пыльце растений, листьях злаков, остатках, насекомых; бластокладиевые — преимущественно на плодах, а сапролегниевые — лучше на семенах конопли, личинках и взрослых насекомых, червях; дейтеромицеты — на гниющих и скелетизированных листьях древесных пород, пене и пленке на поверхности воды.

Приманки обычно погружают в воду в сосудах или мешочках из нейлона или других стойких материалов, в которые обеспечивается непрерывный приток воды. Затем приманки отмывают в струе проточной воды и под микроскопом отсеивают микологическим крючком из пустулы несколько зооспорангиев в пробирку или чашку Петри с чистой водой. Выходящие зооспоры в водной извести переносят в следующую порцию стерильной воды и отсюда — на питательную среду в несколько чашек Петри для получения односпоровой культуры.

Чистые культуры выделяют путем посева зооспор или гиф мицелия на среды, к которым добавляют противобактериальные антибиотики для уничтожения сопутствующих бактерий. В некоторых случаях от бактериального загрязнения избавляются при помощи колец Ван-Тигема. В центр кольца, находящегося на поверхности плотной питательной среды, вносят несколько капель взвеси зооспор в стерильной воде. При этом гифы гриба, растущие через кольцо на поверхности агара, обычно бактериально не загрязнены. Пересевом их на среду в пробирке и получают чистую культуру гриба.

Разнообразные среды обычно содержат глюкозу, минеральные соли и обязательно добавки в виде дрожжевого и кукурузного экстракта, пептона и т. д. При непосредственном изучении водных грибов пробы центрифугируют или фильтруют через микропористые фильтры с последующим микроскопированием осадка и выделением из него чистых культур известными методами. Водные грибы можно выделить методом улавливания их конидий на предметные стекла, покрытые слоем среды или методом обрастания пластин (куски древесины, пластмассовые панели и др.), которые при погружении их в воду на длительное время обрастают водными грибами.

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 метода выделения грибов с помощью фумигации почвы.
7. В чем суть метода выделения грибов с помощью метода приманок?
8. Какие функции выполняют микромицеты в водоемах?
9. Охарактеризуйте видовой состав и адаптации грибов, обитающих в пресных водоемах
10. Охарактеризуйте видовой состав и адаптации грибов, обитающих в морских водоемах
11. Охарактеризуйте метод «приманок».

Лабораторная работа 17-18 (4 ч).

Тема: Грибы как возбудители болезней растений

Цель – изучить жизненные циклы основных грибных возбудителей болезней растений.

Задачи работы:

1. Ознакомиться с биологическим и инфекционным циклом развития возбудителя серой гнили плодов и ягод.
2. Изучить биологический и инфекционный цикл развития возбудителя альтернариоза.
3. Изучить биологический и инфекционный цикл развития возбудителя фузариоза.
4. Изучить биологический и инфекционный цикл развития возбудителя антракноза.
5. Изучить биологический и инфекционный цикл развития возбудителя возбудитель черной парши.
6. Изучить биологический и инфекционный цикл развития возбудителя твердой головни пшеницы.
7. Изучить биологический и инфекционный цикл развития возбудителя пыльной головни ячменя.
8. Изучить биологический и инфекционный цикл развития возбудителя линейной или стеблевой ржавчины злаков.

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:

Грибные болезни растений, заболевания растений, вызываемые фитопатогенными грибами (паразитами и полупаразитами). Грибные болезни растений по сравнению с др. болезнями более распространены и вредоносны, они значительно снижают урожай и

качество продукции, а у плодовых деревьев и ягодников, кроме того, сокращают и сроки их хозяйственного использования.

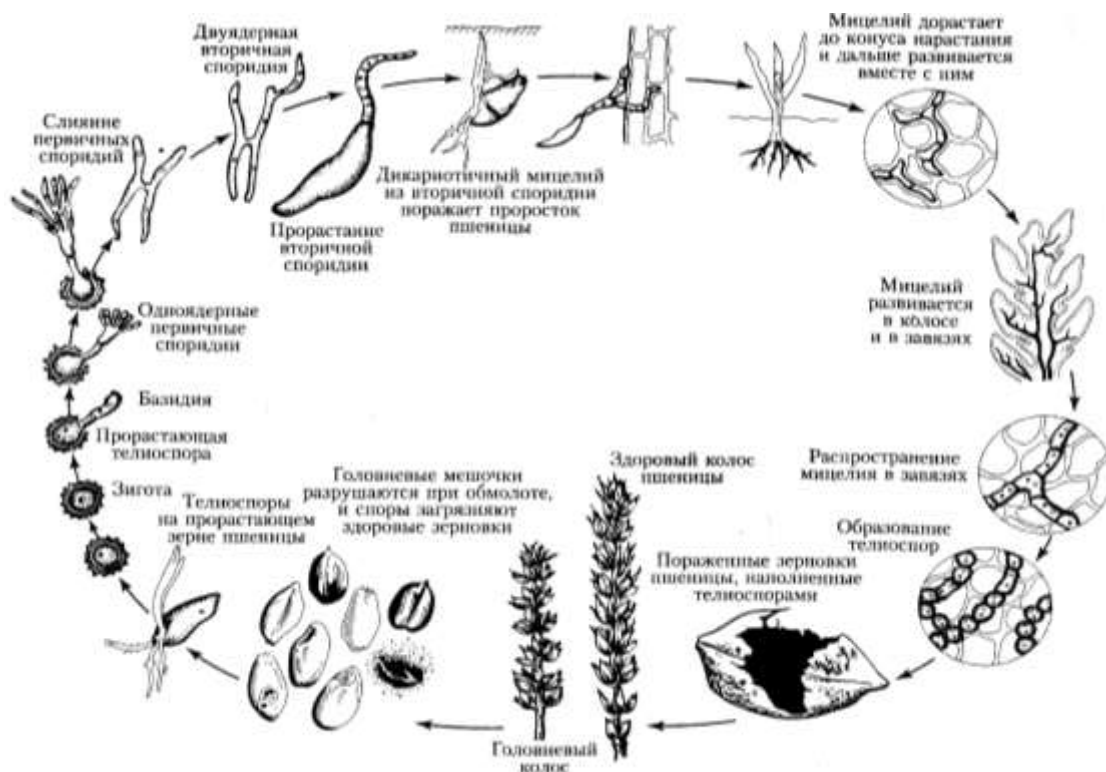
Под воздействием грибов-возбудителей болезней в растениях возникают патологические процессы, сопровождающиеся нарушением структуры и физиологических функций растения или отдельных его частей, например образованием наростов, наплывов, изменением дыхания, ассимиляции, ферментативной деятельности, нарушением роста и развития, отмиранием пораженных тканей. Внешне грибные болезни растений характеризуются тем или иным типом поражения, которое бывает местным или общим. К местному поражению, охватывающему небольшие участки растения или его отдельные органы, относятся пятнистости (церкоспороз свёклы, парша яблони и груши и др.), грибные налёты (мучнистая роса и др.), язвы, пустулы (ржавчина растений); к общему — увядание растений.

Грибные болезни растений передаются семенами, клубнями, луковицами, корнями, черенками, саженцами и др. частями больных растений. Инфекция может сохраняться в послеуборочных остатках, в почве, переноситься ветром, каплями дождя, животными и человеком, тарой, с.-х. машинами и орудиями. Патогенные грибы могут проникать в ткани растений через устьица (милдью винограда), водяные поры, чечевички, через клетки эпидермиса и кутикулу (кила капусты, рак картофеля), раны, возникающие от града (пузырчатая головня кукурузы), солнечных ожогов, морозобоин (чёрный рак яблони), через трещины. Многие насекомые, повреждая растения, открывают «ворота» инфекции, при этом часто переносят возбудителей болезней.

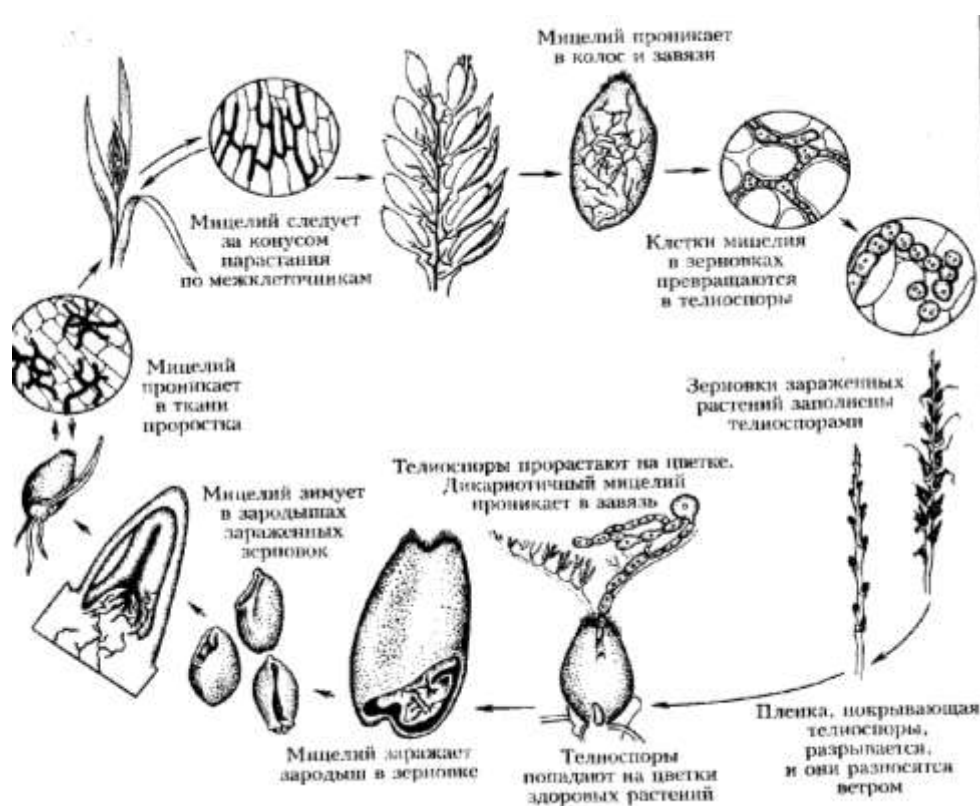
Интенсивность развития болезни зависит от условий внешней среды, которые влияют как на растение, так и на паразита, на взаимоотношения между ними и на течение инфекционного процесса. Например, известкование почвы подщелачивает почвенный раствор и снижает поражение капусты килой. При недостатке в почве бора свёкла чаще заболевает сердцевинной гнилью. Одностороннее внесение в почву азота при недостатке фосфора и калия усиливает поражение злаков ржавчиной, картофеля — фитофторозом. Относительно низкая температура и высокая влажность почвы после посева свёклы обуславливают недружные всходы и поражение их корнеедом.

Для защиты растений от грибных болезней растений широко применяют комплекс агротехнических и химических мероприятий. Агротехнические мероприятия главным образом направлены на ограничение и ликвидацию заразного начала на семенах и в почве; на изменение условий выращивания растений в сторону, благоприятную для них и неблагоприятную для паразитов; на поддержание и повышение устойчивости растений. Они включают возделывание устойчивых сортов, рациональное размещение культур в севообороте, правильную обработку почвы и уход за ней в период вегетации растений, правильное применение всех видов удобрений, соблюдение оптимальных сроков сева и уборки урожая и др.

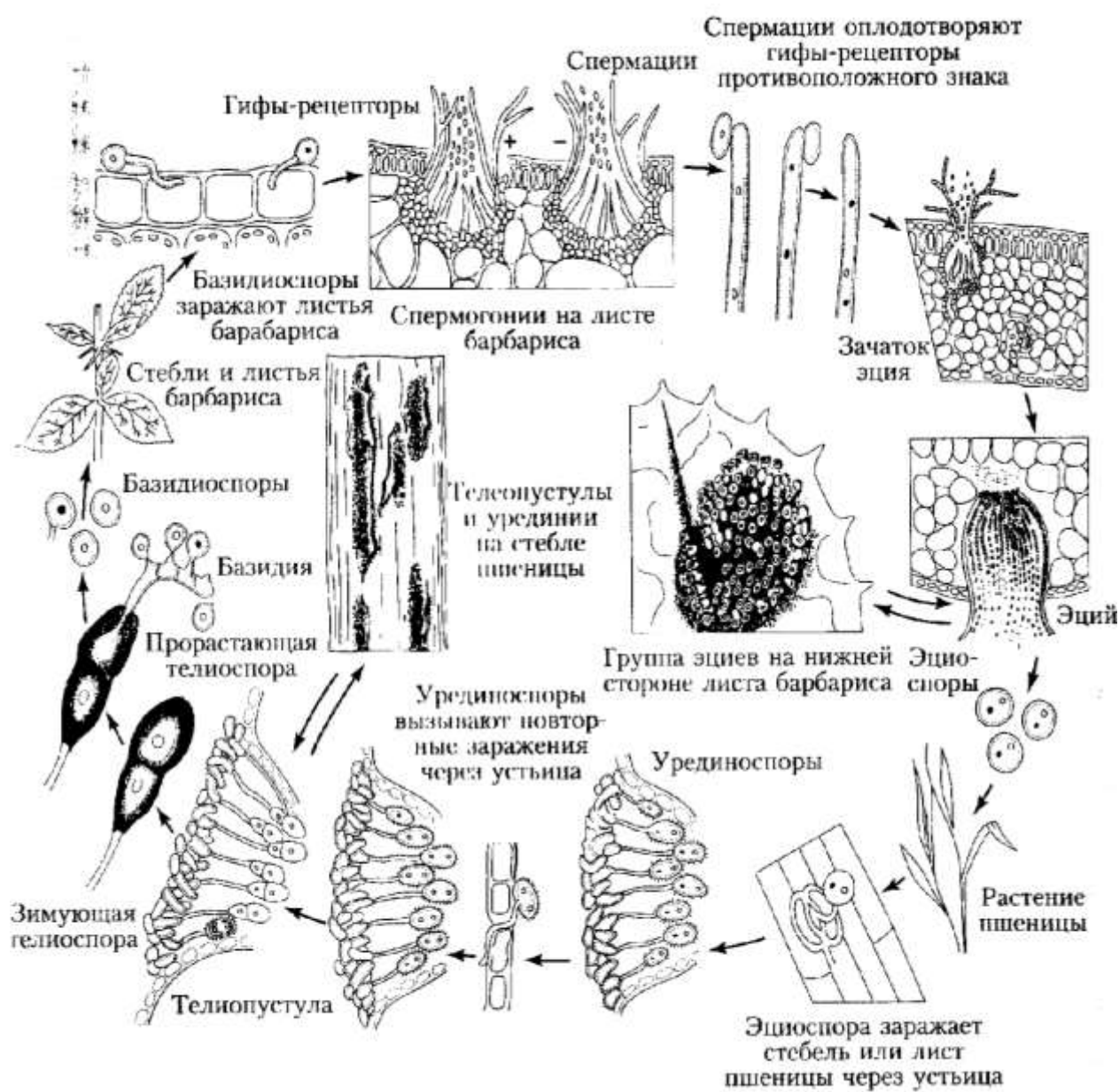
Химические мероприятия состоят из обработки фунгицидами семян вегетирующих растений, обеззараживания с.-х. помещений, хранилищ, почвы и т. д.



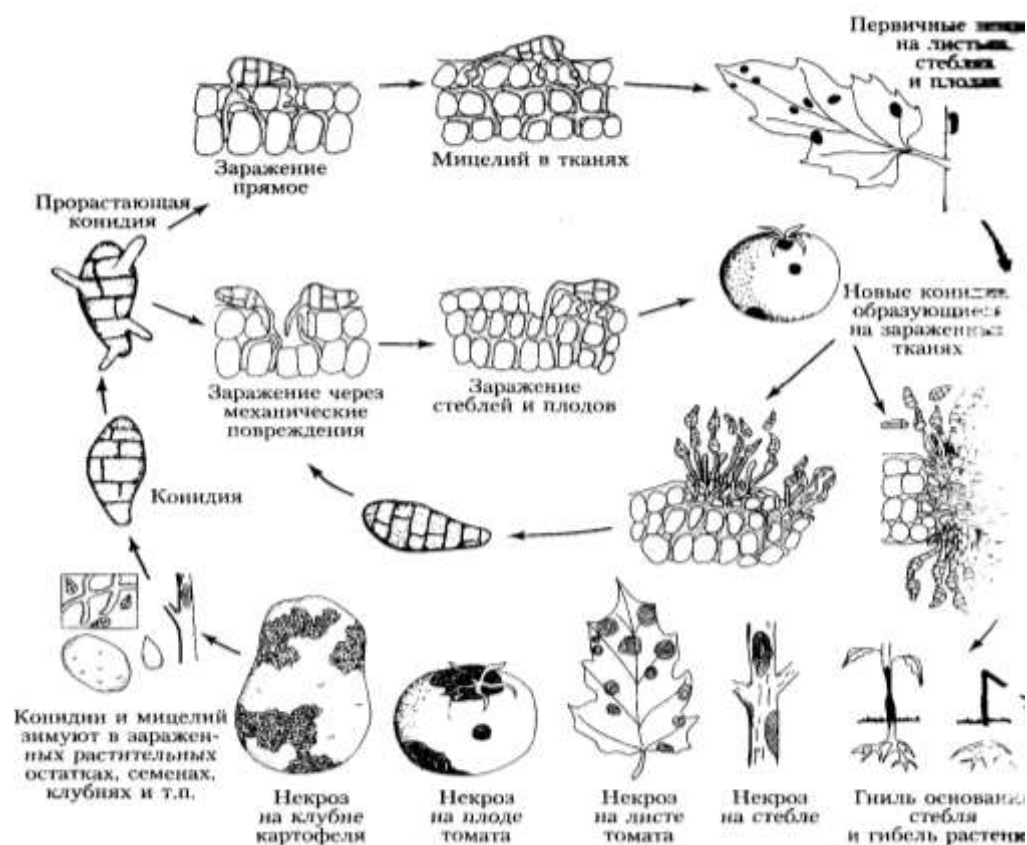
Биологический и инфекционный цикл развития *Tilletia caries* (*T. tritici*). (возбудитель твердой головни пшеницы)



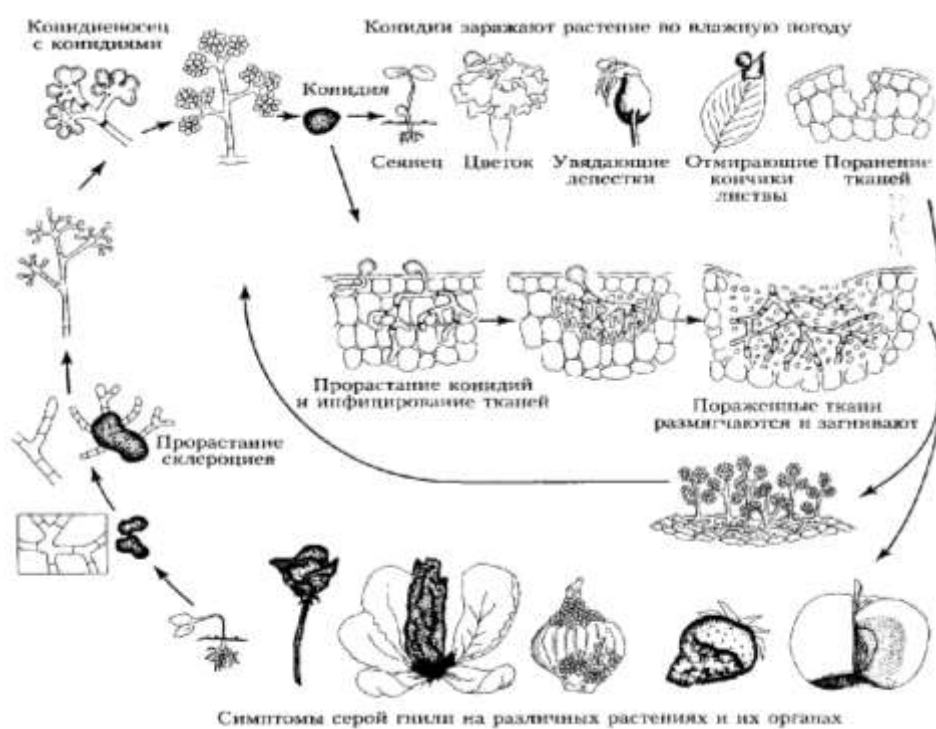
Биологический и инфекционный цикл развития *Ustilago nuda*. (возбудитель пыльной головни ячменя).



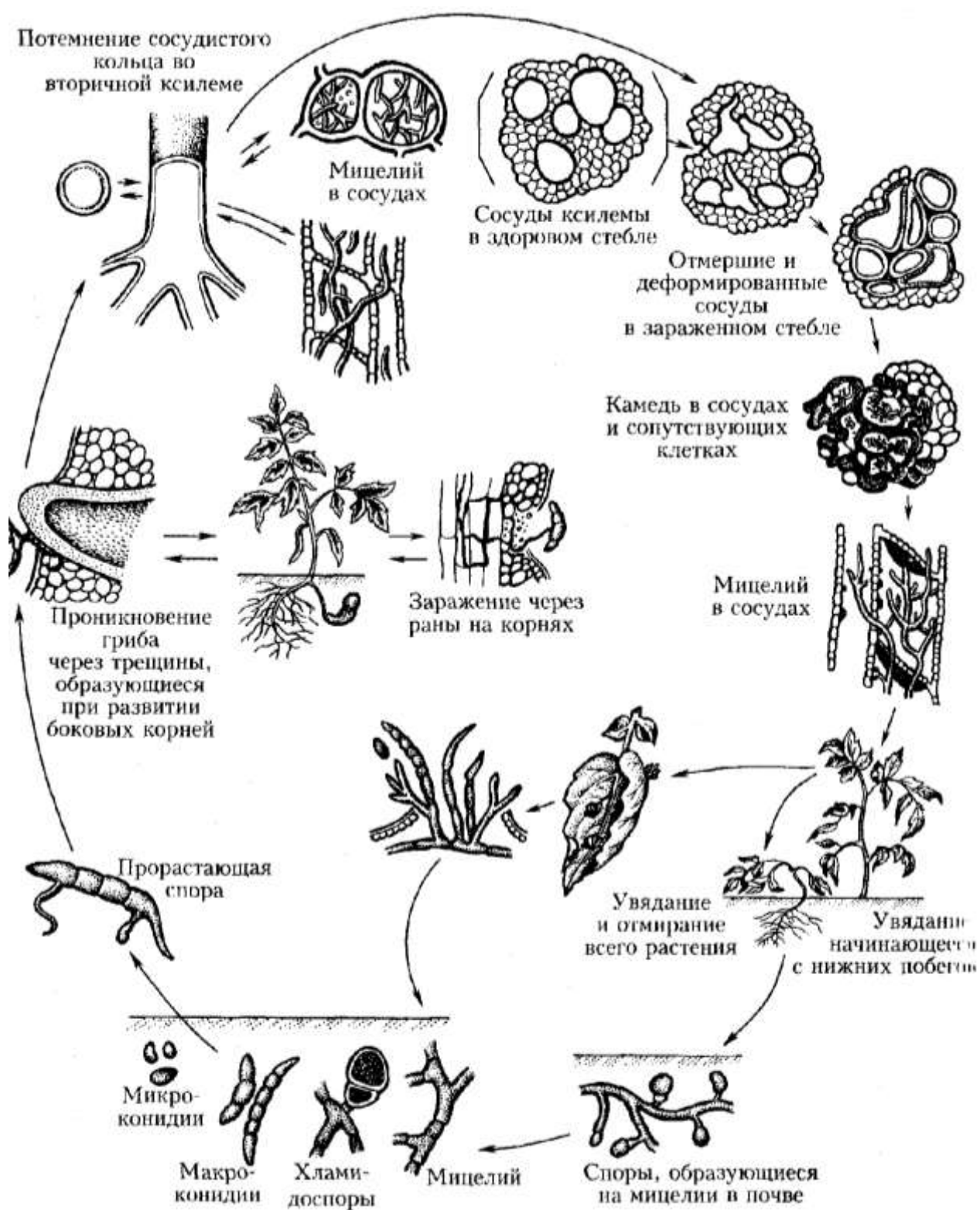
Биологический и инфекционный цикл развития *Puccinia graminis*.
(возбудитель линейной или стеблевой ржавчины злаков).



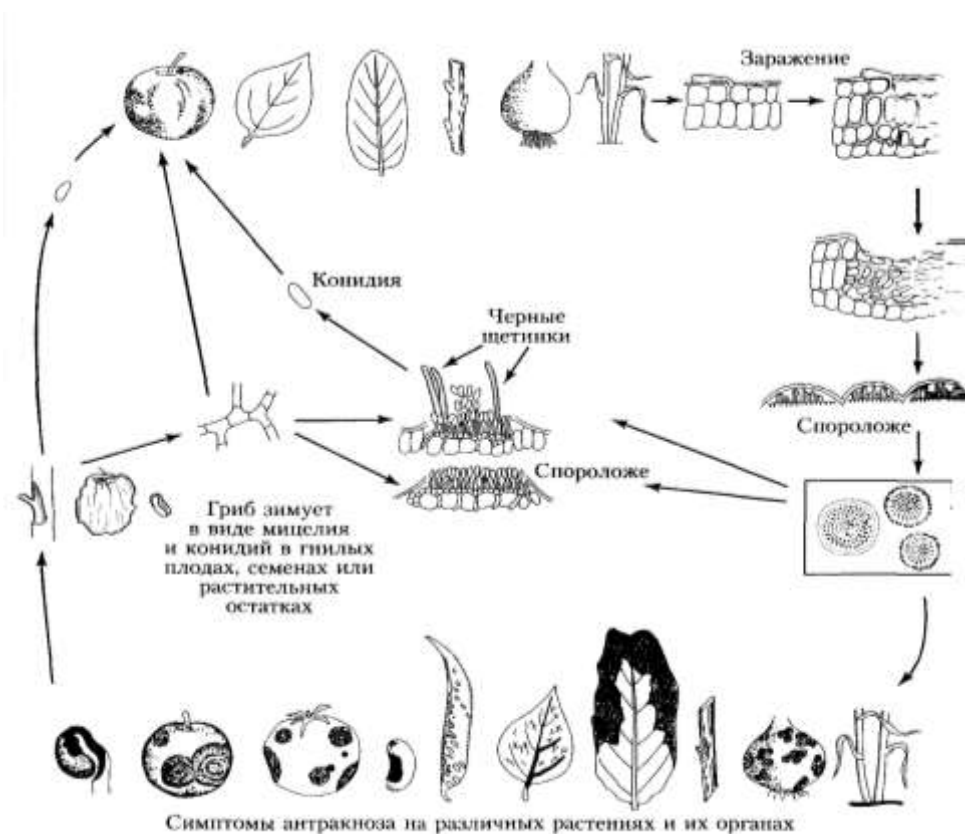
Биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Alternaria* (возбудитель альтернариоза).



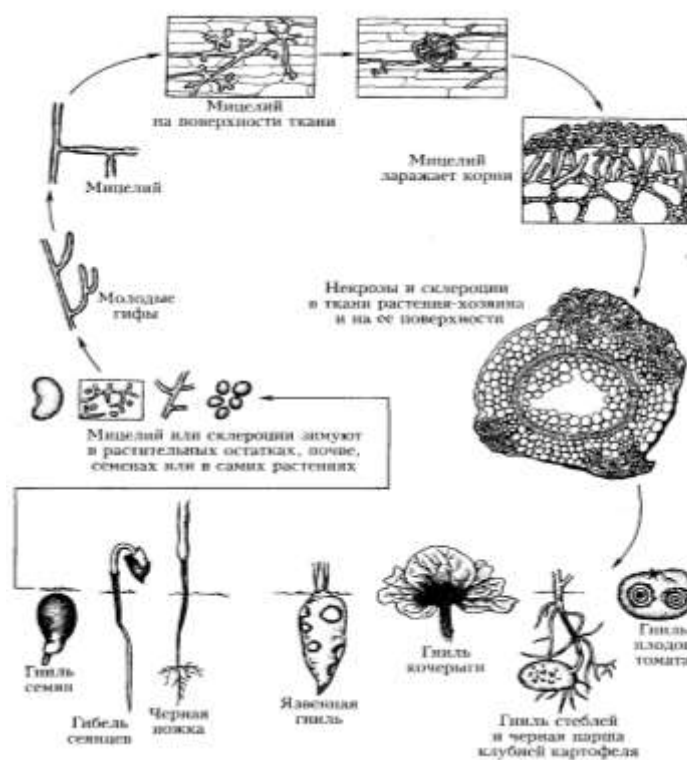
Биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Botrytis*.



Биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Fusarium*.
(возбудитель фузариоза).



Биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Colletotrichum* и *Gleosporium* (возбудитель антракноза).



Биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Rhizoctonia* (возбудитель черной парши).

Контрольные вопросы.

1. Охарактеризуйте биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Botrytis*.
2. (возбудитель серой гнили плодов и ягод).
3. Охарактеризуйте биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Alternaria*
4. (возбудитель альтернариоза).
5. Охарактеризуйте биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Fusarium*.
6. (возбудитель фузариоза).
7. Охарактеризуйте биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Colletotrichum* и *Gleosporium* (возбудитель антракноза).
8. Охарактеризуйте биологический и инфекционный цикл развития грибов рода *Rhizoctonia* (возбудитель черной парши).
9. Охарактеризуйте биологический и инфекционный цикл развития возбудителя твердой головки пшеницы.
10. Охарактеризуйте биологический и инфекционный цикл развития возбудителя пыльной головки ячменя.
11. Охарактеризуйте биологический и инфекционный цикл развития возбудителя линейной или стеблевой ржавчины злаков.

Лабораторная работа 19 (2 ч).

Тема: Грибы как возбудители болезней человека и животных

Цель – ознакомить студентов со свойствами возбудителей и лабораторной диагностики микозов.

Задачи работы:

1. ознакомить студентов со свойствами возбудителей трихофитии, микроспории, кандидомикоза.
2. методами микологического исследования и этапами лабораторной диагностики

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: материал от животных, пораженных трихофитией и микроспорией, культуры грибов рода *Candida* на плотной питательной среде Сабуро или др., препаровальные иглы, микологические крючки, предметные и покровные стекла, смесь воды, спирта, глицерина (поровну), 20%-й раствор гидроксида натрия или гидроксида калия, 50%-й водный раствор глицерина, плакаты, таблицы, биопрепараты.

Описание (ход) работы:

Микозы – грибковые заболевания 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, мукоморикоз, сапролегниоз и бранхиомикоз рыб, аспергиллез, аскоферомикоз и меланоз пчел, мускардину тутового шелкопряда и другие.

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. Все микозы животных условно разделяет на 3 группы в зависимости от локализации поражений:

- поверхностные микозы (ногти, волосы) или дерматомикозы - в патологический процесс вовлекаются эпидермис, волосы и ногти (трихофития, микроспория);
- подкожные или субкутанные микозы - поражаются кожа, подкожная клетчатка, фасции и кости (эпизоотический лимфангит, кандидамикоз; кокцидиоидомикоз);
- системные или глубокие микозы - поражаются все органы, часто наблюдается диссеминирование с вовлечением в патологический процесс различных тканей (мукоморикоз (*M. pusillus*, *M. racemosus*, *R. arrhizus*, *A. corymbifera*) пенициллез (*P. notatum*, *P. crustaceum*, *P. glaucum*, *P. Citrinum*), аспергиллез (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*)).

Общая схема лабораторной диагностики микозов:

- Отбор патологического материала
- Микроскопическое исследование патологического материала в нативных и окрашенных препаратах.
- Культуральное исследование.
- Люминисцентное исследование.
- Иммунологическое и биологическое исследование.
- Гистологическое исследование.

При оценке результатов необходимо учитывать данные всех исследований, а в случае постановки диагноза – клинические признаки и характер патологоанатомических изменений.

Трихофития – грибковое заболевание, для которого характерно появление на коже резко очерченных очагов с шелушащейся отрубевидной поверхностью или воспалительной реакцией кожи волосяных фолликулов.

Микроспория – грибковое заболевание, клинически проявляющееся поверхностным воспалением кожи, обламыванием волос и поражением когтей.

Различают поверхностную, глубокую, или фолликулярную, и стертую (атипичную) формы проявления дерматомикозов. В быту трихофитию и микроспорию называют «стригуший лишай».

Восприимчивы сельскохозяйственные животные всех видов (преимущественно молодняк), пушные и хищные звери. У людей инфицированию более подвержены дети. Важным фактором заражения служит мацерация кожи.

Возбудители дерматомикозов – грибы дерматофиты, принадлежат к трем родам: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* (более 40 видов) семейства Артродермовые (*Arthrodermataceae*), порядка Онигеновые (*Onygenales*), Класа Эуроциомикеты (*Eurotiomycetes*), Отдела Аскомицеты (*Ascomycota*). Широко распространены в природе. Они паразитируют на ороговевших субстратах, выделяя кератиназу, разлагающую кератин эпидермиса, волос, ногтей. К дерматофитам относят представителей

Основными возбудителями трихофитии животных являются:

- у крупного рогатого скота, буйволов, зебу, оленей – *T. verrucosum*, иногда – *T. mentagrophytes*;
- у лошадей – *T. equinum* и *T. mentagrophytes*;
- у верблюдов – *T. verrucosum*, *T. sarkisovi*;
- у овец и коз – *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*;
- у свиней – *T. mentagrophytes*;
- у собак – *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum*;
- у пушных зверей и кроликов – *T. mentagrophytes*, редко *T. verrucosum*;
- у кошек (трихофития встречается редко) – *T. mentagrophytes*.
- у лабораторных животных (мыши, крысы, хомяки, морские свинки) – *T. mentagrophytes*;
- у птиц – *T. gallinae*.

Основные возбудители микроспории животных являются:

- у кошек и собак – *M. canis* (син. *M. lanosum*);
- у лошадей – *M. equinum*, редко *M. distortum* и *M. gypseum*;
- у свиней – *M. canis*;
- у пушных зверей, кроликов – *M. canis*;
- у лабораторных животных – *M. canis*;
- у крупного рогатого скота и овец – *M. canis* и *M. gypseum*.

Лабораторная диагностика основана на результатах микологического исследования.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и люминесцентного анализа, выделение чистой культуры посевом на специальные питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют соскобы с пораженных частей тела животного вместе с корочками и чешуйками, пораженные волосы с участков, граничащих со здоровой кожей.

Люминесцентный анализ заключается в следующем. Исследуемый материал помещают в чашки Петри на расстоянии 20 см от ртутно-кварцевой лампы ПРК-2 или ПРК-4 с фильтром Вуда и просматривают под ультрафиолетовыми лучами в затемненном помещении. Пораженные возбудителем микроспории волосы дают яркое зеленоватое свечение. Корочки, чешуйки не светятся. Кроме того, с помощью люминесцентного анализа проводят раннюю диагностику атипичных и скрытых форм микроспории.

Для микроскопирования патологического материала в лабораторных условиях отбирают волоски с белыми чехликами у корня, обрезая маленькими ножницами пораженную часть волоса. Подготовленные таким образом волоски переносят на предметное стекло в каплю 10-20%-го NaOH, подогревают над пламенем горелки до появления ободка, затем добавляют каплю глицерина, покрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом.

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. 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.

У возбудителей трихофитии споры гриба округлые, в цепочках и образуют вокруг волоса чехол. Споры располагаются вокруг волоса, на поверхности и внутри волоса. В чешуйках и на ранних стадиях поражения встречается ветвящийся мицелий. Споры грибов *T. verrucosum* и *T. equinum* более крупные, чем споры дерматофита *T. mentagrophytes*.

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.

При культуральной диагностике для получения чистой культуры дерматофита и дифференциации вида возбудителя высев патологического материала проводят на сусло-агар (рН 6,2-6,8) или МПГА, содержащего 2% глюкозы и выдерживают в термостате при температуре 26-28 °С в течение 20-30 дней. Для изучения характерного роста дерматофитов наряду с пробирками используют чашки Петри. После изучения макрокультур готовят препараты просматривают под микроскопом. Для этого кусочек культуры переносят на предметное стекло в каплю дистиллированной воды и покрывают покровным стеклом. Предварительно целесообразно спичкой постучать немного по покровному стеклу, чтобы образовался равномерный слой для просматривания.

Культуральные свойства. *T. verrucosum* (син. *T. faviforme*). Культура развивается медленно и достигает достаточных размеров на 30-40-й день. Наиболее типичны плотные, возвышающиеся над средой, кожистые, складчатые колонии серовато-белого цвета. Колонии глубоко врастают в питательную среду. Могут иногда вырастать и колонии без обильного количества кожистых складок. Под микроскопом виден септированный мицелий толщиной 0,7-4,0 мкм, цепочки артроспор 5-15 мкм в диаметре, отдельные хламидоспоры. Некоторые штаммы образуют много микроконидий овальной, грушевидной и палочковидной формы, размером 0,7-3х2-8 мкм. В отдельных штаммах встречаются макроконидии, состоящие из 2-8 сегментов размером 3-8х20-60 мкм.

T. mentagrophytes. Рост начинается на 3-4-й день после посева. Развившиеся колонии плоские, ровные, приподнятые в центре в виде маленького бугорка. Поверхность мучнистая. Молодые культуры белые, с возрастом желтеют. Могут вырастать колонии с многочисленными радиальными лучами. Обратная сторона колоний пигментирована в темно-красный, вишневый цвет. Мицелий слабоветвящийся. Отдельные гифы толщиной 1,5-8,5 мкм образуют типичные спирали. Вдоль гиф по боковым нитям мицелия расположено множество микроконидий диаметром 2-4 мкм в основном округлой формы. Редко встречаются крупные макроконидии веретенообразной формы с 3-8 перегородками, размером 5-10х30-50 мкм.

T. equinum. При высеве патологического материала на сусло-агар рост культуры отмечают на 6-9-й день. Вырастают белые, бархатистые колонии с выраженными радиальными бороздками. Обратная сторона колонии пигментирована в желтый цвет. Мицелий ветвящийся, шириной 1-3 мкм, множество округлых или грушевидных микроконидий размером 1-3х3-7 мкм. Характерным элементом является наличие большого количества рудиментарных микроконидий из 2-4 сегментов, тонкостенных размером 3-7х15-50 мкм. Хламидоспоры единичные или отсутствуют.

T. sarkisovi. На сусло-агаре вырастают пушистые, ровные или клочковатые, бежевые, кожистые, бугристые или складчатые колонии, глубоко врастающие в питательную среду. Ширина мицелия 1,5-9 мкм. Встречаются единичные микроконидии овальной формы, размером 2-5х3-10 мкм. Хламидоспоры диаметром 7-18 мкм располагаются одиночно или цепочками. Диаметр артростор 5-10 мкм.

T. gallinae. Молодые колонии гладкие, бархатистые, белого цвета. С возрастом становятся складчатыми, мучнистыми, поверхность растрескивается. Иногда колонии могут быть окрашены в розовый или малиновый цвет. Мицелий ровный, септированный. Много микроконидий размером 3,5-5 мкм. Встречаются макроконидии с 2-6 перегородками. В старых культурах можно увидеть хламидоспоры.

M. canis. Из патологического материала начинает прорастать на 2-4-й день после посева. Первичные колонии плоские, сероватого или коричневатого цвета с паутинистым растущим краем. Обратная сторона желтоватого цвета. При пересевах культура приобретает устойчивую белую окраску. Мицелий ветвящийся, разной ширины, иногда с ракеткообразными гифами. Много макроконидий веретенообразной формы с 5-12 перегородками размером 1,1-1,5х50-80 мкм. Встречаются микроконидии (алейроспоры) округлой или овальной формы, размером 1-3х2-5 мкм.

M. equinum. Рост культуры отмечают на 6-8-й день после посева патологического материала на сусло-агар. Гриб образует кожистые, складчатые колонии, покрытые серовато-белым мицелием. С первых же дней развития культура глубоко врастает в питательную среду. Отдельные штаммы при пересевах образуют кожистые колонии желтого или коричневого цвета, на которых отсутствует воздушный мицелий. Поверхность колоний имеет много хорошо очерченных радиальных борозд, сходящихся в центре. У старых колоний в центре может появляться кратерообразное углубление. Мицелий ветвящийся, септированный, шириной 1-5 мкм, с возрастом утолщается и принимает четкообразный вид. В старых культурах множество интеркалярных и терминальных хламидоспор. Иногда встречаются многоклеточные макроконидии с 5-7 перегородками размером 5-10х15-60 мкм. Редко встречаются микроконидии размером 1-2х3-5 мкм.

M. gypseum. На сусло-агаре вырастают плоские, слегка желтоватые, порошистые колонии. Иногда колонии окрашены в бежевый цвет. Мицелий ветвящийся с

ракеткообразными утолщениями. Множество макроконидий с закругленными концами и 3-6 перегородками. Встречаются хламидоспоры и много микроконидий.

Биопрепараты. В ветеринарной практике активно применяется ряд вакцин против дерматофитозов (стригущего лишая) различных видов животных. Спектр вакцин против дерматомикозов животных представлен в таблице.

Кандидомикоз (кандидоз, кандидиаз, монилиаз, молочница, оидиомикоз) – грибковое заболевание животных, характеризующееся поражением слизистых оболочек с образованием беловатых творожистых наложений, а иногда возникновением гранулем во внутренних органах. Возбудителем являются *C. albicans*, *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. quilliermondii*, *C. glabrata* рода *Candida*, принадлежащие к порядку Сахаромицетовых (*Saccharomycetes*), класса Сахаромицеты (*Saccharomycetes*), отдела Аскомицеты (*Ascomycota*). Заболевание встречается во всех странах мира. Восприимчивы все виды сельскохозяйственных животных, однако наиболее выраженный экономический ущерб кандидомикоз наносит птицеводческим хозяйствам. Чаще всего кандидомикозом заболевают индюшата, цыплята, гусята и утята в возрасте до 3 месяцев и реже молодняк крупного рогатого скота, поросята, ягнята. Летальность среди молодняка птиц колеблется от 2 до 100%, овец до 60 и свиней 33,6%. Восприимчив и человек.

Лабораторная диагностика основана на результатах микологического исследования.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и ферментативным свойствам.

Материал для исследования. Объектом исследования служат пленки, наложения, соскобы со слизистой оболочки, содержимое язв и эрозий, кусочки внутренних органов, у коров исследуют дополнительно молоко (пробы из пораженной доли вымени).

Микроскопия препаратов из исходного материала. В тканях животных *C. albicans* может образовывать дрожжевые клетки и гифы, обнаружение которых имеет диагностическое значение.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Материал (кроме внутренних органов) берут стерильной бактериологической петлей и тщательно растирают петлей или стеклянным шпателем по поверхности среды. Кусочки печени, селезенки или почек погружают в спирт, обжигают над пламенем спиртовки, а затем из глубины органов вырезают кусочек ткани и проводят им по поверхности плотной среды. Кровь из сердца, содержимое желудка и кишечника, почечной лоханки высевают на агар Сабуро в чашки Петри. Посевы инкубируют при 37 °С 24-48 ч до появления на питательной среде колоний.

Идентификацию культур грибов проводят в два этапа.

На первом этапе изучают культурально-морфологические признаки выделенной культуры в первичном посеве на плотной питательной среде (агар Сабуро, МПА с глюкозой).

На втором этапе для окончательной идентификации грибов рода *Candida* выделенную культуру высевают на жидкие питательные среды (бульон Сабуро, картофельный, кукурузный агары или на аналогичные жидкие среды – кукурузный или картофельный отвар) и определяют культуральные признаки и цитоморфологические особенности. Посев на картофельный и кукурузный агары делают штрихом в толщу среды, разрезая петлей поверхность агара. При микроскопии учитывают наличие псевдомицелия, тип роста на этих средах; присутствие хламидоспор на кукурузном агаре в чашках Петри исследуют при малом увеличении.

Культуральные свойства. Колонии грибов рода *Candida* выпуклые, блестящие, сметанообразные, непрозрачные с различными **беловато-кремовыми** оттенками.

На жидких питательных средах грибы *C. albicans* через 24-48 ч вызывают помутнение среды и образование рыхлого осадка на дне пробирки. Для грибов *C. tropicalis* и *C. krusei* характерны глубинный рост и образование пленки и пристеночного кольца. **Для бластоспор *C. albicans* характерно образование ростковых трубок при культивировании на жидких средах с сывороткой или плазмой (2-3 ч при 37 °C).**

Идентификация других видов ведется преимущественно по спектру усваиваемых сахаров. Для дифференциации видов грибов рода *Candida* определяют ферментативную активность на жидких средах Гисса, содержащих 3% различных углеводов и индикатор Андрее. Посевы наблюдают в течение 10-15 дней, учитывают кислото- и газообразование.

В настоящее время выпускаются коммерческие наборы, пригодные для идентификации отдельных или нескольких видов дрожжевых грибов, и чаще иных, чем *C. albicans*. Использование этих систем считается нетрудоемким, удобным и требует достаточно мало времени.

Наиболее новыми и широко распространенными являются так называемые хромогенные среды. Основной принцип конструирования хромогенных систем заключается во введении в питательную среду хромогенных или флюоресцирующих гексозамидных субстратов, облегчающих идентификацию этих грибов уже при первичном их выделении.

При кандидозе возможно проведение **серологической диагностики (реакция агглютинации, РСК, РП, ИФА) и постановка кожно-аллергической пробы с кандидааллергеном.** Серодиагностика кандидоза малоэффективна в связи с распространенным носительством грибов рода *Candida*.

В последние годы в диагностике глубокого кандидоза используется также газожидкостная хроматография, определяющая компоненты клеточной стенки грибов D-маннозу и арабинитол. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) используется только в диагностике глубоких форм кандидоза в связи с распространенным носительством *Candida*.

Биопроба. Для подтверждения вирулентности осуществляют постановку биологической пробы на лабораторных животных (кролики, белые мыши), вводя им внутривенно (кролики) или внутрибрюшинно (белые мыши) 0,5 мл взвеси 48-часовой культуры гриба, выращенной на среде Сабуро, содержащей 300-500 тыс. клеток. Животные погибают на 2-7-е сутки. При вскрытии павших животных в паренхиматозных органах обнаруживают множественные узелки-гранулемы с грибными элементами в центральной части.

Таблица 17

Биопрепараты для лечения и профилактики дерматомикозов животных

Наименование вакцины	Назначение	Тип	Длительность иммунитета	Профилактические/терапевтические свойства
ТФ-130, ЛТФ-130, Трихостав	Против трихофитии крупного рогатого скота	Живая, моновалентная	Пожизненный	+/+
Вермет	Против дерматофитозов крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов	Живая, поливалентная	5 лет	+/+
Микродерм	Против дерматофитозов кошек, собак, пушных зверей, кроликов и нутрий	Живая, поли-валентная	5 лет	+/+
Вакдерм	Против дерматофитозов собак, кошек, пушных зверей и кроликов	Инактивированная, поливалентная	12 мес.	+/+
Вакдерм F	Против дерматофитозов кошек	Инактивированная, поливалентная	12 мес	+/+
Поливак ТМ	1) против дерматомикозов собак 2) против дерматомикозов кошек	Инактивированная, поливалентная	12 мес.	+/+
Мультикан-7	Против чумы, адено-вирусных инфекций, парвовирусного энтерита, коронавирусного энтерита и дерматофитозов собак	Инактивированная, ассоциированная	12 мес.	+/-

Контрольные вопросы: 1. По каким признакам можно дифференцировать дрожжеподобные грибы от истинных дрожжей? 2. Перечислите основные этапы идентификации грибов рода *Candida*. 3. Назовите представителей рода – основных возбудителей кандидоза. 4. Почему грибы рода *Candida* называют диморфными? 5. Что является видовым морфологическим признаком *C.albicans*? 6. Какие микроорганизмы вызывают дерматомикозы? 7. Какова схема лабораторного исследования на дерматомикозы? 8. По каким критериям дифференцируют грибы родов *Microsporum* и *Trichophyton*? 9. Назовите возбудителей дерматомикозов у разных видов домашних животных. 10. Какие вакцины применяют против дерматомикозов сельскохозяйственных животных?

Лабораторная работа 20 (2 ч).

Тема: Микробиологическая диагностика микозов.

Цель – изучить принципы микробиологической диагностики микозов

Задачи работы:

1. Освоить методы лабораторного исследования патологического материала
2. Освоить посев патологического материала и количественный учет клеток при микозах, вызванных дрожжевыми грибами
3. Освоить посев и микроскопическое исследование патологического материала при подозрении микозов, вызванных плесневыми грибами, идентификацию выделенных культур плесневых грибов.
4. Освоить посев и микроскопическое исследование патологического материала при микозах, вызванных диморфными грибами
5. Освоить посев и микроскопическое исследование патологического материала при дерматомикозах (кератомикозах и дерматофитиях).
6. Освоить серологические методы диагностики микозов
7. Изучить возбудители микозов, наиболее часто выявляемые при лабораторном исследовании различных клинических материалов

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:

Грибы способны поражать различные органы. Это определяет разнообразие патологического материала, который необходимо исследовать при подозрении на микоз. Обязательным условием успешного исследования является взятие материала из очагов поражения в асептических условиях.

Гной из закрытых полостей (абсцессы) берут с помощью пунктирования и аспирации в стерильные пробирки.

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

Отделяемое слизистых ротовой полости, миндалин, влагалища, цервикального канала, уретры, носа, конъюнктивы глаз для посева берут тампоном из гигроскопической ваты, который помещают в стерильную пробирку или в пробирку с 2 мл жидкой питательной среды (сусло, Сабуро, МПБ). Материал со слизистых оболочек рта и зева берут вначале с внутренней поверхности щек, неба, губ, затем с языка, тщательно протирая тампоном спинку и корень, а в заключение - круговым движением из зева. Для микроскопии соскобы беловато-сероватых налетов слизистых берут ложечкой Фолькмана, предметным стеклом.

Кусочки органов и биопсированную ткань собирают в две стерильные чашки Петри или баночки с завинчивающейся крышкой. Одну пробу заливают 10% раствором формалина (40% формальдегид - 1:10) для гистологического исследования, вторую используют для микологического исследования.

Кожные чешуйки с мест поражения соскабливают скальпелем, берут на исследование покрывки пузырьков и пустул. При поражениях наружного слухового прохода кожные чешуйки берут петлей или тампоном. Тампон помещают в сухую пробирку.

Фекалии (последняя порция) собирают в баночку.

Патологический материал транспортируют в специальной таре или металлических биксах, защищая от прямых солнечных лучей. Поступивший в лабораторию материал исследуют в течение часа после взятия при хранении в условиях комнатной температуры или не более чем через 3 ч при хранении в холодильнике при температуре +4 С. Исключение составляет цереброспинальная жидкость, которую хранят в термостате при +37 С в течение того же времени. Ногтевые и кожные чешуйки при необходимости можно исследовать в более поздние сроки.

В сопроводительном документе указывают фамилию, имя, отчество, пол, возраст и адрес больного, предполагаемый клинический диагноз, наименование исследуемого материала, время его взятия, локализацию очага, номер истории болезни, фамилию врача и учреждение, направляющее материал.

Лабораторное исследование патологического материала

Микроскопические исследования

Для обнаружения морфологических элементов гриба - дрожжевых клеток, псевдомицелия, мицелия, конидиеносцев, конидий, тканевых форм глубоких микозов - патологический материал исследуют в нативных и окрашенных препаратах.

Жидкий патологический материал просматривают в неокрашенном состоянии в следующих просветляющих жидкостях: смесь спирта с глицерином (этиловый спирт 1 ч., глицерин 2 ч., дистиллированная вода 2 ч.), раствор Люголя (1 г кристаллического йода, 2 г калия йодида, 150 мл воды), а также в воде или физиологическом растворе. Для приготовления нативных препаратов на предметное стекло петлей или пипеткой наносят каплю материала, затем 1-2 капли просветляющей жидкости, накрывают покровным стеклом и микроскопируют при малом увеличении 1:80 (окуляр 10х и объектив 8х), при котором можно видеть скопления дрожжевых клеток, псевдомицелий, мицелий и другие элементы грибов. При большом увеличении 1:400, можно характеризовать отдельные клетки.

Плотный патологический материал (кожные, ногтевые чешуйки) помещают в каплю 10-20% раствора КОН, слегка подогревают над пламенем горелки (для лучшей мацерации) до появления кристалликов щелочи по периферии капли. Затем каплю накрывают покровным стеклом, слегка надавливают на него и микроскопируют, вначале под малым увеличением для нахождения чешуйки, далее при большом увеличении.

В материале из волос мантия из окружающих волос спор (эктотрикс) или внутри волоса (эндотрикс) элементы гриба обычно очень четко видны. Поражения волос, как и

размеры спор, специфичны для различных видов дерматофитов. Необходима дифференциальная диагностика между структурами гриба и артефактами. Возможными источниками ложноположительных результатов являются липидные капли, пузырьки воздуха, волокна текстиля и так называемый “мозаичный гриб”. Липидные капли могут быть похожи на дрожжевые клетки – такие находки наиболее часты в плохо просветленном материале. Волокна текстиля обычно лежат отдельно от материала эпидермиса, волос или ногтя. Они крупнее, чем гифы гриба, неравномерной толщины и не содержат септ. “Мозаичный гриб” – это артефакт, полученный в процессе кристаллизации КОН при чрезмерном нагревании препаратов. В отличие от грибов, четких разделений на клетки не определяется.

При предположении диагноза “криптококкоз” целесообразно применять методы специфического выявления капсульного материала *Cr.neoformans*, содержащего гликозаминогликаны (кислые полисахариды).

Посев патологического материала и количественный учет клеток при микозах, вызванных дрожжевыми грибами

Получение культур грибов необходимо для их идентификации и определения чувствительности к антифунгальным препаратам.

МОКРОТУ перед исследованием 5-10 мин гомогенизируют встряхиванием со стерильными бусами. Если мокрота содержит много слизи и плохо гомогенизируется, к ней можно добавить 1-2 мл стерильного физиологического раствора. Мокроту микроскопируют в нативных или окрашенных препаратах. Если при микроскопии мокроты с большим увеличением в поле зрения видны элементы гриба, то ее следует сеять в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000, если элементы гриба не обнаруживаются, мокроту сеют не разведенную. Разведения готовят в жидкой питательной среде (сусло, Сабуро, 1% пептонная вода) или в стерильном физиологическом растворе. Из каждого разведения посев производят по 0,1 мл с помощью шпателя на 2 чашки сусло-агара, агара Сабуро или МПА с добавлением антибактериальных антибиотиков – пенициллина и стрептомицина, биомицина (100-200 ед./мл среды). Питательную среду предварительно подсушивают в термостате при +37 °C, т.к. при наличии конденсата рост колоний может иметь сливной характер. Посевы инкубируют в термостате при + 37 °C в течение 48 ч. Затем при наличии роста однотипных дрожжевых колоний производят их количественный учет. Расчет численности дрожжевых клеток (n) в 1 мл или 1 г исследуемого материала производят по формуле $n = авс$, где а - среднее число колоний на одной чашке Петри, в = 10 при объеме посевного материала 0,1 мл, с- степень разведения экскрета (10,100,1000).

Пример расчета: на чашках с разведением 1:1000 выросло в среднем 60 колоний, при этом в 1 мл исследуемого экскрета содержится $60 \times 10 \times 1000 = 600000$ дрожжевых клеток.

ФЕКАЛИИ забирают мерной ложкой в количестве 0,2 г, помещают в 1,8 мл жидкого сусла и тщательно размешивают стеклянной палочкой. Полученное разведение (1:10) отстаивают 5-10 мин, готовят разведения 1:100, 1:1000 и засевают в объеме 0,1 мл на 2 чашки Петри с агаризованной средой. Учет количества дрожжевой флоры производят на 1 г фекалий.

ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНАЯ жидкость. Характеризуют ее внешний вид (прозрачная или мутная, бесцветная или окрашенная, наличие примеси крови, осадка). Микроскопируют мазки из осадка ликвора после его центрифугирования. Готовят три препарата: нативный - в капле стерильного физиологического раствора: нативный - в капле туши и мазок для окраски PAS-методом, по Граму и альциановым синим по Моури.

Микроскопия **цереброспинальной жидкости** в нативных и окрашенных препаратах позволяет установить наличие дрожжевых почкующихся клеток и фрагментов мицелия гриба, либо бактерий, вызывающих гнойный менингит (менингококк, пневмококк, гемофильная палочка и др.). В тушевом препарате может быть выявлен капсульный гриб

Cryptococcus neoformans. При этом на сером фоне туши видны почкующиеся дрожжевые клетки, окруженные светлым ореолом капсулы. В тушевых препаратах также могут быть дрожжевые формы *Candida albicans*, не имеющие светлого ореола капсулы вокруг клетки.

Cr. neoformans может быть также обнаружен с помощью окраски альциановым синим (по Моури). Окраска происходит за счет селективного выявления капсульного гетерополисахарида характерного для *Cr. neoformans*. При обнаружении в окрашенном по Граму препарате бактериальной флоры дальнейшее исследование цереброспинальной жидкости проводят по соответствующим бактериологическим методикам. После микроскопии осадка производят посев жидкости на 3 чашки свежеприготовленных, подсушенных сусло-агара или агара Сабуро, а также на жидкое сусло или жидкую среду Сабуро. На поверхность питательного агара чашек 1 и 2 наносят 2-3 капли осадка жидкости и тщательно втирают шпателем, а на поверхность агара чашки 3 для обнаружения мицелиальных грибов производят посев по 1 капле в трех точках. Оставшуюся жидкость переносят в 5 мл жидкого сусла или агар Сабуро. Посевы инкубируют при двух температурных режимах: чашку 1 - при +37 °С, а чашки 2 и 3 и посев на жидкой среде - при +28 °С - +30 °С. Посевы при температуре +37 °С просматривают на 2 и 5 день, а при 28 - 30 °С - на 4,7,10 день роста. Если на 5 день при температуре +37 °С и на 10 день при температуре 28-30 °С рост не отмечается, производят высев из жидкой питательной среды на чашки с сусло или агаром Сабуро. В случае отсутствия роста дрожжевой флоры результат посева жидкости регистрируют как отрицательный.

ОТДЕЛЯЕМОЕ свищей. Исследование начинают с микроскопии материала в нативных или окрашенных препаратах. Затем производят посев материала на агаровую среду (сусло или Сабуро), для чего на чашку наносят 2-3 капли отделяемого и шпателем распределяют по поверхности агара. Посевы инкубируют в течение 48 ч при +37 °С.

ОТДЕЛЯЕМОЕ слизистых.

1. Тампон помещают в пробирку с 2 мл жидкой среды (сусло, Среда Сабуро или МПБ) и встряхивают 5-7 мин, не замочив пробку. Готовят разведения 1:10, 1:100 и высевают по 0,1 мл из каждого разведения на две чашки сусло-агара, агара Сабуро или МПА. Посевы на плотных средах и пробирку с жидкой средой с тампоном (для обогащения) инкубируют при температуре +37 °С. Через 48 ч подсчитывают число колоний и ориентировочно определяют количество дрожжевых клеток, взятых тампоном. Для этого количество выросших дрожжевых колоний умножают на 20 и на разведение. При отсутствии роста колоний на чашках из взятых разведений производят повторный высев из среды обогащения на одну чашку с сусло-агаром.

2. Посев можно делать, проводя тампоном с вращением по поверхности питательной среды. При этом количество дрожжевых колоний не учитывают, а отмечают только наличие и интенсивность роста: единичные колонии, значительный или сплошной рост, отсутствие роста микробиоты.

КРОВЬ. Пробы венозной крови для получения гемокультуры необходимо разбавлять средой обогащения, по крайней мере, 1:5 для того, чтобы бактерицидные свойства крови не ингибировали рост грибов. Засевают 5-10 мл свежесвзятой крови соответственно в 50-100 мл питательной среды (жидкое Сабуро с 2% глюкозы или в среду Китт-Тароцци после ее регенерации). Для посева можно брать кровь с антикоагулянтом (1:10 5% раствора натрия цитрата). Посевы выращивают 10 дней при +37 °С с контрольным высевом на 5 и 10 дни. Стерильной пипеткой берут осадок, 3 капли которого рассеивают бактериологической петлей по поверхности сусло-агара в чашки Петри. Засеянные чашки помещают в термостат с температурой +37 °С на 2-5 суток. В случае роста дрожжевой флоры выдают предварительный ответ о наличии гриба в крови, а культуру определяют до рода и вида.

Описан другой метод посева крови на микрофлору (H.Rieth). В этом случае посев 5-10 мл крови производят каплями. На поверхность плотной питательной среды в чашке Петри стерильной пипеткой наносят 40-50 капель крови, на расстоянии 0,5 см между каплями. Посев производят на две чашки Петри, инкубируя в одной чашке при температуре +37 °С, а в другой - при комнатной температуре в течение 2-5 дней.

КУСОЧКИ тканей органов. Делают отпечаток исследуемым кусочком ткани на поверхности плотной питательной среды в чашке Петри, затем производят рассев петлей. Этот же кусочек ткани помещают в 50 мл жидкой питательной среды (сусло, среда Сабуро). Посевы инкубируют в термостате при температуре +37 °С в течение 5 дней.

КОЖНЫЕ и ногтевые чешуйки. Посев чешуек производят независимо от результатов микроскопии. Для этого стерильной микологической лопаточкой, увлажненной в конденсате среды, чешуйки переносят в пробирку на скошенный сусло-агар в 2-3 точки, прижимая их к поверхности среды. В зависимости от количества материала, поступившего на исследование, посев делают в 2-3 пробирки. Посевы инкубируют в термостате при температуре 28-37 °С до 5 дней.

Широко применяются методы быстрой идентификации *C.albicans*. Этот вид способен образовывать ростковые трубки и короткие нити псевдомицелия в течение нескольких часов (2-4 часа при 37 °С) на сыворотке крови, яичном белке, на среде Игла, на 199 среде и т.п. Практически в лабораториях используется сыворотка человека (остатки от серологических реакций), где при 37 °С образуются ростковые трубки, а через 24 часа клубки псевдомицелия. Для вида *C.albicans* этот феномен характерен в 90% случаев. Реже образуются ростки у *C.tropicalis*.

Микроскопическое исследование и посев патологического материала при подозрении микозов, вызванных плесневыми грибами

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) во избежание загрязнения микобиотой воздуха. Перед употреблением предметные и покровные стекла стерилизуют над пламенем горелки.

Микроскопия материала

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. Накрывают покровным стеклом, слабо надавливают препаровальной иглой и микроскопируют при малом (1:80, окуляр 10 х 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 мин). Осадок петлей или пастеровской пипеткой переносят в каплю 10% раствора КОН на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и большом увеличениях 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 96% этилового спирта и эфира) в течение 3-5 мин, либо

тремякратным фламбированием над пламенем горелки. Фиксированный мазок окрашивают по Граму, PAS-методом, калькофлюором белым. Окрашенный препарат микроскопируют с использованием иммерсионной системы микроскопа (1:900, окуляр 10х, объектив 90х).

Посев материала

При исследовании любого патологического материала на мицелиальные грибы 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 мицелиальных грибов (+37 °С и +28 °С), всегда в 3 точки в центре чашки. Время инкубации 4-5 суток.

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 определенного срока инкубации засеянные чашки просматривают и при обнаружении спороношения определяют культуру гриба. В случае отсутствия спороношения гриб пересевают на дифференциальную среду Чапека для дальнейшей идентификации.

Осадок промывных вод бронхов, гайморовых полостей, экссудата, мочи, желудочного сока (нативный или после центрифугирования) забирают пипеткой и засевают в объеме 0,1 мл. Фекалии разводят 1:10 (1г фекалий и 9 мл жидкости) в жидкой среде Сабуро или жидком стерильном изотоническом 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, засеивают 0,1 мл смыва с тампона газоном (по Лещенко В.М., 1973), либо в три точки.

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

Осадок цереброспинальной жидкости (центрифугат при 1500 об/мин в течение 5 мин) сеют на две чашки среды по 0,1 мл, а его остаток засеивают 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 мицелиального гриба на плотных средах культуру его определяют из этого посева, при отсутствии роста на Сабуро-агаре или сусло-агаре гриб изучают со среды обогащения. Для этого культуру гриба пересеивают еще раз 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 (Сабуро, сусло).

Кровь исследуют при подозрении на фунгемию в двух - трех повторях. Засеивают 5 или 10 мл крови, соответственно в 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 мицелиального гриба в виде войлочного комочка на дне и поверхностной пленки. Грибницу пересеивают на дифференциальную среду Чапека для определения рода и вида гриба. Если на 5 день рост гриба не отмечается, посевы выдерживают до 10 дней и при отсутствии роста результаты исследования регистрируют как отрицательные.

При посеве на три точки рост гриба в двух и трех точках определяется как диагностически значимый, в одной точке - случайный. При необходимости, возможен повторный посев.

Идентификация выделенных культур плесневых грибов

После выделения культуры мицелиальные грибы пересевают на дифференциальную среду Чапека для родового и, по возможности, видового определения.

В практике диагностических лабораторий, как правило, используют культурально-морфологические критерии идентификации: оценивают характер роста культуры гриба на агаровых средах (культуральная диагностика, макроморфология) и микроморфологию гриба.

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

Понятие макроморфологии (культуральные признаки) включает 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.

Микроморфологию гриба из культуры изучают по 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, вырезанной микологической лопаточкой из колонии в виде треугольника с захватом центральной и периферической частей, 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, на нее наносят каплю жидкости и накрывают 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 поодиночке либо группами, они заметно отличаются 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. Например, у рода *Aspergillus* конидиеносец состоит из следующих клеток: ножки, пузыревидного вздутия, стеригм, цепочек конидий. У рода *Penicillium* конидиеносец имеет форму простых или сложных кисточек, состоящих также из различных клеток: веточек-рамы, метул, фиалид, цепочек конидий.

У плесневых грибов *Mucor* и *Rhizopus* спороношение в виде спорангиев с эндоспорангиоспорами. Спорангий находится на конце спорангиеносца. Спорангии шаровидной или грушевидной формы, у большинства с особой колонкой, являющейся продолжением спорангиеносца внутрь спорангия. Спорангиоспоры округлые, бесцветные или окрашенные.

Конидии (споры) у плесневых грибов полиморфные (цилиндрические, шаровидные, овальные, эллипсоидные, яйцевидные, грушевидные, булабовидные) одно- и многоклеточные, варьируют по размеру и окраске, одиночные, цепочками или собраны в головки и располагаются гроздьями. Поверхность конидий может быть гладкая, шероховатая, шиповатая, бородавчатая, щетинистая и т.д.

Микроскопическое исследование и посев патологического материала при микозах, вызванных диморфными грибами

При этих микозах необходимо учитывать диморфизм возбудителей.

Патологическим материалом при первично патогенных микотических инфекциях (кокцидиоидоз, гистоплазмоз, паракокцидиоидоз, североамериканский бластомикоз), а также хромомикозе, споротрихозе, и мицетомах могут быть гной, мокрота, соскобы с язвенных поражений на коже и слизистой, цереброспинальная жидкость, кровь, биопсированные кусочки из очагов поражения.

Сложность при определении возбудителей этих микозов заключается в том, что из-за их диморфизма при микроскопии патматериала будут обнаруживаться тканевые формы гриба, чаще всего дрожжевые клетки различной морфологии или сферулы с эндоспорами, совершенно непохожие на элементы этого же гриба, извлеченные из его культуры, выросшей при температуре +28 - +30 °С на обычном агаре Сабуро, со значением рН ближе к кислому. Однако нужно иметь в виду, что у некоторых диморфных грибов, можно получить и в культуре дрожжевую фазу роста гриба, часто напоминающую его тканевую форму, но при выращивании на средах, богатых белками со слабо щелочной реакцией (рН = 7,6 - 7,8), при температуре 37 °С.

Вышеуказанное относится к грибам: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Sporothrix schenckii*.

Лабораторная диагностика микозов, вызванных упомянутыми здесь грибами, основана на обнаружении тканевых форм в патологическом материале при микроскопии, выделении культуры возбудителя и его идентификации по культурально-морфологическим признакам.

Микроскопическое исследование производят в неокрашенных препаратах на предметном стекле в капельке 10% растворе едкой щелочи или смеси спирта с глицерином в равных объемах или в окрашенных мазках (Табл.3).

Посев патологического материала производят на вышеуказанные питательные среды в чашках Петри с помощью бактериологического шпателя по общепринятой методике.

Микроскопическое исследование и посев патологического материала при дерматомикозах (кератомикозах и дерматофитиях).

Объектом исследования являются поверхностные микозы, поражающие только кератиновый слой эпидермиса, и дерматофиты, поражающие кожу и ее придатки (волосы, ногти), возбудителями которых являются грибы, относящиеся к родам *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*.

Лабораторное микологическое исследование включает те же этапы, что и при других микозах: микроскопию материала и получение чистой культуры при его посеве. Правильное взятие материала чрезвычайно влияет на успех микроскопии и получение культуры.

Патологический материал исследуют в ближайшие сроки после взятия. Предварительно его делят на три части: для микроскопии, культивирования и повторного изучения. Микроскопия патологического материала - наиболее простой и быстрый метод для установления наличия гриба в тканях. Размельченный материал помещают на середину предметного стекла в каплю 10-20% раствора КОН и слегка подогревают над пламенем спиртовки до получения белесого ободка по краю капли, накрывают покровным стеклом и оставляют на 5-10 мин (волосы, кожные чешуйки) и 30 - 40 мин (ногтевые) для мацерации и просветления; материал можно обработать и без нагревания, для этого препарат оставляют в 20% растворе КОН на 30-60 мин.

Микроскопируют вначале под малым, затем большим увеличением микроскопа.

Культуральное исследование необходимо для выделения и идентификации возбудителя. Засеваемый материал максимально измельчается и засеивается в

минимальных количествах на скошенный агар в пробирках в 2-3 точки на расстоянии 1-2 см. Материалом одной пробы засевают не менее 2-3 пробирок (волосы) и 4-5 пробирок (кожные и ногтевые чешуйки). Для первичной изоляции дерматофитов лучше всего использовать стандартную агаризованную среду Сабуро с 2-4% глюкозы или сусл-агар, содержащие антибактериальные антибиотики (пенициллин 50 мкг/мл + стрептомицин 50 мкг/мл или биомицин 200 ед./мл) и антиплесневый антибиотик актидион (циклогексимид) 0,1 - 0,5 мг/мл. Актидион не влияет на рост дерматофитов и подавляет многие плесневые грибы, а также виды *Candida* и *Cryptococcus*.

Посевы инкубируют при 22-30 °С (лучше всего 28 °С). Появление роста дерматофитов отмечается с 4 по 12 день инкубации в точках посева по краям внесенного материала. При отсутствии роста в течение 30 дней результаты культивирования считаются отрицательными. В оптимальных условиях первичные культуры многих дерматофитов можно идентифицировать на 7-10 день после посева, но следить за посевами нужно в течение 20-30 дней. Первичные культуры растут сравнительно медленно и при использовании сред без антибиотиков дерматофиты могут быть подавлены более быстро растущими бактериями или плесневыми грибами. При появлении роста в первичном посеве необходимо произвести отсев с края колонии на свежую дифференциальную среду для получения чистой культуры, которая будет служить материалом для идентификации выделенного дерматофита.

Серологические методы диагностики микозов

Значение серологических методов состоит, главным образом, в следующем: выявление больных с вероятными инвазивными микозами; подтверждение микотической природы аллергических заболеваний; скрининговое обследование групп риска развития микозов.

Ложно положительные результаты серологических проб возможны при миконосительстве и у здоровых людей, сенсибилизированных антигенами грибов, отрицательные пробы могут быть при иммунодефиците даже на фоне протекающего инвазивного микоза.

Рутинные общепринятые методы серологической диагностики микозов достаточно подробно описаны /П.Н.Кашкин, В.В.Лисин. "Практическое руководство по медицинской микологии", Медицина, 1983/. Однако в последние десятилетия произошли заметные сдвиги в методических подходах /Елинов Н.П., 2001/. Предложены оригинальные процедуры обнаружения антигенов и антител некоторых метаболитов клеток грибов; созданы специальные диагностические наборы ("киты"), например *Pastorex*® *Candida*, для определения в реакции "латекс-агглютинации" повторяющихся олигоманнозных эпитопов антигенных структур/, экспрессирующих на большом числе макромолекул гриба; для определения антигена-маннана *Candida*, например, в сыворотке крови пациента с кандидемией, можно воспользоваться набором *Platelia*® *Candida*.

С помощью первого набора порог определения антигенных структур равен 2,5 нг/мл, с помощью второго в связке с _методом порог определения - 0,5 нг/мл.

Возбудители микозов, наиболее часто выявляемые при лабораторном исследовании различных клинических материалов

Кровь

- *Candida*
- *Cryptococcus*
- Мицелиальные возбудители редко выявляются при исследовании крови за исключением *Fusarium*

Спинномозговая жидкость

- *Candida*
- *Cryptococcus*

Гной, отделяемое из абсцессов, язв и пр.

- *Candida*
- *Cryptococcus*
- *Fusarium*
- *Aspergillus*
- *Sporotrix*

Респираторные секреты (мокрота, БАЛ, бронхиальная браш-биопсия, транстрахеальный аспират)

- *Aspergillus*
- *Candida*
- *Cryptococcus*
- *Mucor*
- *Scedosporium*
- *Rhizopus*
- *Sporotrix*

Отделяемое, биопсийный материал из ран

- *Aspergillus*
- *Candida*
- *Fusarium*
- *Rhizopus*

Прочие биосубстраты**Моча**

- *Candida*
- *Cryptococcus*

Материал из грудной, брюшной полости; синовиальная жидкость

- *Aspergillus*
- *Candida*
- *Fusarium*

Стекловидное тело

- *Candida*
- *Aspergillus*

Контрольные вопросы

1. Как проводят посев патологического материала и количественный учет клеток при микозах, вызванных дрожжевыми грибами?
2. Как проводят микроскопическое исследование и посев патологического материала при подозрении микозов, вызванных плесневыми грибами?
3. Как проводят микроскопическое исследование и посев патологического материала при микозах, вызванных диморфными грибами?
4. Как проводят микроскопическое исследование и посев патологического материала при дерматомикозах (кератомикозах и дерматофитиях)?
5. Как проводят серологические методы диагностики микозов?
6. Какие возбудители микозов, наиболее часто выявляются при лабораторном исследовании различных клинических материалов?

Лабораторная работа 21 (2 ч).

Тема: Идентификация грибов рода *Candida*. Тест на хламидоспоры. Тест ассимиляции и ферментации углеводов.

Цель – изучить методы идентификации грибов рода *Candida*

Задачи работы:

1. Изучить биологические свойства грибов рода *Candida*
2. Изучить способы выделения грибов рода *Candida*
3. Изучить культуральные способы идентификации грибов рода *Candida*
4. Изучить биохимические способы идентификации грибов рода *Candida*

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:

Род *Candida* включает около 150 видов грибов, которые относят к дейтеромицетам в связи с полным отсутствием половой стадии развития. Некоторые из этих видов: *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.kefyr*, *C.globrata*, *C.guilliermondii*, *C.parapsilosis* – признаны с медицинской точки зрения наиболее важными болезнетворными микроорганизмами. *C.albicans* является наиболее распространенным представителем рода, изолированным от человека, и известен как комменсал и как условно-патогенный микроорганизм.

Различные виды *Candida* обитают в разнообразных экологических нишах. широко распространены в природе. Кандиды могут находиться на объектах внешней среды, на поверхности медицинского инструментария, на предметах домашнего обихода, на игрушках, посуде, в питательном креме для рук, косметике. Они лучше выживают на влажных поверхностях, чем на сухих неживых объектах, но при достаточной степени загрязнения могут сохраняться на последних до 24 ч. *C.albicans* изолируется с зубных щеток большинства носителей кандид во рту, с зубных протезов, катетеров. В больших количествах эти микроскопические грибы обнаруживаются в молочных продуктах: в творожных сырках (78,6%), твороге (66,6%), сметане (75%). Кандиды способны сапрофитировать в окружающей среде на субстратах живой и неживой природы (чаще на богатых сахарами фруктах и овощах, особенно несвежих).

C. albicans выделяется от приматов, домашних и других млекопитающих, сумчатых, птиц. У людей *C.albicans* предпочтительно колонизирует поверхность слизистых (ротоглотка, влагалище). Желудочно-кишечный тракт является главным резервуаром инфекции, при этом *C.albicans* способна колонизировать практически любую часть желудочно-кишечного тракта, от ротовой полости до перианальных тканей. Вульвовагинальная область колонизирована видами кандид у 40% здоровых женщин. *C.albicans* также часто колонизирует человеческий эпидермис, особенно влажную кожу между пальцами рук или ног. Частота выделения кандид от людей зависит от возраста и диеты: ротовая полость – 1,9-41%, желудочно-кишечный тракт – 0-55%, влагалище – 2,5-68%.

При носительстве в ротовой полости первое место занимает *C.albicans* – 47-75%, второе – *C.tropicalis* и *C.globrata* – 7%. К факторам, которые увеличивают процент

носительства кандид, относят: снижение процесса слюноотделения, низкую pH слюны, увеличение концентрации глюкозы в слюне, курение.

Возбудителем кандидоза чаще всего является *C.albicans* (до 62% случаев). Из внешней среды *C.albicans* выделяется реже, чем другие виды кандид, и это может быть следствием ее большей патогенности (адаптация к паразитизму) для человека.

Идентификация грибов рода *Candida*

Посевы материала проводят на питательные среды Сабуро, Кандида агар (изготовитель Дагестанский НИИПС, г. Махачкала) с pH 6,0-6,5 методом секторного посева. Чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре 37° С в течение 48 ч.

Второй этап микологического исследования проводят через 2 суток после посева материала, когда на чашках вырастают колонии, он включает четыре этапа:

- 1) отбор характерных однотипных колоний грибов и подсчет их;
- 2) микроскопия окрашенных (метиленовым синим) препаратов для проверки чистоты культуры и изучения морфологии (иногда при этом обнаруживаются псевдомицелий и тогда сразу определяется принадлежность гриба к роду *Candida*);
- 3) пересев из колонии на мясо-пептонный бульон (МПБ) с глюкозой для выявления псевдомицелия (если он не был обнаружен в мазке из колонии);
- 4) пересев из колонии на скошенную среду Сабуро.

В случае отсутствия типичных колоний грибов чашки сохраняют еще 7 дней, так как некоторые виды грибов растут очень медленно, и возможно было появление их роста в течение недели.

На завершающем этапе исследования проводят идентификацию выделенной культуры гриба по следующей схеме:

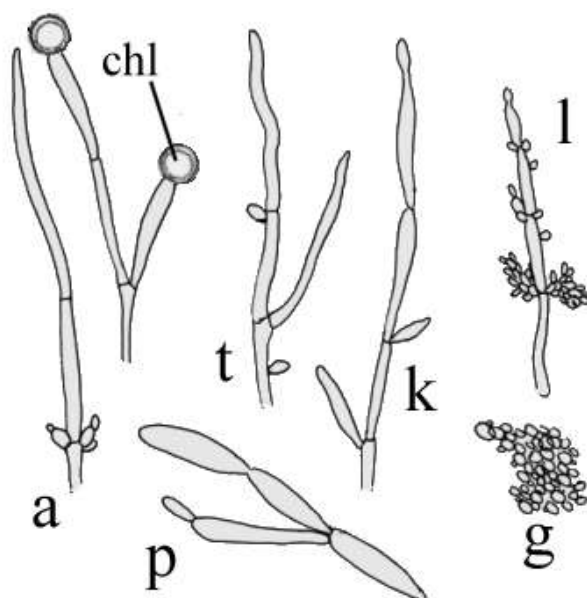
1. Определение типа филаментации.
2. Проверка на наличие хламидоспор.
3. Изучение биохимических свойств – ферментацию углеводов.

Тип филаментации и наличие хламидоспор выявляют при посеве на рисовый агар или хламидоспорагар. Для этого производят прерывистый штриховой посев, часть посева покрывают фламбированным покровным стеклом. Посевы инкубируют при 22° С в темном месте в течении 3-4 дней.

Выявление хламидоспор позволяет идентифицировать культуру как *C. albicans* и не проводить дальнейших исследований с этим штаммом, так как хламидоспорообразование является видовым признаком только *C. albicans*.

У культур, не обладающих хламидоспорами, исследуют ферментативную активность путем посева чистой культуры на ряд углеводов: лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу. Посевы инкубируют при 37° С, учитывают результат через 48 ч и 7 суток.

Среды для определения ферментативной активности готовят на 1% пептонной воде с индикатором Андреде с добавлением 2% углевода.



Особенности морфологии грибов рода *Candida* на хламидоспорагаре, рисовом агаре (a - *albicans*, t - *tropicalis*, k - *krusei*, l - *lusitaniae*, g - *glabrata*, p - *parapsilosis*; chl - *chlamydospore*).

Ферментативные свойства *Candida*

Виды	Сахара			
	Глюкоза	мальтоза	сахароза	лактоза
1. <i>C. albicans</i>	+	+	-(+)	-
2. <i>C. tropicalis</i>	+	+	+(-)	-
3. <i>C. krusei</i>	+	-	-	-
4. <i>C. kefyr</i> (<i>C.pseudotropicalis</i>)	+	-	+	в
5. <i>C.parapsilosis</i>	+	-(+m)	-(+c)	-
6. <i>C. guilliermondii</i>	+	-	+	-
7. <i>C. catenulata</i>	в	-	-	-
8. <i>C. glabrata</i>	+	-	-	-
9. <i>C. lambica</i>	+	-	-	-
10. <i>C. lusitaniae</i>	+	-(+в,с)	+(+m)	-
11. <i>C. rugosa</i>	-	-	-	-
12. <i>C. utilis</i>	+	-	+	-
13. <i>C. viswanathii</i>	+	+	-(+m)	-
14. <i>C. zeylanoides</i>	-(+m)	-	-	-

Условные обозначения: +(-) - реакция положительная, но у некоторых штаммов отрицательная; -(+) - реакция отрицательная, но у некоторых штаммов положительная; в - активность варьирует у разных штаммов; с - реакция слабо выраженная; m - реакция замедленная, проявляется после 7 дней.

Контрольные вопросы.

1. К какому отделу Царства Мусота относятся грибы рода *Candida*?
2. Какие экологические ниши предпочитают грибы рода *Candida*?
3. Почему грибы рода *Candida* называют диморфными?
4. Назовите представителей рода – основных возбудителей кандидоза?
5. Какие факторы патогенности характерны для грибов рода *Candida*?
6. Что такое псевдомицелий, хламидоспора, бластоконидия?
7. Какие морфологические элементы считаются патогенными?
8. Что является видовым морфологическим признаком *C. albicans*?

Лабораторная работа 22 (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 антимикотикочувствительности.

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]-1Н-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 продается 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 ониомикозах (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 микросомах печени человека). Не обладает антиандрогенной 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 – 10мкг, флуконазол – 40 мкг, итраконазол – 10 мкг, кетоконазол – 20 мкг и предназначены для определения чувствительности дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

Техника постановки анализа

1. Питательная среда. Рекомендуются 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, охлаждали 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 23 (2 ч).

Тема: «Практическое использование грибов»

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 микровицетов. 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? Назовите продуцентов.
3. Какие вещества продуцируемые грибами используют в пищевой промышленности?
4. Какие грибные биопестициды были разработаны для сельского хозяйства.