

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.Б.16 Микробиология

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	4
1.1 Лекция № 1 Предмет и задачи микробиологии.....	4
1.2 Лекция № 2-3 Систематика микроорганизмов.....	8
1.3 Лекция № 4-6 Морфология микроорганизмов.....	10
1.4 Лекция № 7-8 Рост и размножение бактерий.....	16
1.5 Лекция № 9-10 Энергетический метаболизм прокариот.....	20
1.6 Лекция № 11 Брожение. Типы жизни, основанные на субстратном фосфорилировании.....	23
1.7 Лекция № 12 Фототрофные бактерии и фотосинтез.....	30
1.8 Лекция № 13-14 Биосинтетические процессы прокариот.....	34
1.9 Лекция № 15 Регуляция метаболизма прокариот.....	37
1.10 Лекция № 16 Фиксация молекулярного азота.....	40
1.11 Лекция № 17-18 Генетические механизмы эволюции прокариот.....	43
1.12 Лекция № 19 Полимеразная цепная реакция и ее применение в микробиологии.....	48
1.13 Лекция № 20-21 Действие физических и химических факторов на микроорганизмы.....	51
1.14 Лекция № 22-23 Действие биологических факторов на микроорганизмы.....	54
1.15 Лекция № 24 Взаимоотношения микроорганизмов с высшими растениями.....	60
1.16 Лекция № 25-26 Взаимоотношения микроорганизмов с человеком и животными.....	64
1.17 Лекция № 27 Биогеохимическая деятельность микроорганизмов.....	70
1.18 Лекция № 28 Практическое применение микроорганизмов.....	75
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	82
2.1 Лабораторная работа 1 (ЛР-1) Введение. Устройство микробиологической лаборатории. Техника безопасности при работе в бак. лаборатории.....	82
2.2 Лабораторная работа 2 (ЛР-2) Устройство микроскопа. Микроскопия. Виды микроскопии.....	84
2.3 Лабораторная работа 3 (ЛР-3) Методы приготовления и простая окраска микропрепаратов из чистой культуры.....	86
2.4 Лабораторная работа 4 (ЛР-4) Сложный метод окраски по Граму.....	87
2.5 Лабораторная работа 5-6 (ЛР-5-6) Строение бактериальной клетки. Не обязательные компоненты бактериальной клетки, их функции (жгутики, споры, капсулы, включения).....	89
2.6 Лабораторная работа 7 (ЛР-7) Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Составление и приготовление питательных сред для разных групп микроорганизмов.....	92
2.7 Лабораторная работа 8 (ЛР-8) Стерилизация. Методы стерилизации.....	95
2.8 Лабораторная работа 9 (ЛР-9) Коллоквиум.....	97
2.9 Лабораторная работа 10 (ЛР-10) Условия культивирования микроорганизмов. Оптимальный режим. Кислотность среды. Температура. Время. Свет. Вода.....	98
2.10 Лабораторная работа 11 (ЛР-11) Культивирование анаэробных микроорганизмов. Строгие анаэробы. Специальные среды для культивирования анаэробов.....	100
2.11 Лабораторная работа 12 (ЛР-12) Выделение чистых культур. Получение накопительных культур микроорганизмов. Метод глубинного посева. Метод разведений.....	103
2.12 Лабораторная работа 13 (ЛР-13) Выделение чистой культуры из одной клетки. Капельный метод Линднера.....	104

2.13 Лабораторная работа 14 (ЛР-1) Культуральные свойства микроорганизмов...	106
2.14 Лабораторная работа 15-16 (ЛР-15-16) Определение внеклеточных ферментов.....	109
2.15 Лабораторная работа 17-18 (ЛР-17-18) Определение способности микроорганизмов к брожению.....	111
2.16 Лабораторная работа 19 (ЛР-19) Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота.....	116
2.17 Лабораторная работа 20 (ЛР-20) Роль бактерий в превращении соединений серы, железа и фосфора.....	118
2.18 Лабораторная работа 21 (ЛР-21) Коллоквиум.....	120
2.19 Лабораторная работа 22 (ЛР-22) Идентификация микроорганизмов с выделением в чистые культуры.....	121
2.20 Лабораторная работа 23-24 (ЛР-23-24) Идентификация микроорганизмов без выделения в чистые культуры методом ПЦР. Постановка реакции. Учет результатов.....	124
2.21 Лабораторная работа 25-25 (ЛР-25-26) Методы количественного учета микроорганизмов.....	128
2.22 Лабораторная работа 27-28 (ЛР-27-28) Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.....	131
2.23 Лабораторная работа 29 (ЛР-29) Межмикробные взаимодействия	134
2.24 Лабораторная работа 30 (ЛР-30) Коллоквиум	136
2.25 Лабораторная работа 31-32 (ЛР-31-32) Факторы вирулентности патогенных микроорганизмов.....	137
2.26 Лабораторная работа 33 (ЛР-33) Хранение микроорганизмов.....	138
2.27 Лабораторная работа 34 (ЛР-34) Итоговое занятие.....	140

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Предмет и задачи микробиологии».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Предмет и задачи микробиологии.
2. Этапы развития микробиологии.
3. Отрасли микробиологии, связь с другими науками.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Предмет и задачи микробиологии

В биосфере нет такой среды, в которой не встречались бы микроорганизмы. Всюду, где есть хотя бы какие-то источники энергии, углерода и азота, обязательно встречаются микроорганизмы, различающиеся по своим физиологическим потребностям и свойствам. Именно это разнообразие, в основе которого лежит способность использовать любые, даже минимальные возможности для существования, исторически обусловило вездесущность микроорганизмов.

Изучением микроорганизмов занимается микробиология (от греч. «микрос» - малый, «биос» - жизнь, «логос» - учение) – одна из фундаментальных биологических наук. Микробиология – это наука, предметом изучения которой являются микроскопические существа, названные микроорганизмами, их биологические признаки, систематика, экология, взаимоотношения с другими организмами, населяющими нашу планету, - человеком, животными, растениями.

Мир микроорганизмов богат и разнообразен. Микроорганизмы очень широко распространены в почве, воде и воздухе всех климатических зон. В воде бактерии найдены на глубине 2700 м у острова Шпицберген, а у берегов Филиппинских островов – на глубине 10462 м. Бактерии могут развиваться при давлении 600 атм, или 60 Мпа (в морях), и температуре 104⁰С (в горячих источниках). Микроорганизмы (бактерии и дрожжи) обнаружены в небольшом антарктическом озере Дон-Жуан, вода которого содержит высокую концентрацию солей (в 13 раз превышает концентрацию в морской воде) и имеет низкую температуру: не замерзает даже при температуре -24⁰С.

Бактерии, дрожжи, споры грибов обнаруживаются в воздухе. Больше всего микроорганизмов над городами, значительно меньше над вершинами высоких гор, ледниками, морями.

В почве обитают самые разнообразные микроорганизмы: бактерии, грибы, водоросли, простейшие. Например, обрабатываемый слой почвы на площади 1 га содержит 2-5 тонн микроорганизмов. Почвенные микроорганизмы разлагают остатки животных и растений до минеральных веществ, тем самым восполняя запасы питательных веществ, необходимых для жизни растений.

Микроорганизмы живут на поверхности тела, в кишечнике человека и животных, на растениях, на пищевых продуктах вокруг нас.

2. Этапы развития микробиологии

В истории микробиологии различают следующие этапы:

1. Эвристический
2. Морфологический или описательный
3. Физиологический
4. Современный (молекулярно-генетический).

1. Первый период развития микробиологии – эвристический период (IV-III тысячелетие до н.э. XVI в. н.э.) начался в 4-3 тыс. до н.э., так как ещё древние люди применяли микроорганизмы в хлебопечении, виноделии.

Используя логические приёмы, учёные древности стали задумываться о причинах заразных болезней. Так Гиппократ, осмысливая теорию причины заболеваний, выдвинул

миазматическую теорию, считая источником болезни — миазмы. Лукреций выдвинул теорию «болезнетворных семян». В древности эпидемии считали ни чем иным, как наказанием Божиим. К концу средних веков возникло представление о том, что болезни, вызывающие эпидемии, связаны с инфекционными агентами. Когда бактерии еще не были обнаружены с помощью микроскопа, Джироламо Фракастро (15 век), врач и поэт из Вероны, в своем трактате высказал мысль об инфекции как следствии передачи «контагиума» - мельчайших живых телец, вызывающих данную болезнь. Он видел в контагиумах причину не только болезней человека, но и разложения растительных остатков. Для предохранения от болезней им были предложены: изоляция больного, карантин, ношение масок, обработка предметов уксусом.

Однако идеи Фракастро оказались слишком преждевременными для восприятия современниками и могли быть признаны лишь в 19 веке.

2. Размеры микроорганизмов лежат за пределами разрешающей способности человеческого глаза, поэтому до изобретения микроскопа человек не знал о существовании столь мелких живых существ. Открытие микробов смогло осуществиться лишь во второй половине 17 века, когда в связи с развитием торговли назрела потребность в усовершенствовании оптики для мореплавания (подзорные трубы, телескопы и т. п.). Открытие мира микробов связано с именем А. Левенгука (1632—1723), который сконструировал первый микроскоп в 1676 г., дающий увеличение до 300 раз. Исследуя под микроскопом различные предметы (дождевую воду, настои, зубной налет, кровь, экскременты, сперму), А. Левенгук наблюдал мельчайших животных.

Он впервые описал эритроциты человека, лягушек и рыб, простейших, сперматозоиды. Он увидел в прозрачной капле воды множество бактерий, которых он назвал «маленьими зверушками», подробно описал и зарисовал основные формы бактерий. С открытия Левенгука начинается период зарождения микробиологии как науки и ее становления. Однако ученые того времени не подозревали о роли, которую играют микроорганизмы в природе. Накопление знаний о микроорганизмах длилось довольно долго, около 100 лет, так как было крайне трудно их изучать. Этот период принято называть описательным, так как изучение микроорганизмов сводилось лишь к описанию их форм, доступных исследованию при помощи далекого не совершенного микроскопа. Их биологические свойства и значение для человека долго еще оставались во многом не понятными.

3. Микробиологию развивали большие и малые открытия известных и менее известных естествоиспытателей и микробиологов. Иногда это были драматические открытия, особенно в медицинской микробиологии, когда микробиологи, прививая возбудитель себе лично, погибали. Третий период микробиологии — период ее подлинного рождения как самостоятельной биологической науки и стремительного развития — физиологический — связан прежде всего с именами Л. Пастера, Р. Коха и их учеников.

Л. Пастер впервые показал огромную роль микроорганизмов как возбудителей разнообразных биохимических превращений и заболеваний человека. Многочисленные исследования Л. Пастера открыли новый период в развитии микробиологии, который назвали физиологическим.

Первый период научной деятельности Л. Пастера связан с изучением различных видов брожения. Л. Пастер установил, что каждый вид брожения имеет свои возбудители, живущие без воздуха. Было открыто явление анаэробиоза, что имело большое значение для создания теории брожения. Л. Пастер доказал, что микроорганизмы вызывают болезни вина и пива, гниение и распад мочевины.

Следующий этап в жизни Луи Пастера — изучение болезней вина, пива и шелковичных червей и мер борьбы с ними — начало медицинской микробиологии. Введенный Пастером в 1877 г. метод получения чистых культур бактерий вне организма

или той естественной природной среды, где микробы находятся, открыл новую эпоху в микробиологии и обеспечил ее развитие в ближайшие годы.

Второй период научной деятельности Л. Пастера был посвящен изучению возбудителей заболеваний и знаменуется тем, что в это время им были открыты возбудители таких заболеваний, как сибирская язва и бешенство. Против бешенства он создал вакцину. Пастеру принадлежит честь открытия возбудителя куриной холеры, родильной горячки, септицемии, остеомиелита, одного из возбудителей газовой гангрены.

Невозможно переоценить значение открытий Л. Пастера. Его имя навсегда вписано в историю микробиологии. Он первым доказал, что микроорганизмы энергично воздействуют на окружающую природу, в том числе на человека и на пищевые продукты — основу жизни человека. В 1885 г. в лаборатории Л. Пастера был изготовлен первый автоклав.

Пастер не только создал микробиологию как фундаментальную биологическую науку, но и определил ее основные разделы, которые затем выделились в качестве самостоятельных научных дисциплин со своими целями и задачами: общая микробиология, техническая (промышленная), сельскохозяйственная, ветеринарная, медицинская и т. д.

Огромное влияние на становление и развитие медицинской микробиологии оказал немецкий учёный Р. Кох (1843 - 1910). Именно он подвёл окончательную черту под многолетней дискуссией: являются ли обнаруживаемые бактерии случайными спутниками болезни или причиной её?

Он доказал бактериальную природу сибирской язвы. Р. Кох сфотографировал бациллы сибирской язвы и стал основателем микробиологической фотографии. Им был открыт и изучен возбудитель такого заболевания, как туберкулез — *Mycobacterium tuberculosis*, который в его честь назван палочкой Коха, открыт холерный вибрион.

Много времени Р. Кох уделял разработке микробиологических методов исследования: им сконструирован осветительный аппарат к микроскопу, разработан метод микрофотографирования и окрашивания бактерий анилиновыми красителями. Но самым существенным для дальнейшего развития микробиологии было его предложение о введении в микробиологию твердых питательных сред с использованием желатина, а позднее агар-агара. Этот метод дал возможность получать микроорганизмы в виде чистых культур, что открыло совершенно новые подходы для более углубленного изучения микроорганизмов. В экспериментах Р. Коха были выработаны этапы бактериологического исследования, позднее ставшие известными как постулаты Коха.

Один из сотрудников Р. Коха — Робер Петри — предложил особую стеклянную посуду, которую знают и используют микробиологи всего мира, — чашку Петри. Второй сотрудник — Джон Тиндалль — предложил многократное нагревание сред для их стерилизации, получившее название «тиндализация».

Так, благодаря Л. Пастеру и Р. Коху, возникла и начала развиваться новая наука — микробиология. Такое название ей дал соратник Л. Пастера П.Дюкло.

Родоначальником русской микробиологии можно считать Л.С. Ценковского (1822-1887), который изучал микроскопические простейшие, водоросли, грибы, сделал вывод об отсутствии резкой границы между миром растений и животных. Организовал первую Пастеровскую станцию в России и предложил вакцину против сибирской язвы.

И.И. Мечников (1845-1916) — основоположник медицинской микробиологии, изучал взаимоотношения хозяина и микроорганизма-паразита. Создал фагоцитарную теорию иммунитета, за что в 1908 г. получил Нобелевскую премию.

Огромный вклад в развитие микробиологии внес советский микробиолог С.Н. Виноградский, изучавший автотрофные бактерии. Он открыл способность некоторых бактерий получать энергию за счет окисления неорганических соединений. Для выделения в лабораторных условиях группы бактерий с определенными свойствами, предложил создавать специфические (элективные) условия, дающие возможность

преимущественного развития данной группы микроорганизмов. Исследования этого учёного по физиологии микроорганизмов дали возможность русской микробиологии занять ведущее место в мировой науке о микроорганизмах. Он же является основоположником сельскохозяйственной микробиологии.

Наблюдая антагонизм микробов, некоторые исследователи пытались выделять вещества, продуцируемые микробами-антагонистами в окружающую среду, в частности зеленой плесенью, лечебные свойства которой были известны еще в XIX веке. Но практического выхода эти работы не получили и вскоре были забыты.

Английский ученый Александр Флеминг в 1928 г. наблюдал зоны лизиса стафилококка в чашках, случайно проросших зеленой плесенью. Выделенный штамм плесени губительно действовал и на другие микробы. Однако выделить активное начало зеленой плесени — пенициллин — удалось только в 1940 г. В чистом виде пенициллин был получен группой английских химиков во главе с Г. Флори и Э. Чейном. Организация производства и широкое внедрение пенициллина в медицинскую практику потребовали согласованных усилий ученых разных специальностей.

4. Современный этап развития микробиологии начался во второй половине 20-го века. В 1944 году в опытах по трансформации пневмококков впервые было доказано, что носителем генов является ДНК. Использование бактерий, вирусов, а затем и плазмид в качестве объектов молекулярно-генетических и молекулярно-биологических исследований привело к более глубокому пониманию фундаментальных процессов, лежащих в основе жизни.

Бурному формированию микробиологии способствовали следующие моменты:

- важнейшие открытия в области молекулярной биологии, генетики, биоорганической химии;
- появление таких новых наук, как генетическая инженерия, биотехнология, информатика;
- появление новых методов и научного оборудования, позволяющих глубже заглянуть в секреты живого организма.

Молекулярно-генетический период характеризуется рядом принципиально важных научных достижений и открытий. К ним относятся:

- расшифровка молекулярно-генетической структуры многих вирусов и микробов; открытие простейших форм жизни - «инфекционного белка» приона;
- расшифровка химического строения и химический синтез некоторых антигенов. Например, пептидов вируса СПИДа (Р.В.Петров, В. Т. Иванов и др.);
- получение рекомбинантных бактерий и рекомбинантных вирусов. Соединение отдельных генов вирусов и бактерий, приобретение рекомбинантных штаммов бактерий и вирусов, соединяющих свойства родительских особей или приобретающих новые свойства;
- получение вакцин (вакцина против гепатита В, малярии, антигенов ВИЧ и других антигенов), биологически активных пептидов (интерфероны, интерлейкины, ростовые факторы и др.) с помощью схем биотехнологии и приемов генетической инженерии;

Перечислены только наиболее крупные достижения молекулярно-генетического периода развития микробиологии. За этот период был выявлен ряд новых вирусов (возбудители геморрагических лихорадок Ласса, Мачупо; вирус СПИД) и микробов (возбудитель болезни легионеров); созданы новые вакцины и профилактические препараты (вакцины против кори, полиомиелита, свинки, клещевого энцефалита, вирусного гепатита В, полианатоксины против столбняка, газовой гангрены и ботулизма и др.).

В Российской Федерации существует разветвленная сеть научно-исследовательских институтов и предприятий по производству диагностических, профилактических и лечебных препаратов. В системе РАМН действуют крупные научно-исследовательские институты: эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи,

вирусологии им. Д. И. Ивановского, полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова, вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, вирусных препаратов и др.

3 Отрасли микробиологии, связь с другими науками

Так, этап за этапом развивалась микробиология. По своей сущности микробиология является биологической фундаментальной наукой. Для изучения бактерий она применяет методы таких наук, как физики, биологии, биоорганической химии, молекулярной биологии, генетики, цитологии, иммунологии.

Микробиология подразделяется на общую и частную. Общая микробиология — изучает фундаментальные закономерности биологии микроорганизмов.

Предметом исследования частной микробиологии являются некоторые представители микромира.

Со временем из недр фундаментальной микробиологии выделились отраслевые науки:

- техническая (промышленная) — изучает различные типы процессов брожения, которые используются для получения спиртов, ацетона, глицерина и т. п., а также разрабатывает и организует производство с помощью микробов-продуцентов антибиотиков, витаминов и других биологически активных соединений. Частью промышленной микробиологии можно считать пищевую микробиологию с производством молочнокислых, алкогольных, заквашенных продуктов и хлеба.

- сельскохозяйственная — изучает почвенную микрофлору, её роль в круговороте веществ в природе и влияние на структуру и плодородие почв, а также болезни растений, методы предупреждения и борьбы с ними;

- ветеринарная — изучает биологию возбудителей заразных болезней животных и разрабатывает методы специфической диагностики, профилактики и лечения их. Ветеринарная микробиология тесно связана с медицинской, так как имеются болезни, общие для животных и человека и передающиеся от животных к человеку.

Медицинская микробиология занимается изучением биологии болезнетворных микробов и особенностей взаимодействия их с организмом человека. Задачей медицинской микробиологии является не только выяснение этиологии инфекционных заболеваний, но и разработка специфических методов их диагностики, профилактики и лечения. Как известно, здесь достигнуты громадные успехи.

К отраслевым наукам относится космическая микробиология — решает задачи поиска жизни на других планетах, проблемы возможного загрязнения космоса земными микробами (спорами), развития микроорганизмов на космических кораблях и привнесения «космических пришельцев- микробов» на Землю.

1.2 Лекция №2-3 (4 часа).

Тема: «Систематика микроорганизмов».

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Систематика и номенклатура микроорганизмов.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Систематика и номенклатура микроорганизмов.

Раздел систематики, изучающий принципы классификации, называется таксономией (от греч. *Taxis* – расположение, порядок).

Систематика микроорганизмов базируется на следующих признаках: морфологических, физиологических, биохимических, генетических, тинкториальных и т.д.

Основной таксономической категорией в микробиологии, как и в других биологических науках, является **вид** – совокупность особей, характеризующихся рядом

общих морфологических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических признаков.

Культура микроорганизмов, состоящая из клеток одного вида, носит название **чистой культуры**.

Штамм - это чистая культура микроорганизмов, выделенная из определённого места обитания (воды, почвы, организма животного и т.д.). Разные штаммы микроорганизмов могут различаться по некоторым признакам, например, чувствительности к антибиотикам, способности синтезировать некоторые вещества и т.д.

Первую бактериологическую классификацию разработал Фердинанд КОН. А К. Линней предложил биноминальную номенклатуру, согласно которой каждый вид имеет название, состоящее из двух латинских слов. Первое слово означает род, а второе определяет конкретный вид этого рода и называется видовым эпитетом. Видовой эпитет может быть присвоен, исходя из клинических признаков, вызываемого заболевания, морфологии колоний, местообитания, географического места выявления. Родовое название пишется с заглавной буквы, а второе – со строчной даже в том случае, если видовой эпитет присвоен в честь учёного.

Основными классификационными понятиями помимо вида и штамма, являются следующие:

- **ВИД** – эволюционно сложившаяся совокупность особей, имеющих единый генотип, проявляющийся сходными фенотипическими признаками.
- **ПОПУЛЯЦИЯ** – совокупность особей одного вида, относительно длительно обитающих на определенной территории.
- **КУЛЬТУРА** – совокупность бактерий одного вида (чистая) или нескольких видов (смешанная), выращенная на питательной среде (жидкой или плотной).
- **КОЛОНИЯ** – видимое скопление бактерий одного вида на поверхности или в глубине питательной среды.
- **КЛОН** – культура клеток, выращенная из одного микроорганизма методом клонирования.

Ключ к определению видов дают специальные определители бактерий, предложенные рядом авторов. Наиболее широко используемым в настоящее время является определитель Д. Берджи или Д. Берги (американский микробиолог 1860-1937) в 1923 году выпустил первый международный определитель. Последующие издания определителя под названием “Bergey's Manual of Determinative Bacteriology” подготовлены Международным комитетом по систематике бактерий и переиздавались 9 раз. В них приводятся последние на время издания сведения о микроорганизмах, их таксономии, номенклатуре и принципах идентификации, дана экологическая характеристика (место обитания, ниши) и другие свойства.

Представление о месте микроорганизмов среди других живых существ изменялось с течением времени от отнесения их к животным или растениям до выделения в три отдельных домена (надцарства, империи).

Существует формальная нумерическая таксономия, где все признаки альтернативны и имеют «одинаковый вес». Это позволяет дать количественную оценку степени сходства и различия организмов путём вычисления коэффициентов сходства или соответствия. Для использования нумерической классификации необходимо как можно полнее изучить фенотипические признаки микроорганизма, так как от этого зависит точность помещения его в данную группу.

Однако в настоящее время основным является филогенетический подход к систематике микроорганизмов, который учитывает родственные связи и пути эволюции организмов. На основании исследований профессора Иллинойского университета К. Вёзе сделана попытка перехода к филогенетической классификации микроорганизмов. При этом сравнивают нуклеотидные последовательности 16S рибосомальной РНК, состоящей из 1500 нуклеотидов, из которых 900 – консервативны.

Филогения бактерий. Рибосомы – это места синтеза белка, и они имеются поэтому во всех клетках. По своим функциям они очень консервативны; в особенности это относится к рибосомным РНК (рРНК), так как на последовательность их оснований не может влиять ни вырожденность генетического кода, ни супрессорные мутации. Таким образом, рРНК отвечает требованиям, которые можно предъявить всеобщему филогенетическому маркеру. При определении последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК у большого числа бактерий обнаружились как неожиданные различия, так и черты сходства. В результате каталогизации нуклеотидных последовательностей были установлены коэффициенты сходства, что привело к созданию дендрограммы, которую следует признать филогенетическим древом.

Этот анализ, кроме того, привел к выводу, что одна из групп бактерий очень сильно отличается от всех остальных; по-видимому, уже очень давно произошло разделение прокариот на две ветви, одну из которых составляет группа архебактерий, а другую – все остальные группы, которые объединяют под названием эубактерий.

Таким образом, можно думать, что от проклеток (прогенот) произошли, с одной стороны архебактерии, а с другой – эубактерии. Имеются также данные, позволяющие предполагать тесные связи между архебактериями и эукариотами.

В настоящее время все живые существа на основании анализа нуклеотидной последовательности 16S рибосомальной РНК разделены на три домена (надцарства): *Bacteria, Archaea и Eukarya*.

В домен *Eukarya* вошли все эукариотические организмы как одноклеточные так и многоклеточные, включая человека.

К домену *Archaea* относятся микроорганизмы, разделённые на три филума: *Euryarchaeota, Crenarchaeota и Korarchaeota*.

Домен *Bacteria* включает прокариотические микроорганизмы, имеющие типичные признаки бактерий, в частности клеточные оболочки, содержащие пептидогликан. В зависимости от микроскопически различаемой формы (кокки, палочки, спирillы), от окраски по Грамму и отношению к молекулярно азоту (аэробы, анаэробы) домен *Bacteria* разделён на 19 групп, цианобактерии выделены в виде 20-ой группы.

1.3 Лекция №4-5-6 (6 часов).

Тема: «Морфология микроорганизмов».

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Общие признаки и разнообразие микроорганизмов.
2. Основные морфологические группы микроорганизмов.
3. Обязательные компоненты бактериальной клетки. Клеточная стенка грамположительных и грамотрицательных бактерий.
4. Бактерии, лишённые клеточной стенки
5. Цитоплазма и мембранны.
6. Рибосомы.
7. Нуклеоид. Плазмиды.
8. Жгутики. Механизмы движения.
9. Эндоспоры.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

- 1 Общие признаки и разнообразие микроорганизмов.

Микроорганизмы – это самая обширная по количеству представителей группа, члены которой повсеместно распространены. Отличительными чертами микроорганизмов являются следующие признаки:

- Древность происхождения.

- Малые размеры (определяемые в мкм и нм).
- Особенности физиологии (высокая адаптация к окружающей среде).
- Максимальная плодовитость (кишечная палочка каждые 10-15 минут дает потомство).

Накопление огромного фактического материала потребовало классифицировать изучаемые в микробиологии объекты для удобства работы с ними.

Изучение разнообразия микроорганизмов составляет предмет систематики. Микроорганизмы систематизированы в определенном порядке по их сходству, различиям и взаимоотношениям между собой.

2. Основные морфологические группы микроорганизмов.

Формы клеток бактерий не отличаются большим разнообразием. Различают:

Кокки – это бактерии шаровидной формы. В зависимости от взаимного расположения различают:

микрококки – отдельно лежащие кокки;

диплококки – парно расположенные кокки;

стрептококки – цепочки кокков;

стафилококки – скопление кокков в виде виноградной грозди;

тетракокки – структуры из четырех кокков;

сарцины – многослойные структуры из 8...16 кокков.

Палочковидные бактерии.

Клетки цилиндрической формы могут располагаться одиночно;

диплобактерии – парами;

стрептобактерии – цепочками.

Палочковидные бактерии, образующие в неблагоприятных условиях специфическую форму существования – споры, диаметр которой не превышает диаметр клетки, называют бациллами. Если диаметр споры в клетке существенно превышает её поперечный диаметр, то такие спорообразующие бактерии называют *клостридиями*.

Извитые (спиралевидные) бактерии. К ним относят вибрионы, спириллы и спирохеты.

Вибрионы – клетки в форме слегка изогнутых палочек;

Спириллы – бактерии, образующие до 6 завитков;

Спирохеты – бактерии со множеством (свыше 6) мелких завитков и в отличие от спирилл без жгутиков.

Ветвящиеся бактерии. Выраженная способность к ветвлению отмечена у прокариот из группы актиномицет; тенденцию к ветвлению проявляют и другие бактерии.

Бактерии без постоянной формы. Микоплазмы лишены клеточной стенки, поэтому их форма легко изменяется.

Существуют микроорганизмы необычной формы (квадратные, прямоугольные, бобовидные, звездчатые, тарелкообразные), ветвящиеся и образующие мицелий (актинобактерии), имеющие гифы с почками, стебельки. Существуют также бактерии, меняющие свою морфологию в течение жизненного цикла (каринобактерии, мукобактерии, нокардии) и обладающие полиморфизмом – свойство некоторых бактерий в процессе роста на питательных средах образовывать формы, отличающиеся от типичной.

Несмотря на то, что термин «микроорганизм» подразумевает малые размеры, этот признак варьирует в довольно широких пределах.

Размеры клеток большинства прокариот находятся в пределах 0,2-10,0 мкм. Однако среди них есть «карлики» (трепонемы, микоплазмы и нанобактерии размерами примерно 0,05-0,1 мкм) и «гиганты» (ахроматиум и макромонас длиною до 100 мкм).

Размеры известных в настоящее время прокариотических микроорганизмов находятся в пределах от 0,05 до 600 мкм.

3. Обязательные компоненты бактериальной клетки. Клеточная стенка грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Все структуры бактериальной клетки подразделяются на обязательные и необязательные. К обязательным относятся: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, нуклеоид, мезосомы, рибосомы. Не обязательные: капсула, слизистый чехол, пили, жгутики и эндоспоры.

Клеточная стенка. Большинство прокариот имеет ригидную клеточную стенку, под которой расположена ЦПМ. Состав и строение клеточной стенки – важный систематический признак, по которому все прокариоты подразделяются на следующие группы: грамположительные, грамотрицательные и не имеющие клеточной стенки.

Клеточная стенка выполняет следующие функции:

1. Защищает от осмотического шока и других повреждающих факторов.
2. Определяет форму бактерий.
3. Участвует в обмене веществ.
4. У многих микроорганизмов токсична и содержит поверхностный антиген.
5. Участвует в транспорте экзотоксинов.

Грамположительные бактерии имеют мощную клеточную стенку, состоящую из 5-6 слоев пептидогликана (на его долю приходится до 90% сухой массы клеточной стенки), включающих полимеры тейхоевых кислот, которые являются производными рибита или глицерина. Они пронизывают пептидогликан насквозь или находятся на его поверхности. Выделено 2 типа кислот: *рибитетхоевые* и *глицеринтхоевые* (клетки каждого вида содержат только один тип тейхоевой кислоты). Липотехоевые кислоты закреплены в цитоплазматической мембране, они пронизывают пептидогликан или располагаются между ним и мембраной.

Клеточная стенка у грамотрицательных бактерий тонкая, имеют однослойный пептидогликан, на долю которого приходится до 5-10% сухого веса стенки и не содержит тейхоевой кислоты. Пептидогликан покрыт наружной мембраной с мозаичным строением, в ее состав входит липопротеин, фосфолипиды, липополисахарид (ЛПС) и белки. ЛПС обладает иммуногенными свойствами и называется О-Аг.

На особенностях строения и химического состава Г+ и Г- бактерий основан метод окраски по Граму. В результате Г+ микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, а Г- в красный.

4. Бактерии, лишённые клеточной стенки.

Из любой бактериальной клетки можно получить формы, полностью или частично лишенные клеточной стенки. Они называются соответственно *протопластами* и *сферопластами* и независимо от исходного морфологического типа бактерии из-за отсутствия клеточной стенки принимают шарообразную или грушевидную форму. Кроме того, существуют L-формы бактерий, которые, в отличие от протопластов и сферопластов, способны к размножению, являясь вполне полноценными микробными клетками данного вида бактерий.

L-формы разных видов бактерий морфологически неразличимы. Независимо от формы исходной клетки (кокки, палочки, вибрионы) они представляют собой сферические образования разных размеров. Имеются L-формы:

стабильные — не реверсирующие в исходный морфотип;
нестабильные — реверсирующие в исходный морфотип при устраниении причины, вызвавшей их образование.

В процессе реверсии восстанавливается способность бактерий синтезировать пептидогликан муреин клеточной стенки. L-формы различных бактерий играют существенную роль в патогенезе многих хронических и рецидивирующих инфекционных заболеваний: бруцеллеза, туберкулеза, сифилиса, хронической гонореи и т. д.

5. Цитоплазма и мембранны.

Цитоплазматическая мембрана. Состоит из простых фосфолипидов, образующих мембранный бислой, куда погружены многочисленные белки. Цитоплазматическая мембрана имеет сложную трехслойную структуру, для нее характерна избирательная проницаемость. На долю ЦМ приходится около 10% сухого веса бактерий.

Белки цитоплазматической мембраны разделяют на *структурные и функциональные* (включают ферменты, участвующие в синтетических реакциях на поверхности мембраны, окислительно-восстановительных процессах, а также некоторые специализированные энзимы (например, пермеказы)).

В ЦМ расположена *система электронного транспорта бактерий*, обеспечивающая энергетические потребности.

ЦПМ выполняет ряд функций:

1. Служит осмотическим барьером.
2. Контролирует поступление питательных веществ в клетку и выход метаболитов.
3. Содержит ферменты, участвующие в переносе веществ.
4. В мембране локализуются ферменты, отвечающие за дыхательную активность.
5. Образует инвагинаты – мезосомы.
6. С ЦПМ связаны жгутики и аппарат регуляции их движения.

Между ЦМ и внутренним слоем пептидогликана находится периплазматическое пространство, которое играет существенную роль во взаимодействии ЦМ и клеточной стенки, в нем содержатся различные ферменты (фосфатазы), олигосахариды и другие вещества.

Мезосомы. Прокариоты характеризуются простой внутриклеточной организацией и не содержат автономных органелл, хотя имеют включения. Среди них следует отметить мезосомы – Это инвагинация ЦПМ в форме везикул, трубочек и ламелл. Функции:

1. Энергетический метаболизм.
2. Участие в делении клетки, спорообразовании.
3. Обеспечивают транспортировку экзотоксинов у патогенных бактерий.

Однако некоторые исследователи считают, что мезосома – это артефакт, возникающий при фиксации клеток для электронной микроскопии.

Цитоплазма – это сложная коллоидная система, неподвижна. В ней располагается ядерный аппарат – генофор (нуклеоид), который не отделен от нее мембранами; плазмиды, которые связаны со специфическими рецепторами на ЦПМ; рибосомы. Помимо этих основных структурных элементов, в цитоплазме содержатся различные макромолекулы (аминокислоты, тРНК), мезосомы, различные включения, которые образуются в процессе жизнедеятельности: капельки нейтральных липидов, воска, серы, гранулезы (у бактерий рода *Clostridium*), волютина (*Spirillum volutans*, *Corynebacterium diphtheriae*). Гранулеза, гликоген, зерна волютина служат для бактерий запасным источником энергии. У некоторых бактерий (*Bacillus thuringiensis*) в цитоплазме находятся кристаллы белковой природы, обладающие ядовитым действием для насекомых.

Функции включений: продукты обмена бактериальной клетки, запас питательных веществ.

6. Рибосомы.

Рибосомы – Рибонуклеопротеиновые частицы размером около 20 нм, состоящие из двух субъединиц с коэффициентом седиментации 30S для одной и 50S для другой. Объединение субъединиц происходит перед началом синтеза белка в одну, коэффициент седиментации 70S (единиц Сведберга). В зависимости от интенсивности роста бактериальная клетка может содержать от 5 000 до 50 000 рибосом.

Функция: синтез белка.

7. Нуклеоид. Плазмиды.

В бактериальной клетке нет ядерной мембраны, ДНК сконцентрирована в цитоплазме в виде клубка, называемого нуклеоидом или генофором.

Нуклеоид бактерий представлен двойной спиральной кольцевой ковалентно замкнутой суперспирализованной молекулой ДНК, составляющей 2-3% сухой массы клетки, не содержит гистонов.

У бактерий существует дополнительная молекула ДНК в виде внекромосомных элементов – **плазмиды** – это кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК. Они могут существовать и реплицироваться как независимо от бактериальной хромосомы, так и быть интегрированы в неё. Плазмиды не являются обязательным для клетки элементом, хотя могут давать определённые преимущества. Известно, что плазмиды могут нести гены устойчивости к АБ, тяжёлым металлам, различным лекарственным препаратам и т.д.

Необязательные компоненты бактериальной клетки. Капсула и слизь.

Капсулы. На поверхности клеточных стенок многих прокариот можно обнаружить слизистые капсулы разной толщины, поверхность колоний с клетками выглядит гладкой, влажной и блестящей. Капсула представляет собой слизистый слой, который сохраняет связь с клеточной стенкой, служит внешним покровом бактерий, толщина ее не более 0,2 мкм, в образовании капсулы принимает участие ЦПМ. По химической природе – капсула чаще всего полисахаридной природы, но бывают гликопротеидной и полипептидной природы.

Основная роль капсул для патогенных видов – предохранение клетки от неблагоприятных условий среды обитания. Капсулы содержат запасные питательные вещества, выполняют адгезивную функцию, способствуя прилипанию к поверхности клетки хозяина. Являются важными факторами патогенности: либо маскируют их от фагоцитоза, либо подавляют фагоцитоз.

8. Жгутики и механизмы движения.

Жгутики. Часто подвижность у прокариот обусловлена наличием жгутиков. У бактерий жгутики правовращающие, у архей – левовращающие.

Жгутик состоит из базального тела, включающего четыре (у Г-) или два (у Г+) кольца, стержень и моторные белки, а также из крючка и филамента. Базальное тело закреплено в ЦПМ двумя кольцами М и С, которые часто рассматриваются как одно целое. MS-кольцо окружено несколькими белками, которые называют моторными и от которых вращающий момент передаётся на филамент. В пептидогликановом слое периплазмы у Г- бактерий находится кольцо Р, а во внешней мембране – кольцо L. Оба эти кольца выполняют роль втулки, дополнительно удерживающей механизм жгутика. Все кольца пронизаны жестким стержнем, который передаёт крутящий момент. Механизм жгутика имеет крючок, переходящий затем в филамент, который заканчивается «шапочкой». Филамент состоит из белка флагеллина.

Пили. Это нитеобразные полимерные органеллы белковой природы, локализованные на поверхности клеток. Термином «пили» обозначают все типы нежгутиковых образований на поверхности клетки, синоним «фимбрии». Тонкие полые нити белковой природы длиной 0,3-10 мкм, толщиной 10 нм, покрывающие поверхность бактериальных клеток. Пили состоят из одного или нескольких типов белковых субъединиц, называемых пилины или фимбринами, которые организованы в спиральные структуры. Пили часто расположены перитрихиально по поверхности клеток, но иногда могут быть локализованы на одном конце клетки.

Пили подразделяются на 2 типа: пили 1 типа обусловливают прикрепление или адгезию бактерий к определенным клеткам организма хозяина. На одну бактериальную клетку приходится от нескольких сотен до нескольких тысяч таких пилей.

Пили 2 типа (конъюгативные или половые – sex pili) участвуют в конъюгации бактерий, обеспечивающей перенос части генетического материала от донора к реципиенту. Они имеются только у бактерий-доноров в ограниченном количестве (1-4 на клетку).

Функции пилей: адгезия, питание, водно-солевой обмен (пили общего типа), передача генетической информации (конъюгативные или половые пили, F-пили), а некоторые — могут принимать участие в движении.

Запасные вещества бактериальной клетки.

Многие микроорганизмы откладывают внутриклеточно запасные вещества, называемые также **тельцами включения** (полисахариды, полифосфаты, сера и т.д.). Все запасные вещества присутствуют в клетке в химически инертной форме. Такое состояние препятствует нарушению осмостаза клеточного содергимого. Некоторые включения просто лежат в цитоплазме, другие окружены тонкой мембраной толщиной 2-4 нм. Мембрана обычно белковой природы, но иногда может содержать и липиды. Многие бактерии откладывают гранулы валютина (полифосфатов), которые являются запасным резервуаром фосфата, важного предшественника в синтезе АТФ и ДНК. Элементарная сера содержится в клетках микроорганизмов, использующих соединения серы в своём метаболизме, в виде гранул, окружённых однослойной белковой мембраной.

Таким образом, основной функцией большинства включений можно считать обеспечение клеток энергией и необходимыми элементами в неблагоприятных условиях.

9. Эндоспоры.

Споры. Грамположительные бактерии образуют устойчивые к внешним воздействиям покоящиеся структуры, называемые эндоспорами. Они формируются внутри вегетативных клеток бактерий, принадлежащих к родам *Bacillus*, *Clostridium* и др. Все эти микроорганизмы образуют толстую клеточную стенку грамположительного типа, что, по-видимому, является необходимым для спорообразования. Эндоспоры чрезвычайно устойчивы к действию таких факторов как нагревание, УФ-облучение, действие химических дезинфектантов, растворителей, к высушиванию. В природе образование спор помогает клеткам избегать гибели при истощении субстрата или высушивании, воздействии радиации или химических веществ. Обычно спора в клетке закладывается одна, однако известны случаи формирования до пяти спор в одной бактериальной клетке.

Некоторые эндоспоры остаются жизнеспособными в течение 500 лет (напр. споры бацилл сибирской язвы в скотомогильниках), но совершенно уникальным является случай прорацивания спор *Bacillus cereus*, обнаруженных в кишечнике пчелы, найденной в кусочке янтаря, насчитывающего 25-30 млн. лет. Из-за высокой резистентности и того факта, что многие спорообразующие бактерии являются опасными патогенами, борьба со спорами играет важную роль в пищевой, медицинской и промышленной микробиологии.

Эндоспоры хорошо просматриваются в клетках с помощью светового или электронного микроскопа. Поскольку споры практически непроницаемы для многих видов красителей, они наблюдаются как неокрашенные тельца на фоне прокрашенного остального содергимого клетки. Но есть специальные методы дифференциальной окраски спор.

Электронно-микроскопические исследования показали, что их структура довольно сложна. Споры большинства клеток гладкие и оvoidные, хотя встречаются и круглые, а также с характерными поверхностями. Спора окружена тонким экзоспориумом, за ним (по направлению к центру споры) лежит оболочка споры, состоящая из нескольких белковых слоёв, имеющая, как правило, значительную толщину. Оболочка практически не проницаема для химических веществ, вследствие чего спора обладает существенной устойчивостью к дезинфектантам. За оболочкой располагается кортекс, который может занимать до половины объёма споры. Кортекс состоит из пептидогликана, менее поперечносшитого, чем пептидогликан вегетативной клетки.

Клеточная стенка споры (или стенка ядра споры) расположена внутри кортекса и окружает протопласт (или ядро споры). Ядро споры содержит нормальные клеточные структуры, такие как нуклеоид и рибосомы. Ядро несёт в себе всё необходимое для начала роста, запасённое в стабильной форме. Ядро лишено компонентов вегетативной клетки,

которые либо нестойки, либо могут быть легко восполнены при начале прорастания споры.

Споруляция обычно начинается при истощении питательных веществ в среде. Образование споры – сложный процесс, который можно подразделить на 7 стадий. На стадии 1 в материнской клетке формируется второй полноценный нуклеоид, отделяющийся от остального содержимого клетки ЦПМ, которая втячивается внутрь цитоплазмы, образуя септу периспоры (стадия 2). Мембрана продолжает нарастать и окружает незрелую спору двойным слоем (стадия 3). Далее между двумя слоями мембранны начинается формирование кортекса, на этой стадии (4) начинается накопление в споре Са-дипиколината (кальцевая соль дипиколиновой кислоты играет роль в терморезистентности спор). На стадии 5 вокруг кортекса образуются белковые оболочки и экзоспориум. На стадии 6 синтез оболочек завершается, спора превращается в зрелую, увеличивается её светопреломление, термоустойчивость. На стадии 7 происходит лизис спорангия и выход споры. Длительность цикла спорообразования составляет обычно от 7 до 10 часов.

Прорастание спящей споры в активную вегетативную клетку происходит в три стадии: 1. активация; 2) созревание; 3) прорастание. Часто споры не прорастают даже в богатой среде без активации, которая может заключаться в слабом нагреве. Процесс активации заканчивается созреванием, т.е. нарушением состояния покоя споры. Процесс характеризуется набуханием споры, разрывом или поглощением экзоспориума, потерей устойчивости к нагреву и стрессам, утратой способности преломлять свет, увеличением метаболической активности. В период прорастания протопласт споры образует новые компоненты, выходит из остатков споровых оболочек и формирует новую активную клетку бактерий.

1.4 Лекция №7-8 (4 часа).

Тема: «Рост и размножение бактерий».

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Культивирование микроорганизмов
2. Фазы развития бактериальной популяции
3. Количественные характеристики роста
4. Культуральные свойства бактерий

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

Жизнедеятельность бактерий характеризуется ростом - формированием структурно-функциональных компонентов клетки и увеличением самой бактериальной клетки, а также размножением - самовоспроизведением, приводящим к увеличению количества бактериальных клеток в популяции. Различают рост клеток и рост популяции. Каждый из них характеризуется своими особенностями и закономерностями. Под ростом индивидуальной клетки понимают увеличение ее биомассы, наступающее в результате синтеза клеточного материала. Объем клетки можно вычислить, если известны ее продольные и поперечные размеры. Для шаровидных клеток он определяется по формуле

$$V=4/3\pi r^3$$
 а для цилиндрических - по формуле

$$V=\pi a^2 l$$
, где r - радиус клетки, a - длина клетки.

Бактерии размножаются путем бинарного деления пополам, реже путем почкования. Актиномицеты, как и грибы, могут размножаться спорами, так как являются ветвящимися бактериями, а также путем фрагментации нитевидных клеток. Грамположительные бактерии делятся путем врастания синтезирующихся перегородок

деления внутрь клетки, а грамотрицательные - путем перетяжки, в результате чего образуются две одинаковые клетки.

Делению клеток предшествует репликация бактериальной хромосомы по полуконсервативному типу (двусpirальная цепь ДНК раскрывается и каждая нить достраивается комплементарной нитью), приводящая к удвоению молекул ДНК бактериального ядра - нуклеоида.

Образовавшиеся в результате репликации две хромосомы расходятся, чему способствует увеличение размеров растущей клетки: прикрепленные к цитоплазматической мемbrane или ее производным (например, мезосомам) хромосомы по мере увеличения объема клетки удаляются друг от друга. Окончательное их обособление завершается образованием перетяжки или перегородки деления.

Клетки с перегородкой деления расходятся в результате действия аутолитических ферментов, разрушающих сердцевину перегородки деления. Аутолиз при этом может происходить неравномерно: делящиеся клетки в одном участке остаются связанными частью клеточной стенки в области перегородки деления. Такие клетки располагаются под углом друг к другу, что характерно для дифтерийных коринебактерий.

1. Культивирование микроорганизмов

Питательные среды. Для выращивания микроорганизмов (например бактерий) в условиях лаборатории или производства используют жидкие, плотные и полужидкие питательные среды, которые должны обязательно отвечать **трем основным требованиям:**

- 1) содержать в достаточном количестве все необходимые питательные вещества (источники энергии, углерода, азота), соли и ростовые факторы;
- 2) иметь оптимальное значение pH для роста данного вида бактерий;
- 3) иметь достаточную влажность (при их усыхании повышается концентрация питательных веществ, особенно солей, тормозящих рост бактерий).

Универсальные - среды, на которых хорошо растут многие виды бактерий (МПБ, МП А).

Дифференциально-диагностические - позволяющие отличать одни виды бактерий от других по их ферментативной активности или культуральным проявлениям (среды Эндо, Плоскирева, Гисса).

Дифференциально-селективные - сочетающие в себе свойства дифференциальных и селективных сред. Используются для ускорения обнаружения и идентификации бактерий.

Специальные - специально приготовленные для получения тех бактерий, которые растут очень плохо или не растут на универсальных средах (кровяной агар, среда Левенштейна - Иенсена).

Синтетические - строго определенного химического состава.

Полусинтетические - синтетические, к которым добавляют продукт природного происхождения (сыворотку, кровь).

Способы культивирования микроорганизмов

Стационарный способ. При культивировании этим способом питательные среды сохраняются постоянными, никаких манипуляций с ними не производят. Преобладают анаэробные энергетические процессы. Выход биомассы незначителен. Для получения большего выхода биомассы или биологически активных соединений разработаны новые методы.

Глубинный способ с аэрацией. Глубинное культивирование проводят в реакторах - в герметичных котлах с жидкой питательной средой, оборудованных автоматическими приспособлениями для контроля pH, O₂, температуры, поступления стерильного воздуха и т.д. (цв. вклейка, рис. VII). В аэробных условиях достигается максимальное использование энергии и максимальный выход биомассы. Выход биомассы *E.coli* при

культивировании в стационарных условиях через 18 - 20 ч - 1 млрд, а при глубинном способе через 12 - 14 ч - 50 - 60 млрд.

Проточный способ культивирования позволяет клеткам длительное время находиться в определенной фазе роста (экспоненциальной) при постоянной концентрации питательных веществ и в одних и тех же условиях, обеспечивающих непрерывный рост культуры. Метод основан на том, что в культивируемую суспензию непрерывно добавляют свежую питательную среду и одновременно удаляют соответствующее количество бактерий.

Различают два типа аппаратов: хемостаты и турбидостаты. Хемостат-аппарат, в который постоянно добавляется свежая питательная среда. В турбидостате поддерживается постоянная плотность (мутность) бактериальной популяции.

В зависимости от способа культивирования различают периодические (стационарные и при глубинном культивировании) и непрерывные (при проточном) культуры бактерий. При определенных условиях получают синхронные культуры, то есть культуры, в которых все клетки одновременно (синхронно) делятся.

Рост — координированное воспроизведение всех компонентов бактериальной клетки и увеличение ее биомассы. *Размножение* — воспроизведение и увеличение количества клеток, приводящее к образованию бактериальной популяции.

Бактерии характеризуются высокой скоростью размножения. Скорость размножения зависит от видовой принадлежности, состава питательной среды, pH, температуры, аэрации.

На плотных питательных средах бактерии образуют скопления клеток, называемые колониями. Колонии разных видов отличаются по размерам, форме, консистенции, окраске, характеру краев, характеру поверхности, прозрачности. Характер роста на жидких питательных средах: пленочный (образованием пленки на поверхности питательной среды), диффузное помутнение, придонный (образование осадка).

2. Фазы развития бактериальной популяции

1. Исходная стационарная фаза (~ 1–2 ч.). Число бактерий не увеличивается, клетки не растут.

2. Лаг-фаза или фаза задержки размножения (~ 2 ч.).

3. Log-фаза — логарифмическая или экспоненциальная фаза (~ 3–5 ч).

Популяция делится с максимальной скоростью и идет увеличение особей в геометрической прогрессии.

4. Фаза отрицательного ускорения (~ 2 ч.). Связана с истощением лимитирующего метаболита или накоплением токсических продуктов метаболизма.

5. Стационарная фаза максимума. Количество образующихся и отмирающих клеток одинаково.

6. Фаза ускоренной гибели (~ 3 ч.).

7. Логарифмическая фаза гибели (~ 5 ч.).

8. Фаза уменьшения скорости отмирания — остающиеся живые особи переходят в состояние покоя.

3. Количественные характеристики роста

Для количественной характеристики ростовых процессов в микробной популяции пользуются двумя показателями: абсолютная (валовая) скорость и относительная (удельная) скорость роста. Среднюю валовую скорость роста (v_{cr}) за отрезок времени ($t_1 - t_0$) можно определить по абсолютному приросту биомассы по формуле:

где m_0 и m_{t1} — величины биомассы в начале и конце исследуемого отрезка времени.

Под удельной скоростью роста понимают часовой прирост, пересчитанный на единицу растущей массы: $(x = d(\ln m) / dt)$.

Скорость размножения бактерий (число удвоений за единицу времени) описывают уравнением $v = n/(t_1 - t_0)$, где n — число поколений.

Продолжительность жизни одного поколения (время генерации) в среднем составляет $g = (f_i - f_o)/n = 1/v$.

В результате логарифмирования приведенных формул и их сопоставления установлена связь удельной скорости роста с продолжительностью времени генерации и скоростью размножения клеток:

$$g = 0,693 / \mu; v = 1,44\mu; \lambda = 0,693 / g.$$

То есть между временем генерации и удельной скоростью роста существует обратно пропорциональная зависимость. Скорость роста не является величиной неизменной.

4. Культуральные свойства бактерий

При росте на жидкой питательной среде бактерии чаще всего вызывают ее равномерное помутнение (диффузный рост), иногда выпадение осадка (придонный рост) крошковатого (стрептококки), хлопьевидного (стрептобациллы), при этом бульон остается прозрачным. Некоторые бактерии образуют пленку на поверхности жидкой среды (поверхностный рост): сухую чешуйчато-бородавчатую (туберкулезная палочка), тонкую нежную (холерный вибрион), рыхлую с отходящими вниз отростками «сталактитами» (возбудитель чумы).

Еще более разнообразен рост на плотных питательных средах. Размер, форма, консистенция, прозрачность, цвет и другие особенности колоний на плотной питательной среде учитываются при идентификации бактерий, а также отборе колоний для получения чистых культур. Колонии бывают очень мелкими (0,1 - 0,5 мм), мелкими (0,5 - 3,0 мм), средними (3 - 5 мм) и крупными - более 5 мм в диаметре. Они могут быть круглыми (дисковидными), плоскими, иметь форму, напоминающую львиную гриву (голову медузы), ризоидными и т.п.; края колонии могут быть гладкими, зазубренными, фестончатыми, изрезанными. Поверхность колонии бывает гладкая или шероховатая, влажная или сухая, ровная или складчатая, плоская или выпуклая, а ее консистенция - плотная, рыхлая, слизистая. Колонии могут быть прозрачными, полупрозрачными, непрозрачными и различаться по другим признакам, например, у некоторых бактерий центр темный, а периферическая зона полупрозрачная.

Культуры некоторых видов бактерий обладают характерным запахом, который связан с разложением органических веществ, сопровождающимся образованием скатола, индола, сероводорода, меркаптана, масляной кислоты, аммиака и др.

Многим видам микроорганизмов присуща способность образовывать пигменты. Пигменты, растворимые в воде, дифундируют в питательную среду и окрашивают ее, например, синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) окрашивает среду в сине-зеленый цвет. И наконец, существуют пигменты, не растворимые ни в воде, ни в органических соединениях. Наиболее распространены среди микроорганизмов такие пигменты, как каротины, ксантофиллы и меланины. Меланины являются нерастворимыми пигментами черного, коричневого или красного цвета, синтезирующимися из фенольных соединений.

Химическая природа пигментов разнообразна: каротиноиды относятся к ненасыщенным углеводородам, антоцианы и меланины - к ароматическим соединениям и т.п. Биологическая роль этих пигментов заключается, во-первых, в том, что они защищают бактерии от губительного действия солнечных лучей, поэтому в воздухе так много пигментных бактерий; во-вторых, пигменты участвуют в обмене веществ этих бактерий.

1.5 Лекция №9-10 (4 часа).

Тема: «Энергетический метаболизм прокариот».

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Энергетический метаболизм хемотрофов, использующих механизм брожения
2. Энергетический метаболизм хемоорганотрофов, использующих процесс дыхания
3. Энергетический метаболизм хемолитотрофов

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

Конструктивные и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. У большинства прокариот они тесно связаны между собой. Метаболизм прокариот, как энергетический, так и конструктивный, отличается чрезвычайным разнообразием, которое является результатом способности этих форм жизни использовать в качестве источников энергии и исходных субстратов для построения веществ тела самый широкий набор органических и неорганических соединений.

Энергетический метаболизм в целом сопряжен с биосинтетическими и другими энергозависимыми процессами, происходящими в клетке, для протекания которых он поставляет энергию, восстановитель и необходимые промежуточные метаболиты. Сопряженность двух типов клеточного метаболизма не исключает некоторого изменения их относительных масштабов в зависимости от конкретных условий.

Энергетические процессы прокариот по своему объему (масштабности) значительно превосходят процессы биосинтетические, и протекание их приводит к существенным изменениям в окружающей среде. Разнообразны и необычны в этом отношении возможности прокариот, способы их энергетического существования. Все это вместе взятое сосредоточило внимание исследователей в первую очередь на изучении энергетического метаболизма прокариот.

1. Энергетический метаболизм хемотрофов, использующих механизм брожения

Из трех путей образования АТФ субстратное фосфорилирование наименее простой. Такой тип энергетического метаболизма характерен для многих бактерий и дрожжей, осуществляющих различные виды брожения. Брожение идет в анаэробных условиях и может быть определено как процесс биологического окисления сложных органических субстратов для получения энергии, при котором конечный акцептор водорода (также органическое вещество) образуется в ходе распада исходного субстрата. При этом одни органические вещества служат донорами водорода и окисляются, другие - акцепторами водорода и в результате восстанавливаются. Перенос водорода от доноров к акцепторам осуществляется с помощью окислительно-восстановительных ферментов.

Кроме углеводов многие бактерии способны сбраживать самые разнообразные соединения: органические кислоты, аминокислоты, пурины и т. д. Условие, определяющее способность вещества к сбраживанию, - наличие в его структуре не полностью окисленных (восстановленных) атомов углерода. Только в этом случае возможна внутри- и межмолекулярная перестройка субстрата за счет сопряжения окислительных и восстановительных реакций без участия кислорода.

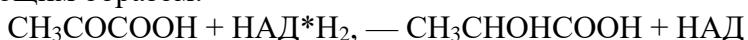
В результате процессов брожения в среде накапливаются вещества, в которых степень окисления углерода может быть как выше, так и ниже, чем в исходном субстрате. Однако строгое равновесие окислительных и восстановительных процессов при брожении приводит к тому, что средняя степень окисления углерода остается такой же, как и у субстрата. Существует несколько типов брожений, названия которым даются по конечному продукту: спиртовое (осуществляют дрожжи и некоторые виды бактерий), пропионовокислое (пропионовые бактерии), метановое (метанобразующие бактерии), маслянокислое (маслянокислые бактерии) и т.д.

Многие микроорганизмы, осуществляющие процессы брожения, — облигатные анаэробы, не способные развиваться в присутствии кислорода и даже более слабых

окислителей. Другие - факультативные анаэробы - могут расти как в кислородной среде, так и в бескислородной. Это отличительное свойство факультативных анаэробов объясняется тем, что они могут изменять способ образования АТФ переключаться с окислительного фосфорилирования при наличии в среде кислород на субстратное его отсутствии. Характерная особенность процессов биологического окисления - их многостадийность, обеспечивающая постепенное выделение свободной энергии, заключенной в сложных органических субстратах.

Многостадийность энергетического метаболизма принципиально необходима для жизнедеятельности любого организма. Если бы в клетке окисление сложных веществ протекало в одну стадию, то одновременное освобождение нескольких сотен килоджоулей привело бы к выделению большого количества тепла, резкому повышению температуры и к гибели клетки, поскольку эффективность использования энергии ограничена возможностями системы АДФ—АТФ.

Простейший пример анаэробного окисления глюкозы - молочнокислое брожение. Оно вызывается молочнокислыми бактериями, факультативными анаэробами, не образующими спор. Превращение ПВК при молочнокислом брожении протекает следующим образом:



Значительно сложнее механизм пропионовокислого брожения, служащего источником энергии группе пропионовых бактерий, факультативных анаэробов, неподвижных не спорообразующих бактерий рода *Propionibacterium*. Эти бактерии синтезируют конечный акцептор, присоединяя к молекуле ПВК CO_2 . Процесс известен под названием гетеротрофной ассимиляции CO_2 . В результате образуется щавелевоуксусная кислота - акцептор водорода для $\text{НАД}^*\text{H}_2$. Дальнейшие ферментативные реакции приводят к образованию пропионовой кислоты.

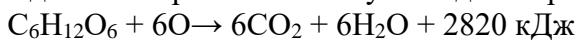
Маслянокислое брожение осуществляют бактерии род *Clostridium*. Таким образом, энергетический выход процесса брожения невелик, поскольку органические вещества не окисляются полностью и часть энергии исходного субстрата сохраняется в достаточно сложных продуктах брожения. В большинстве случаев при сбраживании глюкозы клетка запасает две молекулы АТФ на 1 моль глюкозы.

Для получения энергии, необходимой для синтеза клеточного вещества и других жизненных функций, микроорганизмам, осуществляющим процессы брожения, приходится перерабатывать большое количество органических веществ. Именно в силу этих причин на очистных станциях систем водоотведения анаэробные процессы брожения используют для обработки концентрированных субстратов – осадков сточных вод.

2. Энергетический метаболизм хемоорганотрофов, использующих процесс дыхания

Большинство гетеротрофных организмов получают энергию в процессе дыхания - биологического окисления сложных органических субстратов, являющихся донорами водорода. Водород от окисляемого вещества поступает в дыхательную цепь ферментов. Дыхание называют аэробным, если роль конечного акцептора водорода выполняет свободный кислород. Микроорганизмы, способные существовать только в присутствии кислорода, называются облигатными аэробами.

В качестве источников энергии - доноров водорода - хемоорганогетеротрофы в процессе дыхания могут использовать разнообразные окисляемые органические соединения: углеводы, жиры, белки, спирты, органические кислоты и т. д. Суммарно процесс дыхания при окислении углеводов выражается следующим уравнением:



Начальная стадия превращения углеводов вплоть до образования ПВК полностью идентична ферментативным реакциям окисления углеводов в процессе брожения.

В клетках аэробов ПВК может быть окислена полностью в результате ряда последовательных реакций. Совокупность этих превращений составляет цикл, именуемый циклом Кребса или циклом ди- и трикарбоновых кислот (ЦТК). Водород, отнятый

дегидрогеназами в цикле, передается в дыхательную цепь ферментов, которая у аэробов кроме НАД включает ФАД, систему цитохромов и конечный акцептор водорода - кислород. Передача водорода по этой цепи сопровождается образованием АТФ.

Первый этап фосфорилирования связан с передачей водорода от первичной дегидрогеназы на ФАД. Второе фосфорилирование происходит при переходе электрона с цитохромом *b* на цитохром, третье - при передаче электрона кислороду. Таким образом, на каждые два атома водорода (электрона), поступивших в дыхательную цепь, синтезируется три молекулы АТФ. Образование АТФ одновременно с процессом переноса протона и электрона по дыхательной цепи ферментов называется окислительным фосфорилированием. В некоторых случаях электрон включается в дыхательную цепь на уровне ФАД или даже цитохромов. При этом соответственно уменьшается количество синтезируемых молекул АТФ.

Суммарный энергетический итог процесса окисления 1 моля глюкозы составляет 38 молекул АТФ, из них 24 - при окислении ПВК в цикле Кребса с передачей водорода в дыхательную цепь ферментов. Таким образом, основное количество энергии запасается именно на этой стадии. Замечательно то, что цикл Кребса универсален, т.е. характерен и для простейших, и для бактерий, и для клеток высших животных и растений. Промежуточные соединения цикла частично используются для синтеза клеточного вещества. Окисление питательных веществ не всегда идет до конца. Некоторые аэробы окисляют органические соединения частично, при этом в среде накапливаются промежуточные продукты окисления.

Некоторые микроорганизмы в процессе дыхания в качестве конечного акцептора водорода используют не кислород, а окисленные соединения азота (нитриты, нитраты) хлора (хлораты и перхлораты), серы (сульфаты, сульфит тиосульфата), углерода (CO_2), хрома (хроматы и бихроматы). Такой тип дыхания называется анаэробным. Микроорганизмы, осуществляющие процесс дыхания за счет окисленных соединений азота и хлора, относятся факультативным анаэробам. Они имеют две ферментативные системы, позволяющие им переключаться с аэробного дыхания на анаэробное и наоборот в зависимости от присутствия в среде того или иного конечного акцептора.

Если в среде одновременно присутствуют нитраты и молекулярный кислород, то в первую очередь будет использоваться акцептор, позволяющий получить большее количество энергии. Аэробное дыхание сопровождает тремя фосфорилированиями, анаэробное - двумя. Тем не менее, если концентрация кислорода в среде невелика, а концентрация нитратов намного превышает ее, микроорганизмы используют нитраты. Решающим условием в этом случае является свободная энергия реакции восстановления акцептора, которая зависит от его концентрации. Анаэробное дыхание за счет нитратов называется денитрификацией

Окисленные соединения серы, хрома, углерода играют роль конечных акцепторов для разных видов микроорганизмов относящихся к облигатным анаэробам. У сульфатредуцирующих микроорганизмов обнаружена цепь переноса электронов, включающая несколько ферментов но последовательность их действия остается неясной. При употреблении сульфатов в качестве конечного акцептора водорода микроорганизмы восстанавливают их до сульфидов:

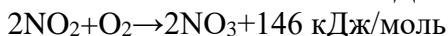


Анаэробное дыхание с использованием диоксида углерода сопровождается образованием метана.

3. Энергетический метаболизм хемолитоавтотрофов

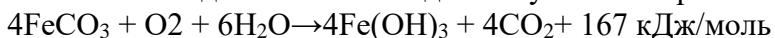
Окисление восстановленных минеральных соединений азота, серы, железа служит источником энергии для хемолитотрофных микроорганизмов. Деление хемолитотрофных микроорганизмов на группы основано на специфичности каждой группы по отношению к окисляемому соединению. Различают нитрифицирующие бактерии, железобактерии, бактерии, окисляющие соединения серы.

Нитрифицирующие бактерии окисляют аммонийный азот до нитратов. Процесс называется нитрификацией и идет в две фазы, за каждую из которых ответственны свои возбудители:

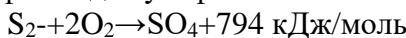


Окисление аммиака до нитритов с передачей электронов в дыхательную цепь служит энергетическим процессом для группы нитрозобактерий. Окисление аммонийного азота — многостадийный процесс, при котором в качестве промежуточных продуктов образуются гидроксиламин и гипонитрит. Энергетическим субстратом, окисляемым в дыхательной цепи, служит гидроксиламин.

Железобактерии (хемолитоавтотрофы) не представляют собой единой таксономической единицы. Этим термином объединяют микроорганизмы, окисляющие восстановленные соединения железа для получения энергии:



В транспорте электронов от двухвалентного железа к кислороду принимают участие хиноны и цитохромы. Перенос электронов сопряжен с фосфорилированием. Эффективность использования энергии у этих бактерий настолько мала, что для синтеза 1 г клеточного вещества им приходится окислять около 500 г углекислого железа. Бактерии, окисляющие соединения серы и способные к автотрофной ассимиляции CO_2 , относятся к группе тионовых бактерий. Энергию для конструктивного метаболизма тионовых бактерий получают в результате окисления сульфидов, молекулярной серы, тиосульфатов и сульфитов до сульфатов:



Дыхательная цепь тионовых бактерий содержит флавопротеиды, убихиноны, цитохромы. Механизм ассимиляции CO_2 в конструктивных целях у всех хемолитоавтотрофов сходен с таким у фотосинтезирующих автотрофов, использующих в качестве донора водорода воду. Основное отличие состоит в том, что в процессе хемосинтеза кислород не выделяется.

1.6 Лекция №11 (2 часа).

Тема: «Брожение. Типы жизни, основанные на субстратном фосфорилировании».

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Спиртовое брожение
2. Молочнокислое брожение
3. Пропионовокислое брожение
4. Брожение, вызываемое бифидобактериями
5. Муравьинокислое брожение
6. Маслянокислое брожение

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

Продукты брожения известны человеку с незапамятных времен, хотя истинная причина этого явления была установлена Л. Пастером только в 1861 г. Он открыл три основных типа брожений: спиртовое, молочнокислое и маслянокислое.

Брожение — это анаэробный метаболический процесс, при котором образуется АТФ, а продукты расщепления органического субстрата являются как донорами, так и акцепторами водорода окисляемого субстрата.

1. Спиртовое брожение

Сбраживание углеводов микроорганизмами с образованием этилового спирта и диоксида углерода составляет сущность спиртового брожения.

Спиртовое брожение осуществляют дрожжи сахаромицеты, мукоровые грибы и некоторые виды бактерий (*Zymomonas mobilis*, *Sarcina ventricula* и др.).

Процесс спиртового брожения суммарно можно выразить следующим уравнением:



Спиртовое брожение протекает по фруктозодифосфатному пути (гликолитический путь Эмбдена—Мейергофа—Парнаса).

На первой стадии брожения происходит фосфорилирование глюкозы при участии АТФ, изомеризация глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат, который, в свою очередь, фосфорилируется в положении 1.

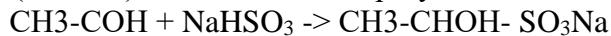
Затем образовавшийся фруктозо-1,6-дифосфат расщепляется под действием фермента альдолазы (ключевого фермента гликолитического пути) на две триозы: глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацитон-фосфат, которые легко превращаются друг в друга при участии фермента триозофосфатизомеразы.

Таким образом, первый этап гликолиза характеризуется активированием одной молекулы глюкозы с затратой энергии в виде 2 молекул АТФ.

На второй стадии брожения глицеральдегид-3-фосфат окисляется до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты при участии НАД⁺ и неорганического фосфата. В последующих реакциях превращения 1,3-дифосфо-глицериновой кислоты в пируват обе фосфатные группы переносятся на АДФ (*субстратное фосфорилирование*), в результате чего образуются 4 молекулы АТФ. Поскольку на начальных этапах активирования глюкозы затрачивается 2 молекулы АТФ, общий выход составляет 2 молекулы АТФ на один моль сброшенной глюкозы.

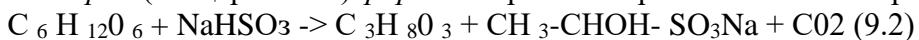
Центральный метаболит гликолитического пути — пируват — подвергается реакции декарбоксилирования под действием пируватдекарбоксилазы — ключевого фермента спиртового брожения. Образовавшийся при этом ацетальдегид становится акцептором водорода окисляемого субстрата и восстанавливается до этанола при помощи фермента алкогольдегидрогеназы. Биологическое значение последней реакции заключается в окислении восстановленного НАДН₂, образовавшегося ранее.

Сбраживание глюкозы до этанола и СО₂ обычно происходит в слабокислой среде при pH 4—5,5 (первая форма брожения по Нойбергу), К. Нойберг обнаружил, что в зависимости от условий при спиртовом брожении могут образовываться нехарактерные для этого процесса продукты. Так, если к дрожжам, сбраживающим глюкозу, добавить бисульфит (№H503), то последний образует комплекс с ацетальдегидом:



Поскольку ацетальдегид заблокирован, он уже не может выполнять роль акцептора водорода, в результате чего водород от НАДН2 передается на дигидроксиацетонфосфат. Этот метаболит восстанавливается до глицерол-3-фосфата и дефосфорилируется с образованием глицерина, как это показано на схеме.

Это *вторая (глицериновая) форма спиртового брожения* по Нойбергу:



Если спиртовое брожение проводить в щелочной среде, то также происходит накопление глицерина.

Это объясняется тем, что ацетальдегид в щелочных условиях не может являться акцептором водорода окисляемого субстрата, поскольку участвует в реакции дисмутации с образованием этанола и уксусной кислоты. Поэтому акцептором электронов, как и в

предыдущем случае, служит дигидроксиацетонфосфат. Процесс брожения в щелочной среде называют *смешанной формой* спиртового брожения (*третья форма* брожения по Нойбергу), которую можно представить в виде уравнения:



Дрожжи относятся к аэробным микроорганизмам, но расщепление глюкозы они осуществляют в анаэробных условиях, при этом спиртовое брожение идет очень интенсивно, хотя роста дрожжей почти не происходит.

При изучении спиртового брожения Л. Пастер открыл, что в условиях свободного доступа кислорода воздуха брожение подавляется и активируется дыхание. Это явление получило название «эффекта Пастера»

Оно объясняется взаимодействием между различными энергетическим путями, существующими у дрожжей, а именно конкуренцией за АДФ между процессами субстратного фосфорилирования гликолитического пути и окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи.

Спиртовое брожение лежит в основе таких биотехнологических процессов, как производство этилового спирта и глицерина, виноделие, пивоварение, хлебопечение. В некоторых кисломолочных напитках (кефир, кумыс, курунга, мацони) спиртовое брожение осуществляют дрожжи, способные сбраживать молочный сахар.

2. Молочнокислое брожение

Характеристика молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии — специфическая группа микроорганизмов, главной особенностью которых является образование молочной кислоты в качестве основного продукта брожения.

Молочнокислые бактерии характеризуются сложными потребностями в питательных веществах, поэтому они практически не обнаруживаются в водоемах или почве. Чаще всего они встречаются в молоке и молочных продуктах, на растениях и разлагающихся растительных остатках, в желудочно-кишечном тракте и на слизистых оболочках человека и животных.

По форме клеток их разделяют на шаровидные и палочковидные.

Молочнокислые бактерии грамположительны, в большинстве неподвижны, спор, как правило, не образуют (исключение составляет атипичный вид *Sporolactobacillus inulinus*, выделенный из силюса, образующий споры и обладающий активной подвижностью).

В отношении нуклеотидного состава ДНК группа молочнокислых бактерий весьма гетерогенна - молярное содержание ГЦ-пар оснований у них варьирует от 32 до 52 %.

Молочнокислые бактерии относят к группе факультативных анаэробов.

Однако в отличие от бактерий семейства *Enterobacteriaceae* они не содержат гемопротеинов (цитохромов и каталазы) и единственным способом синтеза АТФ у них является молочнокислое брожение. Тем не менее лактобактерии могут расти в присутствии кислорода воздуха, являясь аэроботерантными анаэробами. Лактобактерии - единственная группа бактерий, лишенных каталазы, но способных расти в присутствии кислорода воздуха. Каталаза - фермент, расщепляющий пероксид углерода, образующийся при окислении субстрата, на воду и кислород. У молочнокислых бактерий функцию каталазы выполняет пероксидаза. Отсутствие каталазной активности при способности расти в аэробных условиях является одним из диагностических тестов распознавания этой группы микроорганизмов.

Молочнокислые бактерии, в отличие от большинства других микроорганизмов, способны расщеплять молочный сахар - лактозу. Для включения лактозы в катаболизм лактобактерии расщепляют ее под действием фермента (3-галактозидазы) на две гексозы:

Поскольку в процессе своей жизнедеятельности лактобактерии накапливают молочную кислоту, они довольно кислототерантны и способны расти при низких значениях pH (3,5-3,0).

В зависимости от конечных продуктов метаболизма молочнокислые бактерии подразделяют на гомоферментативные (расщепляющие сахара по гексозодифосфатному пути) и гетероферментативные (расщепляющие сахара по пентозофосфатному пути).

Гомоферментативные молочнокислые бактерии в качестве основного источника энергии могут использовать моносахара (глюкозу, галактозу) и олигосахариды (лактозу, мальтозу). Превращение глюкозы до пирувата происходит по гликолитическому пути. В данном случае акцептором электронов окисляемого субстрата является пируват: на него переносятся 2 электрона с восстановлением

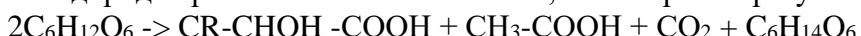


Энергетический выход при гомоферментативном молочнокислом брожении составляет 2 АТФ на одну молекулу сброшенной глюкозы.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии сбраживают углеводы по окислительному пентозофосфатному пути с образованием различных продуктов: молочной кислоты, диоксида углерода, этанола и/или уксусной кислоты. В частности, бактерии вида *Leuconostos mesenteroides* расщепляют глюкозу согласно уравнению:



Другие гетероферментативные бактерии (*L. brevis*, *L. fermentum* и др.) превращают ацетилфосфат в уксусную кислоту, а глицеральдегид-3-фосфат через пируват — в лактат. Избыток водорода принимает на себя глюкоза, из которой образуется маннитол:



Гомо- и гетероферментативные молочнокислые бактерии участвуют в таких биотехнологических процессах, как производство кисломолочных напитков, творога, сметаны, сыров, кислосливочного масла, сыропокченых колбас. Они играют большую роль в квашении плодов и овощей, силоса. Их широко используют в хлебопекарной промышленности для приготовления жидких дрожжей, заквасок для ржаного и пшеничного хлеба.

3. Пропионовокислое брожение

Возбудителями пропионовокислого брожения являются пропионовокислые бактерии, ферментирующие углеводы с образованием пропионовой и уксусной кислот и диоксида углерода:



Пропионовокислые бактерии обитают в кишечном тракте жвачных животных, встречаются в молоке, твердых сырах, силосе, забродивших маслинах.

Пропионовокислые бактерии объединены в семейство *Propionibacteriaceae* род *Propionibacterium*. Типовым представителем рода является вид *Propionibacterium freudenreichii*. В группу классических пропионокислых бактерий входят также виды *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici*, *P. acnes*.

Пропионовокислые бактерии представляют собой мелкие полиморфные палочки размером (1,0—5,0) x (0,5—0,8) мкм. Форма клеток бывает кокковидной, булавовидной, разветвленной. Клетки располагаются чаще всего одиночно, иногда парами, в виде китайских иероглифов или букв V или Y. Пропионовокислые бактерии грамположительны, неподвижны, не образуют спор и капсул. Некоторые штаммы могут образовывать внеклеточную слизь, однако она не формируется в виде четкой капсулы.

По отношению к кислороду воздуха являются факультативными анаэробами или микроаэрофилами, тем не менее большинство штаммов хорошо растут в строго анаэробных условиях.

Пропионовокислое брожение характеризуется присоединением к молекуле пирувата диоксида углерода, что приводит к формированию четырехуглеродного скелета.

Пропионовокислые бактерии применяют в хлебопечении с целью предупреждения развития картофельной болезни хлеба. Продукты метаболизма пропионовокислых

бактерий - уксусная и пропионовая кислоты - подавляют размножение возбудителей болезни хлеба.

Пропионовокислые бактерии используют также в процессе приготовления сыров с высокой температурой второго нагревания (швейцарский, советский, маасдам и др.). Накапливающиеся в процессе созревания сыров пропионовая и уксусная кислоты придают им специфический острый вкус, а диоксид углерода формирует рисунок сыра в виде крупных редких глазков. Полезным свойством пропионовокислых бактерий является также их способность синтезировать витамин B12.

4. Брожение, вызываемое бифидобактериями

Впервые бифидобактерии были выделены в 1900 г. французским ученым Н. Тиссье из стула грудных детей, вскармливаемых материнским молоком. Свое название эти бактерии получили за способность раздваиваться на концах. Бифидобактерии относятся к семейству *Actinomycetaceae*, роду *Bifidobacterium*.

Клетки бифидобактерий имеют вид палочек, чрезвычайно вариабельных по форме, размером (0,5-1,3) x (1,5—8) мкм, слегка изогнутых, булавовидных и часто разветвленных. Расположение клеток одиночное, парами, V- или Y-образное, розетками, палисадом, редко цепочками.

Бифидобактерии грамположительны, неподвижны, не образуют спор, могут формировать микрокапсулу, некислотоустойчивы.

На плотных питательных средах они образуют колонии в виде гвоздиков или гречишных зерен. Оптимальная температура роста бифидобактерий 37-41 °С, оптимальное значение pH 6,0-7,0, они не растут при pH ниже 4,5 или выше 8,5.

Бифидобактерии - строгие анаэробы, каталазоотрицательны, очень требовательны к источникам питания. Размножение этих микроорганизмов обусловлено огромным количеством факторов роста. Некоторые штаммы бифидобактерий растут только при наличии в среде определенных факторов роста, содержащихся в женском молоке и отсутствующих в коровьем. Этими факторами являются азотсодержащие олигосахариды, в состав которых входят N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилманнозамин и др., необходимые для синтеза клеточных стенок бифидобактерий. Наиболее известным бифидогенным фактором является лактулоза.

Лактулоза не расщепляется ферментом (3-галактозидазой, синтезируемой слизистой тонкого кишечника, поэтому она достигает толстого кишечника. Там ее активно утилизируют бифидобактерии, ацидофильная палочка, энтерококки, накапливая молочную и уксусную кислоты, снижая тем самым pH фекальной массы. Вещества, стимулирующие рост бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике (*in vivo*), называются *пребиотиками*.

Бифидобактерии сбраживают углеводы по так называемому фруктозо-бифосфатному пути, в ходе которого два моля глюкозы превращаются в молочную и уксусную кислоты в соотношении 2:3, при этом образуется 2,5 АТФ на один моль глюкозы.

Бифидобактерии играют важную роль в организме человека и животных.

В настоящее время установлено, что существует тесная взаимосвязь между здоровьем человека и составом его кишечной микрофлоры, называемой *нормальной микрофлорой*.

Положительное действие бифидобактерий на организм человека связывают с их ферментативной, витаминсintéзирующей и антагонистической активностью.

При ферментации углеводов, как следует из схемы, бифидобактерии образуют уксусную кислоту и изомер молочной кислоты. Это приводит к снижению внутрикишечного значения pH, что препятствует размножению патогенных бактерий, уменьшает всасывание в кровь аммиака и биогенных аминов, способствует усвоению кальция, железа, витамина О. Образующаяся в больших количествах уксусная кислота оказывает более высокое антагонистическое воздействие на грамотрицательные бактерии

по сравнению с молочной кислотой. Бифидобактерии синтезируют целый ряд витаминов и незаменимых аминокислот, снижают уровень холестерина, обладают антиканцерогенной и антимутагенной активностью.

Нормальная микрофлора кишечника обеспечивает колонизационную устойчивость - предупреждение заселения кишечника вредной микрофлорой. Бифидобактерии прикрепляются к эпителию слизистой кишечника, создавая механическую преграду внедрению возбудителей кишечных инфекций. Кроме того, клетки бифидобактерий синтезируют экзогенный полисахарид, образуя на слизистых поверхностях биопленку.

5. Муравьинокислое брожение

Муравьинокислое брожение вызывает определенная физиологическая группа микроорганизмов, которая при сбраживании углеводов образует в качестве одного из продуктов муравьиную кислоту. Поскольку наряду с муравьиной кислотой эти микроорганизмы накапливают целый ряд других продуктов, такое брожение называют еще смешанным.

Основными возбудителями муравьинокислого брожения являются некоторые представители семейства *Enterobacteriaceae* (от греч. *enteron* - кишечник).

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* — это грамотрицательные тонкие палочки размером (0,3-0,6) x (0,6-1,0) мкм, подвижные или неподвижные, перитрихи. Они не образуют эндоспор и микроцист, некислотоустойчивы.

Факультативные анаэробы, механизм метаболизма дыхательный и ферментативный. Неприхотливы к питанию и растут на простых мясных и пептонных средах. Каталазоположительны (за исключением *Shigella dysenteriae*), оксидазоотрицательны.

При муравьинокислом брожении глюкоза расщепляется до пирувата по гликолитическому пути. Дальнейшие превращения пирувата зависят от вида возбудителя. В зависимости от вида возбудителя различают два типа метаболических процессов: бактерии вида *Escherichia coli* образуют большое количество различных соединений, среди которых преобладают органические кислоты: уксусная, муравьиная, янтарная и молочная, за счет чего реакция с метиловым красным дает положительный эффект;

• бактерии вида *Enterobacter aerogenes* также образуют целый ряд кислот, однако они в количественном отношении уступают нейтральным соединениям — ацетоину и 2,3-бутандиолу, поэтому реакция с метиловым красным отрицательна.

Муравьиную кислоту, образующуюся при расщеплении пирувата, большинство газообразующих видов энтеробактерий расщепляют на CO_2 и H_2 . Молочная кислота образуется в результате восстановления пирувата, янтарная кислота — путем фиксации CO_2 . Часть образующегося из пирувата ацетил-КоА выделяется в виде уксусной кислоты, а этанол является продуктом восстановления ацетил-КоА.

Ацетоин образуется путем конденсации двух молекул пирувата, включающим двухкратное декарбоксилирование. При восстановлении ацетоина образуется 2,3-бутандиол.

Размножение энтеробактерий в пищевых продуктах обычно приводит к вспучиванию за счет образования газов, появлению нечистого вкуса.

6. Маслянокислое брожение

Маслянокислое брожение протекает в строго анаэробных условиях по гексозодифосфатному пути до пирувата. Особенностью маслянокислого брожения является реакция конденсации двух молекул ацетил-КоА (т. е. $\text{C}_2 + \text{C}_2 = \text{C}_4$) при участии фермента карбонилазы с образованием ацетоацетил-КоА и его последующим восстановлением до масляной кислоты.

Типичными возбудителями маслянокислого брожения являются бактерии рода *Clostridium* — *C. butyricum* и *C. pasteurianum*.

Клостридии представляют собой палочковидные грамположительные бактерии, относящиеся к семейству *Bacillaceae*. Большинство видов подвижны благодаря перитрихиально расположенным жгутикам.

По мере старения клетки теряют подвижность, накапливают запасное вещество гранулезу и приступают к спорообразованию. Клостридии образуют овальные или круглые эндоспоры, диаметр которых больше диаметра клетки. Если спора располагается в центре клетки, то последняя приобретает вид веретена, если же спора находится на конце клетки, клетка становится похожей на барабанную палочку или теннисную ракетку. Споры клостридий довольно терморезистентны.

Клостридии — строгие анаэробы. Не содержат гемопротеинов (цитохромов, каталазы). Оптимальная температура роста от 30 до 40 °С.

Наряду с мезофильными клостридиями встречаются и термофильные виды, имеющие температурный оптимум 60-75 °С, в частности *C. igegtoasePsit*. Как большинство представителей семейства *Bacceae*, клостридии способны расти только при нейтральной или слабощелочной реакции среды. Их нежелательное размножение в пищевых продуктах может быть полностью подавлено при подкислении среды (квашение капусты и огурцов, закисание фарша в сырокопченых колбасах, маринование овощей и грибов).

По способности использовать различные субстраты клостридии можно разделить на следующие группы:

- сахаролитические — расщепляют преимущественно полисахариды или сахара. Сюда относятся *C. utyricum*, *C. acetobutelicum* и др.;
- протеолитические — расщепляют белки, пептоны, аминокислоты.

В эту группу входят *C. putrificum*, *C. sporogenes*, *C. histolyticum*

- пуринолитические — способные разлагать пурины и пиrimидины.

К этой группе относятся бактерии вида *C. acidiurici*. В ходе маслянокислого брожения образовавшийся из глюкозы пируват расщепляется с образованием диоксида углерода и ацетил-КоА и восстановленного белка ферредоксина (Бе8 -белок). Последний передает электроны на протоны и способствует появлению еще одного из метаболитов маслянокислого брожения — водорода. Конденсация двух молекул ацетил-КоА приводит к образованию ацетоацетил-КоА, который затем восстанавливается в р-оксибутирил-КоА. В результате отщепления воды от (3-оксибутирил-КоА образуется соединение с двойной углеродной связью — кротонил-КоА. Он восстанавливается в последующей реакции с образованием бутирил-КоА. Перенос кофермента А с бутирил-КоА на ацетат приводит к образованию основного метаболита — масляной кислоты.

Присутствие и размножение маслянокислых бактерий в пищевых продуктах крайне нежелательно. Вследствие образования большого количества газов при сбраживании углеводов возникают такие пороки, как позднее вспучивание сыров, бомбаж консервов. Накопление масляной кислоты приводит к появлению прогорклого вкуса и резкого неприятного запаха в продукте.

В микробиологической промышленности маслянокислое брожение используют для производства масляной кислоты, которая служит основой для получения различных эфиров. Эфиры масляной кислоты имеют приятный запах и в качестве ароматических веществ находят широкое применение в парфюмерной, кондитерской промышленности, производстве безалкогольных напитков.

1. 7 Лекция №12 (2 часа).

Тема: «Фототрофные бактерии и фотосинтез».

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Фотосинтез бактерий
2. Фотосинтетический аппарат состоит из трех основных компонентов

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

Жизнь на нашей земле в различных ее проявлениях прямо или косвенно зависит от процессов фотосинтеза. До появления на нашей планете фотосинтезирующих клеток и организмов, атмосфера Земли была лишена кислорода. Фотосинтез по тому типу как он протекает у растений, очевидно, предшествовал долгой эволюции.

Полагают что именно бактерии сделали атмосферу нашей планеты кислородной. Кислород имеет важнейшее значение для обмена веществ, участвует в процессах образования и растворения углекислого кальция и необходим для разложения органических веществ.

Главным источником кислорода на планете является фитопланктон который на 60% состоит из бактерий.

Но не все бактерии фотосинтетики способны выделять кислород, встречаются азотофиксаторы, многие также в процессе жизнедеятельности способны выделять молекулярную серу, что имеет большое значение в круговороте серы. Способность организмов существовать за счет энергии света в первую очередь связана с наличием у них специфических пигментов.

Набор пигментов специфичен и постоянен для определенных групп фотосинтезирующих прокариот.

1. Фотосинтез бактерий

Фотосинтез - комплексная ассимиляция световой энергии и неорганического углерода с использования неорганического донора электронов.

Уникальность этого способа ассимиляции энергии заключается в том, что в результате фотофизического процесса образуется возобновленный субстрат-возбужденный хлорофилл. При его окислении с помощью электрон-транспортной цепи создается электрохимический энергоноситель.

Способность к фотографии проявляют 5 филлумов домена бактерии:

- зеленые нитчатые бактерии
- цианобактерии
- зеленые одноклеточные бактерии
- пурпурные бактерии
- гелиобактерии

Преобразование световой энергии в энергию химических связей может осуществляться при фотосинтезе трех типов:

- с помощью бактериохлорофиллов без выделения молекулярного кислорода (бескислородный, или аноксигенный фотосинтез). **Доноры электронов** - разнообразные органические и не органические вещества, вода никогда не входит в их число.

Этот тип фотосинтеза осуществляют пурпурные и зеленые бактерии, гелиобактерии;

- зависимого от наличия хлорофилла, сопровождающегося выделением молекулярного кислорода (кислородный, или оксигенный, фотосинтез). Донор электронов - молекулы воды, присущ большой группе цианобактерий.

- с помощью белка бактериородопсина, ковалентно связанного с каротиноидом ретиналем (бесхлорофильный фотосинтез). Этот процесс

не сопровождается выделением молекулярного кислорода. Он характерен для галобактерий, которые относятся к архебактериям.

В основе фотосинтеза I и II типа лежит поглощение солнечной энергии различными пигментами, приводящее к разделению электрических зарядов, возникновению восстановителя с низким и окислителя с высоким окислительно-восстановительным потенциалом. Перенос электронов между этими двумя компонентами приводит к выделению свободной энергии. В фотосинтезе III типа окислительно-восстановительные переносчики отсутствуют. В этом случае энергия в доступной для организма форме возникает в результате светозависимого перемещения H^+ через мембрану.

Рассмотрим структурную организацию фотосинтетического аппарата прокариот.

У каждой из основных групп прокариот фотосинтетический аппарат организован по-разному. Это определяется тем, какие пигменты входят в его состав, какие вещества являются переносчиками электронов и где локализованы фотохимические реакционные центры.

2. Фотосинтетический аппарат состоит из трех основных компонентов:

- **светособирающих пигментов**, поглащающих энергию света и передающих ее в реакционные центры; (пигменты)
- **фотохимических реакционных центров**, где происходит трансформация электромагнитной формы энергии в химическую; (пигменты)
- **фотосинтетических электротранспортных систем**, обеспечивающих перенос электронов, сопряженный с запасанием энергии в молекулах АТФ. Содержат специфические переносчики.

Фотосинтезирующие бактерии отличаются друг от друга и по расположению в клетке компонентов фотосинтетического аппарата.

Два компонента этого аппарата – фотохимические реакционные центры и фотосинтетические электротранспортные системы – у всех фототрофных бактерий локализованы в цитоплазматической мембране и ее производных (тилакоидах).

Локализация светособирающих пигментов в разных группах фотосинтезирующих прокариот различна. У пурпурных бактерий, гелиобактерий и прохлорофит светособирающие пигменты в виде комплексов с белками интегрированы в мембранах. В зеленых бактериях основная масса светособирающих пигментов находится в **хлоросомах**, у цианобактерий – в фикобилисомах.

Фотосинтетический состав

Физическая основа фототрофии - **хромофоры** (греч. chroma - краска и phoreo - носить) — небольшие органические молекулы, которые интенсивно поглащают свет в интервале длин волн 300-1200 нм и ярко окрашены. Хромофоры действуют в комплексе с полипептидами - «апопротеинами» в составе фотосинтезирующего аппарата. Благодаря хромофорам достаточно густые суспензии фототрофных бактерий имеют зеленую, сине-зеленую, пурпурно-фиолетовую, красную, коричневую или розовую окраску.

Хромофоры принадлежат к разным классам химических соединений и представлены набором молекулярных гомологов и изомеров.

По химической природе хромофоры подразделяются на три группы:

- металлпорфиноиды (хлорофиллы и хлорофиллподобные пигменты);
- полизопреноиды (каротиноиды);
- линейные тетрапирролы (фикобилины).

на данный момент обнаружено 11 хлорофиллов.

Основные фотосинтетично активные пигменты фотосинтезирующих бактерий - бактериохлорофиллы: a,b,c,d и e - первый типу хромофоров.

В зависимости от выполняемой функции хлорофиллы подразделяются на:

Главные - входящие в состав реакционных центров;

Вспомогательные – входящие в состав светособирающих комплексов.

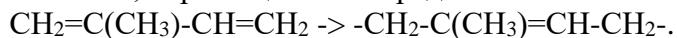
К главным хлорофиллам относят: хлорофилл *a*, хлорофилл *d*, бактериохлорофилл *a*, Zn-содержащий бактериохлорофилл *a*, бактериохлорофилл *b* и бактериохлорофилл *d*

Вспомогательные - у пурпурных и аэробных фототрофных бактерий один и тот же бактериохлорофилл *a*, входит в качестве главного хлорофилла в реакционный центр, а в качестве вспомогательного хлорофилла - в светособирающий комплекс.

Каратиноиды - дополнительные пигменты фототрофных микроорганизмов. Они поглощают свет в спектральной области от 400 до 550 нм. Каратиноиды выполняют две функции: с одной стороны они участвуют в фотосинтезе как светособирающие пигменты; с другой стороны, они предохраняют хлорофилл от фотоокисления.

Строение каратиноидов.

Химическую структуру каратиноидов расшифровали в 1930-е годы швейцарский биохимик Пауль Кэррер (P. Karrer, Нобелевская премия по химии, 1937 г.) и австрийский химик Рихард Кун (R. Kuhn, Нобелевская премия по химии, 1938 г.). Основу молекулы каратиноида составляет изопреновая группа — изомер метилбутадиена (изопрена) с двойной связью, перемещенной в среднее положение:



Каратиноиды представляют собой отдельную группу полизопреноидов. Большинство из них относится к октапреноидам (восемь изопреновых единиц, т. е. 40 атомов углерода). Помимо этого встречаются «апокаратиноиды» с укороченным углеродным скелетом, а также «гомокаратиноиды», или высшие каратиноиды, которые содержат более восьми изопреновых единиц. Окрашенные каратиноиды имеют систему сопряженных двойных связей, и чем она протяженнее, тем интенсивнее окраска пигмента.

Каратиноиды подразделяют на две основные группы:

Каротины - это ациклические, терминально моноциклические и терминально бициклические полизопреноиды.

Ксантофиллы представляют собой кислородсодержащие производные каротинов, в которых имеются эпокси (-O-), гидрокси (-OH), кето (-CO-), метокси (-OCH₃) или формильные (-CHO) группы.

Различают ациклические каратиноиды и циклические каратиноиды. Последние содержат концевые циклогексеновые кольца с двойной связью в положении 5:6 или 4:5; циклопентановые кольца; арильные кольца с метильными заместителями в положениях 1,2,5 или 1,2,3.

В настоящее время известно до 700 каратиноидов. Некоторые группы фототрофных бактерий содержат специфический набор каратиноидов.

Пурпурные бактерии образуют только ациклические каратиноиды.

Цианобактерии синтезируют уникальные гликозилированные каратиноиды — миксоксантофилл и осциллоксантин, а также кетокаратиноиды — кантаксантин и эхиненон.

Фикобилины

Эти хромофоры близки по строению к тетрапиррольным пигментам животного происхождения - биливердину и билирубину, которые образуются при катаболизме гема эритроцитов и входят в состав желчи.

Фикобилины имеются только у цианобактерий и пластид водорослей некоторых классов.

Описаны четыре группы фикобилинов - фикоцианобилины, фикоэритробилины, фикоуробилины и фикобиливиолины.

Фотосинтезирующие бактерии - зеленые серные, пурпурные серные и пурпурные несерные — обитают в пресной и морской воде, во влажной и илистой почве, в прудах и

озерах со стоячей водой, в серных источниках и т. д. Для них характерны примитивные, древнейшие формы фотосинтеза.

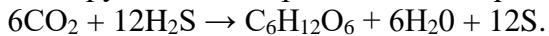
В клетках фотосинтезирующих бактерий имеются мезосомы, образующиеся в результате впячивания цитоплазматической мембраны. На мембранах мезосом находятся фотосинтезирующие пигменты и осуществляется световая фаза фотосинтеза, а темновая фаза происходит в цитоплазме.

Пигментные системы фотосинтезирующих бактерий несколько отличаются от таковых у растений. Хлорофиллоподобные пигменты бактерий называют *бактериохлорофиллами*. По своей структуре эти пигменты подобны хлорофиллам *a* и *b*, отличаясь от них лишь природой боковых цепей при некоторых атомах углерода.

В настоящее время известно пять типов бактериохлорофиллов — *a*, *b*, *c*, *d*, *e*. В реакционных центрах всех бактерий обнаружен *бактериофитин*, который отличается от бактериохлорофилла заменой центрального атома магния на два атома водорода. Основные каротиноидные пигменты также несколько отличаются от каротиноидов водорослей.

Энергия света поглощается молекулами бактериохлорофилла и каротиноидов, а затем передается реакционному центру, содержащему 2 или 4 особым образом упакованные молекулы бактериохлорофилла. Разделенные заряды переносятся через мембрану молекул этих бактериохлорофиллов, запуская электронный транспорт, обусловливающий образование АТФ, НАД · Н + Н⁺ или восстановленного ферредоксина. Почти у всех видов фотосинтезирующих бактерий найдены ферменты цикла Кальвина, значит, данные организмы способны фиксировать СО₂ в реакциях этого цикла.

Зеленые бактерии используют в качестве доноров электронов сероводород, серу или в некоторых случаях тиосульфат, а пурпурные бактерии — карбоновые и дикарбоновые кислоты, спирты и др. Наиболее распространенным донором электронов у фотосинтезирующих бактерий является сероводород (H₂S):

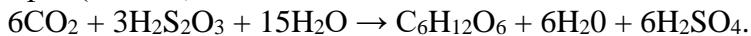


При недостатке H₂S сера, которая часто накапливается в клетке в виде капель, может утилизироваться как донор электронов. Суммарное уравнение этого процесса имеет следующий вид:



В этой реакции используются протоны воды, однако происходит не фотоокисление (H₂O → 2H⁺ + 2e⁻ + ½O₂), а лишь не требующая затраты энергии диссоциация (H₂O → 2H⁺ + OH⁻).

Подобным образом происходит реакция, в которой донором электронов служит тиосульфат (H₂S₂O₃):



Углеводороды являются не единственным и даже не всегда продуктом этих форм бактериального фотосинтеза.

Соединения, образующиеся в клетках зеленых и пурпурных бактерий, могут быть в дальнейшем использованы в качестве субстратов хемосинтезирующими анаэробами, которые, в свою очередь, продуцируют соединения, играющие роль питательных веществ у фототрофных бактерий. Следовательно, в анаэробных условиях бактерии этих двух типов могут существовать.

В природе также существует группа фототрофных бактерий — цианобактерии, которые осуществляют двухстадийный фотосинтез с разложением воды и выделением кислорода.

1. 8 Лекция №13-14 (4 часа).

Тема: «Биосинтетические процессы прокариот».

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Биосинтез углеводов
2. Биосинтез аминокислот
3. Биосинтез нуклеотидов
4. Биосинтез липидов

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

Клетки используют энергию для синтеза. Пути метаболизма организованы так, чтобы максимально экономить материалы и энергию. Многие пути – амфибolicкие. Использование разных ферментов для регуляции 2 направлений амфибolicких реакций, позволяет независимо регулировать оба направления. Биосинтез углеводов. Если источник углерода – одно-, двух- или трехуглеродные соединения, то необходимые сахара бактерии синтезируют из имеющихся в среде источников углерода. У подавляющего большинства автотрофов на среде с CO_2 в качестве единственного источника углерода сахара синтезируются в реакциях цикла Кальвина. Процесс, обеспечивающий синтез углеводов из не углеводных предшественников, например, аминокислот, глицерина, молочной кислоты, получил название глюконеогенеза. Таким путем, сочетающим использование имеющегося в клетке катаболического аппарата и специальных реакций, служащих только для биосинтетических целей, решается прокариотами проблема биосинтеза необходимых моносахаров. Фиксация углерода. Для автотрофов единственным источником углерода является CO_2 . Из 4 путей фиксации самым распространенным является цикл Кальвина.

ЦК составляют 3 фазы: карбоксилирование, восстановление и регенерации.

Глюконеогенез. Полисахаридные капсулы в цитоплазме или включения полимеров глюкозы или других C6 сахаров. Клеточная стенка синтезируется на основе глюкозофосфата. Моносахариды синтезируются из глюкозо- и фруктозо-6-фосфата. Важную роль в метаболизме играет уридин дифосфат глюкоза (УДФГ), с ее помощью осуществляется синтез крахмала и гликогена. Нуклеозиддифосфатные сахара также участвуют в синтезе пептидогликанов. Биосинтез липидов. Липиды: жиры, высокомолекулярные жирные кислоты, воска. К липидам относятся также соединения, молекула которых содержит изопреновые фрагменты: $\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, каротиноиды. Изопреновые компоненты входят в состав молекул хлорофиллов и хинонов. К липидам относятся и некоторые витамины, и их производные. У прокариот липиды входят в состав клеточных мембран и клеточной стенки, служат запасными веществами, являются компонентами пигментных систем и цепей электронного транспорта. Биосинтез нуклеотидов. Центральное место в биосинтезе мононуклеотидов занимает синтез пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований. Большинство прокариот способно к синтезу этих соединений *de novo* из низкомолекулярных предшественников. Синтез пуриновых и пиримидиновых мононуклеотидов осуществляется независимыми путями. Многие прокариоты способны использовать содержащиеся в питательной среде готовые пуриновые и пиримидиновые основания.

1. Биосинтез углеводов

Основные компоненты прокариотной клетки состоят из органических веществ – полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот, липидов, большинство из которых (исключая липиды) являются полимерами. Образованию полимеров предшествует биосинтез мономеров, их составляющих. На процессы биосинтеза мономеров и реакции их полимеризации расходуется большая часть энергии, получаемой клеткой в процессах катаболизма.

Прокариоты способны синтезировать моно-, олиго-, и полисахариды, а также и другие соединения, в состав которых входят углеводы.

Для прокариот-автотрофов исходным продуктом для синтеза углеводов является CO_2 . Фотосинтезирующие автотрофные микроорганизмы фиксируют CO_2 и осуществляют биосинтез углеводов также, как растения при фотосинтезе, через восстановительный пентозофосфатный цикл, или цикл Кальвина. Из клеток автотрофных прокариот выделены два специфических фермента этого цикла:

1. Фосфорибулокиназа, фосфорилирующая рибулозо-5-фосфат при участии АТФ в рибулозо-1,5-дифосфат, выступающий далее акцептором CO_2 .

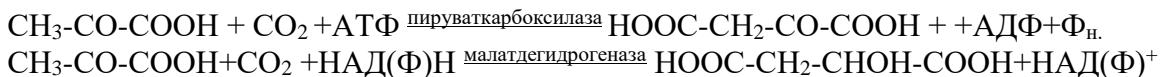
2. Рибулозодифосфаткарбоксилаза, катализирующая реакцию фиксации CO_2 рибулозо-1,5-дифосфатом с образованием двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты. 3-ФГК подвергается различным превращениям до получения глюкозы.

Подобным образом фиксируют CO_2 и ведут синтез углеводов хемосинтезирующие автотрофные микроорганизмы. Но они используют энергию АТФ, получаемую клеткой в результате реакций окисления неорганических веществ субстрата.

Моносахариды, образовавшиеся в результате фиксации CO_2 , используются на синтез олиго- и полисахаридов. Биосинтез полисахаридов осуществляется путем трансгликозилирования (переноса остатков моносахаридов на конец растущей цепи полисахарида) и всегда сопровождается затратой энергии.

Прокариоты-гетеротрофы способны синтезировать углеводы из C_2 и C_3 -соединений, используя при этом реакции гликолитического пути, идущие в обратном направлении.

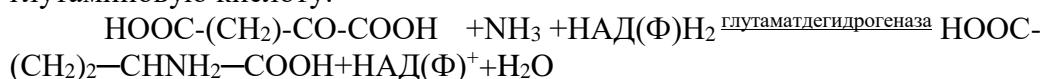
Все гетеротрофные микроорганизмы, помимо усвоения органических углерод содержащих веществ, фиксируют углекислый газ и используют его в реакциях анаболизма и катаболизма. Включение CO_2 в вещества клетки у гетеротрофных микроорганизмов происходит в реакциях карбоксилирования. В большинстве случаев акцепторами CO_2 выступают органические кислоты, например реакции карбоксилирования пировиноградной кислоты с образованием щавелевоуксусной (ЩУК) или яблочной кислот:



2. Биосинтез аминокислот

Большинство прокариот способны синтезировать все аминокислоты, входящие в состав их клеточных белков. Биосинтез аминокислот является примером связи процессов анаболизма и катаболизма. Предшественниками для синтеза аминокислот служат промежуточные продукты метаболизма, такие, как альфа-кетоглутаровая, щавелевоуксусная пировиноградная, 3-фосфоглицериновая кислоты и другие соединения. Источником азота обычно является аммиак или нитраты, нитриты, молекулярный азот.

Биосинтез аминокислот происходит различными путями. Наиболее простой путь – прямое аминирование кетокислот аммиаком. Так, альфа-кетоглутаровая кислота, взаимодействуя с аммиаком при участии фермента глутаматдегидрогеназы, образует глутаминовую кислоту:



Глутаминовая кислота служит донором аминогрупп при биосинтезе многих аминокислот и других азотсодержащих органических соединений. Подобным образом идет биосинтез аланина и аспарагиновой кислот.

В клетках гетеротрофных прокариот биосинтез аминокислот происходит в основном путем переаминирования аминокислот, поступающих из среды при участии ферментов аминотрансфераз.



Синтезируемые внутриклеточно аминокислоты полимеризуются в жизненно важные молекулы белков. Некоторые гетеротрофные прокариоты, например такие, как лактобациллы, не способны синтезировать все аминокислоты, поэтому их рост возможен только на сложных обогащенных питательных средах.

3. Биосинтез нуклеотидов. Нуклеотиды являются исходным материалом для биосинтеза нуклеиновых кислот и многих ко-ферментов. По химической природе нуклеотиды – сложные соединения, состоящие из азотистых оснований – производных пурина или пиридинина, углеводов типа пентоз и фосфорной кислоты. Однако, несмотря на сложность химической природы, большинство прокариот способны синтезировать нуклеотиды, используя низкомолекулярные предшественники.

Основным звеном биосинтеза нуклеотидов считается синтез пуриновых и пиридиновых азотистых оснований. Начальной стадией синтеза пуриновых нуклеотидов является взаимодействие 5-фосфорибозил-1-пирофосфата с глутамином с образованием фосфорибозиламина. Затем в реакцию включаются другие соединения – предшественники – и ряд последовательных ферментативных реакций завершается образованием инозиновой кислоты – пуринового нуклеотида. Она служит исходным продуктом для синтеза других нуклеотидов – адениловой и гуаниловой кислот, необходимых для синтеза РНК.

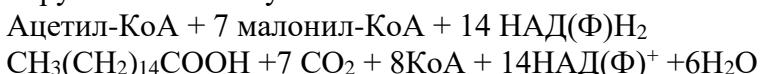
Первым пиридиновым нуклеотидом, синтезируемым из низкомолекулярных соединений, является оротидиловая кислота, которая декарбоксилируется с образованием уридиловой кислоты. Из последней путем аминирования образуется цитидиловая кислота-нуклеотид, содержащий цитозин, и путем ферментативного метилирования – тимидиловая кислота-нуклеотид, содержащий тимин.

Многие прокариоты способны утилизировать содержащиеся в среде пуриновые и пиридиновые основания и их нуклеозиды и нуклеотиды. Вновь синтезированные клеткой или усвоенные из среды нуклеотиды при участии РНК- и ДНК-полимераз полимеризуются в полинуклеотиды – молекулы РНК и ДНК.

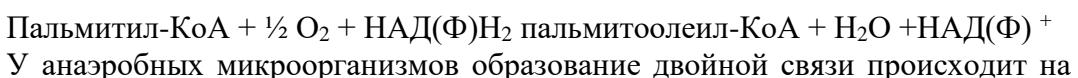
4. Биосинтез липидов

Липиды в клетке прокариот представлены химическими соединениями различной природы (триглицериды, фосфолипиды, гликолипиды, воска), выполняющими разные функции. Они входят в состав клеточных мембран, являются компонентами пигментных систем и транспорта электронов, выполняют роль запасных веществ. Исходными продуктами для биосинтеза липидов служат жирные кислоты, спирты, углеводы, фосфаты. Пути биосинтеза липидов сложны и протекают с затратой значительного количества энергии при участии многочисленных ферментов. Наиболее важны для жизнедеятельности клетки триглицериды и фосфолипиды.

Биосинтез жирных кислот с четным числом атомов углерода происходит в результате последовательного присоединения к молекуле ацетил-КоА двууглеродного остатка от малонил-КоА. Так, при биосинтезе пальмитиновой кислоты 1 молекула ацетил-КоА конденсируется с 7 молекулами малонил-КоА:



Важную роль в реакциях биосинтеза жирных кислот играет ацилпереносящий белок (АПБ) – переносчик ацильных групп. Последовательное наращивание двууглеродных остатков через ряд промежуточных продуктов приводит к образованию C₁₆-C₁₈-соединений. В клетках прокариот компонентами липидов могут являться ненасыщенные жирные кислоты, содержащие одну двойную связь. Образование двойной связи у аэробных микроорганизмов происходит при участии кислорода и специфического фермента десатуразы. Например, пальмитоолеиновая кислота образуется из пальмитил-КоА:



ранней стадии биосинтеза молекулы жирной кислоты в результате реакции дегидратации.

Исходным субстратом для синтеза фосфолипидов служит фосфодиоксиацетон – промежуточное соединение гликолитического цикла. Восстановление его приводит к образованию 3-фосфоглицерина, который, соединяясь с двумя остатками жирных кислот, продуцирует фосфатидную кислоту. Присоединение к ее фосфатной группе серина, инозина, этаноламина, холина заканчивается синтезом фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, фосфатидихолина, фосфатидилэтаноламина.

1.9 Лекция №15 (2 часа).

Тема: «Регуляция метаболизма прокариот».

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Неспецифические механизмы регуляции
2. Специфические механизмы регуляции
3. Специфические механизмы саморегуляции
4. Регуляция метаболизма прокариот

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

В бактериальной клетке совершается огромное количество биохимических процессов, завершающихся в конечном счете увеличением биомассы. Это предполагает наличие у нее совершенных механизмов саморегуляции, чутко реагирующих на все изменения условий ее жизни.

В настоящее время эти механизмы разделяют **на две основные группы**:

- а) группа неспецифических механизмов регуляции роста и размножения;
- б) группа специфических механизмов саморегуляции.

1. Неспецифические механизмы регуляции - совокупность действий различных физико-химических факторов, регулирующих общую скорость всех основных процессов жизнедеятельности - температура, pH, гН2, концентрация ионов, степень обеспечения среды кислородом, давление и др.

Неспецифический характер этой формы регуляции заключается в том, что она влияет, прежде всего, на общую кинетику биосинтетических процессов. Регулируя оптимальное соотношение всех указанных факторов, можно получить максимальную скорость размножения бактерий и максимальный выход биомассы в соответствующих производствах.

Действие физико-химических факторов опосредуется через специфические механизмы саморегуляции клетки. Она носит многоступенчатый характер и отличается выраженной универсальностью - специфическая саморегуляция связана с ферментами, катализирующими биохимические реакции, которые имеют одинаковую химическую природу. Взаимодействие на уровне фермент - субстрат является важнейшим пусковым моментом всей клеточной системы саморегуляции.

Именно на этом уровне происходит интеграция неспецифических и специфических механизмов саморегуляции клетки.

2. Специфические механизмы регуляции

Специфичность взаимодействия фермента с субстратом детерминирована генетически - она обусловлена последовательностью расположения аминокислот в белковой молекуле и определяемыми ею вторичной, третичной и четвертичной структурами молекулы фермента. В связи с этим никаких дополнительных механизмов регуляции на уровне фермент - субстрат не требуется. Синтезированный фермент готов в любой момент, если не изменена его аллостерическая структура, вступить в реакцию с соответствующим субстратом.

Как известно, **скорость ферментативной реакции можно выразить уравнением**

$$V=K+2[E0]/[S]/Km+[S],$$

где $K+2$ - константа субстрата; $E0$ - начальная концентрация фермента; Km - константа Михаэлиса; S - концентрация субстрата.

При малых величинах концентрации субстрата скорость реакции будет находиться в линейной зависимости от S , а при очень высокой концентрации субстрата скорость реакции будет стремиться к максимальной и мало зависеть от дальнейшего увеличения концентрации S . В свою очередь, при условии, когда $S > E0$, скорость реакции будет пропорциональна концентрации фермента.

Колебание температурного режима.

Скорость ферментативных реакций зависит также от концентрации водородных ионов. Величина оптимальной рН варьирует в зависимости от типа и свойств ферментов. Даже изоферменты, имеющие одинаковую специфичность к субстрату, могут различаться по оптимуму рН.

3. Специфический механизм саморегуляции скоростей отдельных биохимических реакций: конечный продукт реакции, взаимодействуя с молекулой фермента, так изменяет ее конформацию, что она временно утрачивает свою активность.

Этот принцип саморегуляции, получивший название регуляции по типу *отрицательной обратной связи*, или *торможения конечным продуктом*, носит универсальный характер.

С его помощью создаются идеальные условия для саморегуляции, так как он не требует никакой дополнительной затраты энергии и вещества. Запуск реакций, ведущих к превращению субстрата, осуществляется самим субстратом, а их остановка - конечным продуктом. Как только содержание конечного продукта достигает определенного уровня, дальнейший синтез его прекращается. Конечный продукт выступает в роли регулятора собственного синтеза.

Существует высшая форма клеточной саморегуляции, осуществляемая на генетическом уровне.

В соответствии с химическими сигналами, поступающими как из внешней среды, так и эндогенным путем, клетка автоматически запускает (индуцирует) или подавляет (репрессирует) синтез соответствующих ферментов.

Благодаря механизмам индукции и репрессии, реализуемым с помощью соответствующих генов (регуляторов, операторов, промоторов, аттенуаторов т.п.) и белков (репрессоров, активаторов, апорепрессоров и т.п.), клетка в соответствии с химическими сигналами осуществляет автоматический контроль биосинтеза необходимых ей в данное время ферментов.

Одним из проявлений регуляции синтеза ферментов на уровне генома служит постоянная или временная *катализитическая репрессия*. Суть ее в том, что некоторые источники углерода, принимающие участие в энергетическом обмене, например глюкоза, способны подавлять биосинтез определенных ферментов.

У бактерий обнаружены различные системы, способные воспринимать из внешней среды физические и химические сигналы. У многих патогенных бактерий (*E.coli*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) обнаружены термоиндуцильные системы, контролирующие синтез факторов патогенности. Например, у *E.coli* при температуре 18-20 °C практически не происходит синтез факторов адгезии (пилей). Повышение температуры до 37 °C индуцирует их образование. Такой же температурозависимый контроль синтеза факторов патогенности обнаружен у возбудителей чумы, дизентерии и других заболеваний. Целесообразность этих систем очевидна: факторы патогенности необходимы для обеспечения их существования в организме животных или человека, то есть при 37 °C.

Восприятие химических сигналов бактериями осуществляется с помощью так называемых сенсорно-регуляторных систем.

Сенсорно-регуляторная система состоит из белка-рецептора (сенсора), который располагается почти, но не всегда на мемbrane, и белка-регулятора, локализованного в цитоплазме.

Примером такой системы является система осмотической регуляции у *E.coli*: ее сенсором является белок EnvZ, а регулятором-белок OmpR. Белок EnvZ получает информацию из периплазмы, в которой располагается его N-концевой домен. С-концевой домен располагается в цитоплазме и в присутствии АТФ С-домен фосфорилируется, а затем передает фосфорную группу белку-регулятору OmpR. Этот белок контролирует работу двух генов - *ompC* и *ompF*, кодирующих синтез белковпоринов наружной мембраны.

При большом количестве взаимодействующих систем для их согласованности решающее значение имеет соблюдение **трех основных условий**:

во-первых, регулирования количественного и качественного состава самих ферментов в строгом соответствии с сигналами, поступающими из окружающей среды;

во-вторых, приспособляемости - корреляции между степенью физиологической активности клетки и условиями среды, которая возникает как следствие установления взаимосвязи между динамическими системами клетки;

в-третьих, внешних условий - наличия необходимых субстратов, температуры, pH и др., которые индуцируют одни системы и лимитируют активность других систем.

Целесообразность поведения живой системы складывается из совокупности согласованно протекающих в ней саморегулируемых и взаимосвязанных реакций, то есть она обусловлена самой организацией живой системы.

Конечным результатом регуляции протекающих в клетке биосинтетических и катаболитических процессов является воспроизведение потомства, а показателем сбалансированности функционирующих систем служит скорость роста бактерий.

4. Регуляция метаболизма прокариот.

Наряду с регуляцией экспрессии генов, которая может занимать до нескольких периодов генерации, клеткам требуется более оперативный и гибкий путь координации метаболической активности.

Микроорганизмы должны регулировать метаболизм для сохранения материалов и энергии в условиях постоянно меняющейся окружающей среды. Если *E. coli* выращивается на среде с единственным источником углерода – глюкозой, все пути функционируют, если добавить триптофан, угнетается путь его синтеза. Если перенести бактерию на среду с лактозой – запускается путь ее метаболизма.

Пути регулирования метаболических путей:

- Комpartmentация.
- Аллостерическая регуляция.
- Ковалентная модификация.

Комpartmentация.

Цитоплазма – достаточно плотная и вязкая среда и молекулы затрачивают некоторое время на диффузию. В клетке может формироваться разность концентраций метаболитов. Отсутствие мембранных органоидов у прокариот значительно усложняет регуляцию катаболических и анаболических процессов. Все они протекают в гомогенной цитоплазме.

Комpartmentы прокариотической клетки:

- Цитоплазма;
- Плазматическая мембрана;
- Периплазматическое пространство;
- Наружная мембрана;
- Наружная поверхность и примыкающее внеклеточное пространство.

Аллостерическая регуляция.

Аллостерические ферменты имеют 2 активных сайта – каталитический и аллостерический. Связывание молекулы-регулятора с аллостерическим сайтом вызывает изменение конформации фермента, каталитический сайт получает или теряет способность связывать молекулу субстрата.

Обратная связь.

Ингибиование по типу обратной связи - конечным продуктом. Характерный механизм для анаболических реакций. Конечный продукт в некоторых случаях может связываться с аллостерическим сайтом первого специфического фермента пути. Накопление продукта – сигнал о прекращении его синтеза, что позволяет избежать накопления промежуточных продуктов.

Адаптация бактерий.

В отличие от растений и животных, большинство бактерий живут в постоянно изменяющихся условиях среды. Они способны реагировать на изменения, корректируя структурные протеины, транспортные белки, токсины, ферменты. Например *E. coli* не продуцирует фимбрии, когда свободно живет в толще воды. *Vibrio cholerae* не продуцирует холерный токсин, вне ЖКТ. *Bacillus subtilis* не синтезирует фермент для синтеза триптофана если в среде есть его предшественники. *Neisseria gonorrhoeae* развивает сложную систему поглощения и транспорта железа, если его не хватает в среде. Хемотаксис. Ферменты также могут участвовать в контроле поведения.

У *E. coli* имеется два типа движения: прямое (жгутик против часовой стрелки) и колебательное (по часовой стрелке). В гомогенной среде клетка движется случайно без определенного направления. При наличии химического градиента, частота колебаний снижается если клетка приближается к аттрактанту. Механизм включает хеморецептор, определяющий наличие субстрата. Фосфорилирующая система (сенсорная киназа и регулятор ответа), воздействует на мотор жгутика. Положительный таксис увеличивает число прямых движений, отрицательный – колебательных.

У прокариот основные положения теории регуляции биосинтеза белка:

1. Регуляция происходит только на уровне транскрипции. Первичные транскрипты генов у них транслируются до завершения транскрипции.

2. Неоднородность геномов. В геноме есть структурные гены и есть регуляторные области, которые могут включать регуляторные элементы и регуляторные гены. Структурные гены кодируют синтез структурных и функциональных белков. Регуляторные элементы не кодируют синтез белков вообще, но влияют на процесс транскрипции.

3. Регуляция биосинтеза белков у прокариот протекает альтернативно путём репрессии и индукции.

1.10 Лекция №16 (2 часа).

Тема: «Фиксация молекулярного азота».

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Характеристика клубеньковых бактерий (ризобий).

1.10.2 Краткое содержание вопросов:

В 1886 г. русский ученый М. С. Воронин в одной из своих работ описал бактерии, обнаруженные им в клубеньках, и высказал предположение об их непосредственной связи с образованием клубеньков. Выделить бактерии из клубеньков в чистую культуру удалось в 1888г. М. Бейеринку. Он назвал их *Bact. radicicola*. Вскоре после этого такие же бактерии из клубеньков выделил Б. Франк и дал им название *Rhizobium*, которое и принято в настоящее время. Была установлена способность микробов в симбиозе с бобовыми

фиксировать молекулярный азот. Это было великое открытие XIX в. К. А. Тимирязев по этому поводу писал: «Едва ли в истории найдется много таких открытий, которые были бы таким благодеянием для человечества, как включение клевера и вообще бобовых растений в севооборот, так поразительно увеличивших производительность труда землемельца». По расчетам некоторых исследователей (Е. Н. Мишустин с соавт., 1983), примерно около 70% азота, который растения берут из почвы, накоплено биологическим путем. Такой азот не только дешев, но и безвреден. Велика роль в этих процессах микроорганизмов, находящихся в клубеньках бобовых растений.

1. Характеристика клубеньковых бактерий (ризобий).

Клубеньковые бактерии могут быть овальной, палочковидной или разветвленной (бактероиды) формы. Палочковидные формы обычно слегка изогнуты. У клевера они более толстые и короткие, у гороха и вики — длиннее. Клубеньковые бактерии люпина и фасоли более изогнутые. В молодом возрасте клетки подвижные, причем количество жгутиков и их расположение у медленно- и быстрорастущих бактерий разные. Медленнорастущие — монотрихи, быстрорастущие — перитрихи. Клубеньковые бактерии хорошо окрашиваются эритрозином и метиленовым голубым. По Граму не окрашиваются. Из всех форм наибольший интерес представляют разветвленные (бактероиды), они появляются при старении культуры, не способны размножаться, но с их появлением фиксация азота из воздуха возрастает.

По скорости роста на питательных средах клубеньковые бактерии делят на две группы: 1) быстрорастущие (колонии на плотных питательных средах появляются через четверо суток), к ним относятся клубеньковые бактерии гороха, клевера, люцерны, кормовых бобов, вики, чины, донника, фасоли и др.; 2) медленнорастущие, их размножение происходит в 2 раза медленнее, колонии появляются на 7—8-е сутки. Такие бактерии содержатся в клубеньках люпина, сои, арахиса, сераделлы и других растений.

Растут клубеньковые бактерии на маннитном агаре, образуя на поверхности среды колонии белого цвета слизистой консистенции. Колонии медленнорастущих культур мельче, чем быстрорастущих. Каждое бобовое растение имеет свои клубеньковые бактерии.

В клубеньках бобовых могут содержаться активные и неактивные штаммы бактерий. Если клубеньки мелкие, то в них чаще встречаются неактивные штаммы, то есть такие, которые вместе с бобовыми плохо усваивают атмосферный азот. Они характеризуются высокой вирулентностью. Кроме того, образование большого количества клубеньков не только не способствует усвоению азота, но они сами используют тот азот, который растение получает из почвы, то есть ведут паразитический образ жизни. Рост растений с большим количеством мелких клубеньков угнетается. Среди бобовых имеются и такие, которые не образуют клубеньки на корнях. Они составляют примерно около 9% общего количества бобовых.

При образовании меньшего количества крупных розовых клубеньков растения получают больше азота, повышается урожай. Розовый цвет ткани клубенька обуславливает содержание в нем леггемоглобина — гемоглобина бобовых растений. Такой пигмент в клубеньках сои обнаружен в 1939 г. японским исследователем Х. Кубо. Он образуется только в симбиотической системе клубеньковые бактерии — растение. Вне симбиоза клубеньковые бактерии и бобовые растения не синтезируют гемоглобин. В связи с этим его рассматривают как фактор, принимающий участие в симбиотической фиксации азота. По-видимому, гемоглобин превращает гидроксиламин в аммиак, выполняет роль переносчика и регулятора кислорода в симбиотической системе. Бобовые растения в симбиозе с клубеньковыми бактериями способны фиксировать в среднем до 200 кг азота на 1 га почвы, причем 2/3 его берут из воздуха и 1/3 — из минеральных соединений почвы.

Первый стабильный продукт биологической азотфиксации — аммиак. Он образуется в результате повышения активности инертного азота ферментом нитрогеназой

и последующего соединения его с водородом. Нитрогеназа — специфический ферментативный комплекс, состоящий из двух белков: в один из них входят молибден и железо, в другой — только железо. Обязательный компонент азотфикссирующей системы — негеминовый железосодержащий белок ферредоксин, который служит донором электронов, то есть восстановителем. Для восстановления одной молекулы азота затрачивается 12 молекул АТФ. Реакция идет по схеме $N_2 + 3H_2 + 12 \text{ АТФ} \rightarrow 2NH_3 + 12 \text{ АДФ} + 12 \text{ ФН}$. Аммиак соединяется с кетокислотами бактерий, которые превращаются в аминокислоты, используемые затем растениями. Фиксация молекулярного азота происходит в видоизмененных клубеньковых бактериях — бактеридах.

Формировать клубеньки и фиксировать азот воздуха в симбиозе с другими микроорганизмами могут и небобовые растения. На корнях некоторых из них (ольха, облепиха, береза, хвойные) имеются образования, подобные клубенькам бобовых, в которых симбионтами являются не бактерии, а грибы. По эффективности фиксации

молекулярного азота такие растения не уступают бобовым. Следовательно, микроорганизмы могут фиксировать азот из воздуха в симбиозе не только с бобовыми, но и другими растениями.

Нитрагин. Наблюдения показали, что бобовые растения дают высокий урожай и обогащают почву азотом в том случае, если на корнях имеются крупные клубеньки. Бобовые плохо растут на почвах, где впервые культивируются и где нет соответствующих клубеньковых бактерий. Это обстоятельство привело к попытке обогатить ими почву. Наиболее простой метод обогащения почвы клубеньковыми бактериями — перенос земли с поля, на котором бобовые давали хороший урожай. Подобные опыты были проведены в 1887 г. Сальфельдом на опытной станции в Бремене (Германия). Установлено, что на почве из-под бобовых урожай был значительно выше, чем в контроле, где отсутствовали клубеньковые бактерии. В дальнейшем обогащение почвы бактериями проводили путем рассева земли из-под бобовых. Такой метод очень трудоемкий, так как требовалось переносить большие количества земли, при этом он и небезопасен в смысле распространения фитопатогенных микроорганизмов и семян сорных растений. Все это требовало разработки других, более совершенных методов инокуляции. Лучшим оказался метод использования чистых культур клубеньковых бактерий.

Впервые бактериальный препарат был изготовлен в 1896 г. Ф. Ноббе и Л. Гильтнером (Германия) и назван нитрагином. И Россия подобная работа (1907) была проведена Л. Т. Будиновым. Массовое производство нитрагина в нашей стране начато в 1929 г., когда была получена первая крупная партия препарата, которую вносили под сою. С этого времени начинают создаваться первые специальные производственные лаборатории для изготовления бактериального удобрения, а затем и заводы.

Микробиологическая промышленность выпускает две формы нитрагина: ризоторфин и ризобин — *Ризоторфин* представляет собой смесь клубеньковых бактерий со стерильным торфом. Культуру клубень-конь: бактерий, предназначенную для определенного вида бобового растения, вначале выращивают на агаризованной среде, в состав которой входит отвар семян бобовых и 1% сахарозы. Полученную лабораторную культуру вносят за)ем в производственный ферментер и культивируют в течение 50—70 ч при температуре 28—30°C в аэробных условиях, для чего в среду (рН 6,5—7,2) подают стерильный воздух. В процессе культивирования численность микробных клеток в 1 мл среды возрастает до 1 млн. Такую культуру смешивают со стерильным торфом.

Наполнитель высушивают, размалывают, нейтрализуют $CaCO_3$, помещают в полиэтиленовые пакеты, которые запаивают и стерилизуют γ -лучами. В такой пакет стерильной иглой вводят инокулят. Отверстие в пакете заклеивают липкой лентой. Содержимое тщательно перемешивают и выдерживают в течение 2—4 недель при 26°C. За это время численность клубеньковых бактерий резко возрастает.

Ризобин (сухой нитрагин) представляет собой высущенную культуру клубеньковых бактерий с наполнителем. Клетки бактерий от среды отделяют сепарированием, после

чего к ним добавляют защитную среду (20% мелассы и 1% тиомочевины) и высушивают под вакуумом при температуре 30—35°C. Сухую биомассу (влажность 2—5%) размалывают, смешивают с наполнителем (бентонит) и фасуют в влагозащитные мешки. В 1 г препарата должно быть не менее 9 млрд. жизнеспособных клубеньковых бактерий.

1.11 Лекция №17-18 (4 часа).

Тема: «Генетические механизмы эволюции прокариот».

1.11.1 Вопросы лекции:

- 1 Характеристика генома микроорганизмов.
- 2 Мутационная изменчивость.
- 3 Рекомбинантная изменчивость.

1.11.2 Краткое содержание вопросов:

- 1 Характеристика генома микроорганизмов.

Генетика – наука о законах и механизмах наследственности и изменчивости. Генетика бактерий имеет также и прикладной интерес, поскольку позволяет установить механизмы передачи патогенных свойств и возникновения устойчивости к лекарственным препаратам. Генетические исследования базируются на изучении бактерий, поскольку последних отличает относительная простота строения генома, позволяющая выявлять мутанты; гаплоидный набор генов, исключающий явление доминантности; половая дифференциация в виде донорских и реципиентных клеток; наличие обособленных и интегрированных фрагментов ДНК (плазмиды, транспозоны); легкость культивирования и возможность получения популяций, содержащих большое количество микробных клеток.

Генетический материал бактерий представлен нуклеоидом. Нуклеоид – компартмент неправильной формы внутри клетки прокариот, в котором находится генетический материал. Она суперспирализирована (от 12 до 80 петель), замкнута в кольцо. Одной точкой крепится к ЦПМ. Содержит от 3 до 5 тысяч генов (у человека 3,5·10⁶ генов). При делении ДНК никогда не изменяет своей длины и толщины. Удвоение ДНК всегда сопровождается делением. ДНК составляет примерно 60 % от массы нуклеоида, в его состав также входят матричная РНК и белки, регулирующие экспрессию генов бактериального генома. В состав нуклеоида входят также структурные белки, которые способствуют компактизации ДНК.

Многие бактерии наряду с хромосомной ДНК содержат и внекромосомную ДНК, тоже представленную двойными спиралями, замкнутыми в кольцо. Эти автономно реплицирующиеся элементы ДНК называют плазмидами. Термин «плазмида» впервые ввел американский ученый Д. Ледерберг в 1952 году для обозначения полового фактора бактерий.

Плазмиды представляют собой замкнутые в кольцо двухцепочечные молекулы ДНК, несущие до 50 генов. Выделяют автономные и интегрированные плазмиды. Автономные существуют в цитоплазме бактерий и способны самостоятельно размножаться. В клетке может содержаться несколько копий таких плазмид. Интегрированные (интегративные, эпизомы) плазмиды встроены в бактериальную хромосому, размножаются вместе с ней.

Кодирующие плазмиды привносят в бактериальную клетку новую генетическую информацию, кодирующую новые, необычные свойства (например, устойчивость к антибиотикам).

В соответствии с определенными признаками, кодируемыми плазмидными генами, выделяют группы плазмид:

F-плазмиды контролируют синтез F-пилей, способствующих спариванию бактерий-доноров с бактериями-реципиентами. Такие плазмиды могут быть автономными или интегрированными.

R-плазмиды несут гены, обуславливающие резистентность к антибиотикам, сульфаниламидным препаратам. Бактерии, устойчивые (резистентные) к некоторым антибиотикам, были впервые открыты в 50-е годы в Японии. Речь идет о штаммах возбудителя дизентерии *Shigella*, выделенных от больных, которых лечили антибиотиками. Характерно то, что бактерии обнаруживали множественную устойчивость и что эта устойчивость могла передаваться другим бактериям, таким как *Escherichia coli*.

Плазмиды бактериоциногении – кодируют синтез бактериями белков (бактериоцинов), убивающих родственные виды или штаммы или тормозящие их рост. Такие плазмиды содержатся в количестве 1-2 копий на клетку, передаются при конъюгации, репликация связана с репликацией бактериальной хромосомы.

Плазмиды патогенности кодируют вирулентные свойства многих микроорганизмов.

Скрытые плазмиды не содержат генов, позволяющих обнаружить их по фенотипическим проявлениям.

Плазмиды биодеградации кодируют ферменты, необходимые для деградации природных (мочевина) и неприродных (камфора, нафталин) соединений – источников углерода и энергии для некоторых видов бактерий.

Плазмиды, вероятно, играли очень важную роль в эволюции прокариот.

В составе бактериального генома (как в бактериальной хромосоме, так и в плазмidaх) также обнаруживаются подвижные (мигрирующие) генетические элементы. К таким элементам относят вставочные последовательности и транспозоны.

Вставочные (инсерционные) последовательности, IS-элементы – это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами. Величина их не превышает 1500 п.о., самостоятельно не реплицируются и не кодируют распознаваемых фенотипических признаков. Они содержат лишь те гены, которые необходимы для их собственного перемещения – транспозиции: ген, кодирующий фермент транспозазу, обеспечивающую процесс исключения IS-элемента из ДНК и его интеграцию в новый локус.

Перемещение подвижных генетических элементов принято называть репликативной или незаконной рекомбинацией. Однако, в отличие от бактериальной хромосомы и плазмид, подвижные генетические элементы не являются самостоятельными репликонами, так как их репликация – составной элемент репликации ДНК репликона, в составе которого они находятся.

Транспозоны (Tp) представляют собой короткие двойные цепи ДНК, которые состоят из более чем 2000 пар оснований и обычно обуславливают устойчивость к одному антибиотику, в исключительных случаях – к нескольким. Транспозоны способны «перепрыгивать» из одного участка генома в другой, в частности из бактериальной хромосомы в плазмиду и обратно; таким образом, они могут включаться в различные участки генома. В случае внедрения транспозона в какой-либо структурный ген хромосомы нуклеотидная последовательность этого гена будет нарушена и генетическая информация не сможет транслироваться в функционально полноценный полипептид. Возникнет инсерционный мутант.

Поскольку транспозоны не способны к автономной репликации, для переноса их из одной бактериальной клетки в другую необходим так называемый вектор (переносчик). Векторами могут служить плазмиды или бактериофаги.

Перемещаясь по репликону или между репликонами, подвижные генетические элементы вызывают:

1. Инактивацию генов тех участков ДНК, куда они, переместившись, встраиваются.

2. Образование повреждений генетического материала.
3. Слияние репликонов, т. е. встраивание плазмиды в хромосому.
4. Распространение генов в популяции бактерий, что может приводить к изменению биологических свойств популяции, смене возбудителей инфекционных заболеваний, а также способствует эволюционным процессам среди микробов.

В геноме патогенных бактерий имеются участки ДНК протяженностью не менее 10000 п.о., которые отличаются от основного генома составом Г-Ц пар н.о. Эти участки ответственны за синтез факторов патогенности микроорганизмов, поэтому названы «островками патогенности». Большинство островов патогенности локализовано в хромосоме (*Salmonella*), но также они могут находиться в составе плазмид (*Shigella*) и фаговых ДНК (*V. cholerae* O1, 0139).

2. Мутационная изменчивость.

В основе изменчивости лежит либо изменение реакции генотипа на факторы окружающей среды, либо изменение самого генотипа в результате мутации генов или их рекомбинации. В связи с этим фенотипическую изменчивость подразделяют на наследственную и ненаследственную.

Ненаследственная (адаптивная, модификационная) изменчивость обусловлена влиянием внутри- и внеклеточных факторов на проявление генотипа. При устраниении фактора, вызвавшего модификацию, данные изменения исчезают. Роль фенотипических изменений – обеспечение выживаемости микробных популяций в изменившейся внешней среде.

Наследственная (генотипическая) изменчивость играет большую роль в эволюции микроорганизмов. В ее основе лежат мутации и рекомбинации. Они происходят в структуре ДНК и проявляются в стабильности изменений каких-либо свойств. Основу мутации составляют изменения последовательности нуклеотидов в ДНК, полная или частичная их утрата, т. е. происходит структурная перестройка генов, проявляющаяся фенотипически в виде измененного признака.

Мутация – изменение первичной структуры ДНК, проявляющееся наследственно закрепленной утратой или изменением какого-либо признака или группы признаков.

Типы мутаций. В популяции бактерий без всякого экспериментального вмешательства регулярно возникают мутации; такие мутации называют спонтанными мутациями, а клетки, в которых они возникли, – спонтанными мутантами.

Обрабатывая клетки мутагенными (вызывающими мутации) веществами, можно повысить частоту мутаций. В этом случае говорят об индукции мутаций, а полученные при этом клетки называют индуцированными мутантами. Мутагенами могут быть химические (азотистая кислота и её аналоги и др.), физические (УФ-лучи, γ -радиация) или биологические агенты (транспозоны).

Как спонтанные, так и индуцированные мутации являются результатом нарушения нуклеотидной последовательности в ДНК. Они могут затрагивать либо только один ген (генные мутации), либо большее количество генов (хромосомные мутации).

По протяженности изменений повреждения ДНК различают:

Точечные – повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов. Их классифицируют на транзиции – одно пуриновое основание замещается на другое (аденин на гуанин или наоборот), либо происходит аналогичная замена пиримидиновых оснований (тимин с цитозином); и трансверсии – пуриновое основание замещается на пиримидиновое основание или наоборот.

Протяжённые (аберрации) – затрагиваются несколько пар нуклеотидов, возникают вследствие перемещения подвижных генетических элементов. В последнем случае возможны:

Делеции – выпадение нескольких пар нуклеотидов;

Дупликации – добавление нуклеотидных пар;

Транслокации – перемещение фрагментов хромосомы;

Инверсии – перестановка нуклеотидных пар.

По влиянию на экспрессию генов мутации разделяют на две категории: мутации типа замен пар оснований и типа сдвига рамки считывания.

Последние представляют собой делеции или вставки нуклеотидов, число которых не кратно трём, что связано с триплетностью генетического кода. Мутации со сдвигом рамки, обусловленные вставкой или выпадением нуклеотида, нарушают нормальную последовательность «считывания» нуклеотидных триплетов. В процессе репликации ДНК в новообразованную комплементарную цепь «напротив» вставленного нуклеотида также включается лишний нуклеотид. При последующей репликации продолжают синтезироваться цепи с лишним основанием.

На жизнеспособности клетки точковые мутации сказываются по-разному. Транзиции и трансверсии – сравнительно «мягкие» мутации, поскольку в худшем случае обусловливают замену только одной аминокислоты в соответствующей полипептидной цепи (а иногда в силу вырожденности генетического кода вообще не происходит аминокислотной замены). Дефектный белок с одной замененной аминокислотой функционально не отличается от нормального белка.

В этом случае говорят о «молчащих» мутациях (не вызывают изменения аминокислотной последовательности белка), также различают миссенс-мутации – появление в полипептиде новой аминокислоты, нонсенс-мутации – образование кодонов-терминаторов, вызывающих преждевременное прекращение синтеза полипептидной цепи.

Теоретически, мутации могли бы привести к вымиранию бактериальной популяции. Этого не происходит, поскольку в клетке существуют механизмы, обеспечивающие полное или частичное восстановление исходной структуры ДНК. Совокупность ферментов, катализирующих коррекцию повреждений ДНК, объединяют в системы репарации.

3. Рекомбинантная изменчивость.

Длительное время считалось, что изменчивость бактерий обусловлена только мутациями. Однако в 40х гг 20 века было установлено, что бактерии способны обмениваться генетическим материалом между собой, давая начало потомству с новыми свойствами.

Взаимодействие между двумя ДНК, обладающими различными генотипами, которое приводит к образованию рекомбинантной ДНК, сочетающей гены обоих родителей, получило название генетической рекомбинации.

Особенность рекомбинации бактерий в том, что у них гаплоидный набор генов, отсутствует половое размножение. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые его воспринимают.

Передача генетического материала от клетки-донора к клетке-реципиенту может осуществляться с помощью конъюгации, трансформации и трансдукции.

Конъюгация бактерий состоит в переходе генетического материала (ДНК) из клетки-донора («мужской») в клетку-реципиент («женскую») при контакте клеток между собой.

«Мужская» клетка содержит F-фактор, или половой фактор, который контролирует синтез половых пилей, или F-пилей. Клетки, не содержащие F-фактора, являются «женскими»; при получении F-фактора они превращаются в «мужские» и сами становятся донорами. F-фактор является плазмидой. При конъюгации F-пили соединяют «мужскую» и «женскую» клетки, обеспечивая переход ДНК через конъюгационный мостик или F-пили. Переносимая ДНК взаимодействует с ДНК реципиента – происходит гомологичная рекомбинация.

При конъюгации происходит только частичный перенос генетического материала, поэтому ее не следует отождествлять полностью с половым процессом у других организмов.

Трансдукция – передача ДНК от бактерии-донора к бактерии-реципиенту при участии бактериофага. Открытие трансдукции связано с именем американского учёного Джошуа Ледерберга.

Различают:

Общую трансдукцию – при внутриклеточном размножении фага происходит разрушение бактериальной хромосомы и отдельные случайные фрагменты её включаются в созревающие частицы фагов.

Специфическую трансдукцию – формирующийся фаг при исключении из хромосомы может включать в свой геном рядом расположенные фрагменты бактериальной хромосомы.

Абортинную трансдукцию – фрагмент хромосомы донора, принесённой фагом в реципиентную клетку, не включается в хромосому и не реплицируется, а располагается в цитоплазме.

Трансформация заключается в том, что ДНК, выделенная из бактерий в свободной растворимой форме, передается бактерии-реципиенту.

Впервые явление трансформации описал Ф. Гриффит (1928). Он вводил мышам живой невирулентный бескапсулный R-штамм пневмококка и одновременно убитый вирулентный капсулный S-штамм пневмококка. Из крови погибших мышей был выделен вирулентный пневмококк, имеющий капсулу убитого S-штамма пневмококка. Таким образом, убитый S-штамм пневмококка передал наследственную способность капсулообразования R-штамму пневмококка. О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти (1944) доказали, что трансформирующим агентом в этом случае является ДНК. Путем трансформации могут быть перенесены различные признаки: капсулообразование, устойчивость к антибиотикам, синтез ферментов.

Трансформирующей активностью обладает лишь высоко-молекулярная ($M \geq 105$) двухцепочечная ДНК, хотя в геном реципиента включается только одна цепь, а другая разрушается ДНК-азой реципиентной клетки.

Оптимальное физиологическое состояние клеток, в котором они способны к поглощению чужеродной ДНК, называется компетентностью. Компетентность обусловлена появлением на поверхности клетки особого антигена – фактора компетентности, который является низкомолекулярным белком и играет роль специфического ДНК-связывающего рецептора. В период развития компетентности происходят изменения структуры клеточной стенки, в результате чего стенка становится более пористой и проницаемой для ДНК.

Процесс трансформации разделяют на несколько стадий:

- 1) присоединение ДНК к поверхностным рецепторам реципиентной клетки;
- 2) проникновение ДНК в клетку;
- 3) превращение проникшей двухцепочечной ДНК в одноцепочечную;
- 4) рекомбинация проникшей ДНК с ДНК реципиента;
- 5) фенотипическое выражение поглощенного гена (или генов).

Знания о генетике микроорганизмов применяются для обнаружения микробы в исследуемом материале без выделения чистой культуры, так и для определения таксономического положения, внутривидовой идентификации.

1.12 Лекция №19 (2 часа).

Тема: «Полимеразная цепная реакция».

1.12.1 Вопросы лекции:

1. История открытия ПЦР. Сущность метода.
2. Этапы полимеразной цепной реакции.
3. Применение в микробиологии.

1.12.2 Краткое содержание вопросов:

1. История открытия ПЦР. Сущность метода.

XXI век можно без преувеличения назвать веком молекулярной биологии и биотехнологии, поскольку накоплен достаточный объем знаний о строении биологических систем не только на макро-, но и на микроуровне. Эти знания представляют ценность прежде всего в аспекте их практического применения. Знания о ДНК как универсальном носителе наследственной информации всех клеточных организмов (бактерий, грибов, растений, животных и человека), о ее структуре и функционировании способствовали появлению совершенно новых направлений современной биологической науки, имеющих прикладное значение.

Идея полимеразной цепной реакции осенила изобретателя мгновенно и, как кажется, абсолютно непредсказуемо. Но это только на первый взгляд, поскольку мы помним слова отца микробиологии Л.Пастера, которому принадлежит известная фраза - Удача одаривает только подготовленные умы. Весной поздним вечером вместе с подругой Кэри Мюллис, 39-летний химик-синтетик из калифорнийской биотехнологической фирмы Cetus, ехал в автомобиле в свой загородный дом, когда он догадался о возможности многократного увеличения числа копий участков ДНК в пробирке в процессе реакции, главной особенностью которой являются повторяющиеся температурные циклы, за что, спустя 9 лет, получил Нобелевскую премию по химии. Метод ПЦР назван "изобретением века", поскольку он не только ускорил реализацию программы "Геном человека", но, прежде всего, способствовал повышению эффективности клинической диагностики многих заболеваний человека и животных.

В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляющее с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция называется репликация ДНК.

2. Этапы полимеразной цепной реакции.

Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий:

- 1) Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК).
- 2) Инициация - образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК).
- 3) Элонгация - синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей).

ПЦР имитирует естественный процесс репликации (размножения) ДНК *in vitro*, в результате чего, в течение нескольких часов из одного фрагмента молекулы ДНК можно получить более 50 млрд. идентичных молекул. Помним, что репликация ДНК может начаться не в любой точке, а только в определенных стартовых блоках - коротких дупнитевых участках.

Суть метода заключается в том, что маркировав такими блоками специфический только для данного вида организма (но не для других видов) участок ДНК, можно многократно воспроизвести именно этот участок.

Для того чтобы осуществить такой процесс в пробирке, используют две генетические пробы, называемые праймерами, которые и служат в качестве затравки для синтеза выбранного участка ДНК. При внесении в исследуемую пробу праймеры

«прочесывают» раствор в поисках участка, которому они комплементарны и, следовательно, способны присоединится, образовав двунитчатый стартовый участок.

После присоединения праймеров начинается воспроизведение с помощью фермента полимеразы специфического фрагмента [ДНК](#). Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле - это и есть цепная реакция в ПЦР. В результате количество копий фрагмента увеличивается в геометрической прогрессии и в течение 30-40 циклов нарабатывается количество ДНК, достаточное, чтобы визуально учитывать результаты реакции.

Полимеразная цепная реакция – искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфического фрагмента ДНК, осуществляемый *in vitro*.

Открытие возможности избирательной наработки определённых участков ДНК с помощью ПЦР, произвело, по существу, революционный переворот во взглядах исследователей, и было взято на вооружение представителями различных дисциплин.

Схема ПЦР-диагностики включает следующие этапы:

1. Пробоподготовка (выделение нуклеиновой кислоты).
2. Собственно ПЦР.
3. Детекция продуктов амплификации.

1 этап. Пробоподготовка или выделение ДНК (РНК). Проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, и получение раствора ДНК или РНК. В процессе выделения нуклеиновой кислоты необходимо предотвратить влияние ингибиторов ПЦР, сконцентрировать нуклеиновую кислоту в объеме, соответствующем формату ПЦР, и предотвратить действие ДНКаз и РНКаз. В качестве исходной матрицы для ПЦР может быть использована ДНК, выделенная как из свежеполученных клеток и тканей, так и из замороженных, высушенных или фиксированных препаратов, имеющих частично деградированные нуклеиновые кислоты, т. е. объекты, ранее недоступные для анализа. Так, с помощью ПЦР была амплифицирована, клонирована и секвенирована ДНК египетской мумии, именно с помощью метода ПЦР были идентифицированы останки семьи Романовых.

2 этап. Собственно ПЦР или амплификация (*amplification* – англ. умножение, усиление). Для её проведения необходимы следующие компоненты:

ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент).

Праймеры – это химически синтезированные олигонуклеотидной природы затравки для ПЦР, определяющие границы (фланкирующие) амплифицируемого участка ДНК-матрицы и комплементарные противоположным её цепям.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (дАТФ, дТТФ, дГТФ и дЦТФ) в реакционной смеси содержатся в эквивалентных концентрациях, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов в ПЦР.

Фермент Таq-полимераза (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК). Таq-полимераза была выделена у микроорганизмов, обитающих в гейзерах - *Thermus aquaticus*.

Магний необходим для функционирования фермента Таq-ДНК-полимеразы.

Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента. Наиболее распространен трис-НС1-буфер, который удерживает pH во время ПЦР между 6,8 и 7,8, содержит желатин или бычий сывороточный альбумин и неионные детергенты для стабилизации фермента.

Минеральное масло наслаждается на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения в процессе ПЦР.

Амплификация состоит из повторяющихся циклов, которые делятся на этапы. Каждый этап протекает при определённом температурном режиме, который разработчики

подбирают опытным путём, поэтому значения температур для конкретного этапа могут варьировать в достаточно широком диапазоне.

I этап: Денатурация ДНК (плавление), когда рвутся водородные связи и получается две ниточки. Осуществляется при температуре 93⁰ - 95⁰С в течение 30-40 сек.

II этап: Отжиг праймеров, т.е. их присоединение. Осуществляется при температуре 50⁰ - 65⁰С. Праймеры комплементарны последовательности ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что дстраивание новой цепи протекает только между ними.

К подбору праймеров предъявляют определённые требования:

1. Они должны быть комплементарны определённому участку ДНК и не должны быть комплементарны друг другу.

2. Чтобы исключить отрицательный результат, в случае появления мутации, праймеры для ПЦР-детекции инфекционных возбудителей создают на консервативных участках их ДНК, которые редко подвергаются генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

3. Праймер должен иметь длину 20—30 нуклеотидов. Чем больше нуклеотидов в праймере, тем специфичнее ПЦР, поскольку короткие праймеры часто «ошибаются».

4. Используемые праймеры должны быть сбалансированы по температуре отжига.

III этап: Достраивание цепей ДНК или элонгация. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) и проходит при температуре 70-72⁰С. Время протекания синтеза - 20-40 сек.

Три вышеописанных фазы: 1) денатурация ДНК (плавление); 2) комплементарное связывание праймера с ДНК-матрицей (отжиг); 3) синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы (достройка праймера) и составляют суть каждого цикла ПЦР.

Далее этот стандартный цикл ПЦР — плавление, отжиг, синтез — воспроизводится многократно, количество ампликонов растет в геометрической прогрессии, поскольку образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей.

Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около 10⁸ молекул ампликона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

Однако кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе (20—25 циклов), после чего начинается выход на плато (после 40—45 циклов) в силу

1. истощения дезоксинуклеозидтрифосфатов,
2. истощения праймеров
2. нарастающего температурного повреждения Taq- полимеразы,
3. конкуренции за фермент ампликонов, когда их число начнет превышать число молекул Taq-ДНК-полимеразы.

Детекция продуктов амплификации осуществляется несколькими способами. Это детекция с помощью химических (иммунохимических) реакций, детекция с помощью флюоресценции (при этом могут использоваться различные модификации праймеров), однако до настоящего времени самым простым, доступным и недорогим методом является **электрофорез**. До проведения электрофоретического разделения, к амплификационной смеси или в агарозный гель добавляется раствор бромистого этидия,

образующий с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения внедрения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле. Под действием электрического поля молекулы ДНК движутся от отрицательного полюса к положительному. После просматривания геля в ультрафиолетовом свете можно говорить о результатах ПЦР (в случае успешного прохождения реакции на геле видны светящиеся полоски).

В качестве альтернативы электрофоретическому методу детекции, имеющему некоторые недостатки: субъективность чтения результатов, ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, могут быть предложены **гибридизационные схемы детекции**. В этих схемах образующийся в результате амплификации фрагмент ДНК можно пометить флуоресцентным красителем, присоединяя его к 5'-концу каждого праймера. В качестве красителей часто используют флуоресцеин и родамин, которые испускают зеленый и красный свет, соответственно.

После ПЦР-амплификации ДНК-мишени проводят разделение флуоресцеин-меченного праймера и продуктов амплификации, затем регистрируют включение метки. Если ДНК-мишень в образце отсутствует, то не будет образовываться и флуоресцирующий продукт. Регистрация таких комплексов может быть проведена колориметрически или флуориметрически.

Таким образом, в процессе реакции происходит многократное избирательное копирование определённого участка [ДНК](#) при помощи [ферментов](#) в искусственных условиях (*in vitro*). При этом идёт копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

3. Применение в микробиологии.

Амплификация фрагментов ДНК известной специфичности: диагностика инфекционных болезней, определение генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности у микроорганизмов.

Амплификация фрагментов ДНК с разным уровнем специфичности: изучение биоразнообразия, составление филогенетических древ.

1.13 Лекция №20-21 (4 часа).

Тема: «Действие физических и химических факторов на микроорганизмы».

1.13.1 Вопросы лекции:

1. Действие химических факторов на микроорганизмы.
2. Действие физических факторов на микроорганизмы.

1.13.2 Краткое содержание вопросов:

1. Действие химических факторов на микроорганизмы.

Химические вещества по-разному влияют на микроорганизмы. Это зависит от природы, концентрации и времени действия химических веществ. Они могут стимулировать рост (используются как источники энергии), оказывать микробицидное, микробстатическое, мутагенное действие или могут быть безразличными для процессов жизнедеятельности

Например: 0,5-2% раствор глюкозы – источник питания для микробов, а 20-40% раствор оказывает угнетающее действие.

Для микроорганизмов необходимо **оптимальное значение рН среды**. Для большинства симбионтов и возбудителей заболеваний человека – нейтральная,

слабощелочная или слабокислая среда. При росте pH сдвигается чаще в кислую сторону, рост микроорганизмов при этом приостанавливается. А затем наступает гибель. **Механизм:** денатурация ферментов гидроксильными ионами, нарушение осмотического барьера клеточной мембраны.

Химические вещества, которые обладают **противомикробным действием, используются для дезинфекции, стерилизации и консервации.**

2. Действие физических факторов на микроорганизмы.

Стерилизация – это процесс полного уничтожения в объекте всех жизнеспособных форм микробов, в том числе спор.

Различают 3 группы методов стерилизации: **физические, химические и физико-химические.** **Физические методы:** стерилизация высокой температурой, УФ облучением, ионизирующим облучением, ультразвуком, фильтрованием через стерильные фильтры. **Химические методы** – использование химических веществ, а также газовая стерилизация. **Физико-химические методы** – совместное использование физических и химических методов. Например, высокая температура и антисептики.

Стерилизация высокой температурой.

К этому методу относятся: 1) стерилизация сухим жаром; 2) стерилизация паром под давлением; 3) стерилизация текучим паром; 4) тундризация и пастеризация; 5) прокаливание; 6) кипячение.

Стерилизация сухим жаром.

Метод основан на бактерицидном действии нагретого до 165-170°C воздуха в течение 45 мин.

Аппаратура: сухожаровой шкаф (печь Пастера). Печь Пастера – металлический шкаф с двойными стенками, обшитый снаружи материалом, плохо проводящим тепло (асбест). Нагретый воздух циркулирует в пространстве между стенками и выходит наружу через специальные отверстия. При работе необходимо строго следить за нужной температурой и временем стерилизации. Если температура будет более высокой, то произойдет обугливание ватных пробок, бумаги, в которую завернута посуда, а при более низкой температуре требуется более длительная стерилизации. По окончании стерилизации шкаф открывают только после его остывания, иначе стеклянная посуда может потрескаться из-за резкой смены температуры.

Материал и режим стерилизации:

а) стеклянные, металлические, фарфоровые предметы, посуда, завернутые в бумагу и закрытые ватно-марлевыми пробками для сохранения стерильности (165-170°C, 45 мин);

б) термостойкие порошкообразные лекарственные средства - тальк, белая глина, окись цинка (180-200°C, 30-60 мин);

в) минеральные и растительные масла, жиры, ланолин, вазелин, воск (180-200°C, 20-40 мин).

Стерилизация паром под давлением.

Наиболее эффективный и широко применяемый в микробиологической и клинической практике метод.

Метод основан на гидролизующем действии пара под давлением на белки микробной клетки. Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает высокую эффективность этой стерилизации, при которой погибают самые стойкие споровые бактерии.

Аппаратура – автоклав. Автоклав состоит из 2-х металлических цилиндров, вставленных друг в друга с герметически закрывающейся крышкой, завинчивающейся винтами. Наружный котел – водопаровая камера, внутренний – стерилизационная камера. Имеется манометр, паровыпускной кран, предохранительный клапан, водомерное стекло. В верхней части стерилизационной камеры – отверстие, через которое пар проходит из водопаровой камеры. Манометр служит для определения давления в стерилизационной камере. Между давлением и температурой существует определенная зависимость: 0,5 атм

- 112°C, 1-01,1 атм – 119-121°C, 2 атм - 134°C. Предохранительный клапан – для защиты от чрезмерного давления. При повышении давления выше заданного, клапан открывается и выпускает лишний пар. **Порядок работы.** В автоклав наливают воду, уровень которой контролируют по водомерному стеклу. В стерилизационную камеру помещают материал и плотно завинчивают крышку. Паровыпускной кран открыт. Включают нагрев. После закипания воды кран закрывают лишь тогда, когда будет вытеснен весь воздух (пар идет непрерывной сильной сухой струей). Если кран закрыть раньше, показания манометра не будут соответствовать нужной температуре. После закрытия крана, в кotle постепенно повышается давление. Начало стерилизации – тот момент, когда стрелка манометра показывает заданное давление. По истечении срока стерилизации прекращают нагрев и охлаждают автоклав до возвращения стрелки манометра к 0. Если выпустить пар раньше, жидкость может вскипеть из-за быстрой смены давления и вытолкнуть пробки (стерильность нарушается). Когда стрелка манометра вернется к 0, осторожно открывают паровыпускной кран, спускают пар и затем вынимают стерилизуемые объекты. Если не выпустить пар после возвращения стрелки к 0, вода может конденсироваться и смочить пробки и стерилизуемый материал (стерильность нарушится).

Материал и режим стерилизации:

- а) стеклянная, металлическая, фарфоровая посуда, белье, резиновые и корковые пробки, изделия из резины, целлюлозы, древесины, перевязочный материал (вата, марля) (119 - 121°C, 20-40 мин);
- б) физиологический раствор, растворы для инъекций, глазные капли, дистиллированная вода, простые питательные среды - МПБ, МПА(119-121°C, 20-40 мин);
- в) минеральные, растительные масла в герметически закрытых сосудах (119-121°C, 120 мин);

Стерилизация текучим паром.

Метод основан на бактерицидном действии пара (100°C) в отношении только вегетативных клеток.

Аппаратура – автоклав с незавинченной крышкой или **аппарат Коха**.

Аппарат Коха - это металлический цилиндр с двойным дном, пространство в котором на 2/3 заполнено водой. В крышке – отверстия для термометра и для выхода пара. Наружная стенка облицована материалом, плохо проводящим тепло (линолеум, асбест). Начало стерилизации – время от закипания воды и поступления пара в стерилизационную камеру.

Материал и режим стерилизации. Этим методом стерилизуют материал, который не выдерживает температуру выше 100°C: питательные среды с витаминами, углеводами (среды Гисса, Эндо, Плоскирева, Левина), желатином, молоко.

При 100°C споры не погибают, поэтому стерилизацию проводят несколько раз - **дробная стерилизация** - 20-30 мин ежедневно в течение 3-х дней.

В промежутках между стерилизациями материал выдерживают при комнатной температуре для того, чтобы проросли споры в вегетативные формы. Они будут погибать при последующем нагревании при 100°C.

Тиндализация и пастеризация.

Тиндализация - метод дробной стерилизации при температуре ниже 100°C. Она используется для стерилизации объектов, которые не выдерживают 100°C: сыворотка, асцитическая жидкость, витамины. Тиндализация проводится в водяной бане при 56°C по 1 часу 5-6 дней.

Пастеризация - *частичная* стерилизация (споры не погибают), которая проводится при относительно низкой температуре **однократно**. Пастеризацию проводят при 70-80°C, 5-10 мин или при 50-60°C, 15-30 мин. Пастеризация используется для объектов, теряющих свои качества при высокой температуре. Пастеризацию, например, *используют для некоторых пищевых продуктов: молока, вина, пива*. При

этом не повреждается их товарная ценность, но споры остаются жизнеспособными, поэтому эти продукты нужно хранить на холода.

1.14 Лекция №22-23 (4 часа).

Тема: «Действие биологических факторов на микроорганизмы».

1.14.1 Вопросы лекции:

- 1 Антибиотики.
- 2 Бактериофаги.
- 3 Бактериоцины.

1.14.2 Краткое содержание вопросов:

1. Антибиотики.

В настоящее время антибиотиками считают химические вещества биологического происхождения (природные), а также их полусинтетические производные и синтетические аналоги, которые избирательно тормозят рост и размножение или губительно действуют на микроорганизмы и опухоли.

Антибиотики классифицируют по способу получения, по происхождению, по химической структуре, по механизму антимикробного действия.

По способу получения выделяют

- биосинтетические антибиотики (природные). В условиях специальных производств культивируют микроорганизмы-продуценты, которые выделяют антибиотики в процессе жизнедеятельности.
- полусинтетические антибиотики. Получают путем биосинтеза с последующей химической модификацией. В результате улучшаются антимикробные и фармакологические свойства препарата.
- синтетические антибиотики (аналоги природных). Имеют структуру природных, но синтезированы химически.

По происхождению среди природных антибиотиков выделяют растительные (фитонциды), животной природы, микробные (синтезируемые грибами, актиномицетами (80% антибиотиков), бактериями). Первые две группы природных антибиотиков не получили широкого применения в медицине.

Антибиотики оказывают на микробные клетки воздействия, результатом которых может явиться бактерицидный, бактериостатический, бактериолитический, либо антибиотикозависимый эффект.

По химической структуре выделяют:

- β -Лактамы (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы);
- Гликопептиды;
- Липопептиды;
- Аминогликозиды;
- Тетрациклины;
- Макролиды;
- Линкозамиды;
- Стреptограмины;
- Хлорамфеникол/левомицетин;
- Рифамицины;
- Полипептиды;
- Полиены.

- β -Лактамы. К данной группе относятся антибиотики, характерной чертой которых является наличие β -лактамного кольца, при разрушении которого препараты теряют свою активность.

Пенициллин Цефалоспорины природный в основе содержит молекулу 6-аминопенициллановой кислоты, которая состоит из двух колец – тиазолидонового и бета-лактамного. Препарат – бензилпенициллин и его соли. Активен в отношении грамположительных микроорганизмов. Быстро выводится из организма, разрушается под действием желудочного сока, инактивируется пенициллиназами.

Полусинтетические получают при присоединении к 6АПК радикалов.

обладают бактерицидным действием, низкой токсичностью, с широким спектром действия (более активны в отношении грамотрицательных микроорганизмов). Получены на основе 7-аминоцефалоспориновой кислоты и содержащие цефемовое (также бета-лактамное) кольцо. По последовательности внедрения различают 4 поколения препаратов, которые отличаются по спектру активности, устойчивости к β -лактамазам, фармакологическим свойствам. Препараты разных поколений не заменяют друг друга, а дополняют.

Гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин) препараты этой группы в своей молекуле содержат замещенные пептидные соединения. Активны в отношении грамположительных бактерий. Используют при лечении тяжелых инфекций.

Аминогликозиды (стрептомицин, канамицин, гентамицин, тобрамицин) – соединения, в молекуле которых входят аминосахара, соединенные гликозидной связью с остальной частью (агликоновым фрагментом) молекулы. Обладают бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных аэробных бактерий, стафилококков, некоторых простейших.

Тетрациклины – семейство крупномолекулярных препаратов, имеющих в составе четыре циклических соединения основу молекулы составляет полифункциональное гидроафтаценовое соединение с родовым название тетрациклин. Тип действия – статический. Спектр действия широкий, в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, внутриклеточных паразитов. Полусинтетический препарат – доксициклин.

Новые препараты полусинтетические – глицилциклины (тигекциклин). Широкий спектр, более прочная связь с рибосомами.

Макролиды – семейство макроциклических молекул содержат в своей молекуле макроциклическое лактоновое кольцо, связанное с одним или несколькими углеводными остатками. (эритромицин, кларитромицин, азитромицин). Широкий спектр действия, бактериостатический эффект.

По механизму действия среди антибиотиков выделяют:

1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки (муреина):

– Бета-лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбопенемы).

Блокируют образование гетерополимерных цепей на внешней поверхности ЦПМ за счет ингибирования пенициллин-связывающих белков (белков-ферментов – транспептидаз), участвующих в образовании поперечных сшивок. Ингибирование ПСБ приводит к накоплению в бактериальной клетке предшественников ПГ и запуску системы аутолиза. В результате действия аутолитических ферментов и увеличения осмотического давления цитоплазмы происходит бактериолизис.

– Гликопептиды (ванкомицин, клиндамицин).

Блокируют объединение предшественников пептидогликана в гликопептидные цепи, связывая D-аланин. Поскольку пептидогликана нет в стенках животных клеток, то эти антибиотики обладают очень низкой токсичностью для макроорганизма, и их можно применять в высоких дозах (мегатерапия);

- Липопептиды формируют каналы в КС при необратимом соединении гидрофобной части молекулы липопептида с клеточной мембраной грамположительных бактерий. В результате происходит деполяризация клеточной мембраны из-за выхода калия, что приводит к гибели бактериальной клетки.

2. Вызывающие повреждение цитоплазматической мембраны

Полиеновые антибиотики обладают ярко выраженной противогрибковой активностью, изменяя проницаемость клеточной мембраны путем взаимодействия (блокирования) со стероидными компонентами, входящими в ее состав именно у грибов, а не бактерий;

Полипептидные антибиотики лизируют фосфолипидные компоненты ЦПМ. Только местное применение.

3. Подавляющие белковый синтез

— нарушение синтеза белка может происходить на всех уровнях, начиная с процесса считывания информации с ДНК и кончая взаимодействием с рибосомами — (аминогликозиды), с 50S субъединицами рибосом (макролиды) или с информационной и РНК (на 30S субъединице рибосом — тетрациклины). Эта группа антибиотиков — самая многочисленная, в нее входят

4. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот — эти антибиотики обладают не только антимикробной, но и цитостатической активностью, и поэтому используются как противоопухолевые средства. Один из антибиотиков относящихся к этой группе — рифампицин, ингибирует ДНК-зависимую РНК-полимеразу, и тем самым блокирует синтез белка на уровне транскрипции (блокирует синтез мРНК).

Хинолоны оказывают бактерицидный эффект. Ингибируя два жизненно важных фермента микробной клетки - ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, нарушают синтез ДНК.

Все основные осложнения при химиотерапии можно разделить на 2 группы:

- *осложнения терапии со стороны микроорганизма;*
- *осложнения со стороны макроорганизма:*

— *аллергические реакции* Наличие аллергической реакции на один из препаратов той или иной группы, является абсолютным противопоказанием для использования и других препаратов этой группы, так как возможна перекрестная гиперчувствительность;

— *прямое токсическое (органотоксическое) действие химиопрепаратов* — так, противоопухолевые антибиотики обладают гемато-, гепато- и кардиотоксичностью, а все аминогликозиды — ототоксичностью и нефротоксичностью.

— *побочное токсическое (органотропные) эффекты* — эти осложнения связаны не с прямым, а опосредованным действием химиопрепаратов на различные системы макроорганизма. Хлорамфеникол (левомицетин) может подавлять синтез белков не только в микробной клетке, но и в клетках костного мозга, вызывая у части больных развитие стойкой лейкопении

— оценивая влияние антибиотиков на *функциональную активность иммунной системы*, следует помнить, что все антимикробные агенты снижают напряженность иммунитета. Однако, ряд бета-лактамных антибиотиков, например, цефалоспорин 4-го поколения — цефпиром, а также макролиды, фторхинолоны усиливают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, а цефтазидим при системном применении и биопарокс — при местном — обладают истинной иммуностимулирующей активностью.

— *реакции обострения* — применение бактерицидных антибиотиков в первые дни заболевания при общем тяжелом состоянии больного нередко приводит к резкому ухудшению его состояния. Вплоть до развития *инфекционно-токсического шока*. В основе этого явления лежит массовая гибель возбудителей, сопровождающаяся освобождением большого количества эндотоксина и других токсических продуктов распада бактериальных клеток. Такие выраженные реакции обострения чаще развиваются у детей, так как процессы детоксикации у них развиты слабее, чем у взрослых;

– *развитие дисбактериоза* — нарушения качественного и количественного состава нормальной микрофлоры — также одно из частых осложнений химиотерапии. Оно чаще возникает на фоне использования антибиотиков широкого спектра действия. Одним из наиболее тяжелых клинических проявлений дисбиоза является кандидоз полости рта, гениталий или кишечника.

1. Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов

Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов проявляется развитием лекарственной устойчивости.

В настоящее время лекарственная устойчивость *микроорганизмов-возбудителей* различных заболеваний — не только чисто микробиологическая, но и огромная государственная проблема (например, смертность детей от *стафилококкового сепсиса* находится в настоящее время примерно на том же высоком уровне, что и до появления антибиотиков). Это связано с тем, что среди стафилококков — возбудителей различных гнойно-воспалительных заболеваний, — довольно часто выделяются штаммы, одновременно устойчивые ко многим препаратам (5–10 и более). Среди *микроорганизмов-возбудителей* острых кишечных инфекций до 80 % выделяемых возбудителей дизентерии устойчивы ко многим используемым антибиотикам.

В основе развития лекарственной устойчивости к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам лежат мутации хромосомных генов или приобретение плазмид лекарственной устойчивости. Прежде всего, необходимо отметить, что существуют роды и семейства микроорганизмов, *природно-устойчивые* к отдельным антибиотикам; в их геноме есть гены, контролирующие этот признак. *Полирезистентны* к антибиотикам и многие представители псевдомонад, неклостридиальных анаэробов и другие микроорганизмы. Такие бактерии являются природными банками (хранилищами) генов лекарственной устойчивости.

Плазмидная устойчивость приобретается микробными клетками в результате процессов генетического обмена. Сравнительно высокая частота передачи R-плазмид обеспечивает широкое и достаточно быстрое распространение устойчивых бактерий в популяции. Плазмидная устойчивость может быть множественной, т. е. к нескольким лекарственным препаратам, и при этом достигать достаточно высокого уровня.

Биохимическую основу резистентности обеспечивают разные механизмы:

- *энзиматическая инактивация антибиотиков* — этот процесс осуществляется с помощью синтезируемых бактериями ферментов, разрушающих активную часть антибиотиков.
- *изменение проницаемости клеточной стенки* для антибиотика или подавление его транспорта в бактериальные клетки. Этот механизм лежит в основе устойчивости к тетрациклину;
- *изменение структуры компонентов микробной клетки*, например, изменение структуры бактериальных рибосом сопровождается повышением устойчивости к аминогликозидам и макролидам, а изменение структуры РНК-синтетаз — к рифампицину.

У бактерий одного и того же вида могут реализовываться несколько *механизмов резистентности*.

2. Борьба с лекарственной устойчивостью

Для борьбы с лекарственной устойчивостью, т. е. преодоления резистентности микроорганизмов к химиопрепаратам, существует несколько путей:

- *создание новых химиотерапевтических средств*, отличающихся механизмом антимикробного действия (например, созданная в последнее время группа химиопрепаратов — фторхинолоны) и мишениями,
- *постоянная ротация* (замена) используемых в данном лечебном учреждении или на определенной территории химиопрепаратов (антибиотиков),
- *комбинированное применение* бета-лактамных антибиотиков в комбинации с ингибиторами бета-лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам),

- и главное – соблюдение *принципов рациональной химиотерапии*.

Выбор препарата для химиотерапии должен основываться на показателях антибиотикочувствительности соответствующих микроорганизмов – наиболее вероятных возбудителей данной нозологической формы заболевания по данным литературы, или при ориентации на данные о региональной чувствительности тех или иных инфекционных агентов-возбудителей данного заболевания.

2. Бактериофаги.

Бактериофаги (*фаги*) (от др.-греч. φάγω — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки.

Был открыт в 1915 году английским бактериологом Фредериком Туортом, который описал способность фильтрата стафилококков растворять свежую культуру этих же бактерий. Канадский микробиолог Феликс Д'Эрель в 1917 году выдвинул предположение, что бактериофаги имеют корпускулярную природу, выделив фильтрующийся липидный агент из испражнений больных дизентерией. Добавление липидного агента к культуре в бульоне и на плотной питательной среде приводило к лизису. Д'Эрель предположил, что это вирус и назвал его бактериофагом – пожирателем бактерий.

Бактериофаги широко распространены в природе, выявлены у большинства бактерий. В настоящее время обнаружены вирусы грибов, поэтому в широком смысле слова бактериофаги часто называют просто фагами.

БФ состоят из ДНК (РНК) и белковой оболочки – капсида. Могут иметь нитевидную форму, икосаэдрический капсид (головка фага), сложную форму сперматозоида (головка и хвостовой отросток). Некоторые фаги в хвостовой части содержат лизоцим.

По результату взаимодействия с бактериальной клеткой выделяют вирулентные и умеренные бактериофаги.

Вирулентные бактериофаги взаимодействуют с бактерией по продуктивному типу. Проникнув в бактерию, они репродуцируются с образованием 200-300 новых фаговых частиц и вызывают лизис бактерий.

Вирулентные бактериофаги имеют следующий жизненный цикл:

1. Фаг приближается к бактерии, и хвостовые нити связываются с рецепторными участками на поверхности бактериальной клетки.

2. Хвостовые нити изгибаются и «заякоривают» шипы и базальную пластинку на поверхности клетки; хвостовой чехол сокращается, заставляя полый стержень входить в клетку; этому способствует фермент лизоцим, который находится в базальной пластинке; таким образом, нуклеиновая кислота фага вводится внутрь клетки.

3. Нуклеиновая кислота фага направляет синтез ферментов фага, используя для этого белоксинтезирующий аппарат бактерии.

4. Фаг тем или иным способом инактивирует ДНК и РНК хозяина, а ферменты фага совсем расщепляют её; РНК фага «подчиняет» себе клеточный аппарат синтеза белка.

5. Нуклеиновая кислота фага реплицируется, и направляет синтез новых белков оболочки.

6. Образуются новые частицы фага в результате спонтанной самосборки белковой оболочки вокруг фаговой нуклеиновой кислоты; под контролем РНК фага синтезируется лизоцим.

7. Лизис клетки: клетка лопается под воздействием лизоцима; высвобождается около 200–1000 новых фагов; фаги инфицируют другие бактерии.

Стадии 1–7 по времени занимают около 30 минут; этот период называется латентным периодом.

Умеренные бактериофаги могут взаимодействовать с бактерией по интегративному типу. В данном случае ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии, не вызывая ее лизиса. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии называется

профагом, а культура бактерий, содержащих профаг - лизогенной. Само же явление существования бактерии и умеренного бактериофага носит название лизогении. Профаг, ставший частью хромосомы передается по наследству от клетки к клетке неограниченному числу потомков. Спонтанно или направленно профаги могут переходить в вегетативное состояние и лизировать клетку хозяина. Феномен воздействия, приводящий к инактивации репрессора, называется индукцией профага. Геном профага может придавать бактерии новые свойства (фаговая конверсия).

Бактериофаги используют в лабораторной диагностике при внутривидовой идентификации бактерий, при обнаружении микроорганизма в исследуемом материале, для лечения и профилактики ряда заболеваний, чаще всего кишечных. У таких лекарственных препаратов отсутствует побочный эффект, но и терапевтический эффект умеренный. В генетической инженерии бактериофаги используются в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

3. Бактериоцины.

Бактериоцины - антибактериальные вещества белковой природы, вырабатываемые бактериями и подавляющие жизнедеятельность других штаммов того же вида или родственных видов. Бактериоцины обозначаются в соответствии с видовым или родовым латинским названием продуцента. Спектр активности бактериоцинов в отличие от антибиотиков узок и определяется наличием у бактерий специальных рецепторов для адсорбции.

Молочнокислые бактерии образуют широкий спектр бактериоцинов: курвацин, диацетин, лактококцин, ацидоцин, лактоцин, плантацин, плантарицин и др. (табл. 1). Бактериоцины из молочнокислых бактерий разделяют на две группы. Представители первой группы характеризуются узким спектром антибактериального действия - вызывают гибель организмов, близких к организму-продуценту. В эту группу входят лактоцин В и F-27, амиловорин, педиоцин N5P, термофилин А, курвацин А, амиловорин L471, энтерококцин.

Бактериоцины, относящиеся ко второй группе, ингибируют рост многих видов грамположительных микроорганизмов, в том числе *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus faecalis*. Перечисленные бактерии вызывают порчу пищевых продуктов, среди них есть и патогенные виды. Показано, что большая часть этих бактериоцинов не токсична и не иммуногенна.

Перспективно применение ряда бактериоцинов, производимых группой молочнокислых бактерий, в пищевой промышленности. Продуценты этих бактериоцинов используются в качестве заквасочной культуры при различных пищевых производствах. Образующийся бактериоцин обеспечивает доминирование нужной микрофлоры и подавление посторонней микрофлоры, что обеспечивает безопасное протекание микробиологических процессов.

Например, при производстве сухой колбасы в качестве заквасочной культуры используется *Lactobacillus curvatus*, образующий курвацин, который ингибирует рост близкородственных лактобацилл и условно-патогенных бактерий и обеспечивает этим безопасное протекание биохимических процессов при созревании сухой колбасы. Бактериоцины осуществляют естественное предохранение пищевых продуктов, в том числе полученных путем ферментации.

Продуцирующие бактериоцины штаммы микроорганизмов, в частности молочнокислые бактерии, или сами бактериоцины могут быть использованы как природные консерванты пищевых продуктов. Задача состоит в том, чтобы оптимизировать производство бактериоцинов бактериями, повысить активность и стабильность этих соединений, направленно получать бактериоцины с заданными свойствами. Однако появление и селекция вариантов бактерий, устойчивых к

бактериоцинам, осложняет использование этих веществ в качестве пищевых консервантов.

Большое количество разнообразных по свойствам бактериоцинов образуется представителями семейства энтеробактерий. Это многочисленная группа грамотрицательных бактерий, факультативных анаэробов, использующих для своего развития разнообразные органические соединения.

Среди бактериоцинов, образуемых энтеробактериями, наиболее полно изучены колицины из *E.coli*, клоацины из *Enterobacter cloacae*; наряду с колицинами выделены альвецины из *Hafnia alvei*, аэроцины из *Aerobacter aerogenes*, марцесцины из *Serratia marcescens*.

Однако применение в настоящее время в медицине колицинов и других бактериоцинов из грамотрицательных бактерий невозможно из-за ряда их отрицательных свойств - быстрой инактивации протеазами, иммуногенности, обусловленной белковым компонентом.

Предполагают, что *механизм биологического действия ряда бактериоцинов связан с нарушением проницаемости цитоплазматических мембран*.

В настоящее время с применением методов генной инженерии проводятся исследования, направленные на получение штаммов-продуцентов бактериоцинов с заданными свойствами.

В естественных условиях бактериогенеза может быть одним из факторов, влияющих на формирование микробного ценоза. Поэтому большой интерес представляет выяснение значения этого явления для развития популяции. У бактериогенных популяций суммарная защитная активность проявляется в подавлении развития других бактерий, обладающих сходными пищевыми потребностями (родственные виды микроорганизмов). Это подавление обеспечивается бактериоцином, который продуцируют отдельные клетки этой популяции. Эти клетки погибают, но остальные клетки популяции не чувствительны к бактериоцину, который вытесняет другие микроорганизмы, чувствительные к данному веществу. Таким образом, бактериогенные бактерии обладают важным селективным преимуществом в условиях микробных ассоциаций, естественно складывающихся в процессе эволюции.

Штаммы – продуценты бактериоцинов, а также сами бактериоцины широко применяются в качестве компонента пробиотических и синбиотических препаратов, в пищевой промышленности могут использоваться в качестве заквасочных культур, подавляя рост патогенных микроорганизмов и обеспечивая созревание молочнокислых и мясных продуктов, а в последующем – их хранение.

1.15 Лекция №24 (2 часа).

Тема: «Взаимоотношения микроорганизмов с высшими растениями».

1.15.1 Вопросы лекции:

1. Микробно-растительные взаимодействия
2. Микробно-растительные взаимодействия в ризосфере и ризоплане.
3. Микробно-растительные взаимодействия в филлосфере и филлоплане.
4. Биохимические механизмы микробно-растительных отношений.

1.15.2 Краткое содержание вопросов:

1. Микробно-растительные взаимодействия

Микробно-растительные взаимодействия являются основой поддержания жизни на планете. Растения поставляют кислород и продукты питания для человека и животных, микроорганизмы же в свою очередь осуществляют возврат питательных элементов для растений.

Совместное развитие бактерий рода *Rhizobium* и растений семейства бобовые, а также микоризных грибов и разнообразных растений – распространенный пример симбиоза.

Микробно-растительные симбиозы классифицируют с разных точек зрения.

Их можно разделить на специфические, эволюционно закрепленные, облигатные, неспецифические, временные и случайные, наземные и внутрипочвенные.

Пресноводные и морские макро- и микроскопические растения колонизируются микроорганизмами.

Эволюционно микроорганизмы – более древние живые существа. Растения появились позже бактерий и им пришлось внедряться в уже занятые бактериями экологи.

С одной стороны растения обладают особенностями, которые позволяют им успешно конкурировать с микроорганизмами и даже использовать их, с другой стороны – микроорганизмы также приобретают способность использовать растения для роста, развития и расселения.

Растения делятся на низшие и высшие, микроскопические и макроскопические. В силу близких размеров низших одноклеточных растений и бактерий и грибов, это живые объекты занимают одинаковые экологи.

Взаимодействие высших растений и микроорганизмов.

С организационно-морфологической точки зрения прокариоты представлены как одноклеточными, так и многоклеточными, точнее мицелиальными организмами – актиномицеты. Следовательно, бактериально-растительные взаимодействия это отношения между одноклеточными и мицелиальными организмами и одноклеточными и многоклеточными высшими растениями.

К микроорганизмам относят и царство грибов. Известно около 8000 видов фитопатогенных грибов. Среди грибов выделяют одноклеточные и дрожжи, по наличию или отсутствию полового процесса у грибов их разделяют на высшие совершенные и низшие несовершенные.

Вирусы также вписываются в систему микробно-растительных взаимодействий.

К сфере микробно-растительных взаимодействий относится также взаимодействия микроскопических животных (простейшие, нематоды) и растений. Часто эти отношения носят паразитический характер, где растения выполняют роль хозяина.

При систематизации микробно-растительных взаимодействий необходимо отметить *уровни способов взаимодействия* с точки зрения организации матери.

Химический уровень взаимодействия – «узнавание» хозяина, обмен «информацией», восприятие или отторжение молекул и организмов.

Физический уровень – физический контакт между микроорганизмами и растениями. Удерживание микроорганизмов на поверхности растений – решающий фактор дальнейшего развития событий.

Биологический уровень – это и *молекулярно-генетический* уровень, и *клеточный* уровень, который для многих микроорганизмов является и *организменным*.

В микробно-растительных взаимодействиях имеют место и *уровень сообщества*, который наиболее сложен.

Можно говорить о взаимодействии растений и микроорганизмов после отмирания одного из компонентов. Так, при отмирании растений происходит его разрушение и утилизация микроорганизмами, как и наоборот.

Семена растений, попадая в почву, уже населены микроорганизмами. Это особенно характерно для фитопатогенов.

Потенциально семя растений может нести на себе бактериальные клетки, их эндоспоры или цисты, конидиоспоры или обрывки гиф актиномицетов, обрывки мицелия грибов и их конидиоспоры, цисты простейших, а также яйца нематод и вирусы.

Важную роль в контаминации поверхности семян, способности удерживаться на их поверхности играют такие характеристики микроорганизмов, как размеры и морфология, структура поверхности клетки, способность к длительному выживанию в условиях низкой влажности, при воздействии света и т.д.

На поверхности и в покровах семян можно обнаружить бактерии родов *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, грибов рода *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phytophthora* и др.

При попадании в благоприятные условия влажности и температуры семя растения набухает и прорастает, при этом происходят соответствующие молекулярно-генетические и физиолого-биохимические процессы. Те же факторы – температура и влажность – оказывают соответствующее действие и на микроорганизмы, находящиеся на поверхности семени. Основное действие на микробное сообщество поверхности семян оказывает выброс органических веществ из набухающего и прорастающего семени. Концентрация и состав органики специфичен.

При прорастании семян пшеницы в основном обнаруживаются углеводы, органические кислоты и до 16 аминокислот, среди которых доминируют аспарагиновая и глутаминовая.

2. Микробно-растительные взаимодействия в ризосфере и ризоплане.

Прорастающее из семени растение в почве сталкивается с различными микроскопическими объектами: животные, простейшие, грибы, бактерии, вирусы. Будущее растение контактирует с этими объектами как формирующейся корневой системой, так и надпочвенной частью – проростком.

Корень контактирует с *неспецифическими микроорганизмами* и *специфическими*, которые его инфицируют. Среди инфицирующих имеются непатогенные и типичные патогены. *Непатогенные* – клубеньковые бактерии, микоризные грибы.

Пространство и почву вокруг формирующегося корня называют *rizosferой*. Первое определение дал Хилтнер в 1904 году.

Ризосфера – это пространство вокруг корня от 0 до 2-8 мм в диаметре, в котором имеет место более обильное развитие микроорганизмов из-за стимулирования их роста корневыми экссудатами.

Пространство ризосферы еще называют *эндоризосферой*, включая в это понятие и ткани самого корня в противовес *rizopлане*, под которой подразумевают только то, что находится непосредственно на поверхности корня и прикреплено к нему.

Корневые экссудаты – низкомолекулярные органические вещества, продукты фотосинтеза и метаболизма растения. К ним относятся сахара, органические и аминокислоты, спирты, гормоны, витамины.

Корневые ризодепозиты – более широкое понятие. Они включают не только экссудаты, но и все другие вещества – высокополимерные слизи полисахаридной и белковой природы, ферменты, отмирающие и слущивающиеся поверхностные клетки с их содержимым, куски тканей, в частности кортекс верхних стареющих участков корня, корневой чехлик, корневые волоски, летучие органические вещества и т.д.

Имеет место и чисто механическое воздействие растущего корня на экзонишу.

Феномен более высокой плотности микроорганизмов вокруг корня за счет потребления экссудатов и ризодепозитов называется *rizosферным эффектом*.

Общая численность микроорганизмов в ризосфере зависит от типа почвы, растения и других факторов и может колебаться от миллионов до сотен миллиардов клеток на грамм сухой почвы.

Пространственно-временная организация микробного сообщества ризосферы имеет свою специфику. Микробное сообщество развивается вдоль растущего корня

волнообразно, т.е. зоны с более высокой плотностью микроорганизмов чередуются с зонами с низкой плотностью. При этом пики разной плотности бактерий смещаются во времени вдоль корня – «движущаяся волна» развивающегося микробного сообщества ризосферы.

3. Микробно-растительные взаимодействия в филлосфере и филлоплане.

Пространство, окружающее надпочвенную поверхность растения, включая ткани этого растения, называют филлосферой, а поверхность растения – филлопланой.

Микроорганизмы, колонизирующие надземные поверхности растений, называют иногда эпифитными.

Численность и разнообразие микроорганизмов существенно зависят от вида растения и его местообитания, климата, погодных условий и др. Это сапротрофные и фитопатогенные представители родов: *Pseudomonas* (*P. syringae*, *P. fluorescens*), *Erwinia* (*E. carotovora*, *E. amylovora*), *Agrobacterium* (*A. tumefaciens*), *Enterobacter*, *Klebsiella*.

Имеются различия в микробном сообществе верхней стороны листа и нижней. Существенную роль в этом играет свет и температура.

При прорастании растение выносит на своей поверхности из почвы типично почвенные микроорганизмы. Однако со временем, под влиянием окружающих условий, качественный состав микробного сообщества на поверхности растений меняется. Локализация и пространственная приуроченность микроорганизмов на поверхности листьев родо- и даже видоспецифична.

Устьица листьев и других частей растения служат главными местами газообмена растений с окружающей средой и одновременно – местами выделения веществ, которые могут служить субстратами для микроорганизмов. Существенную часть этих веществ составляют сахара, органические кислоты, эфирные масла и высшие спирты.

Оказалось, что именно устьица очень часто служат «входными воротами» для инфекций. Некоторые фитопатогенные бактерии и грибы приспособились проникать в растения только через устьица.

Однако не все органические вещества, выделяемые растениями, являются субстратами для микроорганизмов. Некоторые из них – фитоциды – оказывают ингибирующее действие. К ним относят гликозиды, терпеноиды и др. Сосна выделяет вещества, подавляющие рост туберкулезной палочки.

4. Биохимические механизмы микробно-растительных отношений.

Растения и ризосферные бактерии обмениваются химическими веществами – «сигналами», которые позволяют им вступать в мутуалистические взаимоотношения. Среди таких веществ, образуемых ризобактериями, имеются стимуляторы роста растений – гормоны роста растений, в частности ауксин. Активными продуцентами гормонов роста растений являются *Aeromonas veronii*, *Edwardsiella tarda*, *Listonella anguillarum*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, в том числе почвенные бактерии *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*. Кроме ауксина некоторые бактерии продуцируют гомосерин, который служит аутоиндуктором активности бактериальной популяции и взаимодействия бактерий с окружающей средой и растением-хозяином. Широко известен продуцент гомосерина *Agrobacterium tumefaciens*.

Важную роль в микробно-растительных взаимодействиях играют высокомолекулярные вещества, в частности лектины.

Лектины – это углеводсодержащие белки, обладающие свойством обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без изменения их ковалентной структуры. Роль лектинов в микробно-растительных взаимодействиях можно свести к посредничеству. Она хорошо продемонстрирована на примере бактерий рода *Azospirillum*, симбионтов для многих небобовых растений, в частности злаковых. Разные виды *Azospirillum* синтезируют лектины, участвующие в адгезии соответствующих штаммов к корням пшеницы и, в конечном счете, в формировании азотфикссирующей ассоциации.

Лектины выполняют и других функции непосредственно и опосредованно. Лектины *Azospirillum brasiliense* избирательно влияют на прорастание семян, подавляя прорастание семян пшеницы при концентрации 0,5 мг/мл раствора и, наоборот, стимулируя при концентрации 10 мкг/мл.

Лектины, синтезируемые растениями могут выполнять защитную функцию для них: в частности, лектины пшеницы способны подавлять рост некоторых грибов. Лектин связывается с апикальной частью гифы и ингибитирует синтез хитина, основной конструктивный компонент клеточной стенки большинства грибов.

Взаимодействие бактерий рода *Rhizobium* и бобовых растений – это сложный многоступенчатый процесс, контролируемый множеством генов как в бактериях, так и в растениях.

Азотфиксация осуществляется ферментным комплексом бактерий – нитрогеназой. Нитрогеназа чувствительна к кислороду, инактивируясь в его присутствии. Следовательно процесс азотфиксации может часто лимитироваться наличием кислорода.

Процесс инфицирования начинается с адгезии бактерий на поверхности корневых волосков. Корневые волоски продуцируют особые вещества – хемоаттрактанты для бактерий – флавоноиды и изофлавоноиды. *Флавоноиды и изофлавоноиды индуцируют экспрессию бактериальных nod-генов*, которые отвечают за синтез веществ, называемых *Nod-факторами*, обеспечивающими *межвидовое взаимодействие*. Доля в том, что бобово-ризобиальный симбиоз со стороны растений видо-, а со стороны бактерий даже штаммоспецифичен. Компонент экссудатов – аминокислоту триптофан – ризобии способны трансформировать в индолилуксусную кислоту – гормон роста для растительных клеток.

В месте выделения экссудатов имеет место повышенное скопление бактерий и гормонов роста, это приводит к более активному росту части поверхностных клеток корневого волоска, в результате чего волосок закручивается и бактерии оказываются внутри спирали. В этом процессе участвует фермент полигалактуроназа, который может синтезироваться как бактериями, так и растениями. Этот фермент, гидролизуя пектины, размягчает поверхностные покровы волоска и бактерии проникают внутрь клеток растений, формируя там инфекционную нить, которая развиваясь в кортексе корня, активно инфицирует его тетраплоидные клетки.

Клетки ризобий выходя из инфекционной нити теряют палочковидную форму и называются *бактериоидами*. Интенсивный рост и размножение тетраплоидных клеток и бактериоидов приводит к образованию наростов на корнях растений – *клубеньки*.

Внутри клубеньков протекает процесс азотфиксации – биологическое превращение бактериями газообразного атмосферного азота в доступную растениям форму – аммоний.

В процессе азотфиксации главную роль играет вещество леггемоглобин. Этот пигмент находится в растительных клетках, а его синтез осуществляется частично бактериями (протогем) и частично растением (белковая часть) – симбиоз на молекулярно-генетическом уровне.

1.16 Лекция №25-26 (4 часа).

Тема: «Взаимоотношения микроорганизмов с человеком и животными».

1.16.1 Вопросы лекции:

1. Нормобиоценоз человека и животных: характеристика, роль в сохранении гомеостаза.
2. Микрофлора кожи
3. Микрофлора органов дыхания

1.16.2 Краткое содержание вопросов:

1. Нормобиоценоз человека и животных: характеристика, роль в сохранении гомеостаза.

Нормальная микрофлора представлена преимущественно бактериями. Они обитают на поверхности кожи, в полости рта, в желудочно-кишечном тракте и дыхательных путях. В зависимости от местообитания количественные соотношения отдельных видов меняются, хотя каждая область организма имеет свою стабильную микрофлору.

На поверхности кожи содержатся в основном кокковые формы: стафилококки, стрептококки, сарцины. Но наряду с ними могут быть палочковидные бактерии и дрожжевые грибки. Источником питания для них служат выделения потовых и сальных желез. Поэтому загрязненная кожа в большей степени обсеменена микроорганизмами.

Более обильна и разнообразна микрофлора полости рта. Это стрептококки разных видов, лактобациллы, вейлонеллы, довольно часто обнаруживаются дрожжеподобные грибы рода *Candida* и коринебактерии.

Из полости рта через пищевод микроорганизмы попадают в желудок. Но микрофлора желудка более бедна, так как кислая реакция желудочного сока не благоприятствует развитию большинства попавших в него микробов. В желудке в основном развиваются виды, хорошо переносящие кислую среду - молочнокислые стрептококки, энтерококки, сарцины, дрожжи. Встречаются и другие микробы - спороносные палочки, аэробактер, кишечная палочка, актиномицеты.

Весьма разнообразна и многочисленна микрофлора рубца (преджелудка) жвачных животных. Значительное количество микрофлоры рубца составляют целлюлозоразрушающие бактерии. Они играют важную роль в усвоении растительной пищи жвачными животными, которые не образуют фермент целлюлозу, необходимый для гидролиза клетчатки.

В тонком кишечнике человека и животных содержание микроорганизмов ничтожно, хотя реакция среды там щелочная. Предполагают, что слизистая оболочка тонкого кишечника обладает бактерицидными свойствами. Основными обитателями этой полости являются энтерококки, кишечная и ацидофильная палочки, дрожжи.

Наиболее богат микрофлорой толстый кишечник.

Нормальная микрофлора играет в организме положительную роль, что обусловлено ее антагонистической, ферментативной и витаминообразующей функциями.

Микрофлора кишечника играет важную роль в обеспечении микроорганизма витаминами.

В определенных условиях отдельные представители ее могут стать возбудителями заболеваний. Эти заболевания носят название аутоинфекции. В основе их лежат изменения макроорганизма - повреждение органов и тканей, снижение иммунитета, а также генетические и фенотипические изменения представителей нормальной микрофлоры. При воздействии макроорганизма и других неконтролируемых условий из обычных штаммов могут образовываться вирулентные. Поэтому отдельные виды нормальной микрофлоры - кишечная палочка, стафилококки, стрептококки, энтерококки - получили название условно патогенных.

В отдельных случаях может иметь место нарушение в составе нормальной микрофлоры, приводящее к изменению соотношения между отдельными видами - дисбактериоз.

Возникновение дисбактериоза связано с подавлением развития микробов-антагонистов, регулирующих состав нормальной микрофлоры. В результате активно размножаются патогенные и условно патогенные микроорганизмы. Резко увеличивается количество бактерий родов *Pseudomonas*, *Proteus*, являющихся причиной внутрибольничных инфекций, грибов рода *Candida*, вызывающих кандидозы. Последствием дисбактериоза является значительное возрастание антибиотикорезистентных штаммов бактерий, нарушение витаминообразующих и

ферментативных функций нормальной микрофлоры, ослабление иммунорезистентности организма.

Лечение дисбактериозов направлено на восстановление нормального состава микрофлоры организма. С этой целью производится применение препаратов, содержащих суспензии живых микроорганизмов - представителей нормальной микрофлоры человека.

Микрофлора человека — это совокупность микроорганизмов, обитающих на коже и слизистых оболочках. Фактически она является собой метаболическую систему, синтезирующую и разрушающую собственные и чужеродные субстанции, участвующие в адсорбции и переносе в организм человека как полезных, так и, увы, потенциально вредных веществ.

Нормальное состояние микрофлоры (эубиоз) — это качественное и количественное соотношение разнообразных микробов отдельных органов и систем, поддерживающее биохимическое, метаболическое и иммунное равновесие микроорганизма, необходимое для сохранения здоровья человека. Важнейшей функцией микрофлоры является ее участие в формировании резистентности организма различным заболеваниям и обеспечение предотвращения колонизации организма человека посторонними микроорганизмами.

Основными функциями нормальной кишечной микрофлоры являются:

- о обеспечение колонизационной резистентности организма;
- о участие в синтетической, пищеварительной и детоксицирующей функциях кишечника;
- о стимуляция синтеза биологически активных веществ;
- о поддержание высоких уровней лизоцима, секреторных иммуноглобулинов, интерферона, важных для иммунологической резистентности;
- о морфокинетическое действие и усиление физиологической активности желудочно-кишечного тракта.

Вся микрофлора кишечника подразделяется на:

- о облигатную - главная или индигенная микрофлора (в ее состав входят бифидобактерии и бактероиды), которые составляют 90% от общего числа микроорганизмов;
- о факультативную - сапрофитная и условно-патогенная микрофлора (лактобактерии, эшерихии, энтерококки), которая составляет 10% от общего числа микроорганизмов;
- о остаточную (в том числе и транзиторную) - случайные микроорганизмы (цитробактер, энтеробактер, протеи, дрожжи, клостридии, стафилококки, аэробные бациллы и др.), которая составляет менее 1% от общего числа микроорганизмов.

Содержимое желудка здорового человека натощак благодаря бактерицидным свойствам желудочного сока часто бывает стерильным, но нередко обнаруживается и относительно большое число микроорганизмов, проглатываемых со слюной. Примерно такое же количество их в начальной части тощей кишки. В содержимом подвздошной кишки микроорганизмы обнаруживаются регулярно. В содержимом толстой кишки число бактерий максимальное, и 1 г кала здорового человека содержит 10 млрд и более микроорганизмов.

У здоровых лиц в кишечнике большую часть микроорганизмов составляют представители так называемой облигатной микрофлоры - бифидобактерии, лактобактерии, непатогенная кишечная палочка и др. На 92–95% микрофлора кишечника состоит из облигатных анаэробов.

Таким образом, в связи с анаэробными условиями у здорового человека в составе нормальной микрофлоры в толстом кишечнике преобладают (96-98 %) анаэробные бактерии:

- о бактероиды (особенно *Bacteroides fragilis*),
- о анаэробные молочнокислые бактерии (например, *Bifidumbacterium*),

о клостридии (*Clostridium perfringens*),
о анаэробные стрептококки,
о фузобактерии,
о эубактерии,
о вейлонеллы.

И только 14% микрофлоры составляют аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы:

о грамотрицательные колiformные бактерии (прежде всего кишечная палочка - *E.coli*), энтерококки,
о стафилококки,
о протеи,
о псевдомонады,
о лактобациллы,
о грибы рода *Candida*,
о отдельные виды спирохет, микобактерий, микоплазм, простейших и вирусов.

Характер взаимоотношений микроорганизмов с хозяином может быть различным и в первую очередь зависит от особенностей его рациона.

В кишечном тракте хищных или насекомоядных находится корм, являющийся также прекрасным субстратом для развития микроорганизмов. Поэтому здесь складываются конкурентные взаимоотношения микроорганизмов с хозяином. Последний не может полностью исключить возможность их развития, но ограничивает его благодаря секреции кислоты и быстрому пищеварению, в результате чего почти все продукты деятельности пищеварительных ферментов потребляются животным.

В кишечнике травоядных попадает большое количество клетчатки. В большинстве случаев переваривание клетчатки происходит за счет разрушения ее бактериями, а животное потребляет в качестве пищи продукты ее деградации и сами клетки микроорганизмов. Таким образом, здесь наблюдается кооперация. Наибольшего совершенства этот тип взаимодействий достиг у жвачных животных.

В состав кишечной микрофлоры различных животных входит ряд видов бактерий, способных разрушать целлюлозу, гемицеллюлозы, пектины. У многих млекопитающих в кишечнике обитают представители родов *Bacteroides* и *Ruminococcus*. *B.succinogenes* был обнаружен в кишечнике лошадей, коров, баранов, антилоп, крыс, обезьян. *R.albus* и *R.flavefaciens*, активно разрушающие клетчатку, обитают в кишечнике лошадей, коров, кроликов. К сбраживающим клетчатку кишечным бактериям относятся также *Butyrivibrio fibrisolvens* и *Eubacterium cellulosolvens*. Роды *Bacteroides* и *Eubacterium* представлены в кишечнике млекопитающих рядом видов, некоторые из которых разрушают также белковые субстраты.

Рубец жвачных обильно заселен большим числом видов бактерий и простейших.

В среднем количество бактерий составляет 10⁹ - 10¹⁰ клеток в 1 г рубцового содержимого.

2. Микрофлора кожи

Микроорганизмы заселяют главным образом участки кожи, покрытые волосами и увлажненные потом.

Обычно на коже преобладают грамположительные бактерии. Типичными обитателями кожи являются различные виды *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacicrium*, *Acinetobacter*. Для нормальной микрофлоры кожи характерны такие виды *Staphylococcus*, как *S. epidermidis*, но не упомянутый *S. aureus*, развитие которого здесь свидетельствует о неблагоприятных изменениях микрофлоры организма. Представители рода *Corynebacterium* иногда составляют до 70% всей кожной микрофлоры. Некоторые виды образуют липазы, разрушающие выделения жировых желез.

Большинство микроорганизмов, населяющих кожу, не представляют какой-либо опасности для хозяина, но некоторые, и прежде всего *S. aureus* условно патогенны.

Основные зоны колонизации – эпидермис (особенно роговой слой), кожные железы (сальные и потовые) и верхние отделы волосяных фолликулов. Микрофлора волосяного покрова идентична микрофлоре кожи.

3. Микрофлора органов дыхания

Верхние отделы дыхательных путей несут высокую микробную нагрузку – они анатомически приспособлены для осаждения бактерий из выдыхаемого воздуха. Помимо обычных негемолитических и зеленящих стрептококков, непатогенных нейссерий, стафилококков и энтеробактерий, в носоглотке можно обнаружить менингококки, биогенные стрептококки и пневмококки. Верхние отделы дыхательных путей у новорожденных обычно стерильны и колонизируются в течении 2-3 суток. Исследования последних лет показали, что наиболее часто из дыхательных путей клинически здоровых животных выделяется сапрофитная микрофлора:

- о *S. saprophyticus*,
- о бактерии родов *Micrococcus*,
- о *Bacillus*,
- о коринеформные бактерии,
- о негемолитические стрептококки,
- о грамотрицательные кокки.

о Кроме того, выделены патогенные и условно-патогенные микроорганизмы:

- о альфа - и бета – гемолитические стрептококки,
- о стафилококки (*S. aureus*, *S. hysus*),
- о энтеробактерии (эшерихии, сальмонеллы, протей и др.),
- о пастереллы,
- о *P. aeruginosa*,
- о грибы рода *Candida*.

В носовой полости обнаруживается наибольшее число сапрофитов и условно-патогенных микроорганизмов. Они представлены стрептококками, стафилококками, сарцинами, пастереллами, энтеробактериями, коринеформенными бактериями, грибами рода *Candida*, *P. aeruginosa* и бациллами. Трахея и бронхи заселены аналогичными группами микроорганизмов. В легких обнаружены отдельные группы кокков (бета-гемолитическими, *S. aureus*), микрококки, пастереллы.

Микробный биоценоз органов мочеполовой системы более скучный. Верхние отделы мочевыводящих путей обычно стерильны; в нижних отделах доминируют *Staphylococcus epidermidis*, негемолитические стрептококки, дифтероиды; часто выделяют грибы родов *Candida*, *Toluropsis* и *Geotrichum*. В наружных отделах доминирует *Mycobacterium smegmatis*. Основной обитатель влагалища – *B. vaginalis*, обладающая выраженным антагонизмом к другим микробам. При физиологическом состоянии мочеполовых путей микрофлора обнаруживается только в их наружных отделах (стрептококки, молочнокислые бактерии). При гинекологических заболеваниях нормальная микрофлора изменяется.

Вышеприведенные облигатные представители микрофлоры свойственны большинству домашних, сельскохозяйственных млекопитающих животных и организму человека. В зависимости от вида животного скорее может меняться количество микробных групп, но не видовой их состав.

Патогенными (от греч. *patos* - болезнь, страдание) называются микроорганизмы, потенциально способные вызывать инфекционный процесс. Это генотипический признак, характеризующий видовую способность бактерий приживаться в тканях и полостях организма и размножаться в них. Патогенность является потенциальным признаком бактерий потому, что она может быть проявлена только в определенных условиях - в восприимчивом организме. Патогенность контролируется многими генами,

ответственными за проявление всех свойств, определяющих патогенность, таких как синтез продуктов метаболизма, ферментов, образование морфологических структур микроорганизма, в частности капсулы.

Характерной особенностью патогенных микробов является специфичность действия. Степень или мера патогенности микроорганизма называется вирулентностью (от лат. *virulentus* - ядовитый, болезнетворный).

Вирулентность представляет собой совокупность ряда болезнетворных свойств микробы: инфекционность или заразительность, инвазивность (способность внедряться в организм и распространяться в его тканях), интенсивность размножения и способность вырабатывать ядовитые вещества. Степень вирулентности измеряется условно принятой единицей - минимальной смертельной дозой (DLM – *dosis letalis minima*), т. е. наименьшим количеством микробов, которое при заражении восприимчивых к ним животных вызывает 95-100 % гибели их. Иногда используют 50 %-ную летальную дозу (LD50). Это количество микробов, вызывающее гибель 50 % подопытных животных.

Вирулентность - сложное свойство патогенных микробов, определяющееся рядом факторов, названных факторами вирулентности. Наиболее существенным из них является образование веществ, способствующих внедрению микробов в организм. Такие вещества называются факторами инвазии, или факторами распространения. К ним относятся ферменты гиалуронидаза, коллагеназа, фибринолизин. Гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав соединительной ткани и обеспечивающую ее прочность, и непроницаемость для микробов. Расщепление гиалуроновой кислоты увеличивает проницаемость тканей и способствует распространению микробов по организму.

Наличие гиалуронидазы у микробов легко выявляется в простом лабораторном опыте на животных. Кролику подкожно (поверхность предварительно выбрита) вводят в один участок тушь, в другой - тушь, смешанную с бульонной культурой вирулентных бактерий. В результате участок появляющегося подкожного окрашивания в месте введения чистой туши меньше, чем там, где вводилась смесь ее с микробами. Это указывает на увеличение проницаемости ткани под действием микробов. Гиалуронидаза обнаружена у многих патогенных микробов: у палочек газовой гангрены, стафилококков и стрептококков, у возбудителей дифтерии, бруцеллеза и др.

Фермент коллагеназа разрушает тканевые белки и вызывает распад мышц. Это также способствует распространению микробов в организме. Коллагеназа обнаружена у палочки газовой гангрены.

Фибринолизин расщепляет сгустки фибрин, которые образуются в крови в процессе воспалительных реакций и препятствует распространению микробов. Фибринолизин вырабатывается стрептококками и стафилококками, возбудителем чумы и др.

Вирулентность микробов определяется также образованием ими специфических веществ белковой природы - агрессинов. Агрессины сами по себе безвредны для организма, но подавляют его защитные функции. Так, несмертельная доза патогенных микробов под влиянием агрессинов вызывает гибель животного.

Существенную роль в вирулентности микробов играет капсула. Капсула выполняет в основном защитную функцию. Капсулевые бактерии более устойчивы к фагоцитозу, к бактерицидному действию крови. Они дольше сохраняются в организме, чем бескапсулевые. Утрата способности к образованию капсулы ведет к снижению или потере вирулентности. Полученный в 1942 г. Н. Н. Гинзбургом бескапсулный штамм палочки сибирской язвы настолько снизил вирулентность, что стал совершенно безвредным для животных. Этот бескапсулный штамм используется для изготовления вакцины против сибирской язвы.

Самым важным фактором вирулентности является способность микробов вырабатывать ядовитые продукты метаболизма - токсины. Попадая в ток крови, они

разносятся по организму и вызывают различные отравления. Механизм действия большинства токсинов изучен еще недостаточно.

Среди микробных токсинов различают экзо- и эндотоксины. Экзотоксины, или истинные токсины, подобно экзоферментам, продуцируются клеткой и выделяются в окружающую среду, эндотоксины прочно связаны с клеткой и освобождаются только после гибели ее.

Эндотоксины образуются главным образом грамотрицательными патогенными микроорганизмами. Они представляют собой комплекс полисахаридов и липопротеидов, характеризуются термостабильностью, меньшей ядовитостью, чем экзотоксины. Кроме того, они не обладают специфичностью действия и при поражении макроорганизма дают однотипную картину патологического процесса: слабость, одышку, головную боль, расстройство кишечника. Малые дозы эндотоксина вызывают повышение температуры, большие - понижение и гибель животного.

В отличие от эндотоксинов экзотоксины вырабатываются только некоторыми грамположительными микроорганизмами - возбудителями столбняка (*Clostridium tetani*), ботулизма (*Clostridium botulinum*), дифтерии (*Corynebacterium diphtheriae*), газовой гангрены (*Clostridium perfringens*). Они более токсичны и более опасны, чем эндотоксины. Это самые сильные биологические яды. Смертельная доза токсина палочки ботулизма для морской свинки равна $1 \cdot 10^7$ мл; дифтерийной - $2 \cdot 10^3$ мл.

Экзотоксинам свойственна высокая специфичность действия. Дифтерийный токсин является продуктом незавершенного синтеза цитохрома а и катализирует окислительные реакции в организме.

Действие экзотоксинов проявляется через определенный инкубационный период, который длится от нескольких часов до суток. Это одно из отличий экзотоксинов от ядов небиологической природы. Экзотоксины обладают свойством антигенностии, т. е. при введении в организм обусловливают образование антител, нейтрализующих токсины. Весьма важно то, что, теряя токсичность, они сохраняют антигенностии. Так, токсины бактерий дифтерии, столбняка, ботулизма при обработке их формалином (0,2-0,5 %) при температуре 37-38° С в течение месяца утрачивают ядовитые свойства, сохраняя при этом антигенностии. Такие обезвреженные токсины называются анатоксинами. Они используются как вакцины в профилактических целях, а также для получения антитоксических лечебных сывороток. Все перечисленные выше факторы вирулентности определяют болезнетворность микроорганизмов и форму тяжести вызываемого ими инфекционного заболевания.

1.17 Лекция №27 (2 часа).

Тема: «Биогеохимическая деятельность микроорганизмов».

1.17.1 Вопросы лекции:

1. Круговорот химических элементов.
2. Круговорот азота.
3. Круговорот углерода.
4. Круговорот серы.

1.17.2 Краткое содержание вопросов:

1. Круговорот химических элементов.

Микроорганизмам принадлежит исключительно важная роль в круговороте в природе, в образовании и разрушении месторождений полезных ископаемых, минералов и горных пород, а также в миграции отдельных элементов.

Основы понимания биохимической роли микроорганизмов были заложены на рубеже 19 и 20 вв. исследованиями выдающихся русских микробиологов С. Н. Виноградского, Т. А. Надсона, В. Л. Омелянского, а также В. И. Вернадского.

Будучи широко распространеными в природе и обладая активным ферментативным аппаратом, микроорганизмы осуществляют процессы расщепления и синтеза самых сложных органических веществ. Благодаря минерализующей деятельности микроорганизмов происходит постепенное очищение поверхности земли от трупов животных и остатков растений. По словам В. Л. Омелянского, микроорганизмы являются настоящими могильщиками органического мира. Органические вещества астений и животных под действием микроорганизмов разлагаются на простые минеральные элементы, которые растворяются в воде и используются растениями в качестве источника питания, вовлекаясь таким образом в малый биологический круговорот. Следовательно, биологический круговорот объединяет процессы синтеза и распада органических веществ и обусловлен деятельностью живых организмов.

Помимо биологического круговорота элементов, в природе функционирует большой геологический круговорот. Он осуществляется действием физико-химических факторов и включает процессы выветривания горных пород, растворение минеральных продуктов выветривания и вынос их моря и океаны. Преобладающая часть вынесенных минеральных элементов используется водными организмами и после их смерти частично переходит в состав осадочных пород, выключаясь тем самым из биологического круговорота. Если бы этот процесс был бы постоянно, то жизнь на земной поверхности не могла бы развиваться. Однако этого не происходит, так как биологически важные элементы непрерывно закрепляются в почве благодаря деятельности зеленных растений и некоторых автотрофных микроорганизмов, использующих минеральные элементы для синтеза органического вещества. После отмирания растения и животные минерализуются микроорганизмами и в зависимости от условий поступают в биологический или геологический круговорот. Круговорот веществ совершается по длинной цепи последовательных и тесно связанных между собой реакций

2. Круговорот азота.

В цикл превращений азота входят реакции синтеза сложных азотистых соединений и реакций минерализации органического азота до солей азотной и азотистой кислоты или молекулярного азота.

Цикл азота состоит из четырёх этапов. 1-ый: фиксация молекулярного азота; аммонификация, нитрификация и денитрификация. Фиксация молекулярного азота осуществляется некоторыми аэробными и анаэробными микроорганизмами, фотосинтезирующими бактериями, цианобактериями. К какой бы группе не относился азотфиксатор, конечными продуктами всегда являются азотсодержащие органические вещества.

Аммонификация

Почти весь азот, попадающий в почву в процессе азотфиксации, а также азот растительных и животных тканей, зеленых удобрений, навоза, гумуса содержится в органических белковых соединениях – до 99 % от всего запаса азота в почве. Однако этот азот не может усваиваться растениями. Им необходим минеральный азот. Благодаря деятельности микроорганизмов в почве и воде постоянно происходит разложение органических азотсодержащих веществ до аммиака – это аммонификация - 2-ой этап цикла азота. Аммонификации подвергаются белковые соединения, алкалоиды, мочевина, нуклеиновые кислоты и т.д. Часть освобождающегося аммиака адсорбируется в обменных реакциях почвы, часть используется гетеротрофными бактериями и превращается в белки их тел; некоторое количество аммиака окисляется автотрофами до нитратов и нитритов или же он может остаться в свободном состоянии и выделяться в атмосферу.

В аммонификации принимают участия многие микроорганизмы, включая спорообразующие бактерии, бациллы, актиномицеты, микроскопические грибы.

Активными возбудителями процесса являются бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus*.

Химизм аммонификации состоит в следующем. Расщепление молекулы белка начинается с процесса гидролиза, осуществляемого внеклеточными гидролитическими ферментами, выделяемыми аммонификаторами. В результате образуется более простые продукты: белок – пептоны – пептиды – аминокислоты. Аминокислоты ассимилируются бактериями как источники питания, и под действием внутриклеточных ферментов дезаминаз от них отщепляется аммиак – конечный продукт аммонификации.

Нитрификация

Аммиак и аммонийные соли, образующиеся в процессах аммонификации, подвергаются в почве и водоемах окислению в соли азотистой (нитриты), и затем азотной кислоты (нитраты). Процесс окисления аммиака и аммиачных солей до азотной кислоты называется нитрификацией. Сущность процесса нитрификации была выяснена в классических исследованиях С. Н. Виноградского.

В 1891 г. Он выделил возбудителей нитрификации в чистую культуру и показал, что процесс нитрификации является двухфазным и осуществляется различными видами бактерий.

В первую фазу через ряд промежуточных звеньев происходит окисление аммиака до нитритов. Освобождена при этом энергия обусловливают развитие нитрифицирующих бактерий. Возбудителями первой фазы нитрификации являются бактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosolobus*.

Наиболее значимым в процессе нитрификации является род *Nitrosomonas*. Бактерии этого рода имеют палочковидную форму размером 1,5 * 1 мкм. Они грамотрицательны, подвижны, спор не образуют.

Для второй фазы характерно окисление нитритов до нитратов.

Возбудителями второй фазы нитрификации являются бактерии родов *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*. Представители рода *Nitrobacter* – мелкие (1* 0,8 мкм) овальные грамотрицательные палочки.

Как и возбудители первой фазы, это типичные хемоавтолитотрофы, т. е. они развиваются на чисто минеральных средах, используя для синтеза органических веществ энергию реакций окисления нитратов, а углерод из углекислого газа.

Нитрификаторы являются облигатными аэробами. Оптимальная температура их развития равна 28-30 0 С. Нитрифицирующие бактерии очень специфичны в отношении окисляемого субстрата. *Nitrosomonas* окисляет только аммиак, а *Nitrobacter* – только соли азотистой кислоты.

Кроме типичных нитрификаторов многие гетеротрофные бактерии родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* способны окислять аммиак и другие восстановительные соединения азота до нитритов и нитратов. Этот тип нитрификации получил название гетеротрофной. Она не является источником энергии для бактерий.

Денитрификация

Нитраты частично используются высшими растениями, частично вымываются водой, некоторое же количество их расходуется на построение самих бактерий. Ряд бактерий используют кислород нитратов для окисления органических веществ. При этом происходит восстановление нитратов в нитриты, молекулярный азот и другие газообразные продукты. Процесс восстановления нитратов получил название денитрификации или нитратредукции.

Денитрифицирующие бактерии относятся к аэробам или факультативным анаэробам. Наиболее активные денитрификаторы известны среди бактерий родов *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*.

3. Круговорот углерода.

Углерод, так же как и азот, является важнейшим элементом органической жизни. Первосточником углерода любого органического вещества служит углекислота воздуха.

Содержание ее в воздухе составляет 0,03 % от общего объема газов и является довольно постоянной величиной.

Круговорот углерода начинается с фиксации углекислоты зелеными растениями и автотрофными микроорганизмами. Образовавшиеся в процессе фото- и хемосинтеза организмов углеводы или другие углеродсодержащие органические соединения частично используются этими же организмами для получения энергии, при этом углекислота (продукт реакций окисления) выделяется в среду. Часть фиксированного растениями углерода потребляется человеком и животными, которые выделяют его в форме углекислоты в процессе дыхания. Углерод, выделяющийся в результате разложения отмерших растений и животных, окисляется до углекислоты и тоже возвращается в атмосферу.

Ведущая роль возвращении углерода в атмосферу принадлежит микроорганизмам. В процессах дыхания и брожения они разлагают самые разнообразные органические соединения. Более доступными являются углеродсодержащие соединения, растворимые в воде (углеводы, спирты). Но в естественных условиях - в почве и воде - в гораздо большем количестве встречаются труднорастворимые соединения углерода, такие, например, как крахмал, пектиновые вещества, клетчатка, лигнин. В них сосредоточена основная масса углерода. Разложение их начинается с гидролиза, в результате чего образуются более простые соединения типа углеводов. Дальнейшее превращение данных соединений осуществляется в реакциях дыхания или брожения.

Расщепление крахмала микробами начинается с его гидролиза. Под действием амилазы крахмал превращается в декстрин, затем в мальтозу и изомальтозу. Осахарившийся крахмал легко подвергается действию микробов и в анаэробных условиях разлагается по одному из типов брожения углеводов. В аэробных условиях крахмал окисляется через ЦТК или пентозофосфатный цикл до углекислоты.

Амилолитической активностью обладают многие микроорганизмы. В анаэробных условиях расщепление крахмала осуществляется спорообразующими микроорганизмами рода *Clostridium*. Специализированные виды его (*Cl. amyloliticum*) расщепляют крахмал до стадии кислот, спиртов и газов. Пектиновые вещества растений имеют слизистую консистенцию и сложное химическое строение, поэтому для минерализации растительных тканей необходимо разрушение пектиновых веществ. В почве это разрушение осуществляется в аэробных условиях *B. subtilis*, *Bac. mesentericus*, в анаэробных - *Cl. felsineum* и *Cl. pectinovorum*. Разложение пектина начинается с его гидролиза под действием фермента пектиназы. В результате образуются галактуроновая и уксусная кислоты, метиловый спирт которые далее окисляются до углекислоты и воды. В анаэробных условиях сбраживанию подвергаются только галактоза и арабиноза с образованием масляной кислоты, остальные вещества накапливаются в субстрате или разлагаются аэробами.

Огромное значение в круговороте углерода имеет расщепление целлюлозы (клетчатки). В состав целлюлозы входит более 50 % всего органического углерода биосфера.

Целлюлоза представляет собой очень стойкое органическое соединение и может быть разрушена только при действии сильных химических окислителей. Но в природе она довольно интенсивно разрушается широко распространенными микроорганизмами,

Различают аэробное и анаэробное расщепление целлюлозы. В аэробных условиях большая часть целлюлозы окисляется до углекислоты и воды и лишь незначительное количество ее окисляется не полностью и входит в состав гумуса. В аэробных условиях ведущая роль в разложении целлюлозы принадлежит грибам.

Высокой целлюлолитической активностью характеризуются грибы родов *Fusarium*, *Chaetomium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*. Возбудителями аэробного окисления целлюлозы являются и бактерии родов *Cytophaga* и *Sporocytophaga* (пор. *Cytophagales*),

миксобактерин родов *Myxococcus*, *Archangium* и *Polyangium*, а также сходные с псевдомонадами бактерии группы *Cellvibrio*. Все они широко распространены в природе.

Превращение углеводородов

Углеводороды биогенного и abiогенного (геохимического) происхождения концентрируют значительную часть углерода. Поэтому разложение их составляет важный этап в круговороте углерода. Большинство природных углеводородов частично или полностью окисляются микроорганизмами. Даже такие химически устойчивые соединения, как нефть, каучук, парафин разлагаются под действием микроорганизмов.

Способностью к расщеплению ароматических углеводородов обладают многие бактерии и грибы: псевдомонады, микобактерии, бациллы и дрожжи. При соответствующих условиях они производят полное окисление определенного углеводорода без накопления промежуточных продуктов. Например, некоторые штаммы нокардий, в частности, *Nocardia corallina*, могут расти на бензоле или толуоле как единственных источниках углерода без накопления промежуточных продуктов. Нафталин и антрацен также могут использоваться отдельными штаммами *Nocardia* и *Corynebacterium*.

4. Круговорот серы.

Микроорганизмы осуществляют 3 этапа превращения серы: минерализацию органической серы, окисление минеральной серы и восстановление минеральной серы. Эти три этапа определяют три основные формы природной серы: органическую серу в белках, АМК; сульфаты и сульфиты; сероводород и сульфиды.

Минерализация органической серы. В этом процессе участвуют многочисленные неспециализированные гетеротрофные микроорганизмы.

В расщеплении органических соединений серы участвуют и многообразные аэробные и анаэробные бактерии грибы и некоторые актиномицеты. В анаэробных условиях *Proteus vulgaris*, *Bac. subtilis* образуют H_2S из цистина и цистеина. Грибы *Microsporum* и *Asp. niger* образуют метилмеркаптаны и сульфаты; актиномицеты при разрушении метионина образуют окислительные

соединения серы и сульфиды. Окисление минеральной серы.

Окисление минеральной серы, получившее название сульфофиксации, включает процессы окисления сероводорода, элементарной серы, тио- и тетрасоединений. Эти процессы вызываются особыми группами бактерий - серобактериями и тионовыми бактериями, широко распространенными как в почвах, так и в водоемах.

Окисление сероводорода серобактериями осуществляется в два этапа. Сначала происходит внутриклеточное окисление сероводорода до элементарной серы. Последняя накапливается в форме гранул капельно-жидкой серы в протоплазме клеток, что и определило название данных бактерий. Откладываемая в протоплазме клеток сера является запасным питательным материалом. Если среда обедняется сероводородом, то эта сера начинает быстро окисляться до серной кислоты.

Образующаяся серная кислота вступает в реакцию с бикарбонатами кальция и превращается в гипс ($CaSO_4$), который диффундирует из клеток в окружающую среду. Поэтому для развития серобактерий необходимо наличие в среде бикарбонатов.

Тионовые бактерии. В отличие от серобактерий, тионовые бактерии способны окислять сернистые соединения без отложения серы внутри клетки. Сера накапливается вне клетки. Например, окисление гипосульфита происходит по следующей схеме:



За счет освобождающейся энергии бактерии ассимилируют углекислый газ. Ассимиляция углекислоты совершается по циклу Кальвина, подобно тому как у зеленых растений при фотосинтезе.

Тионовые бактерии в природных условиях производят окисление сульфидных минералов, способствуя тем самым выщелачиванию находящихся в руде металлов. При участии тионовых бактерий окисление сульфидов и выщелачивание металлов идет

быстрее, чем при их отсутствии и, кроме того, сопровождается большим выходом металлов. Тионовые бактерии, в частности *Th. thiooxidans*, используются в гидрометаллургии для выщелачивания редких металлов: германия, галия, селена, индия, которые содержатся в сульфидах цинка, свинца, меди.

Восстановление минеральной серы

Процесс восстановления соединений минеральной серы до сероводорода получил название десульфофикации. Он происходит в анаэробных условиях: в водоемах на значительных глубинах, в почвах, насыщенных водой, торфяниках (об этом говорит и их черная окраска, обусловленная наличием сульфидов железа).

Восстановление сульфатов осуществляется группой специальных факультативных автотрофных десульфофицирующих бактерий. Одна из этих бактерий была выделена М. Бейеринком в 1895 г. из сточной воды и названа *Vibrio desulfuricans*. Это анаэробная грамотрицательная бактерия, имеющая форму вибриона.

Сульфатредуцирующие бактерии являются облигатными анаэробами. В качестве конечного акцептора водорода они используют сульфаты. Донором водорода могут служить различные органические соединения (спирты, кислоты) и молекулярный водород. В качестве побочного продукта сульфатного дыхания образуется сероводород. Восстановление сульфатов происходит по уравнению.

Органические соединения сульфатредуцирующие бактерии окисляют не до конца, чаще до уксусной кислоты.

Сульфатредуцирующие бактерии представлены бактериями двух родов: *Desulfovibrio* и *Desulfatotomaculum*. Первые имеют форму вибриона с полярно расположенным жгутиком. Спор не образуют, второй род включает 4 вида бактерий - термофилы и мезофиллы. Энергию получают в результате окислительного фосфорилирования, это обеспечивает возможность ассимиляции органических веществ.

1.18 Лекция №28 (2 часа).

Тема: «Практическое применение микроорганизмов».

1.18.1 Вопросы лекции:

1. Микробная биотехнология. Значение биотехнологии для различных областей человеческой деятельности.
2. Производство аминокислот и белка
3. Производство органических кислот
4. Биотехнологии медицинского назначения
5. Биотехнологии для сельского хозяйства
6. Биотехнологии для охраны природы
7. Современные методы биотехнологии

1.18.2 Краткое содержание вопросов:

1. Микробная биотехнология. Значение биотехнологии для различных областей человеческой деятельности.

К одним из самых древних областей человеческой деятельности относятся хлебопечение, виноделие, пивоварение, которые в основе своей имеют не что иное, как жизнедеятельность микроорганизмов – хлебопекарных и винных дрожжей. Сюда же можно отнести получение кисломолочных продуктов, сыров с помощью молочнокислых бактерий, пищевого уксуса с помощью уксуснокислых бактерий.

Все основные технологии можно разделить на три основных класса.

1. **Физико-механические технологии** – исходный материал (сырье) в процессе получения продукта меняет форму или агрегатное состояние, но не изменяет своего

химического состава. Примерами могут служить изготовление досок из бревен или отливка металлических изделий.

2. **Химические технологии** – в процессе получения продукта сырье претерпевает изменения химического состава. Примеры: производство из природного газа спирта, полиэтилена, синтетического каучука, производство из природного газа и воздуха удобрения аммиачной селитры, получение красителей и многих лекарств из простых химических соединений (кислоты, щелочи, бензола и др.).

3. **Биотехнологии** в отличие от физико-механических и химических технологий предполагают использование живых организмов или их компонентов.

По определению Европейской Биотехнологической Федерации (ЕБФ) биотехнология является такой интеграцией естественных и инженерных наук, при помощи которой использование клеток, клеточных структур и отдельных биомолекул дает возможность получения качественно улучшенных и дешевых продуктов медицинского и промышленного назначения или проведения других полезных манипуляций.

Современная биотехнология родилась на стыке нескольких наук. Она опирается на теоретические и методические положения микробиологии, биохимии, генетики, молекулярной биологии, а также использует достижения органической, неорганической и аналитической химии, процессы и аппараты химической и пищевой промышленности.

Условно можно выделить несколько направлений полезной для человека деятельности микроорганизмов.

1. Наращивание клеточной массы, которая представляет собой продукт (получение пекарских дрожжей, производство белково-витаминного концентрата, многих вакцин).

2. Производство продуктов микробного биосинтеза, к числу которых относятся антибиотики, гормоны, ферменты, аминокислоты, витамины красители и др.

3. Биотрансформация – процесс, в результате которого под воздействием биохимической деятельности микроорганизмов или их ферментов происходит изменение химического состава исходного вещества (получение стероидных гормонов).

4. Очистка окружающей среды от загрязняющих ее веществ.

5. Производство энергоносителей (биогаза, этанола).

6. Выщелачивание, то есть перевод в растворенное состояние некоторых веществ, находящихся в твердых телах.

По сравнению с химическими технологиями биотехнологии имеют следующие основные преимущества:

- возможность получения специфичных и уникальных природных веществ, часть из которых еще не удается получить путем химического синтеза;

- проведение биотехнологических процессов при относительно невысоких температурах и давлениях;

- высокая скорость роста микроорганизмов, во много раз превышающая скорость роста животных и растений;

- в качестве сырья в процессах биотехнологии можно использовать дешевые отходы сельского хозяйства и промышленности;

- биотехнологические процессы по сравнению с химическими обычно более экологичны, имеют меньше вредных отходов, близки к протекающим в природе естественным процессам;

- как правило технология и аппаратура в биотехнологических производствах более просты и дешевы.

2. Производство аминокислот и белка

В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей 60-120 г полноценного белка, в рационе сельскохозяйственных животных на каждую кормовую единицу нужно не менее 110 г белка. По прогнозам к 2050 году население Земли возрастет до 10 млрд человек, и для обеспечения его потребности в продукции сельского

хозяйства нужно будет увеличить объемы производства на 75%. Традиционными методами этого достичь нельзя. Потребности в белковых продуктах можно удовлетворить, используя микроорганизмы, которые на 50% состоят из белка. Например, в ферментере объемом 300 м³ за сутки можно выработать 1 т микробного белка (365 т в год). Чтобы такое же количество белка выработать с помощью крупного рогатого скота, нужно иметь 30000 голов. Если же использовать для получения такой скорости производства белка бобовые растения, например, горох, то потребуется иметь поле площадью 5400 га. Для производства белка можно выращивать бактерии, дрожжи и микроводоросли. Известны попытки использования биомассы мицелиальных грибов рода *Fusarium*, на основе которых производят пищевой продукт микопротеин. Для вкуса и цвета в него вводят специальные пищевые добавки. В качестве пищевых добавок используются препараты из пивных и пищевых дрожжей. Белок микробного происхождения добавляется в пищу человека только в очищенном от примесей виде.

Требования к белкам микробного происхождения, добавляемым в корм животным, не такие высокие. Белки хорошего состава можно получить из культивируемых дрожжей. Высушенная дрожжевая масса гранулируется и используется как **белково-витаминный концентрат**, содержащий до 60% белковых веществ. Вместе с тем в кормовых дрожжах встречаются вредные примеси, поэтому дрожжевой белок добавляется в корма животных ограниченно – не более 5-10% от сухой массы корма. Известно более 30 видов бактерий, которые также могут быть использованы в качестве источника полноценного кормового белка. За счет высокого содержания белка добавление 1 т БВК в корма обеспечивает экономию 7 т фуражного зерна и дополнительное производство 800 кг свинины или 5 т мяса птицы. Микроны-производители белка могут расти на различных достаточно дешевых средах (метанол, этанол, природный газ, нефтепродукты). Наиболее продуктивным сырьем для получения микробного белка следует считать клетчатку, причем преимущественно используются отходы сельского хозяйства: подсолнечная лузга, кукурузные кочерыжки, солома и др.

В рационе человека и животных имеет большое значение не только количество белка, но и его состав. Белки состоят из отдельных звеньев – **аминокислот**. Если растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все составляющие белок аминокислоты из углекислоты, воды, амиака и минеральных солей, то человек и животные не могут производить некоторые аминокислоты, которые называются незаменимыми. Это валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и фенилаланин. Эти аминокислоты должны поступать в организм в готовом виде с пищей, их отсутствие вызывает тяжелые заболевания у человека и снижение продуктивности сельскохозяйственных животных.

3. Производство органических кислот

Органические кислоты и их соли широко используются в пищевой, фармацевтической, кожевенной, текстильной, химической, металлургической и других отраслях промышленности. Большинство кислот, используемых для технических нужд, производится химическим путем на основе нефтехимического сырья и продуктов сухой перегонки древесины. В тех случаях, когда химический синтез кислот является сложным и экономически невыгодным, или если они имеют пищевое или медицинское назначение, кислоты производят микробиологическим путем. С помощью микроорганизмов может быть получено более 50 различных органических кислот, методы получения их разработаны достаточно подробно. В настоящее время только 6 органических кислот производится биотехнологическим путем в промышленном масштабе. Причем лимонную, глюконовую, кетоглюконовую и итаконовую кислоты производят только микробиологическим путем, а молочную и уксусную – как химическим, так и микробиологическим методами.

Уксусная кислота имеет наибольшее значение среди органических кислот. Ее используют при выработке многих химических веществ, включая каучук, пластмассы,

волокна, инсектициды. Микробиологический способ производства уксусной кислоты состоит в превращении этанола в уксусную кислоту при участии бактерий *Acetobacter* и *Gluconobacter*. Процесс идет в анаэробных условиях в режиме непрерывного культивирования продуцента.

Лимонную кислоту широко используют в пищевой (приготовление соков, кондитерских изделий), фармацевтической и косметической промышленности. Ею заменяют фосфаты в составе detergентов, так как она полностью метаболизируется живыми организмами и не загрязняет окружающую среду. Лимонная кислота образует хелаты с металлами, поэтому ее применяют для их очистки. Производят лимонную кислоту из сахара или из отходов его производства – мелассы, из содержащих глюкозу гидролизатов древесины и зерна. Мировое производство лимонной кислоты составляет более 300 тыс.т в год. Для промышленного производства лимонной кислоты используют, главным образом, культуру гриба *Aspergillus niger* и *A. wentii*.

Глюконовая, кетоглюконовая, итаконовая и молочная кислоты используются в пищевой промышленности в качестве подкислителей. Глюконат натрия, в виде которого обычно выделяют глюконовую кислоту, используют для извлечения металлов из руд, борьбы с коррозией, как моющее средство, в качестве медицинского препарата. Итаконовая кислота применяется при производстве пластмасс и красителей. Молочную кислоту используют при выделке кожи и как сырье для производства биоразлагаемого полимера полилактата.

4. Биотехнологии медицинского назначения

Биотехнология предлагает новые подходы к разработке и производству лекарственных, профилактических и диагностических медицинских препаратов, а также позволяет производить в достаточных количествах широкий спектр лекарственных средств, которые ранее были малодоступны.

К самому большому классу лекарств, получаемых путем микробного синтеза, относят **антибиотики**. Сегодня известно более 6000 видов антибиотиков, более 100 из которых находят применение в медицинской практике, в том числе при лечении таких тяжелых заболеваний, как туберкулез, менингит, плеврит, пневмония. Отдельные антибиотики применяют при лечении онкозаболеваний.

Важный вклад микробной биотехнологии в медицину состоит в получении профилактических препаратов **-вакцин и сывороток**, причем этот вид продукции не имеет дублера в химической промышленности. Вакцины – специально выращенные болезнетворные микроорганизмы и их компоненты (антигены), которые после специальной обработки вводят в виде ослабленной или убитой культуры в организм человека и обеспечивают за счет этого создание у него иммунитета к данному заболеванию. Сейчас применяют также генно-инженерные вакцины, обладающие рядом преимуществ. Сыворотка – полученные на антиген готовые антитела, вводимые уже заболевшему человеку или животному для быстрого ответа на инфекцию.

Витамины необходимы в малых количествах любому организму, они выполняют в нем катализитические функции, ускоряя различные процессы обмена веществ. Первоначально витамины получали из овощей и фруктов, рыбы. Например, для выделения 1 г рибофлавина (B₂) требовалась 1 т моркови или 160 кг печени трески. В 1935 году был обнаружен активный продуцент рибофлавина – гриб *Eremothecium ashbyii*, способный при выращивании на 1 т питательной среды синтезировать 25 кг витамина B₂.

Большое количество витаминов группы В содержится в биомассе пивных дрожжей. Витамины являются относительно простыми соединениями, поэтому многие из них сейчас синтезируют химическим путем. Но самые сложные по строению витамины B₂, B₁₂, бета-каротин (предшественник витамина А) и эргокальциферол (предшественник витамина D) целесообразнее получать с помощью микроорганизмов.

Следующий класс веществ, производимых биотехнологическим путем, – гормоны. К традиционным микробиологическим продуктам относятся **стериоидные гормоны** –

кортизон, преднизолон, которые широко применяют при лечении различных аллергических заболеваний, бронхиальной астмы, ревматоидного артрита и др. С помощью микроорганизмов производится также **гормон роста** – соматотропин.

Среди лекарственных средств особое место занимают **ферменты**. Так, известно применение протеолитических ферментов при лечении заболеваний пищеварительных органов. Эти же ферменты используют при лечении ожоговых поражений и различных ран для удаления некротических тканей. При лечении патологий обмена веществ применяют также липазы. Протеиназы с фибринолитическим действием используют для растворения тромбов. С помощью таких препаратов, как урокиназа и стрептокиназа, лечат тромбоз коронарных сосудов сердца, легких, конечностей.

Разработаны биотехнологии производства иммуномодуляторов, кровезаменителей, инсулина, интерферона, биоразлагаемых полимеров для хирургических швов, различных диагностических средств. Число новых препаратов постоянно увеличивается. Среди примерно 50 новых видов лекарств, вакцин и диагностикумов, появляющихся на рынке ежегодно, 10-15 получены с помощью биотехнологических методов.

5. Биотехнологии для сельского хозяйства

Сельское хозяйство можно подразделить на две основные отрасли – животноводство и растениеводство. Биотехнология имеет достижения, помогающие обеим отраслям.

Промышленная биотехнология поставляет животноводству **кормовой белок или белково-витаминные концентраты, незаменимые аминокислоты и кормовые антибиотики, стимуляторы роста животных** (см. предыдущие разделы). Кроме того, в настоящее время в разных странах производят более 100 видов **биопрепаратов**, применяемых в растениеводстве. Это препараты микробного происхождения против вредных насекомых: энтомобактерин, инсектицин, токсобактерин, боверин, вирин, а также гербициды, фунгициды, бактериальные удобрения: нитрагин, азотобактерин, фосфоробактерин. Использование биологических средств защиты растений регуляторов роста, микробных удобрений позволяет снизить дозы применяемых химических средств защиты и минеральных удобрений, что приводит к повышению качества продукции и созданию экологически чистых технологий.

6. Биотехнологии для охраны природы

Основой биотехнологических методов защиты окружающей среды является многообразие путей обмена веществ микроорганизмов: среди множества вариантов найдется хотя бы один представитель, способный утилизировать самые необычные, в том числе и токсичные соединения.

Биологическая очистка стоков. Существуют микроорганизмы, для которых загрязнения, содержащиеся в сточных водах, являются питательными веществами. Разработан метод аэробной биологической очистки сточных вод с помощью активного ила – сложной смеси микроорганизмов. В больших резервуарах с перемешиванием и постоянной аэрацией жидкости перерабатываются большие объемы хозяйствственно-бытовых и промышленных стоков. Обычная очистка удаляет в основном органические загрязнения. Если же в стоках содержатся тяжелые металлы (медь, никель, кадмий, хром, свинец и др.), то требуются дополнительные меры очистки. Имеются определенные виды микроорганизмов, которые способны осаждать на себя (сорбировать) металлы, растворенные в жидкости. Концентрация металлов при этом возрастает настолько, что после тепловой обработки биосорбент можно рассматривать как сырье для получения цветных металлов.

Биокомпостирование твердых отходов. Аналогом аэробной очистки стоков является аэробное биокомпостирование твердых отходов. Твердые отходы смешиваются с микроорганизмами, разлагающими вредные загрязнения, и балластным материалом типа торфа, который обеспечивает доступ кислорода к микроорганизмам. Это позволяет

превратить отходы в удобрение или просто использовать их в качестве подсыпки для дорог, в строительстве и других случаях.

Анаэробный способ переработки отходов основан на свойстве некоторых микроорганизмов в отсутствии кислорода разлагать органические вещества с образованием **биогаза**, состоящего на 65% из метана и на 30% из диоксида углерода. Процесс протекает в специальных аппаратах – метан-тенках, где накапливающийся газ находится под некоторым давлением. Метановое брожение применяют для переработки избыточного осадка активного ила, образующегося при работе установок биологической очистки сточных вод. Сброженный осадок, если только он не содержит повышенных концентраций тяжелых металлов, успешно используют как удобрение. От лучше исходного осадка по составу, и в нем почти полностью отсутствуют болезнетворные организмы. Метановое брожение применяют также для переработки концентрированных жидких отходов. С середины XX века процесс анаэробного сбраживания с получением биогаза стал очень популярен применительно к отходам животноводческих ферм, особенно в Индии и Китае. Выделяющийся при переработке отходов метан может быть использован для отопления.

Биологическая очистка газовых выбросов. Многие выбросы промышленных предприятий в атмосферу содержат вредные или дурно пахнущие примеси. Для их очистки применяют биофильтры, заполненные насадкой, на которой закреплены специальные микроорганизмы. Вредные примеси сорбируются на насадке и затем потребляются и обезвреживаются микроорганизмами.

Биодеградация нефтяных загрязнений на почве и воде. При аварийных разливах нефти загрязненные территории обрабатывают специально выращенными нефтеокисляющими микроорганизмами, внося различные добавки для их азотистого и фосфорного питания. Это позволяет утилизировать углеводы нефти, превращая их в биомассу микроорганизмов и диоксид углерода.

Биотехнология и энергетика

Потребление энергетических ресурсов в мире намного превосходит процессы восстановления запасов полезных горючих ископаемых. Все ускоряющиеся темпы развития цивилизации приводят к истощению энергетического потенциала планеты. Мощный потенциальный источник энергии – биомасса зеленых растений, которые являются консервантами солнечной энергии. Растительный покров земли составляет более 1800 миллиардов тонн сухого вещества, что энергетически эквивалентно $3 \cdot 10^{22}$ Дж и соответствует запасам энергии всех полезных ископаемых. В отличие от нефти, газа или каменного угля растения являются возобновляемым сырьем. Превращение растительной биомассы в энергию может помочь решить энергетические проблемы. Значительную долю энергетического потенциала растительной биомассы используют путем непосредственного сжигания дров, древесного угля, сухого навоза. Однако такое использование малоэффективно, так как при этом реализуется только 10% энергозапасов, окружающая среда загрязняется дымом, в атмосфере накапливается диоксид углерода. Конверсия биомассы в **биогаз** и **биоэтанол** дает возможность реализовать 50-80% потенциальной энергии без загрязнения атмосферы и практически без отходов (отходы служат высококачественным удобрением).

Впервые идея применения этанола для энергетических целей возникла в 1975 году в Бразилии, а к 1997 году было сэкономлено 35,6 миллиардов долларов на уменьшении потребления нефти. Затем подобная программа была разработана в США и Канаде. Начинается применение биоэтанола и в нашей стране. Биоэтанол используется в качестве моторного топлива либо в чистом виде, либо с добавлением бензина, например, газохолл содержит 10% этанола, биодизель – 15, газолин – 24%. Масштабы производства этанола с каждым годом увеличиваются.

7. Современные методы биотехнологии

Полученные в последние десятилетия научные данные не только существенно расширили представления о микроорганизмах, но и позволили создать новые высокопродуктивные формы. Открытие методов получения наследуемых изменений, или *мутаций*, позволило усилить полезные свойства промышленных микроорганизмов и ослабить нежелательные. Новые штаммы обеспечивают значительно большую эффективность и безопасность их использования. Например, активность современных антибиотиков в 5000 раз превосходит активность первого пенициллина, полученного в 30-х годах XX века. Формы промышленных микроорганизмов с повышенной продуктивностью при тех же затратах на производство позволяют получить больше витаминов, аминокислот, антибиотиков и других ценных веществ. Микроорганизмы с измененной формой питания способны использовать более дешевый субстрат.

Генетическая инженерия видоизменила структуру и содержание современной биотехнологии. Во-первых, существенно повысилась продуктивность промышленных микроорганизмов – продуцентов классических продуктов путем введения дополнительных генов, увеличения их количества и активности. Во-вторых, вводя в микробную клетку новые гены, удалось изменить питательные потребности микроорганизма. Далее, микроорганизмы «научили» синтезировать несвойственные им вещества и таким образом увеличили разнообразие биотехнологической продукции. Некоторые белки человека, клонированные в микробной клетке, в том числе инсулин, интерфероны, интерлейкины, находят в настоящее время терапевтическое применение. Наконец, подверглась пересмотру вся логика селекции микроорганизмов-продуцентов. Так, если раньше искали активный штамм и затем создавали конкретную биотехнологию с учетом физиологических особенностей продуцента, то теперь можно взять приспособленный к условиям производства штамм и ввести в него генную конструкцию, которая обеспечит синтез целевого продукта.

К числу важных практических достижений генной инженерии необходимо отнести получение диагностических препаратов. Сегодня уже более 200 новых диагностикумов введены в медицинскую практику, разработаны способы диагностики такого опасного заболевания, как СПИД.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Введение. Устройство микробиологической лаборатории. Техника безопасности при работе в бак.лаборатории»

2.1.1 Цель работы: Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.
2. Познакомиться с оборудованием, посудой и инструментами для работы с культурами микроорганизмов.
3. Освоить правила работы с культурами микроорганизмов.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бактериологические боксы, термостат, холодильник, шпатели Дригальского, бактериологическая петля, микологические крючки, колбы, чашки Петри, пипетки Пастера

2.1.4 Описание (ход) работы:

Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения чистоты и порядка для обеспечения стерильности исследований и во избежание загрязнений культур микроорганизмов.

В микробиологической лаборатории ежедневно проводят влажную уборку, производят дезинфекцию воздуха путем проветривания (30-60 мин.) и облучения ультрафиолетовыми лучами от 30 минут до нескольких часов в зависимости от степени загрязненности воздуха. Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории протирают растворами различных дезинфицирующих веществ (2-3 % раствором соды, 3-5 % раствором фенола, 0,3 % водным раствором хлорамина).

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать до начала и после окончания работы (70 % раствором этилового спирта, 0,5-3 % водным раствором хлорамина).

При работе в микробиологической лаборатории необходимо соблюдать следующие правила:

1. Работу производить только в халатах и сменной обуви.
2. В лаборатории запрещается курение, прием пищи.
3. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов; все реактивы, растворы, микробиологическая посуда с питательными средами и культурами микроорганизмов должны быть подписаны.
4. Все предметы, использованные при работе с живыми микроорганизмами, должны быть обеззаражены, либо обжиганием в пламени (петли, крючки, пинцеты), либо погружением в дезинфицирующий раствор (3-5 % водный раствор фенола или 2 % раствор хлорамина) (стеклянные пипетки, шпатели).
5. В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, тщательно вымыть руки.

Оборудование, посуда и инструменты для работы с культурами микроорганизмов

В микробиологической лаборатории используется следующее оборудование: термостат, где с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная для роста микроорганизмов температура; качалки и ферментеры для культивирования

микроорганизмов; сушильные шкафы и автоклавы для стерилизации питательных сред, посуды и инструментов; бактерицидные лампы для дезинфекции помещений, ламинарные боксы, микроскопы и т.д.

Для культивирования микроорганизмов используется следующая стеклянная посуда: качалочные колбы, конические колбы, чашки Петри, пробирки, матрацы (рис. 1).

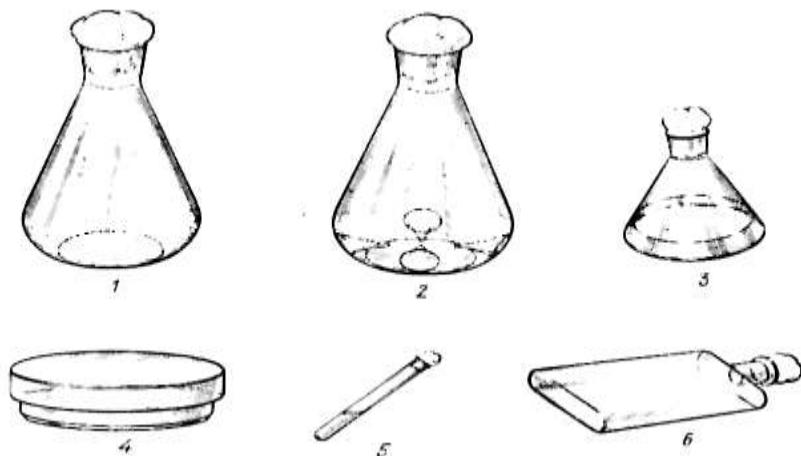


Рис 1. Посуда для культивирования микроорганизмов: 1- качалочная колба; 2- качалочная колба с отбойниками; 3- коническая колба; 4- чашка Петри; 5- пробирка; 6- матрац.

В качестве инструментов для посева и приготовления препаратов используют бактериологические петли, иглы, крючки, стеклянные пипетки, шпатели Дригальского.

Правила работы с культурами микроорганизмов

В лаборатории микроорганизмы выращивают на жидких и плотных питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, чашки Петри. Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют. Процесс выращивания микроорганизмов в искусственных условиях в питательной среде называется культивированием. При этом выращенные клетки определенного вида микроорганизмов называются культурой микроорганизмов.

Все действия следует проводить около пламени горелки (но не в пламени) и по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резких движений и ходить около работающего с чистой культурой, т.к. движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения. Для разлива питательной среды в чашки Петри сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки, обжигают горло сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большим и указательным пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро наливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (около 20 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда.

Внесение клеток микроорганизмов в стерильную среду называется посевом. Распределение микроорганизмов по поверхности питательной среды называют рассевом. Перенос уже выращенных микроорганизмов из одной среды в другую – пересевом. Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей (если микроорганизмы выращены на плотной питательной среде) или стерильной пипеткой (если микроорганизмы выращены в жидкой среде). Перед взятием клеток микроорганизмов петлю стерилизуют, обжигая саму петлю и часть держателя в пламени спиртовки. Сразу же после стерилизации петлю вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю вначале охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде,

свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Устройство микроскопа. Микроскопия. Виды микроскопии».

2.2.1 Цель работы: Ознакомиться с методами изучения морфологии микроорганизмов.

2.2.2 Задачи работы:

1. Овладеть методами изучения морфологии микроорганизмов.

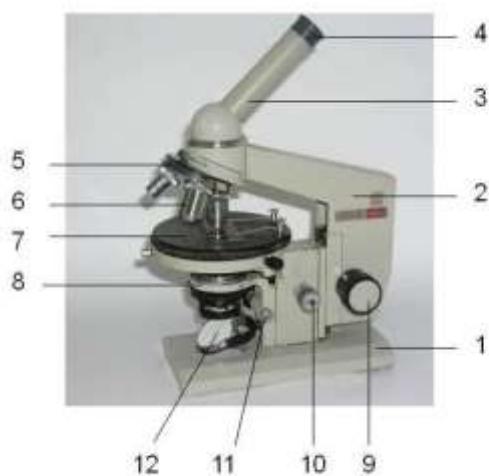
2. Изучить устройство светового микроскопа и правилами работы с ним.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бинокулярные микроскопы, микропрепараты из микроорганизмов, иммерсионное масло.

2.2.4 Описание (ход) работы:

Устройство светового микроскопа:



1. Основание микроскопа
2. Тубусодержатель
3. Тубус
4. Окуляр (чаще $\times 7$)
5. Револьвер микроскопа
6. Объективы
 - а) сухие: $\times 8$, $\times 20$, $\times 40$
 - б) иммерсионный $\times 90$
7. Предметный столик
8. Конденсор
9. Макрометрический винт
10. Микрометрический винт
11. Винт конденсора
12. Зеркало

Общее увеличение микроскопа = увеличение объектива \times увеличение окуляра

Работа 1.

Задание.

1. Ознакомиться с устройством светового микроскопа и правилами работы с ним.

Разобрать и нарисовать в тетради схему образования изображения в световом микроскопе и заполнить таблицу.

2. Вычислить предел разрешения для разных объективов микроскопа при $\lambda = 0,55$ мкм.

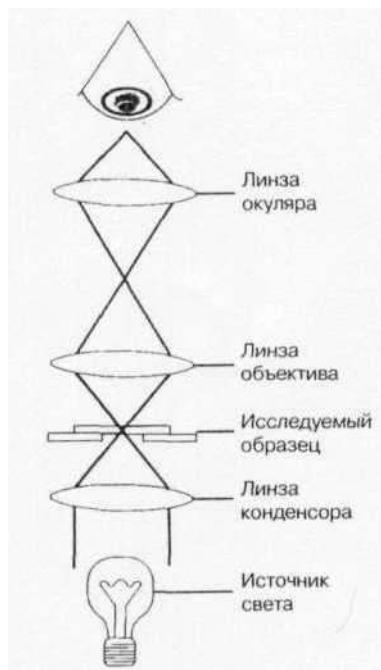


Рис. Схема образования изображения в световом микроскопе

Работа 2.

Задание. Рассмотреть демонстрационный препарат: «раздавленная» капля из дрожжей, при иммерсионной и фазово-контрастной микроскопии. Рассмотреть окрашенный флюорохромом препарат из дрожжей под люминесцентным микроскопом. Необходимо обратить внимание на качество изображения объектов. Сравнить способы микроскопии.

Заполнить таблицу.

Таблица

Исследуемый материал	Микроскопический метод исследования		
	Иммерсионная микроскопия (рис.)	Фазово-контрастная микроскопия (рис.)	Флуоресцентная микроскопия (рис.)

Контрольные вопросы: 1. Какие преимущества имеет метод флуоресцентной микроскопии? 2. Какой принцип лежит в основе фазово-контрастной микроскопии?

Работа 3.

Задание. Рассмотреть два демонстрационных препарата: 1. Смесь эритроцитов и палочек. Окраска фуксином. 2. Смесь дрожжей и кокков. Окраска метиленовым синим.

Подготовка микроскопа для работы: поднять конденсор до уровня предметного столика, полностью открыть диафрагму, поставить плоское (при естественном освещении) или вогнутое (при искусственном освещении) зеркало.

Осветить поле зрения под контролем объектива x8. Нанести на препарат каплю масла, положить препарат на столик микроскопа и закрепить. Установить иммерсионный объектив. Под наблюдением медленно опустить объектив макровинтом до погружения в масло. Затем, глядя в окуляр, медленно поднимать объектив до появления объекта. Провести окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, вращая его только в пределах одного оборота.

Заполнить таблицу.

Таблица

Исследуемый материал	Иммерсионная микроскопия	
	Рисунок	Метод окраски

Контрольные вопросы: 1. Устройство светового микроскопа. 2. Правила работы с иммерсионным объективом. 3. Основные характеристики светового микроскопа. Разрешающая способность микроскопа. Общее увеличение микроскопа. Полезное увеличение микроскопа. 4. Контраст в световом микроскопе и его повышение (фазово-контрастная микроскопия, микроскопия в темном поле). 5. Люминесцентная микроскопия. 6. Электронная микроскопия.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Методы приготовления и простая окраска микропрепаратов из чистой культуры».

2.3.1 Цель работы: Изучить методы приготовления микропрепаратов.

2.3.2 Задачи работы:

1. Овладеть методами приготовления микропрепаратов
2. Освоить иммерсионную микроскопию.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Предметные стекла, бактериологические петли, спиртовки, взвесь бактерий в стерильном физ. растворе, микроскопы, иммерсионное масло, раствор метиленового синего, тушь.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Работа 1.

Задание. Приготовить препараты живых клеток: «раздавленная капля» - грибов, висячая капля - подвижных бактерий, «отпечаток» - актиномицетов. Промикроскопировать препараты и зарисовать результат исследования.

Работа 2.

Задание. Приготовить микропрепарат из агаровой культуры.

Для приготовления мазка необходимо взять чистое обезжиренное стекло. На предметном стекле обозначают стеклографом место нанесения материала. На обратную сторону стекла от обозначенного места наносят петлей каплю физиологического раствора. В левую руку берут пробирку с агаровой культурой, а в правую - петлю за петледержатель. Петлю обжигают на пламени горелки. Пробку прижимают к ладони 4 и 5 пальцами и медленными врачающими движениями извлекают из пробирки. Край пробирки обжигают. Петлю вводят в пробирку и остужают о стенки. Скользящим движением петлей берут материал и осторожно, не задевая о стенки, извлекают. Пробирку снова обжигают и закрывают пробкой.

В каплю физиологического раствора вносят исследуемую культуру и смешивают петлей до образования слегка мутноватой взвеси. Полученную взвесь равномерно распределяют на поверхности стекла, чтобы диаметр мазка был 1 – 1,5 см. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют, для этого проводят стекло над пламенем горелки три раза, при этом мазок должен быть сверху. Препарат окрашивают фуксином (1-2 мин) или метиленовой синькой (3-5 мин).

Для окраски негативным способом на стекло наносят каплю взвеси дрожжей в физиологическом растворе и смешивают с каплей туши. Препарат высушивают.

Окрашенные препараты рассматривают под микроскопом с использованием масляной иммерсии.

Заполнить таблицу.

Таблица

Позитивный метод окраски		Негативный метод окраски
Фуксином (рис.)	Метиленовым синим (рис.)	тушью (рис.)

Контрольные вопросы: 1. Какие красители наиболее часто используются для позитивной окраски микроорганизмов? 2. В чем преимущества негативной окраски микроорганизмов? 3. Правила обработки предметных и покровных стекол. 4. Как приготовить препараты живых клеток? 5. Правила приготовления препаратов фиксированных клеток. 6. Каковы цели и способы фиксации?

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Сложный метод окраски по Граму».

2.4.1 Цель работы: Изучить принцип сложного метода окраски по Граму.

2.4.2 Задачи работы: Овладеть методом сложной окраски по Граму.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры бактерий, бактериологические петли, предметные стекла, фильтровальная бумага, спиртовки, микроскопы, красители генциановый фиолетовый и фуксин, раствор Люголя, этиловый спирт 96%, иммерсионное масло, дистиллированная вода

2.4.4 Описание (ход) работы:

Сложные методы окраски бактерий

Окраска микроорганизмов по Граму.

В зависимости от химического состава и строения клеточной стенки прокариоты делятся на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Основные отличия в строении клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий схематически изображены на рисунке 5.

Такое деление связано со способностью бактерий окрашиваться по Граму. Эта окраска является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий. Сущность окраски заключается в том, что при обработке клеток прокариот сначала красителем генциановым фиолетовым, а затем йодом, образуется окрашенный комплекс, который при последующей обработке спиртом удерживается грамположительными бактериями и вымывается из клеток грамотрицательных бактерий, которые в результате обесцвечиваются. При последующей обработке фуксином они приобретают розово-красную окраску, а грамположительные имеют сине-фиолетовую окраску.

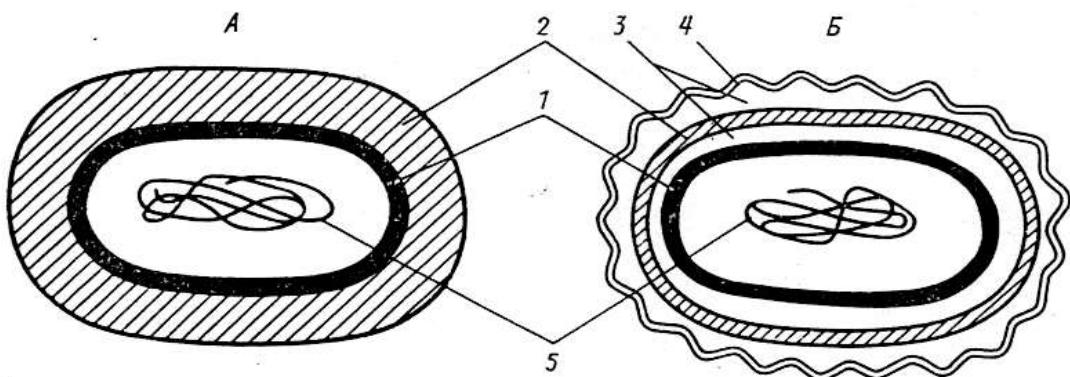


Рис. 5. Схематическое изображение клеточной стенки грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий. 1- цитоплазматическая мембрана; 2- пептидогликан; 3- периплазматическое пространство; 4- наружная мембрана; 5-ДНК.

Приготовление препаратов бактерий, окрашенных по Граму, включает следующие этапы:

1. Приготовление мазка.
2. Фиксация препарата.
3. Окрашивание препарата генциановым фиолетовым (1-2 мин.).
4. Обработка раствором Люголя до почернения.
5. Обработка 96° этиловым спиртом (0.5-1 мин.).
6. Промывание препарата водой.
7. Окрашивание фуксином (1-2 мин.).
8. Промывание препарата водой.
9. Высушивание препарата.
10. Микроскопирование препарата с иммерсионной системой.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные — красный цвет фуксина.

Работа

Задание. Приготовить препарат из смеси грамположительных кокков и грамотрицательных палочек. Окрасить по методу Грама. Рассмотреть окрашенный препарат под микроскопом с иммерсией.

Заполнить таблицу.

Таблица

Исследуемый материал	Ингредиенты окраски по Граму и время их действия	Назначение основных ингредиентов	Результат (рисунок с обозначениями)

Контрольные вопросы: 1. Строение и химический состав клеточной стенки бактерий. 2. Основные отличия грамположительных и грамотрицательных бактерий. 3. Сущность окраски по Граму.

2.5 Лабораторная работа №5-6 (4 часа).

Тема: «Строение бактериальной клетки. Необязательные компоненты бактериальной клетки, их функции (жгутики, споры, капсулы, включения)».

2.5.1 Цель работы: Изучить приемы выявления клеточных структур и запасных веществ с помощью световой микроскопии.

2.5.2 Задачи работы: Овладеть приемами выявления клеточных структур и запасных веществ с помощью световой микроскопии

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры бактерий, бактериологические петли, предметные стекла, фильтровальная бумага, спиртовки, микроскопы, красители щелочная синька Леффлера, малахитовый зеленый, 0,5% водный раствор сафранина, стекла с лунками, покровные стекла, вазелин, иммерсионное масло, дистиллированная вода.

2.5.4 Описание (ход) работы:

Строение бактериальной клетки.

В структуре бактериальной клетки есть обязательные компоненты: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, нуклеоид, рибосомы, мезосомы.

Отдельные виды бактерий в определенных условиях образуют капсулу (пневмококк), цитоплазматические включения (дифтерийная палочка), ворсинки (дизентерийная палочка), жгутики (холерный вибрион). Грамположительные палочки могут иметь спору.

Бактерии могут утратить клеточную стенку (L-формы). L-формы не имеют таксономической самостоятельности (L-формы стафилококков, L-формы туберкулезной палочки и т.д.).

Выявление эндоспор в клетках микроорганизмов

Спорообразующие бактерии широко используются в биотехнологии. Например, с помощью аэробных бактерий рода *Bacillus* получают ферменты, антибиотики, энтомопатогенные препараты и т. д. Анаэробные бактерии рода *Clostridium* используются для получения ацетона, бутанола, масляной кислоты. При этом спорообразующие прокариоты могут быть и вредителями биотехнологических процессов.

Бактериальные эндоспоры – это особый тип покоящихся клеток грамположительных бактерий, формирующихся эндогенно, т. е. внутри цитоплазмы «материнской» клетки, обладающих специфическими структурами (многослойными белковыми покровами, наружной и внутренней мембранами, кортексом) и повышенной устойчивостью к повреждающим факторам внешней среды (к высокой и низкой температурам, обезвоживанию, высокой кислотности среды, радиации, механическим воздействиям).

Поскольку эндоспоры обладают многослойными, труднопроницаемыми для молекул основных красителей оболочками, при простом окрашивании клеток метиленовым синим, фуксином и генциановым фиолетовым, они не окрашиваются и обнаруживаются в окрашенной цитоплазме в виде бесцветных включений. Все имеющиеся специальные способы окраски спор основаны на том, что первоначально сильным красителем с подогреванием красят одновременно клетку и спору, а затем обесцвечивают протоплазму, оставляя спору окрашенной. После этого протоплазму красят дополнительно в другой цвет.

Примером дифференциального способа окраски спор является окраска по методу Ожешки:

1. На высушенный нефиксированный препарат наливают несколько капель 0,5% раствора соляной кислоты и подогревают 1 - 2 минуты над пламенем горелки до закипания, после чего остатки кислоты сливают.

2. Остывший препарат промывают водой.
3. Окрашивают карболовым фуксином Циля (фуксин наливают на фильтровальную бумажку) с подогреванием до появления паров. По мере испарения, краситель периодически подливают.
4. Препарат вновь промывают и обесцвечивают 1% раствором серной кислоты в течение 2 минут.
5. Препарат промывают водой и докрашивают раствором метиленового синего (1:40) в течение 10 - 20 минут.
6. Краситель смывают водой, высушивают. Препараты микроскопируют с иммерсионным объективом.

Наблюдаемая микрокартина: споры, окрашенные фуксином, имеют рубиново красный цвет, вегетативные тела микробных клеток при докрашивании метиленовым синим - синий цвет.

Работа 1.

Задание.

Приготовить фиксированные препараты бактерий рода *Bacillus* и окрасить их метиленовым синим. Промикроскопировать с иммерсионным объективом. Зарисовать.

Работа 2.

Задание.

Приготовить фиксированные препараты спорообразующих бактерий и окрасить их по методу Ожешки. Промикроскопировать с иммерсионным объективом. Зарисовать микропрепарат.

Выявление капсул микроорганизмов

Клетки многих микроорганизмов, особенно при росте на средах, богатых углеводами, образуют слизистый внешний слой – капсулу. Капсулы разных видов бактерий имеют неодинаковый химический состав и могут состоять из гомо- и гетерополисахаридов, полипептидов, нуклеиновых кислот. Капсула не является обязательным структурным элементом клетки, но может выполнять ряд полезных функций: защищать клетку от неблагоприятных условий (высушивания, ультрафиолетовых лучей, химических агентов), от бактериофагов и простейших. Слизистые покрытия многих бактерий определяют их вирулентность и патогенность, обеспечивают прикрепление к различным поверхностям и связь между соседними клетками. Слизеобразующие бактерии широко используются в биотехнологии. Например, с помощью бактерий *Leuconostoc mesenteroides* и *Leuconostoc dextranicum* получают гомополисахарид декстран, который используется при изготовлении заменителей плазмы крови, различных лекарственных форм, косметических средств, сефадексов и т.д. Фитопатогенные бактерии *Xanthomonas campestris* образуют гетерополисахарид ксантан. Благодаря способности сгущать водные растворы, служить в качестве диспергирующего агента, стабилизировать эмульсии и суспензии он нашел применение в пищевой, фармацевтической, нефтяной, горнодобывающей, текстильной и других областях промышленности.

Капсулы часто имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании живых клеток, поэтому для их выявления применяют способ негативного контрастирования с помощью жидкой туши.

Выявление капсул по методу Бури.

На предметное стекло наносят каплю туши, и петлю с исследуемым материалом. Смесь перемешивают тщательно петлей. Второе предметное или покровное стекло ставят на первое под углом 45° и подводят к капле туши до соприкосновения с ней. После того, как тушь растечется пошлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя тушь по всей поверхности стекла тонким слоем.

Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острей угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет одинаковую толщину на всем своем протяжении. Препарат высушивают на воздухе и, не фиксируя, микроскопируют с иммерсионной системой. Фон препарата окрашивается в темно-дымчатый цвет, микробные тела и их капсулы не окрашиваются тушью и остаются бесцветными.

Окраска капсул по методу Гинса.

1. Готовят негативно окрашенный препарат по способу Бурри.
2. Фиксируют любым химическим способом: метиловым спиртом, смесью Никифорова или другими смесями.
3. Промывают водой.
4. Окрашивают карболовым фуксином Циля, рвденным 1:3, в течение 3-5 мин.
5. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

При микроскопировании на темном фоне препарата контрастно выделяются неокрашенные капсулы, внутри которых находятся бактерии ярко-малинового цвета.

Работа.

Задание.

Выявить капсулы бактерий *Leuconostoc mesenteroides*, *Xanthomonas campestris* и *Azotobacter vinelandii* по методам Бурри и Гинса. Результаты микроскопии оформить в виде рисунка.

Контрольные вопросы: 1. Капсулы: их строение и биологическое значение. 2. Методы выявления капсул бактерий.

Выявление включений в клетках микроорганизмов.

В цитоплазме микроорганизмов могут присутствовать твердые, жидкые и газообразные включения. Запасные вещества представлены полисахаридами, липидами, полипептидами, полифосфатами и т. д. Из полисахаридов в клетке откладываются гликоген, крахмал и крахмалоподобное вещество - гранулеза (специфический запасной полисахарид анаэробных споровых бактерий группы клостридий). Гликоген при окраске раствором Люголя легко выявляется у дрожжей. Здоровые дрожжи, осуществляющие интенсивное брожение должны содержать не менее 70 % клеток с гликогеном. Липиды накапливаются в виде гранул и капелек жира, резко преломляющих свет и потому хорошо различимых в световой микроскоп. Полифосфаты содержатся в гранулах, называемых волютиновыми или метахроматиновыми зернами, и выявляются после окрашивания специальными красителями. В клетках прокариот волютин локализован в цитоплазме, в клетках эукариот – в вакуолях.

Для выявления полисахаридов клетки обрабатывают раствором Люголя. Для этого к капле суспензии клеток на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Гранулы крахмалоподобных веществ – гранулезы – окрашиваются в синий, а гранулы гликогеноподобных полисахаридов – в красновато-коричневатый цвет. Перед выявлением в клетках гликогена среду культивирования микроорганизмов необходимо подкислить.

Одним из методов выявления полифосфатов в клетках микроорганизмов является окраска волютина по методу Омелянского:

1. Приготовить мазок, высушить и зафиксировать его.
2. Окрасить карболовым фуксином Циля в течение 30- 60 минут.
3. Препарат промыть водой и обесцветить 1% -ным раствором серной кислоты в течение 20- 30 секунд.
4. Промыть препарат водой.
5. Дополнительно окрасить препарат метиленовым синим (1:40) в течение 1 минуты.

6. Препарат промыть водой, высушить и промикроскопировать с помощью иммерсионной системы. Гранулы волютина будут иметь красный цвет на фоне синей цитоплазмы.

Работа 1.

Задание. Выявить гликоген в клетках дрожжей. Результаты микроскопии оформить в виде рисунка.

Работа 2.

Задание. Выявить волютин в молодых клетках бактерий. Зарисовать результаты.

Контрольные вопросы: 1. Внутрицитоплазматические включения и их назначение. 2. Запасные вещества микроорганизмов и способы их выявления.

2.6 Лабораторная работа № 7 (2 часа).

Тема: «Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Составление и приготовление питательных сред для разных групп микроорганизмов».

2.6.1 Цель работы: Изучить питательные среды, предназначенные для культивирования микроорганизмов. Ознакомиться с методами приготовления питательных сред.

2.6.2 Задачи работы:

1. Изучить классификацию питательных сред для культивирования микроорганизмов.

2. Овладеть приготовлением питательных сред, предназначенных для культивирования микроорганизмов разных физиологических групп.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Сухие питательные среды, бактериологические петли, чашки Петри, спиртовки, пробирки.

2.6.4 Описание (ход) работы:

Питательная среда — однокомпонентный или многокомпонентный субстрат, применяемый для культивирования микроорганизмов или культур клеток высших организмов.

• быть **питательными**, то есть содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят **факторы роста** - витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать.

• иметь **оптимальную** концентрацию водородных ионов - pH , так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (pH 7,2-7,4). Исключение составляют холерный вибрион - его оптимум находится в щелочной зоне (pH 8,5-9,0) и возбудитель туберкулёза, нуждающийся в слабокислой реакции (pH 6,2-6,8).

Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать *буферностью*, то есть содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена.

- быть **изотоничными** для микробной клетки; то есть осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальная среда, соответствующая 0,5 % раствору натрия хлорида.
- быть **стерильными**, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микробы, определению его свойств и изменяют свойства среды.
- плотные среды должны быть **влажными** и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию.
- обладать определённым **окислительно-восстановительным** потенциалом, то есть соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH₂. Например, анаэробы размножаются при RH₂, не выше 5, а аэробы — при RH₂ не ниже 10.
- быть по возможности **унифицированным**, то есть содержать постоянное количество отдельных ингредиентов.

Желательно, чтобы среды были *прозрачными* — удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

По исходным компонентам:

- натуральные среды — готовят из продуктов животного и растительного происхождения (мясо, асцит, костная мука, кормовые дрожжи, сгустки крови и др.)
- синтетические среды — готовят из определённых химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворённых в дважды дистиллированной воде.
- По консистенции (степени плотности):
- **жидкие** (бульоны)
- **полужидкие**
- **плотные**

Плотные и полужидкие среды отличаются от жидких наличием желирующего агента (агар-агар, реже желатин). Кроме того, в качестве плотных сред применяют коагулировавшие яичные или сывороточные белки, картофель, среды с силикагелем. Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество — при их росте среда разжижается.

По составу:

- простые: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), питательный желатин,
- сложные — многокомпонентные среды, которые могут содержать аминокислоты, витамины, микроэлементы и другие вещества.

По назначению:

- основные - служат для культивирования большинства микроорганизмов, например МПБ, МПА, бульон, шоколадный агар, пептонная вода.
- специальные - служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах.
- **элективные** (избирательные) - служат для выделения определённого вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Среды становятся элективными при добавлении к ним определённых антибиотиков, солей, изменения рН. Жидкие элективные среды называют **средами накопления**.
- **дифференциально-диагностические** - позволяют отличить один вид микроорганизмов от другого по ферментативной активности.

- транспортные - предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала.

Посуда для приготовления сред

Посуда для приготовления сред не должна содержать посторонних веществ, например щелочей, выделяемых некоторыми сортами стекла, или окислов железа, которые могут попасть в среду при варке её в ржавых кастрюлях. Лучше пользоваться стеклянной, эмалированной или алюминиевой посудой. Перед употреблением посуду необходимо тщательно вымыть, прополоскать и высушить. Новую стеклянную посуду предварительно кипятят 30 минут в 1-2% растворе хлороводородной кислоты, после чего в течение часа прополаскивают в проточной воде.

Сырьё

Исходным сырьём для приготовления большинства сред служат продукты животного и растительного происхождения, а также готовые полуфабрикаты.

Этапы приготовления

варка: среды варят на открытом огне, водяной бане, автоклаве или варочных котлах.

1. **установление рН:** ориентировочно производят с помощью индикаторной бумаги, для точного определения пользуются потенциометром или компаратором. При стерилизации рН снижается на 0,2, поэтому сначала готовят более щелочной раствор.

2. **осветление** производят, если при варке среды мутнеют или темнеют. Для этого используют белок куриного яйца или сыворотку крови.

3. **фильтрация** жидких и расплавленных желатиновых сред производят через влажный бумажный или матерчатый фильтры. Фильтрация агаровых сред затруднена — они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

4. **разливают** среды не более чем на $\frac{3}{4}$ ёмкости, так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность.

5. **стерилизация:** режим стерилизации зависит от состава среды и указан в её рецепте.

6. контроль

Для контроля *стерильности* среды ставят на 2 суток в термостат, после чего их просматривают.

• **химический** контроль окончательно устанавливает рН, содержание общего и амминого азота, пептона, хлоридов.

• для **биологического** контроля несколько образцов среды засевают специально подобранными культурами, и по их росту судят о питательных свойствах среды.

Работа 1.

Задание. Изучить классификация питательных сред, заполнить таблицу.

Виды питательных сред	Характеристика
1. элективные или избирательные 2. дифференциально-диагностические 3. накопительные 4. оптимальные 5. естественные 6. синтетические 7. полусинтетические 8. плотные 9. жидкие	

Работа 2.

Задание.

1. Приготовить натуральную агариованную среду для культивирования актиномицетов следующего состава (г / л): овсяная мука (или хлопья) -20,0; агар- 20,0; pH 7,0- 7,2. Для приготовления среды овсяную муку (или хлопья) варят в 1 л водопроводной воды 20 мин, фильтруют и доводят объем до 1л.

2. Приготовить синтетическую среду Чапека-Докса для культивирования мицелиальных грибов следующего состава (г / л): сахароза- 30, 0; NaNO_3 – 3,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl - 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,01; агар- 15,0; вода дистиллированная- 1000мл; pH 6,0.

3. Разлить среды в стеклянные емкости не более чем на половину их высоты, закрыть ватными пробками и отдать на стерилизацию.

4. Готовую стерильную агариованную среду расплавить на кипящей водяной бане. Разлить ее в асептических условиях в чашки Петри по 20- 25 мл и в биологические пробирки не более чем на 1/ 3 их высоты. Пробирки установить в наклонном положении так, чтобы среда не доходила до ватной пробки на 4-6 см.

Работа 3.

Задание.

Изучить состав элективных и дифференциально-диагностических сред для культивирования микроорганизмов разных таксономических групп. Используя аннотации к питательным средам, внести в протокол описание сред.

Таблица

Название среды	Назначение	Вещества, придающие элективные и дифференциально-диагностические свойства

Работа 4.

Задание. Изучить особенности роста микроорганизмов разных видов на дифференциально-диагностических средах: среда Эндо, желточно-солевой агар, хламидоспор-агар, кровяной агар. Результаты зарисовать.

Контрольные вопросы: 1. Виды питательных сред и их назначение. 2. Основные требования к питательным средам, используемым для культивирования микроорганизмов. 3. Компоненты питательных сред: источники углерода, источники азота, минеральные соли, микроэлементы, факторы роста, предшественники метаболитов и другие вещества, необходимые для роста микроорганизмов и биосинтеза целевых продуктов. 4. Сырье, используемое для приготовления питательных сред (меласса, гидрол, барда, кукурузный экстракт, молочная сыворотка и т.д.).

2.7 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Тема: «Стерилизация. Методы стерилизации».

2.7.1 Цель работы: Изучить физические и химические методы стерилизации.

2.7.2 Задачи работы: Изучить физические и химические методы стерилизации.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Колбы, пробирки, чашки Петри, вата, марля, нитки, ножницы, сухожаровой шкаф, автоклав.

2.7.4 Описание (ход) работы:

Стерилизация (лат. *sterilis* — бесплодный) — обеспложивание; уничтожение в каком-либо материале патогенных и непатогенных микроорганизмов в вегетативной и споровой формах. Для стерилизации используют физические и химические методы. Механизмы их действия неодинаковы, но при выборе любого из методов должны быть соблюдены два основных требования: достижение полного обеспложивания и сохранение физико-химических свойств стерилизуемого материала.

Физические методы стерилизации. Методы заключаются в уничтожении микроорганизмов с помощью физических средств. К ним относят: стерилизацию сухим жаром, влажным жаром, фильтрованием, ультрафиолетовыми лучами, ультразвуком.

Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Различают термическую и холодную стерилизацию. Существуют следующие способы термической стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. К методам холодной стерилизации относят стерилизацию фильтрованием (пропускание жидкостей через специальные мелкопористые фильтры, называемые бактериальными), ультрафиолетовыми лучами, ионизирующими излучением, растворами и газообразными средствами. Дробная стерилизация применяется для стерилизации сред, портящихся под действием температур выше 100°C, она заключается в многократном прогревании сред без избыточного давления. Пастеризация- однократный прогрев материала при температуре ниже 100°C (15-30 минут при 60-70 °C, 10-15 минут при 80°C).

Для стерилизации посуды обычно используются сухожаровые шкафы, а для стерилизации питательных сред автоклавы, которые отличаются объемом внутренней камеры и способом загрузки (вертикальная и горизонтальная). Современное оборудование может работать в автоматическом режиме и снабжено микропроцессорным управлением.

Химические методы стерилизации. Сводятся в лабораторной практике к консервированию питательных сред, вакцин, а также лечебных и диагностических сывороток различными химическими соединениями (соли металлов, щелочи, антибиотики и др.) с целью предупреждения бактериального загрязнения. Питательные среды консервируют хлороформом, толуолом, иногда эфиром (для освобождения от консерванта среду нагревают до 56 °C). Вакцины и лечебные сыворотки консервируют 0,25...0,5%-м раствором фенола, 0,5%-м раствором хлороформа, 0,5%-м раствором формалина или раствором мертиолата (в конечном разведении 1 : 5000 - 1:10 000).

Работа 1.

Задание

- Познакомиться с устройством и принципом работы автоклава (рис.).

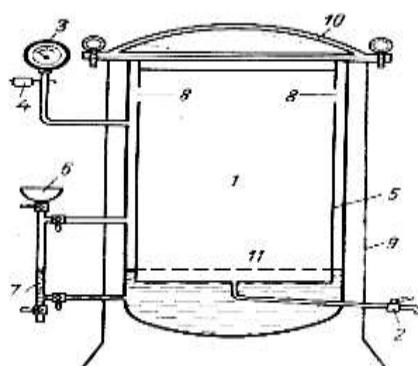


Рис. Схема автоклава

1. стерилизационная камера; 2. кран для выхода воздуха; 3.манометр; 4. предохранительный клапан; 5. водопаровая камера; 6. воронка для заполнения автоклава водой; 7. водомерная трубка; 8. отверстие для поступления пара в стерилизационную камеру; 9. защитный кожух; 10. крышка автоклава; 11. подставка для размещения посуды.

Работа 2.

Задание. Подготовить для стерилизации пробирки и колбы с ватно-марлевыми пробками. Для приготовления пробок плоский кусок ваты, взятый вдоль волокна, скатать валиком, обернуть марлевой салфеткой. Длина обычной пробки должна быть около 4 см. Пробка должна входить в пробирку на 1,5-2 см. Для сохранения формы, пробку вынимают из горлышка, слегка вращая. Перед стерилизацией пробки прикрыть бумажными колпачками.

Работа 3.

Задание. Простерилизовать подготовленную посуду и инструменты в сухожаровом шкафу при 160°C 2 часа. По окончании стерилизации шкаф на открывать до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80°C, так как при резком охлаждении может нарушиться стерильность материала, а сильно нагретое стекло может потрескаться.

Контрольные вопросы: 1. Стерилизация питательных сред. 2. Подготовка сред к стерилизации. 3. Методы стерилизации питательных сред. 4. Устройство и принцип работы автоклава. 5. Выбор режима автоклавирования в зависимости от состава и рН среды, от объема стерилизуемого субстрата, от толщины стенок и формы емкостей. 6. Дробная стерилизация. 7. Пастеризация. 8. Стерилизация фильтрованием. 9. Стерилизация стеклянной посуды, стерилизация инструментов и приборов.

2.8 Лабораторная работа №9 (2 часа)

Тема: «Коллоквиум».

2.8.1 Цель работы: Оценить уровень владения материалом у студентов

2.8.2 Задачи работы: Проверить знания студентов по пройденному материалу

2.8.3. Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бактериологические боксы, термостат, холодильник, шпатели Дригальского, бактериологическая петля, микологические крючки, колбы, чашки Петри, пипетки Пастера, бинокулярные микроскопы, микропрепараты из микроорганизмов, иммерсионное масло, предметные стекла, спиртовки, взвесь бактерий в стерильном физ. растворе, культуры бактерий, фильтровальная бумага, красители генциановый фиолетовый и фуксин, раствор Люголя, этиловый спирт 96%, сухие питательные среды, пробирки, колбы, сухожаровой шкаф, автоклав.

Контрольные вопросы:

1. Устройство светового микроскопа.
2. Виды световой микроскопии
3. Правила работы с иммерсионным объективом.
4. Электронная микроскопия.
5. Позитивная и негативная окраска микроорганизмов

6. Правила приготовления препаратов из живых клеток?
7. Правила приготовления препаратов фиксированных клеток.
8. Строение и химический состав клеточной стенки бактерий. Основные отличия грамположительных и грамотрицательных бактерий.
9. Сущность метода окраски по Граму.
10. Капсулы: их строение и биологическое значение.
11. Методы выявления капсул бактерий.
12. Внутрицитоплазматические включения и их назначение.
13. Запасные вещества микроорганизмов и способы их выявления.
14. Классификация питательных сред.
15. Способы стерилизации питательных сред.
16. Устройство и принцип работы автоклава.
17. Дробная стерилизация.
18. Пастеризация.
19. Стерилизация фильтрованием.
20. Стерилизация стеклянной посуды, стерилизация инструментов и приборов.

2.9 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Тема: «Условия культивирования микроорганизмов. Оптимальный режим. Кислотность среды. Температура. Время. Свет. Вода».

2.9.1 Цель работы: Изучить условия для культивирования микроорганизмов.

2.9.2 Задачи работы: Овладеть способами создания оптимальных условий для культивирования микроорганизмов.

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Стерильные чашки Петри с питательными средами, термостат, спиртовки, автоклав, холодильник.

2.9.4 Описание (ход) работы:

Для роста микроорганизмов существенное значение имеют не только состав питательной среды, но и такие факторы, как кислотность среды, аэрация, температура, свет, влажность. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных пределах каждого фактора, причем для различных групп микроорганизмов эти пределы часто неодинаковы.

Температура. Интервалы температур, в которых возможен рост различных микроорганизмов, заметно варьируют. У мезофилов, к которым относится большинство известных нам форм, температурный оптимум лежит в интервале от 25 до 37 °C. У термофилов он значительно выше: от 45 до 80 — 90 °C. Психрофилы хорошо развиваются в интервале температур 5—10 °C. Отклонение температуры от оптимальной неблагоприятно влияет на развитие микроорганизмов, поэтому микроорганизмы выращивают в термостатах или специальных термостатированных комнатах, где с помощью терморегуляторов поддерживается соответствующая оптимальная температура. Мезофильные бактерии, естественным местом обитания которых являются вода и почва, выращивают в интервале от 20 до 30 °C, тогда как бактерии кожных покровов, слизистой или кишечника человека и животных культивируют при более высокой температуре: 35 — 37 °C. Для выращивания психрофилов используют холодильные камеры.

Свет. Для роста подавляющего большинства микроорганизмов освещение не требуется. Напротив, прямые солнечные лучи отрицательно влияют на их развитие,

поэтому такие микроорганизмы выращивают в темноте. Свет необходим для роста фототрофных микроорганизмов. Однако естественное освещение используют редко, так как оно непостоянно и плохо контролируемо. Как правило, фототрофов выращивают в люминостатах, т.е. камерах, освещенных лампами накаливания или флуоресцентными лампами дневного света. Необходимая температура в люминостатах создается благодаря вентиляции или холодильному устройству.

Выбор источника освещения определяется спектром его излучения и длинами волн, при которых культивируемые микроорганизмы осуществляют фотосинтез. Для выращивания пурпурных и зеленых бактерий лучше использовать лампы накаливания; для культивирования цианобактерий и микроводорослей нужно применять флуоресцентные лампы дневного света. Помимо спектрального состава света обращают внимание на освещенность, которую измеряют с помощью люксметра.

Активная кислотность среды. Активная кислотность (рН) среды имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов. Большинство бактерий лучше всего растет при рН, близком к 7,0, микроскопические грибы, напротив, предпочитают слабокислые среды, поэтому в приготовленных средах всегда следует определить значение рН. Измеряют рН электрометрическим методом на потенциометре. В лабораторной практике удобно использовать различные жидкие или бумажные индикаторы.

Широко применяется, например, жидкий двухцветный индикатор, бромтимоловый синий (бромтимолблау). Его цвет изменяется от желтого к синему при сдвиге рН от 6,0 до 7,6. При рН 7,3 индикатор имеет сине-зеленую окраску.

В случае необходимости рН среды доводят до нужного значения растворами кислот (HCl , H_2SO_4), щелочей ($NaOH$, KOH) или солей, имеющих щелочную реакцию (Na_2CO_3 , $NaHCO_3$). Для корректировки рН целесообразно иметь стерильные растворы разной концентрации.

Значение рН сред может измениться в процессе стерилизации, поэтому после стерилизации его следует проверить и, если требуется, довести до нужного с помощью стерильных растворов кислоты или щелочи. Активная кислотность питательной среды, благоприятная для начала роста микроорганизмов, часто меняется в процессе их культивирования. Эти изменения могут быть результатом образования продуктов метаболизма или неравномерного потребления отдельных компонентов среды.

Например, при потреблении углеводов в среде накапливаются органические кислоты, снижающие рН среды. В средах с KNO_3 , как уже отмечалось, рН возрастает за счет более интенсивного потребления нитрат-иона и накопления ионов калия.

Чтобы не допустить чрезмерного изменения рН в культурах микроорганизмов и удержать его на необходимом уровне, используют различные приемы. Иногда в среды добавляют буферные растворы. В микробиологической практике чаще других применяют фосфатные буферы. Однако если рост микроорганизмов сопровождается образованием большого количества кислот, то тех количеств буферного раствора, которые можно добавлять к средам (не более 5 г фосфатов на 1 л среды), оказывается недостаточно, так как противодействие любого буфера изменению рН ограничено. В связи с этим для микроорганизмов, активно изменяющих кислотность среды, применение буферов не эффективно. При культивировании таких микроорганизмов в среды вводят избыточное количество мела, который нейтрализует образующиеся кислоты. Для нейтрализации кислот по ходу развития культуры можно применять 10%-й стерильный раствор $NaHCO_3$.

Поддержание определенного значения рН во время роста особенно важно для тех микроорганизмов, которые в процессе жизнедеятельности образуют кислоты, но не обладают устойчивостью к ним. К их числу относятся молочнокислые бактерии, а также многие псевдомонады. Большие затруднения встречаются, когда нужно поддержать рН в слабощелочных средах, так как для Диапазона рН от 7,2 до 8,5 подходящих буферов не существует. С этой целью иногда приходится периодически или непрерывно доводить рН

до нужной величины, добавляя стерильно в среду растворы кислоты или щелочи при постоянном контроле значения pH. В современных ферментерах это достигается с помощью специальных автоматических устройств.

Аэрация. Кислород входит в состав воды и многих соединений, поэтому поступает в клетки в больших количествах. Значительная часть микроорганизмов нуждается в постоянном притоке молекулярного кислорода. Такие микроорганизмы принято объединять в группу облигатных аэробов. Энергетическим процессом у них является аэробное дыхание, а молекулярный кислород играет роль терминального окислителя.

Среди облигатных аэробов выделяют группу микроаэрофильных микроорганизмов, которые нуждаются в кислороде, но лучше растут, если его парциальное давление меньше, чем в воздухе. Развитие других микроорганизмов, напротив, возможно только в отсутствие кислорода. Получение энергии у них не связано с использованием молекулярного кислорода, а для многих кислород даже токсичен: он угнетает рост или вызывает гибель клеток. Такие микроорганизмы называются облигатными анаэробами. Факультативные анаэробы способны расти как в присутствии, так и в отсутствие молекулярного кислорода. Например, некоторые дрожжи и энтеробактерии в зависимости от наличия кислорода осуществляют аэробное либо дыхание, либо брожение. Неодинаковые потребности микроорганизмов в свободном кислороде учитывают при выборе способа их выращивания.

Работа 1

Задание: создать оптимальные условия культивирования для следующих микроорганизмов: *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*. Заполнить таблицу.

Микроорганизмы (вид)	Условия культивирования

Контрольные вопросы: 1. Способы создания оптимальных условий для культивирования микроорганизмов разных физиологических групп. 2. Кислотность питательной среды. 3. Температура, свет, влажность при культивировании микроорганизмов.

2.10 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: «Культивирование анаэробных микроорганизмов. Строгие анаэробы. Специальные среды для культивирования анаэробов».

2.10.1 Цель работы: Изучить условия для культивирования анаэробных микроорганизмов.

2.10.2 Задачи работы:

1. Освоить способы создания анаэробных условий для культивирования микроорганизмов.

2. Ознакомиться с приготовлением питательных сред для культивирования анаэробных микроорганизмов

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Стерильные чашки Петри с питательными средами, термостат, спиртовки, автоклав, холодильник, эксикатор, анаэростат, система ГазПак.

2.10.4 Описание (ход) работы:

Для культивирования анаэробных микроорганизмов необходимо создание бескислородных условий, достигаемое различными методами.

Физические методы основаны на создании вакуума в специальных аппаратах - анаэростатах. Иногда воздух в них заменяют каким-либо другим газом, например CO₂. Доступ кислорода в питательную среду можно затруднить, если культивировать анаэробов в глубине столбика сахарного агара или среды Вильсона — Блера, налитых в пробирки в расплавленном состоянии и остуженных до 43°C. По методу Вейона-Виньяля расплавленный и остуженный агар с посевным материалом набирают в стеклянные трубочки, которые запаивают с двух концов.

Химические методы заключаются в том, что при культивировании исследуемого материала на плотных средах в эксикатор помещают химические вещества, например пирогаллол и щелочь, реакция между которыми идет с поглощением кислорода. В жидкие питательные среды можно добавлять различные редуцирующие вещества: аскорбиновую или тиогликоловую кислоту.

Биологический метод основан на одновременном культивировании аэробов и анаэробов на плотных питательных средах в чашках Петри, герметически закупоренных. Вначале кислород поглощается растущими аэробами, посевянными на одной половине среды, а затем начинается рост анаэробов, посев которых сделан на другой половине. Наиболее удобна для культивирования анаэробов специальная среда Кита-Тароцци. В нее входят сахарный МПБ, который наливают в пробирки в количестве 10-12 мл, и кусочки вареных паренхиматозных органов. Перед употреблением среду Кита-Тароцци кипятят на водяной бане для удаления растворенного в ней кислорода. Среду заливают сверху стерильным вазелиновым маслом. Заметный рост анаэробов (помутнение) может наблюдаться через 48 ч и более в зависимости от количества посевного материала.

Рост изолированных колоний анаэробов можно получить при рассеве исследуемого материала по поверхности кровяно-сахарного агара, разлитого в чашки Петри. После посева чашки помещают в анаэростат. Исследуемый материал в убывающей концентрации можно засевать в высокий столбик агара. Образовавшиеся отдельные колонии анаэробов выделяют, распилив пробирку в месте роста. Колонии анаэробов для получения значительного количества биомассы отсевают затем на среду Кита-Тароцци. В качестве источника энергии для анаэробов используют глюкозу, добавление которой в питательную среду обязательно.

При культивировании анаэробов посевы исследуемого материала выращивают на специальных средах в анаэробных условиях, исключающих доступ к ним свободного кислорода. Питательные среды, используемые для культивирования анаэробов: Шедлер-агар, Шедлер-бульон. Среда Кита-Тароции – питательный бульон с глюкозой и кусочками свежих органов животных, которые обладают редуцирующей способностью. Сверху среду заливают слоем стерильного масла. Среда контроля стерильности (СКС) – 0,3% агар с добавлением тиогликоловой кислоты (редуцент кислорода), посев уколом. Среда Вильсона – Блер – высокий столбик питательного агара с добавлением солей натрия и железа, посев уколом. Анаэробы образуют черные колонии в глубине столбика за счет химической реакции с солями металлов.

Анаэробиоз создают, используя анаэростат или эксикатор. Анаэростат представляет собой толстостенную металлическую емкость, куда помещают чашки Петри или пробирки с засевянными микроорганизмами. Система газоотводных трубок и вакуумметр позволяют откачивать из емкости воздушную смесь, одновременно замещая ее инертным газом (гелием), и замерять давление. Современные анаэростаты представляют собой пластиковую емкость с плотно притертой крышкой, в которую для удаления воздуха помещают газорегенераторные пакеты. Эксикатор – толстостенная стеклянная емкость с притертой крышкой и подставкой для чашек Петри. На дно

эксикатора ставится горящая свеча либо наливается тиогликолевая кислота (химический редуцент кислорода), затем крышка притирается.

Работа 1

Задание. Приготовить специальные среды для культивирования анаэробов.

Вильсона-Блера среда - железосульфитный агар для выделения анаэробов. К 100 мл стерильного расплавленного и охлажденного до 80°C щелочного 3% МПА доливают 10 мл 20% свежеприготовленного стерильного р-ра натрия сульфита и 1 мл 8% р-ра железа хлорида, приготовленного на стерильной воде. Среду разливают в пробирки высоким столбиком и без стерилизации ставят в термостат при 37°C на сутки для проверки стерильности. Материал засевают уколом в столбик или в расплавленную и охлажденную среду. Патогенные и условно-патогенные анаэробы образуют в среде колонии черного цвета или дают сплошное почернение среды.

Среда Китт-Тароцци с углекислым кальцием. В пробирки или флаконы, предназначенные для среды Тароцци, добавляют на дно щепотку углекислого кальция, стерилизуют горячим воздухом по [ГОСТ 26668-85](#), закладывают в них кусочки мяса или печени и заливают мясо-пептонным бульоном с глюкозой, приготавливая среду. Применяют для анаэробных микроорганизмов, для посева кислотных консервированных продуктов.

Среда Китт-Тароцци с углекислым кальцием, дрожжевым экстрактом и аскорбиновой кислотой.

Готовят среду Китт-Тароцци с углекислым кальцием, но в мясо-пептонный бульон перед фасовкой вносят 2 г дрожжевого экстракта или 10 см³ раствора дрожжевого экстракта. Перед анализом в регенерированную среду Китт-Тароцци с углекислым кальцием и дрожжевым экстрактом асептически вносят аскорбиновую кислоту из расчета 100 мкг на 1 дм³ среды. Применяют для мезофильных и термофильных анаэробных микроорганизмов. Для внесения аскорбиновой кислоты в среду раствор разводят в стерильной дистиллированной воде в 100 раз и 0,2 см³ приготовленного раствора вносят на 1 дм³ среды.

Работа 2.

Задание: проанализировать различные методы создания анаэробных условий. Заполнить таблицу.

Таблица

Методы создания анаэробных условий

Метод, среда	Условия создания анаэробиоза
Физический	
Химический	
Биологический	
Специальные среды:	
Китта-Тароцци	
Вильсона-Блер	
СКС (среда контроля стерильности)	

Контрольные вопросы: 1. Методы создания анаэробных условий для культивирования бактерий. 2. Состав элективных питательных сред для анаэробных бактерий.

2.11 Лабораторная работа №12 (2 часа).

Тема: «Выделение чистых культур. Получение накопительных культур микроорганизмов. Метод глубинного посева. Метод разведений».

2.11.1 Цель работы: Изучить способы получения чистых культур микроорганизмов.

2.11.2 Задачи работы:

1. Освоить способы получения чистых культур микроорганизмов.
2. Изучить метод глубинного посева микроорганизмов.
3. Ознакомиться со способом получения накопительных культур микроорганизмов.

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Стерильные биологические пробирки с ватными пробками, стерильные чашки Петри, стеклянные емкости для приготовления питательных сред, компоненты питательных сред: пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, овсяная мука (или хлопья), сахароза, NaNO_3 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, KCl , FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, агар, дистиллированная вода, технические и аналитические весы, водяная баня, потенциометр, спиртовки.

2.11.4 Описание (ход) работы:

Выделение чистых культур микроорганизмов

При изучении физиолого-биохимических особенностей бактерий, а также для установления их видовой принадлежности необходимо выделить чистую культуру бактерий (культура, полученная из одной клетки и содержит микроорганизмы одного вида).

Метод механического разобщения колоний (Дригальского). Берут 4 чашки Петри со стерильным МПА, в одну из них на поверхность агара наносят каплю исследуемого материала, которую шпателем растирают по поверхности агара. Этим же шпателем, не прокаливая его, растирают поверхность другой чашки, затем третьей и т.д. Чашки помещают в термостат, перевернув вверх дном, чтобы образующийся конденсат не смывал культуру. Самый густой рост будет в первой чашке, в последней обычно получают изолированные друг от друга колонии. Отобрав колонию с характерными признаками и соответствующими морфологическими, тинкториальными свойствами для искомого вида микроорганизма, пересевают ее в пробирки для получения чистой культуры.

Вместо шпателя можно использовать бактериологическую петлю (метод истощающего штриха). В этом случае исследуемый материал наносят петлей в верхнюю часть твердой среды в чашке Петри и аккуратно зигзагообразно проводят петлей по поверхности первой чашки, затем второй, третьей и четвертой чашек.

Метод Пастера (метод разведений) основан на последовательном разведении в 10 пробирках с жидкой питательной средой капли исследуемого материала для того, чтобы получить в последней пробирке чистую культуру. Кох, впервые использовавший в лабораторной практике плотные питательные среды, предложил содержимое каждой пробирки с разным количеством исследуемого материала выливать в отдельную чашку Петри. После инкубации в термостате в последних чашках с наибольшим разведением обнаруживают изолированные колонии. При исследовании воды, молока и других материалов используют методы, предложенные Пастером и Кохом. **Метод Коха** является также наиболее распространенным способом количественного учета микроорганизмов. Каждая колония на чашке с питательной средой вырастает из одной клетки, которая является колониообразующей единицей (КОЕ).

При выделении спорообразующих микроорганизмов, учитывая стойкость спор при нагревании, исследуемый материал прогревают в водяной бане при 80°C в течение 30 мин, при этом все вегетативные формы погибают, а споры сохраняются.

Для выделения чистой культуры подвижных видов бактерий используют метод Мечникова и Шукевича. Каплю исследуемого материала помещают на дно пробирки со скошенным агаром (в конденсационную воду). Подвижный микроорганизм будет расти вверх по всей поверхности агара.

Накопительной называют культуру в которой преобладают представители одной физиологической группы или одного вида микроорганизмов. Сущность метода накопительных культур связана с созданием элективных условий, которые обеспечивают преимущественное развитие желаемого микроорганизма или группы микроорганизмов из смешанной популяции. Для получения накопительной культуры следует четко представлять физиологические особенности выделяемого микроорганизма.

Работа.

Задание. Выделить чистую культуру микроорганизмов из биологического материала.

На чистую чашку Петри с плотной питательной средой высевают исследуемый материал по методу Дригальского, чашку с посевом убирают в термостат. Далее студенты получают чашки с ростом изолированных колоний микроорганизмов. Каждую подозрительную колонию отсевают на скошенный агар и микроскопируют (изучают морфологию). По результатам исследований заполняют таблицу.

Таблица

Выделение чистой культуры						
	1-й день			2-й день		3-й день
Исследуемый материал	Микроскопия исследуемого материала (рисунок)	Метод выделения чистой культуры	Среда для посева	Характеристика колоний	Микроскопия колоний (рисунок)	Микроскопия чистой культуры (рисунок)

Контрольные вопросы: 1.Методы выделения чистых культур, основанные на механическом разобщении. 2. Методы выделения чистых культур подвижных микроорганизмов. 3. Методы выделения чистых культур спорообразующих микроорганизмов. 4. Методы выделения чистых культур, основанные на биологических свойствах микроорганизмов.

2.12 Лабораторная работа №13 (2 часа).

Тема: «Выделение чистой культуры из одной клетки. Капельный метод Линднера».

2.12.1 Цель работы: Ознакомиться методом выделения чистой культуры из одной клетки.

2.12.2 Задачи работы:

- 1.Освоить технику выделения чистой культуры микроорганизмов из одной клетки.
2. Ознакомиться с капельным методом Линднера.

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри со стерильными плотными питательными средами, пробирки со стерильным МПА, МПБ, бактериологические петли, спиртовки

2.12.4 Описание (ход) работы:

Чистую культуру из одной клетки можно выделить капельным методом с помощью микроманипулятора, а также с помощью микроселектора.

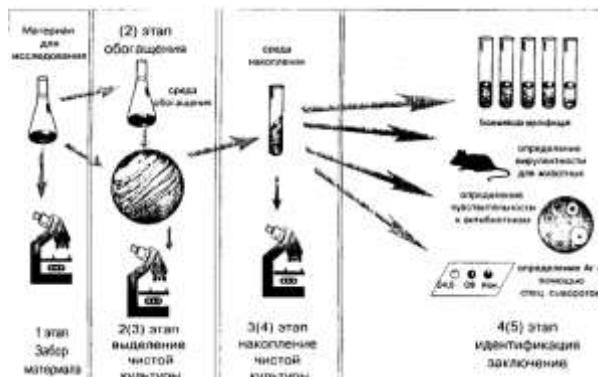
Капельный метод Линднера. Метод используют при работе с крупными микроорганизмами: дрожжами, мицелиальными грибами, цианобактериями, водорослями. Порядок работы следующий. Накопительную культуру разводят в стерильной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле были одиночные клетки микроорганизмов. Затем на поверхность нескольких стерильных покровных стекол стерильным стальным пером наносят по капле приготовленного разведения. Готовят препараты «висячая капля». Нанесенные на покровные стекла капли просматривают под микроскопом и отмечают те, в которых обнаружена только одна клетка. После этого препарат помещают в термостат во влажную камеру, которой обычно служит чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне. Через 12 — 24 ч отмеченные капли вновь микроскопируют. Капли, в которых наблюдается образование микроколоний, осторожно снимают с покровного стекла кусочками стерильной фильтровальной бумаги и переносят в пробирки со стерильной средой.

Выделение отдельных клеток с помощью микроманипулятора. Микроманипулятор — прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать из суспензии одну клетку. Эту операцию контролируют под микроскопом. Микроманипулятор имеет два операционных штатива, между которыми расположен обычный микроскоп. На предметном столике микроскопа установлена влажная камера, в которую помещают препарат «висячая капля». В держателях операционных штативов закреплены микропипетки (микропетли), перемещение которых в поле зрения микроскопа осуществляется с микронной точностью благодаря системе винтов и рычагов. Микропипетки вводят во влажную камеру таким образом, чтобы их концы оказались в висячей капле. Исследователь, глядя в микроскоп, извлекает отдельные клетки микропипетками и переносит их в пробирки со стерильной жидкостью средой.

Выделение отдельных клеток с помощью микроселектора Перфильева. Наиболее существенной частью микроселектора Перфильева является стеклянный микрокапилляр, имеющий строго прямоугольное сечение. Благодаря этому канал капилляра хорошо просматривается даже с иммерсионным объективом. Стерильный капилляр заполняют исследуемой суспензией клеток в агаризованной питательной среде и при большом увеличении микроскопа находят участок с одной клеткой. Специальным приспособлением этот участок капилляра стерильно выбирают в приемник, из которого затем переносят в стерильную среду. Микроселектор Перфильева можно использовать для выделения как крупных, так и мелких микроорганизмов.

Работа

Задание: Зарисовать схему выделения чистой культуры микроорганизмов из одной клетки.



Контрольные вопросы: 1. Этапы выделения чистой культуры микроорганизмов. 2. Способы проверки чистоты бактериальной культуры. 3. Характеристика капельного метода выделения чистой культуры микроорганизмов. 4. Характеристика метода Линднера.

2.13 Лабораторная работа №14 (2 часа).

Тема: «Культуральные свойства микроорганизмов».

2.14.1 Цель работы: Изучить особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

2.14.2 Задачи работы:

Освоить описание культуральных свойств микроорганизмов.

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Чашки Петри с изолированными колониями бактерий, линейки, петли, спиртовки

2.14.4 Описание (ход) работы:

Изучение морфологии колоний бактерий и дрожжей

На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха и сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. При описании колонии отмечают следующие её признаки: форму, величину, цвет, поверхность, профиль, край, консистенцию.

По форме колонии бывают округлые, амёбовидные, неправильные, ризоидные и т.д. (рис.).

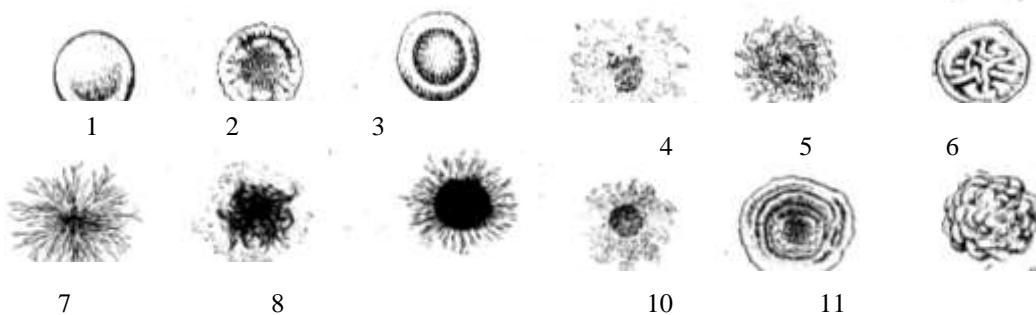
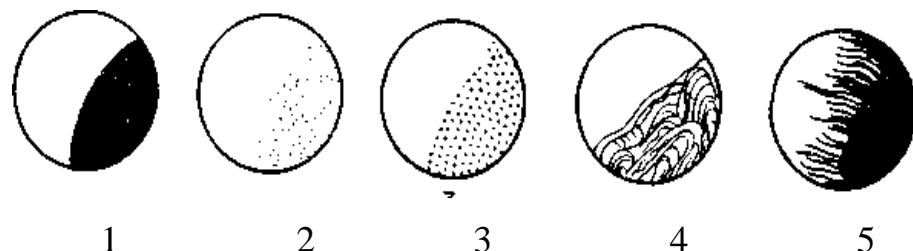


Рис. Форма колоний: 1- круглая; 2- круглая с фестончатым краем; 3- круглая с валиком по краю; 4, 5- ризоидные; 6- с ризоидным краем; 7-



Структура колонии может быть однородной, мелкозернистой, крупнозернистой и т.д (рис.).

Характер края колонии определяют при рассмотрении её под лупой или под микроскопом при малом увеличении. Он может быть ровным, волнистым, зубчатым, бахромчатым и т.д. (рис.).

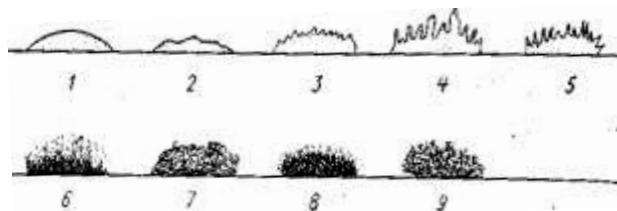


Рис. Край колонии: 1- гладкий; 2- волнистый; 3- зубчатый; 4- лопастной; 5- неправильный; 6- реснитчатый; 7- нитчатый; 8- ворсинчатый; 9- ветвистый.

Величина колонии определяется её диаметром в мм. Мелкие колонии имеют диаметр 1-2 мм, средние 2-4 мм, крупные – более 4 мм. Колонии менее 1 мм в диаметре называют точечными. Размер (диаметр) колонии измеряют с помощью обычной линейки или окулярного микрометра при малом увеличении микроскопа. Чашки при этом помещают на столик микроскопа крышками вниз.

Цвет колонии зависит от выработки определённого пигмента. Например, колонии бактерий *Xanthomonas campestris* обычно имеют желтый цвет благодаря образованию пигментов «ксантомонадинов», которые имеют уникальное строение и представляют собой бромзамещенные арильные полиены. Особо отмечают выделение пигмента в субстрат.

Поверхность колонии изучают с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колонии бывает гладкой, шероховатой, складчатой, морщинистой, с концентрическими кругами и т. д.

Консистенцию колонии определяют, прикасаясь к её поверхности пальцами. По консистенции различают следующие колонии:

- а) пастообразные, легко снимающиеся и размазывающиеся по поверхности питательной среды, наподобие сливочного масла;
- б) вязкие или слизистые, снимающиеся и тянувшиеся за пальцы;
- в) волокнистые, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки;
- г) хрупкие, сухие, распадающиеся от прикосновения пальцев.

Колонии продуцентов ксантана обычно округлые, 3-4 мм в диаметре, гладкие, маслянистые или клейкие, выпуклые с четко очерченным ровным краем, желтого цвета. Морфология колоний в значительной степени зависит от используемого штамма и среды культивирования.

Колонии актиномицетов часто имеют более сложную форму, мучнистую или бархатистую поверхность и волокнистую консистенцию.

Колонии дрожжей на первый взгляд мало отличаются от бактериальных: они не опущены воздушным мицелием как у актиномицетов и грибов и чаще всего бывают гладкими, густыми и плотными или реже – слизистыми, растекающимися. По цвету они могут быть чисто- белыми, буровато- бежевыми, коричневыми или яркими, окрашенными во все тона желто- оранжево- красного цвета. Колонии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* пастообразные, кремовые или коричневато- кремовые, обычно с довольно ровной, гладкой, иногда пузырчатой поверхностью, край колоний ровный, иногда лопастной. Форма колоний дрожжей может быть различной.

Работа

Задание. Отобрать 2-3 изолированных колонии, описать их и зарисовать. Результаты занести в следующую таблицу:

Таблица

Морфология колоний исследуемых бактерий и грибов

№	Форма	Диаметр, мм	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Рисунок
3									

Контрольные вопросы: 1. Признаки, используемые для описания колоний бактерий. 2. Форма колоний. 3. Профиль колоний. 4. Структура колонии. 5. Край колонии. 6. Поверхность колонии. 7. Консистенция колоний.

Материалы и оборудование: чашки Петри с изолированными колониями бактерий, линейки, микроскопы, петли, спиртовки.

Изучение характера роста микроорганизмов в жидкой среде

Микроорганизмы при росте в жидких средах могут вызывать помутнение среды, образование пленок или осадка. Обычно указывают степень помутнения среды — слабая, умеренная или сильная. Мутнота среды может быть постоянной или временной, однородной, хлопьевидной, с шелковистой волнистостью и т. д. Если образуется пленка, то отмечают ее характер — тонкая, плотная или рыхлая, гладкая, морщинистая или складчатая. При образовании осадка следует отметить его количество (скучный, обильный и т. д.) и консистенцию (плотный, рыхлый, слизистый). Отмечают возраст культуры, состав среды, условия культивирования. В ряде случаев рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, изменением цвета среды, газообразованием. Чтобы установить способность микроорганизмов к газообразованию, в пробирку помещают так называемый «поплавок» — маленькую, запаянную с одного конца трубку. Поплавок помещают в пробирку запаянным концом вверх перед стерилизацией среды, и следят, чтобы он полностью был заполнен средой. Если рост микроорганизмов сопровождается газообразованием, то образующиеся газы скапливаются в поплавке в виде пузырька.

Рост мицелиальных грибов в глубинной культуре происходит в виде мицелиальных агломератов или «шариков» более или менее правильной округлой формы, гладких или пушистых, плотных или полых. Может наблюдаться также дисперсный рост в виде отдельных гиф.

Для актиномицетов характерны два типа роста в условиях глубинного культивирования: хлопьевидный (рыхлые колонии с торчащими во все стороны гифами) и зернистый (несвязанные микроколонии в виде уплотненных шариков).

Работа 1.

Задание. Описать характер роста в жидкой среде бактерий, актиномицетов, дрожжей и мицелиальных грибов.

Контрольные вопросы: 1. Характер роста бактерий и дрожжей в жидкой питательной среде. 2. Характер роста актиномицетов и мицелиальных грибов в жидкой питательной среде.

2.14 Лабораторная работа №15-16 (4 часа).

Тема: «Определение внеклеточных ферментов».

2.14.1 Цель работы: Изучить способы определения внеклеточных ферментов.

2.14.2 Задачи: Овладеть способами определения внеклеточных ферментов микроорганизмов

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, пробирки с желатиновой средой, спиртовки, бактериологические иглы, термостат.

2.14.4 Описание (ход) работы:

Питание микроорганизмов осуществляется благодаря наличию в клетке различных ферментов, катализирующих все жизненно необходимые реакции.

Ферменты - это биологические катализаторы белковой природы.

Микробная клетка оснащена достаточно активным ферментативным аппаратом.

В соответствии с катализирующими реакциями все ферменты разделяют на шесть классов:

Оксидоредуктазы - катализируют реакции окисления-восстановления.

Трансферазы - катализируют реакции переноса различных групп от донора к акцептору.

Гидролазы - катализируют разрыв связей в субстратах с присоединением воды.

Лиазы - катализируют реакции разрыва связей в субстрате без присоединения воды или окисления.

Изомеразы - катализируют превращения в пределах одной молекулы (внутримолекулярные перестройки).

Лигазы (синтетазы) - катализируют присоединение двух молекул с использованием энергии фосфатных связей.

Несмотря на малые размеры микробной клетки, распределение в ней ферментов строго упорядочено. **Ферменты энергетического обмена и транспорта** питательных веществ локализованы в цитоплазматической мемbrane и ее производных. **Ферменты белкового синтеза** связаны с рибосомами. **Многие ферменты не связаны с определенными структурами клетки**, а находятся в цитоплазме в растворенном виде.

Ферменты бактерий подразделяются на **экзо- и эндоферменты**.

Эндоферменты функционируют только внутри клетки. Они катализируют реакции биосинтеза и энергетического обмена.

Экзоферменты выделяются клеткой в среду и катализируют реакции гидролиза сложных органических соединений на более простые, доступные для ассимиляции микробной клеткой. К ним относятся гидролитические ферменты, играющие исключительно важную роль в питании микроорганизмов.

В зависимости от условий образования ферментов их разделяют на конститутивные и индуцибельные.

Конститутивными называют ферменты, синтезируемые клеткой вне зависимости от субстрата, на котором развиваются бактерии. Например, ферменты гликолиза.

Индуцибельные ферменты синтезируются только в ответ на присутствие в среде необходимого для клетки субстрата-индуктора. Он взаимодействует с репрессором, инактивирует его, в результате чего включается генетический аппарат клетки и начинается синтез соответствующего фермента. Индуцированный синтез ферментов идет, пока в среде присутствует индуктор. При этом ферменты синтезируются заново во всех клетках одновременно. Индукторами биосинтеза являются многие питательные вещества. К **индуцибельным** относится большинство **гидролитических ферментов**.

Известны также ферменты, которые получили название **аллостерических**. Кроме активного центра у них имеется *регуляторный* или *аллостерический центр*, который в молекуле фермента пространственно разделен с активным центром. Аллостерическим (от греч. *allos* - иной, чужой) он называется потому, что молекулы, связывающиеся с этим центром, по строению (стериически) не похожи на субстрат, но оказывают влияние на связывание и превращение субстрата в активном центре, изменяя его конформацию. Молекула фермента может иметь несколько аллостерических центров. Вещества, связывающиеся с аллостерическим центром, называют аллостерическими эффекторами. Они влияют через аллостерический центр на функцию активного центра: или облегчают ее, или затрудняют. Соответственно аллостерические эффекторы называются положительными (активаторы) или отрицательными (ингибиторы). Аллостерические ферменты играют важную роль в тонкой регуляции метаболизма бактерий. Поскольку практически все реакции в клетке катализируются ферментами, регуляция метаболизма сводится к регуляции интенсивности ферментативных реакций.

Некоторые ферменты, так называемые **ферменты агрессии**, разрушают ткани и клетки макроорганизма, обуславливая тем самым распространение патогенных микроорганизмов и их токсинов в инфицированных тканях. К таким ферментам относятся *плазмокоагулаза*, *нейраминидаза*, *коллагеназа*, *лецитиназа*, *гиалуронидаза* и некоторые другие ферменты. Гиалуронидаза стрептококков, например, расщепляет гиалуроновую кислоту в мембранах клеток соединительных тканей макроорганизма, что способствует распространению возбудителей и их токсинов в организме, обуславливая высокую инвазивность этих бактерий.

Плазмокоагулаза является главным фактором патогенности стафилококков, так как участвует в превращении протромбина в тромбин, который вызывает образование фибриногена, в результате чего каждая бактерия покрывается пленкой, предохраняющей ее от фагоцитоза. Ферменты микроорганизмов, такие как лигазы и рестриктазы, нашли широкое применение в биотехнологии, в том числе в генетической инженерии, для получения различных биологически активных веществ, гибридом, производящих моноклональные антитела, а также ряда продуктов в легкой и пищевой промышленности.

Ферменты микроорганизмов характеризуют их биологические свойства и поэтому их исследуют с целью идентификации бактерий. **В зависимости от субстрата** гидролитические ферменты принято делить на две большие группы:

- **гидролитические или сахаролитические ферменты**, субстратом для которых являются различные сахара, а продуктами их расщепления - кислоты, спирты, альдегиды, H_2O и CO_2 ;

- **протеолитические ферменты**, расщепляющие белки с образованием полипептидов, аминокислот, амиака, индола, сероводорода.

Для изучения активности ферментов при идентификации микроорганизмов широко используют дифференциально-диагностические среды, в состав которых входят определенные субстраты - сахара или белки.

При исследовании гидролитической активности бактерий распространены моносубстратные дифференциально-диагностические среды Гисса (пестрый ряд Гисса), лактозосодержащие среды Эндо, Левина, Плоскирева, дисубстратные среды Ресселя, полисубстратные среды Клиглера и Олькеницкого. Последние могут служить и для изучения протеолитических свойств бактерий, так как рост микроорганизмов сопровождается высвобождением амиака.

Протеолитические ферменты бактерий определяются также по выделению индола, сероводорода, расщеплению некоторых аминокислот, например, фенилаланина, лизина, цистина. Протеолитические ферменты способны изменять (разжигать) желатину, причем, разные виды бактерий по разному изменяют «столбик» желатины в пробирке с посевом микроорганизма. Так, при росте холерного вибриона «столбик» желатины

принимает форму гвоздя, при росте стафилококка - чулка, при росте синегнойной палочки наблюдается послойное разжижение среды.

Окислительно-восстановительные ферменты, дегидрогеназы, каталазу определяют по изменению органического красителя - акцептора водорода. Способность микроорганизмов использовать в качестве источника углерода цитрат оценивают в специальных тестах основанных на работе ферментов.

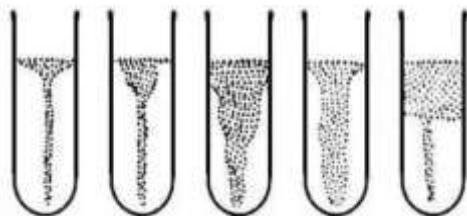
В практических бактериологических лабораториях широко применяют микро- и экспресс-методы для ориентировочного изучения биохимических свойств микроорганизмов. Для этой цели существует множество тест-систем.

Наиболее часто используют **систему индикаторных бумаг (СИБ)**. СИБы представляют из себя диски фильтровальной бумаги, пропитанные растворами сахаров или других субстратов в сочетании с индикаторами. Такие диски опускают в пробирку с выросшей в жидкой питательной среде культурой. По изменению цвета диска с субстратом судят о работе фермента. Микро-тест системы для изучения идентификации энтеробактерий представлены одноразовыми пластиковыми контейнерами со средами, содержащими различные субстраты, с добавлением индикаторов. Посев чистой культуры микроорганизмов в такие тест-системы позволяет быстро выявить способность бактерий утилизировать цитраты, глюкозу, сахарозу, выделять аммиак, индол, разлагать мочевину, лизин, фенилаланин и т.д.

Работа 1

Задание: Определить протеолитическую активность микроорганизмов. Учесть результат. Оформить протокол.

Произвести посев чистой культуры бактерий уколом в столбик мясо-пептонного желатина. Посевы выдержать при комнатной температуре (20-22 °C) в течение нескольких дней, при этом регистрируют не только наличие разжижения, но и его характер.



Контрольные вопросы: 1. Ферменты: характеристика, классификация. 2. Способы обнаружения внеклеточных ферментов у микроорганизмов.

2.15 Лабораторная работа №17-18 (4 часа).

Тема: «Определение способности микроорганизмов к брожению».

2.15.1 Цель работы: Изучить возбудителей микробного брожения.

2.15.2 Задачи:

1. Ознакомиться с процессом спиртового брожения
2. Ознакомиться с процессом молочно-кислого брожения
3. Ознакомиться с процессом масляно-кислого брожения
4. Ознакомиться с процессом брожения пектиновых веществ

2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Картофель, мел, пробирки, пипетки, водяная баня, раствор Люголя (I + KI), 5%-ный раствор FeCl_3 , предметные и покровные стекла, микроскопы Льняная солома, ножницы, раствор Люголя, 5%-ный раствор FeCl_3 , пинцеты, скальпели.

2.15.4 Описание (ход) работы:

Микроорганизмы в основном получают энергию при высвобождении её из безазотистых органических веществ. В зависимости от того, каким путём идёт разложение органических веществ, различают брожение, при котором высвобождение энергии идёт без доступа свободного кислорода, и дыхание или окисление, когда выделение энергии происходит в аэробных условиях. Брожение сопровождается частичным высвобождением энергии, заключённой в органическом веществе. Поэтому среди конечных продуктов этого процесса находятся неполностью окислившиеся вещества, содержащие запасы химической энергии – спирт, молочная кислота и т.д. В зависимости от основного продукта, образующегося в ходе этих процессов, брожения получили соответствующие названия: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое и др.

Брожения, осуществляемые микроорганизмами, имеют большое значение в природе и широко используются в практической деятельности человека. Они лежат в основе пивоварения, квашения овощей, силосования, переработки молока в кисломолочные продукты и сыр и т.д.

Спиртовое брожение – это процесс превращения углеводов, вызываемый дрожжами и некоторыми видами бактерий (*Zymomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi* и др.) и отдельными представителями мукоровых грибов. Однако практическое значение имеет спиртовое брожение, осуществляемое дрожжами.

Дрожжи сбраживают углеводы (моно- и дисахариды) с образованием этилового спирта по схеме:



Только бактерии рода *Sarcina* образуют этанол тем же путём, что и дрожжи. Этanol как побочный продукт образует и гетероферментативная молочнокислая бактерия *Leuconostoc mesenteroides*.

Спиртовое брожение лежит в основе виноделия, пивоварения. В хлебопекарной промышленности дрожжи выполняют роль разрыхлителей теста: при брожении и дыхании образуется диоксид углерода, благодаря чему увеличивается объём теста при выпечке и пористость хлеба.

Молочнокислое брожение осуществляют филогенетически неродственные микроорганизмы, объединяемые по признаку образования молочной кислоты (представители порядков *Lactobacillales* и *Bacillales* класса *Bacilli* и сем. *Bifidobacteriaceae* класса *Actinobacteria*). Они различны по морфологии, но все грамположительны, не образуют спор, не подвижны.

Схема сбраживания сахаров через гликолиз характерна для гомоферментативного молочнокислого брожения, когда лактата образуется 90 % и только 10% приходится на другие продукты (ацетат, ацетоин, этанол). При гетероферментативном молочнокислом брожении сахара сбраживаются через пентозофосфатный путь и лактата образуется ≈ 50%.

Свойство образовывать лактат при брожении используется при квашении капусты, засолке огурцов, приготовлении молочнокислых продуктов, силосовании кормов, в заквасках для ржаных сортов хлеба и добавках в сыроподобные колбасы, а также для получения чистой молочной культуры.

Работа 1.

Задание. Изучить молочнокислое брожение.

Разливают молоко в колбы по 50-100 мл, закрывают ватными пробками, ставят на асbestosовые сетки и доводят молоко до кипения. Колбы с кипяченым и некипяченым

молоком помещают в термостат при 30 °С. Через 10-12 ч некипяченое молоко скисает. В колбе образуется ровный плотный сгусток без следов газа. Сгусток получается в результате реакции молочной кислоты с казеинатом кальция и выпадения казеиновой кислоты в осадок.

При кипячении молока молочнокислые бактерии, поскольку они не образуют спор, погибают, споры же маслянокислых бактерий сохраняются. При инкубации в термостате они прорастают и осуществляют маслянокислое брожение лактозы. В результате реакции масляной кислоты с казеинатом кальция и в этом варианте опыта казеиновая кислота выпадает и осадок. В дальнейшем она подвергается пептонизации, в результате чего сыворотка приобретает кремовый цвет, неприятный запах масляной кислоты и прогорклый вкус.

Микроскопирование молочнокислых бактерий. Если простоквашу хранить при комнатной температуре, то на ее поверхности появляется белая или кремовая бархатистая морщинистая пленка. Такая же пленка обычно бывает на поверхности рассола при квашении огурцов, капусты и других овощей. Это молочная плесень - *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), которая всегда сопутствует молочнокислому брожению, являясь его нежелательным спутником. Она окисляет молочную кислоту, образуемую молочнокислыми бактериями, до СО₂ и Н₂О, снижая кислотность среды. В результате кисломолочные и квашеные продукты начинают портиться, так как в среде происходит развитие гнилостных бактерий.

Молочная плесень - аэробная форма, поэтому развивается только на поверхности. Имеет многоклеточный мицелий, который распадается на отдельные клетки, так называемые оидии, по форме напоминающие дрожжи и служащие для размножения.

Для микроскопических наблюдений за молочнокислым бактериями готовят препарат из прокисшего молока. Бактериологическую петлю вводят в сгусток и, повернув вокруг оси извлекают, прикасаясь ею к пленке, которую образует молочная плесень. Сгусток размазывают по предметному стеклу очень тонким слоем без воды. Сушат на воздухе. Фиксируют смесью спирта с эфиром (приблизительно 1:1), несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации не только погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, но и помошью эфира извлекается и удаляется жир, капли которого на препарате мешают окраске и микрокопированию.

Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим 2-3 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. На препарате преобладают мелкие округлые клетки *Lactococcus lactis*, соединенные в короткие цепочки. Эта бактерия - возбудитель естественного скисания молока в средних широтах. Оптимальная температура для ее развития - 30 °С. Он способствует накоплению в молоке до 1% молочной кислоты.

Нередко на препарате видны разных размеров тонкие палочки обычно правильной формы рода *Lactobacillus*, иногда содержащие зерна волютинна. Чаще встречается *Lactobacillus bulgaricus* (рис.) – возбудитель естественного ски-сания молока в южных широтах.

Оптимальная температура ее развития - 40 °С, она кислотоустойчива, накапливает до 3,5% молочной кислоты. На плотных средах эта бактерия образует мелкие характерные колонии в виде комочек ваты, как правило, выпуклые, непрозрачные, непигментированные.

Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень (рис.). Прямоугольные или овальные клетки ее

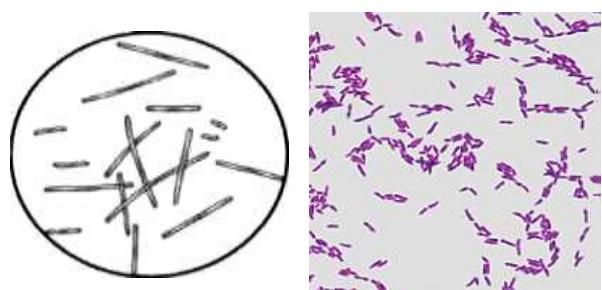


Рис. *Lactobacillus* sp.

отличаются от молочнокислых бактерий большими размерами.

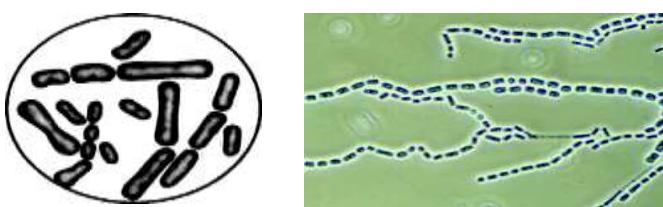


Рис. Молочная плесень *Geotrichum candidum*

- Контрольные вопросы:** 1. Охарактеризовать возбудителей спиртового брожения. 2. Охарактеризовать возбудителей гомоферментативного молочно-кислого брожения. 3. Охарактеризовать возбудителей гетероферментативного молочно-кислого брожения. 4. Практическое применение брожения.

Возбудителями **маслянокислого брожения** являются строгие анаэробы, подвижные палочки с клостридиальным или плектридиальным типом спорообразования. По преобладанию тех или иных конечных продуктов маслянокислое брожение подразделяют на истинно маслянокислое (брожение глюкозы, крахмала), ацетонобутиловое брожение, брожение пектиновых веществ.

Процесс маслянокислого брожения протекает по схеме:



Кроме масляной в процессе брожения в заметных количествах образуется уксусная кислота, а при подкислении среды (до рН 5,5) – значительные количества бутилового спирта и ацетона.

Работа 2.

Задание. Изучить маслянокислое брожение.

Маслянокислое брожение крахмала исследуют на среде с картофелем. В среду не вносят ни почвы, ни маслянокислых бактерий, так как на кожуре картофеля всегда есть их споры. Элективные условия создают наличием крахмала – источника углерода, используемого только микроорганизмами, содержащими фермент амилазу; пастеризацией; анаэробиозом (высокий столбик жидкости в пробирке и выделение в процессе брожения CO_2 и H_2 , вытесняющих воздух).

Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими 1/3 высокой пробирки, добавляют немного мела, заливают водопроводной водой на 2/3 и помещают на водяную баню при 80 °C на 10 мин для пастеризации. Через 2-3 дня картофель всплывает вследствие бурно идущего газообразования. По окончании брожения культуральную жидкость используют для исследования морфологии маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

Микрокопирование маслянокислых бактерий. Питательную среду из пробирки с картофелем отбирают пипеткой, закрыв указательным пальцем верхний конец и погрузив ее кончик в средний слой сброшенной жидкости. Слегка приподняв палец, набирают в пипетку жидкость, снова зажимают пальцем верхний конец пипетки и, вынув ее из колбы, наносят каплю на предметное стекло. К накопительной культуре добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом, на которое наносят каплю кедрового масла. При микрокопировании препарата обнаруживаются клетки *Clostridium butyricum* (от лат. *close* – закрыть, *clostrum* – замок, *iridium* – надолго, долгоживущие, поскольку имеют спору и жизненном цикле; от греч. *butyrum* – масло), *C. pasteurianum* и других бактерий, имеющих подобную форму (рис. 14). В клетках можно заметить овальные тельца, сильно преломляющие свет. Это споры. В тех местах клетки,

где содержится гранулеза, возникает сине-фиолетовое окрашивание. Зарисовывают только окрашенные клетки, явно относящиеся к группе маслянокислых бактерий.

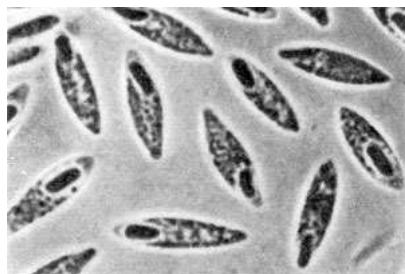


Рис. *C. butylicum*



C. pasteurianum

Качественные реакции на маслянную кислоту. Получение масляно-кислого железа (реакция с FeCl_3). Нейтральные растворы маслянокислых солей при нагревании с FeCl_3 приобретают коричневое окрашивание вследствие образования маслянокислого железа.

В пробирку наливают 3-5 мл сброшенной жидкости, добавляют 1-2 мл 5%-ного хлорида железа и нагревают на пламени. Раствор маслянокислого железа в отраженном свете имеет буровато-коричневый цвет, а в проходящем свете - кроваво-красный.

Получение масляноэтилового эфира (ананасовой эссенции). К 3-5 мл культуральной жидкости в пробирке прибавляют 0,5 мл 96%-ного этилового спирта и 1-2 мл концентрированной серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах эфира (запах ананаса).

Контрольные вопросы: 1. Охарактеризовать возбудителей масляно-кислого брожения. 2. Значение масляно-кислого брожения в народном хозяйстве.

Материалы и оборудование. Картофель, мел, пробирки, пипетки, водяная баня, раствор Люголя (I + KI), 5%-ный раствор FeCl_3 , предметные и покровные стекла, микроскопы.

Работа 3.

Задание. Изучить брожение пектиновых веществ.

Снопик льняной соломы высотой 6-7 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в крупную пробирку, наполненную на 2/3 водопроводной водой. Пробирку, зажав пинцетом, кипятят на горелке 2-3 мин для удаления экстрактивных (легкосбраживаемых) веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Вода приобретает желто-зеленый цвет. Воду сливают. Вновь наполняют пробирку водопроводной водой, кипятят несколько минут и сливают. Эту операцию осуществить 5-6 раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают пробирку под краном, и в снопик вводят свежую соломину, не подвергавшуюся нагреванию.

Пробирку со снопиком помещают в термостат при 30-35 °С. Через 2-3 дня начнется брожение, а через 5-8 сут. оно закончится. Накопление в культуральной жидкости масляной кислоты наряду с уксусной, образующейся при сбраживании продуктов гидролиза пектина, можно обнаружить при помощи качественных реакций на маслянную кислоту.

Микроскопирование. Извлекают снопик из пробирки, из его середины вынимают несколько соломинок и отжимают из них немного жидкости на предметное стекло. Добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате - крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования (барабанная палочка) и прерывистым расположением гранулезы, окрашенной в синий цвет. Это *Clostridium pectinovorum*. Нередко обнаруживается *C. felsineum* - палочки меньшего размера сигарообразной формы со спорой на конце. Гранулеза может заполнять всю вегетативную часть клетки.

Контрольные вопросы: 1. Охарактеризовать возбудителей брожения пектиновых веществ.

2.16 Лабораторная работа №19 (2 часа).

Тема: «Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота».

2.16.1 Цель работы: Ознакомиться со способами микробного превращения органических и минеральных соединений азота.

2.16.2 Задачи работы:

1. Изучить видовое разнообразие микроорганизмов, способных к превращению органических и минеральных соединений азота.
2. Ознакомиться с процессами микробного превращения органических и минеральных соединений азота.

2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: культуры микроорганизмов, чашки петри с плотной питательной средой, бактериологические петли, спиртовки, термостат, холодильник.

2.16.4 Описание (ход) работы:

Фиксация атмосферного азота свободноживущими бактериями (ассоциативная диазотрофия)

Ассимиляция атмосферного азота микроорганизмами – диазотрофия – имеет важное значение в балансе азота в почве. Её осуществляют свободноживущие и симбиотические микроорганизмы: бактерии, актиномицеты, цианобактерии.

Среди свободноживущих наиболее распространены бактерии родов *Azotobacter*, *Clostridium*.

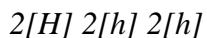
Бактерии *Azotobacter chroococcum* фиксируют азот в аэробных условиях. На агаре образует слизистые колонии. Молодые клетки имеют вид попарно соединенных крупных, коротких палочек с закругленными концами. Они подвижны, перитрихи. По мере развития они теряют подвижность, становятся эллипсоидными, а затем круглыми. Часто окружены слизистой капсулой, которая выявляется после окраски клеток фуксином и смешивания с разбавленной тушью. Внутри клеток ясно выражена зернистость. В качестве источника углерода азотобактер использует моно-, дисахариды, спирты и соли органических кислот, в том числе и бензойной. В неблагоприятных условиях образуют цисту.

Clostridium pasteurianum – облигатный анаэроб. Энергию для всех процессов жизнедеятельности, в том числе для ассимиляции атмосферного азота, бактерии этого вида получают за счет маслянокислого брожения.

Цианобактерии-азотофиксаторы относятся к родам *Nostoc*, *Anabaena*. Все цианобактерии фотоавтотрофы, аминоавтотрофы, аэробы. Образуют специализированные клетки – Гетероцисты, Которые защищены от окисления кислородом воздуха толстой

оболочкой. Это имеет большое значение, так как процесс азотфиксации восстановительный, кислородом он ингибируется.

Химизм: Процесс усвоения азота происходит по восстановительному пути и отражается схемой:



Азот динимид гидразин амиак аминокислота

АТФ АТФ АТФ

Амиак используется для аминирования кетокислот с образованием аминокислот. Процесс идет с использованием восстановительных эквивалентов (НАДФ•Н₂) и энергии АТФ. Для восстановления 1 молекулы N₂ до амиака затрачивается 12 молекул АТФ.

Способность к фиксации атмосферного азота обусловлена наличием сложной системы ферментов – *Нитрогеназой*. Эти ферменты кодируются 17 генами и подразделяются на 2 фракции:

- молибдobelок – фракция, содержащая молибден;
- железobelок – фракция, содержащая железо.

Процесс играет колossalную роль в природе, так как в нем происходит превращение азота в доступные для живых организмов формы, повышается почвенное плодородие.

Симбиотическая азотфиксация

Этот процесс осуществляется многими микроорганизмами в симбиозе как с бобовыми, так и с не бобовыми растениями.

Наиболее изучена фиксация азота бактериями рода *Rhizobium* в симбиозе с бобовыми растениями. Известно 1300 видов бобовых, на корнях которых бактерии образуют клубеньки.

Представители рода *Rhizobium* – грамотрицательные бесспоровые палочки размером 0,5-0,9 x 1,2-3 мкм. Имеют жгутики (монотрихи или перитрихи). При старении теряют подвижность, накапливают жировые включения. В зрелой клубеньковой ткани бактериальные клетки превращаются в бактероиды: грушевидные, сферические или ветвистые образования. В таком виде клубеньковые бактерии наиболее энергично усваивают атмосферный азот. На питательных средах бактерии рода *Rhizobium* усваивают органические вещества (гетеротрофы), аэробы, могут использовать в качестве источника азота как минеральные, так и органические его формы, но не атмосферный азот. *Способность к азотфиксации у ризобий сохраняется только в симбиозе с тканями бобовых растений.*

Химизм симбиотической азотфиксации и ферменты те же, что и у свободноживущих микроорганизмов.

Аммонификация белков (минерализация азота)

Процесс выделения азота из аминокислот и превращение его в амиачную форму называется аммонификацией. Микроорганизмы, вызывающие этот процесс, выделяют в окружающую среду протеолитические ферменты, под действием которых белки гидролизуются до аминокислот. Последние

поступают в клетку и в ней дезаминируются с образованием амиака, органических кислот и других продуктов.

Возбудителями процесса аммонификации являются аммонифицирующие или гнилостные бактерии. Их можно разделить на три группы по отношению к источникам кислорода:

1.Аэробы: *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus mesentericus*.

Bacillus Mycoides – палочки 5-10x1,0-1,5 мкм, перитрихи, соединяются в цепочки, образуя жирные пленки на поверхности жидкой среды. Споры овальные, расположены эксцентрично.

Bacillus Subtilis – палочки короткие и тонкие, 3-5x0,6 мкм, нередко соединены в длинные нити. Споры овальные, расположены без строгой локализации.

Bacillus Mesentericus – палочки тонкие, длинные и короткие, 3-10x0,5-0,6 мкм, одиночные или соединены в длинные нити. Споры овальные и продолговатые, бациллярного типа.

Bacillus Megatherium – клетки толстые до 2 мкм в диаметре, длина от 3 до 12 мкм. Содержимое клеток грубозернистое с большим количеством питательных веществ (жир, гликоген).

2. Анаэробы факультативные:

Proteus Vulgaris – палочки длиной от 1 до 20 мкм, перитрихи, спор не образуют, грамотрицательны.

Escherichia coli – кишечная палочка. Небольшие грамотрицательные палочки, перитрихи, спор не образуют.

Работа 1

Задание: Заполните таблицу

Микроорганизмы	Условия и способы превращения соединений азота
<i>Proteus Vulgaris</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Bacillus Subtilis</i>	
<i>Rhizobium spp.</i>	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	
<i>Azotobacter chroococcum</i>	

Контрольные вопросы: 1. Назовите микроорганизмы, способные к фиксации молекулярного азота. 2. Назовите микроорганизмы, способные к превращению органических соединений азота. 3. Охарактеризуйте основные способы превращения микроорганизмами органических и минеральных соединений азота.

2.17 Лабораторная работа №20 (2 часа).

Тема: «Роль бактерий в превращении соединений серы, железа и фосфора».

2.17.1 Цель работы: Ознакомиться со способами микробного превращения соединений серы, железа и фосфора.

2.17.2 Задачи работы:

1. Изучить видовое разнообразие микроорганизмов, способных к превращению соединений серы, железа и фосфора.

2. Изучить процессы микробного превращения соединений серы, железа и фосфора.

2.17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: культуры микроорганизмов, чашки Петри с плотной питательной средой, бактериологические петли, спиртовки, термостат, холодильник.

2.17.4 Описание (ход) работы:

Фосфор имеет большое значение в жизнедеятельности организма. Без фосфора не могут синтезироваться белки, он в большом количестве входит в состав ядерного вещества и многих ферментов, участвует в так называемых реакциях фосфорелирования. Некоторые фосфорорганические компоненты – носители больших запасов энергии.

В почве имеется много фосфора. По расчетам, его количество составляет 3 – 5 т/га. Особенно много этого элемента в черноземах, богатых гумусом (5 – 6 т/га). Фосфор в почве содержится в основном в органической, неусвоемой растением формой и в виде трудноусвояемых минеральных соединений. Органические соединения фосфора попадают в почву вместе с растительными остатками, а также с отмирающими микроорганизмами. Они представлены нуклеопротеидами, нуклеиновыми кислотами и т.д.

Работами многих авторов была подтверждена роль микроорганизмов в превращении органических соединений фосфора в доступную для растений форму. Однако выделить культуру фосфорных микробов в чистом виде удалось только в 1935 г. Р. М. Менкиной. Ею были выявлены две разные группы микробов: спорообразующие и не обладающие таким свойством.

Из разнообразия фосфорных микроорганизмов наибольший интерес представляют спорообразующие формы, так как они используются для приготовления бактериального удобрения фосфобактерина. Их относят к виду *Vac. Megaterium var. phosphatium*. Это крупные палочки с закругленными концами, плотной оболочкой и зернистой цитоплазмой. Размеры клеток 5 – 6 мкм в длину и 1,8 – 2 мкм в ширину. В ранней стадии клетки расположены поодиночно и слабоподвижны, в дальнейшем они располагаются попарно или короткими цепочками и становятся неподвижными. При старении концы клеток приобретают конусообразную форму.

Клетки богаты органическими соединениями фосфора, нуклеопротеидами, образуют овальные эндоспоры, расположенные внутри клетки. Окрашиваются клетки по Граму, аэробы. Оптимальная температура роста 37°C. Колонии резкоокаймленные грязновато-белого цвета. Старые колонии вначале желтеют, а затем приобретают бурую окраску. На среде, содержащей фосфорорганические соединения и мел, вокруг колонии под влиянием кислот образуются зоны просветления. Фосфорные микробы энергично расщепляют органические соединения фосфора, освобождают фосфор в виде минеральных легкорастворимых солей фосфорной кислоты, доступных для растений. Чем больше таких микробов в почве, тем больше в ней доступного фосфора.

В те почвы, которые бедны легкодоступным фосфором вносят фосфоробактерин. Это бактериальное удобрение может храниться в сухом виде более года, легко транспортируется и не боится низких температур. Можно одновременно проводить бактеризацию и проправливание семян. Протравитель заметного действия на споры микробов не оказывает.

Сущность действия фосфобактерина заключается в том, что микробы, попадая вместе с семенами в почву, способствуют минерализации органического фосфора и тем самым улучшают фосфорное питание растений. Полезное действие микробов состоит еще и в том, что они активизируют развитие других полезных групп микроорганизмов: нитрификаторов и азотфиксаторов.

Наряду с бактериями все большее внимание в усвоении фосфора и других элементов растениями не только экзогенным, но и эндогенным путем уделяется микоризным грибам. Микориза (грибокорень) живет в симбиозе с растением как на поверхности корней, так и внутри их. В чистой культуре на искусственных средах такие грибы пока не получены. Но известно, что микоризованные корни растений наиболее устойчивы к инфекционным болезням, больше усваивают минеральных и биологически активных веществ. Все это повышает жизнеспособность и урожайность сельскохозяйственных культур. Так, учеными исследовательского института сельского хозяйства Индии выведены бактерии, которые способствуют переводу фосфатов в

растворимые соединения, а они лучше усваиваются растениями, и как результат, урожайность пшеницы, картофеля и бобовых повышается на 10 – 50 %.

Превращение соединений серы.

Сера содержится в организме животных и растений, входит в состав серосодержащих аминокислот (цистеин, цистин, метионин), витаминов группы В (биотин, тиамин), много ее в волосах и перьях. Органические соединения серы в почве представлены остатками животных и растений. Минерализация серы осуществляется микроорганизмами, которые в аэробных условиях доводят ее до сульфатов, а в анаэробных – восстанавливают серосодержащие белки до сероводорода и частично до меркаптанов.

Восстановленные соединения серы окисляют автотрофные (фотолитотрофы, хемолитотрофы) микробы. Среди них различают нитчатые, тионовые и фотосинтезирующие. Нитчатые хемолитотрофные серобактерии – аэробы и относятся к родам *Beggiatoa*, *Theatric*, *Thioploca* и другим. *Beggiatoa* по форме представляет длинные нити, которые состоят из множества клеток, окисляют сульфиды до сульфатов. Промежуточным продуктом является элементарная сера, которая в виде шариков накапливается в клетках. Процесс происходит в два этапа по следующей схеме:



Виды рода *Beggiatoa* различают по толщине нитей. Они растут в тех водоемах, где происходит разложение органического вещества с выделением водорода.

Тионовые хемолитотрофные бактерии представляют собой грамотрицательные, неспорообразующие, подвижные палочки и относятся к роду *Thiobacillus*. Они окисляют серу и ее соединения (сероводород, сульфиды и др.), которые накапливаются вне клетки.

Работа 1

Задание: Заполните таблицу

Микроорганизмы	Условия и способы превращения соединений серы, железа и фосфора
<i>Beggiatoa spp.</i>	
<i>Theatric spp.</i>	
<i>Thioploca spp.</i>	

Контрольные вопросы: 1. Назовите микроорганизмы, способные к превращению соединений серы, железа и фосфора. 2. Особенности химических реакций, связанных с микробными превращениями серы, железа и фосфора. 3. Охарактеризуйте основные способы превращения микроорганизмами соединений серы, железа и фосфора.

2.18 Лабораторная работа №21 (2 часа).

Тема: «Коллоквиум».

2.18.1 Цель работы: оценить знания студентов по пройденному материалу

2.18.2 Задачи работы: проверить знания студентов по пройденному материалу

2.18.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: культуры микроорганизмов, чашки петри с плотной питательной средой, пробирки, бактериологические петли, спиртовки, микроскопы.

2.18.4 Описание (ход) работы:

Контрольные вопросы:

1. Назовите микроорганизмы и особенности химических реакций микробного превращения соединений серы, железа и фосфора.
2. Назовите микроорганизмы и охарактеризуйте основные способы микробного превращения органических соединений азота.
3. Охарактеризуйте возбудителей масляно-кислого брожения.
4. Охарактеризуйте возбудителей спиртового брожения.
5. Охарактеризуйте возбудителей гомоферментативного и гетероферментативного молочно-кислого брожения.
6. Ферменты: характеристика, классификация.
7. Способы обнаружения внеклеточных ферментов у микроорганизмов.
8. Характер роста бактерий и дрожжей в жидкой и на плотной питательной среде.
9. Культуральные свойства микроорганизмов: форма, профиль, структура, край, поверхность, консистенция колоний.
10. Этапы выделения чистой культуры микроорганизмов.
11. Методы выделения чистых культур, основанные на механическом разобщении.
12. Методы выделения чистых культур подвижных микроорганизмов.
13. Методы выделения чистых культур спорообразующих микроорганизмов.
14. Методы выделения чистых культур, основанные на биологических свойствах микроорганизмов.
15. Методы создания анаэробных условий для культивирования бактерий.
16. Состав элективных питательных сред для анаэробных бактерий.
17. Способы создания оптимальных условий для культивирования микроорганизмов разных физиологических групп.

2.19 Лабораторная работа №22 (2 часа).

Тема: «Идентификация микроорганизмов с выделением в чистые культуры».

2.19.1 Цель работы: Ознакомиться с методами изучения ферментативной активности микроорганизмов.

2.19.2 Задачи работы:

1. Освоить методы изучения ферментативной активности микроорганизмов.
2. Ознакомиться с принципом идентификации чистой культуры микроорганизмов.

2.19.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Среды Гиса, тест на расщепление белков, коммерческие тест-системы для изучения биохимических свойств микроорганизмов, определители Берджи.

2.19.4 Описание (ход) работы:

Изучение ферментативной активности микроорганизмов.

В пределах семейства у представителей разных родов можно обнаружить как общие для семейства, так и специфические для родов наборы ферментов. У микроорганизмов разных видов в пределах одного рода есть общие (родовые) и специфические для отдельных видов ферменты. Таким образом, каждый вид микроорганизмов характеризуется специфическим набором ферментов, поэтому определение ферментного спектра - важнейший этап идентификации микроорганизмов.

О наличии того или иного фермента судят по способности микроорганизмов воздействовать на известный субстрат. Присутствие фермента регистрируют по изменению физического состояния субстрата (разжижение желатины), закислению питательной среды (среды Гисса с углеводами), образованию определенных продуктов метаболизма (индол, сероводород, аммиак) и т.д.

Наиболее распространены следующие методы регистрации ферментативной активности микроорганизмов.

Выявление сахаролитической активности микроорганизмов. В состав дифференциально-диагностических углеводных сред входят различные соединения, которые можно условно назвать сахарами: моносахарины, полисахарины, многоатомные спирты. При утилизации углеводов в качестве конечных продуктов образуются кислоты и газообразные продукты. Соответственно расщепление углевода регистрируют по изменению pH среды и выделению газообразных продуктов. Закисление питательной среды улавливают при помощи различных индикаторов.

Индикатор ВР, входящий в состав сухих сред Гисса, меняет цвет от розового в щелочной среде через серый при нейтральном pH до голубого или ярко-синего в кислой среде.

Индикатор Андрэдэ (кислый фуксин — 0,5 г, 1%-й раствор гидроксида натрия — 16 мл, дистиллированная вода — 84 мл) при закислении дает покраснение среды. В жидких средах Гисса образование газов при утилизации субстрата улавливают при помощи поплавков («газовок») — стеклянных трубочек, запаянных в верхнем конце и помещенных в пробирки. В «газовках» скапливаются газы, вытесняющие жидкую питательную среду; в полужидких средах Гисса газообразные продукты остаются в толще среды в виде пузырьков.

Ферментация углеводов иногда происходит медленно, поэтому предварительный учет результатов проводят через 24...48 ч, а окончательный — через 10...14 сут инкубирования посевов. Тест с метиловым красным показывает степень закисления среды при расщеплении глюкозы. Метилрот как индикатор срабатывает в диапазоне pH 4,4...6,0. Исследуемую культуру выращивают 2...5 сут в жидкой среде Кларка с глюкозой. Затем на 5 мл среды добавляют пять-шесть капель раствора метилрота. Положительный результат — покраснение среды после внесения индикатора (pH 4,0...5,0).

Протеолитическая активность. Протеолитические ферменты расщепляют белки питательной среды до промежуточных (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или конечных (сероводород, индол, аммиак) продуктов.

Протеазы выделяются различными видами бацилл, актиномицетов, мицелиальных грибов и других групп микроорганизмов. Активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатину, казеин и другие белки. Для определения такого протеолитического фермента, как коллагеназа, проводят посев культуры уколом на мясопептонную желатину (МПЖ). Разжижение МПЖ отмечают визуально. По характеру роста и форме области разжижения можно судить об отношении данного микроорганизма к кислороду (рис.11). В случае строгого аэробиоза разжижение пойдет послойно, начинаясь с поверхности. Менее строгие аэробы вызывают разжижение воронкообразное, факультативные анаэробы — мешковидное разжижение, строгие анаэробы вызывают пузыревидный рост в глубине питательной среды.

Для выявления такого протеолитического фермента, как казеиназа используют молочный агар Эйкмана. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колоний или выросших по штриху микроорганизмов.

Липолитическая активность. Для выявления липолитической активности исследуемые микроорганизмы обычно высевают на среды, содержащие твины — эфиры жирных кислот и сорбита и 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Твин-40 содержит пальмитиновую, твин-60- стеариновую, а твин-80 — олеиновую кислоты.

Обнаружение фермента каталазы. Некоторые микроорганизмы - аэрофобы в процессе дыхания образуют перекись водорода, являющуюся клеточным ядом. Количество перекиси водорода в культуре никогда не достигает высоких концентраций, так как по мере образования перекись разлагается на воду и молекулярный кислород при участии фермента каталазы.

Принципы идентификации микроорганизмов. Основная задача бактериологического диагностического исследования — это определение таксономического положения выделенного микроорганизма путем сравнения его свойств со свойствами известных видов.

В рутинной бактериологической практике микроорганизм идентифицируют, изучая его фенотипические признаки (морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические, патогенные). Стали получать распространение некоторые методы идентификации по генотипическим признакам, которые ранее в основном применяли в научной работе для классификации микроорганизмов с неясным таксономическим положением.

В бактериологии для идентификации используют определители микроорганизмов. Наиболее популярный — определитель бактерий Берджи — включает в себя описание свойств известных видов микроорганизмов. Бактерии в этом руководстве по ограниченному числу морфологических и физиологических признаков объединены в большие группы, например группа № 20 «Грамположительные неспорообразующие палочки неправильной формы» или группа № 5 «Факультативно-анаэробные грам-отрицательные палочки». В пределах этих групп при помощи нескольких дифференцирующих признаков бактерии подразделены на семейства, роды и виды. Распределение микроорганизмов в этом определителе не отражает иерархической классификации, а преследует сугубо практическую цель — как можно быстрее и экономичнее установить таксономическое положение изучаемого микроорганизма.

Идентификация неизвестного микроорганизма представляет собой процесс последовательного его отождествления с той или иной большой группой микробов, характеризующихся общими свойствами, затем с семейством в пределах группы, далее с тем или иным родом в пределах установленного семейства, и на конечном этапе исследуемый микроорганизм отождествляют (идентифицируют) по совокупности морфологических, тинкто либо видом в пределах рода. В случае необходимости внутри вида устанавливают принадлежность культуры к био-, серо-, фаговару. Работа с определителем Берджи предполагает использование достаточно большого количества тестов, характеризующих различные свойства микроорганизма. В практических диагностических лабораториях, исходя из эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, обычно проводят бактериологические исследования, заранее ориентированные на обнаружение возбудителя определенной инфекционной болезни, по схеме, предусмотренной официальной инструкцией.

Работа 1.

Задание. Ознакомится с тестами, характеризующими ферментативные свойства бактерий.

Работа 2.

Задание. Идентифицировать микроорганизмы с помощью коммерческой тест-системы STAPHYtest16.

STAPHYtest16 предназначен для рутинной идентификации стафилококков и дифференциации их от других родственных грамположительных кокков.

Для идентификации каталазоотрицательных грамположительных кокков в настоящее время фирма Lachema выпускает отдельные тест-системы: STREPTOtest16 для идентификации стрептококков и EN-COCCUStest для идентификации энтерококков.

Для идентификации грамотрицательных ферментирующих бактерий наряду с ENTEROtest 16 в настоящее время предложены модифицированная тест-система ENTEROtest 24 и 2 новые тест-системы для ускоренной идентификации энтеробактерий (4 часа) ENTERO-Rapid 24 и, в основном для уропатогенных культур, ENTERO-Screen.

Для идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий новая тест-система NEFERMtest 24.

Анаэробные микроорганизмы идентифицируют с помощью ANAEROtest 23.

Студенты получают планшеты для идентификации микроорганизмов, результаты идентификации заносят в таблицу.

Таблица

STAPHYtest16 биохимическая активность, вид	STREPTOtest16 биохимическая активность, вид	ENTEROtest 16 биохимическая активность, вид	NEFERMtest 24. биохимическая активность, вид	ANAEROtest 23 биохимическая активность, вид

Контрольные вопросы: 1. Какое таксономическое значение имеет определение набора ферментов у микроорганизмов? 2. Как определяются сахаролитические свойства с помощью сред Гисса? 3. Способ определения индола? 4. Способ определения сероводорода? 5. Способ определения протеолитической активности микроорганизмов. 6. Способ определения каталазной активности микроорганизмов

2.20 Лабораторная работа №23-24 (4 часа).

Тема: «Идентификация микроорганизмов без выделения в чистые культуры методом ПЦР. Постановка реакции. Учет результатов».

2.20.1 Цель работы: ознакомиться с этапами постановки полимеразной цепной реакции

2.20.2 Задачи работы:

1. изучить этапы ПЦР
2. освоить учет результатов ПЦР

2.20.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Оборудование для постановки ПЦР, наглядные материалы для учета реакции ПЦР.

2.20.4 Описание (ход) работы:

В 1983 г. К.Б. Мюллис и др. опубликовали и запатентовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), за что автору была присуждена Нобелевская премия по химии.

В начале использования метода после каждого цикла нагревания-охлаждения приходилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спиралы ДНК. Процедура проведения реакции была сравнительно неэффективной, требовала много времени и фермента.

В 1986 году метод полимеразной цепной реакции был существенно улучшен. Было предложено использовать ДНК-полимеразы из термофильных бактерий. Эти ферменты оказались термостабильными и были способны выдерживать множество циклов реакции. Их использование позволило упростить и автоматизировать проведение ПЦР. **Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* *Thermus aquaticus*** - палочковидная экстремально термофильная бактерия рода *Thermus*. Обитает в горячих источниках, гейзерах при температурах намного выше 55°. Впервые открыта Томасом Броком и Хадсоном Фризом в районе Больших Фонтанов Йеллоустонского национального парка и названа *Taq*-полимеразой.

Принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) был разработан Кэрри Мюллисом в 1983 году.

За разработку ПЦР-анализа К.Мюллис в 1993 году был удостоен Нобелевской премии в области химии.

Появление ПЦР было обусловлено определенными достижениями в области молекулярной генетики - **расшифровкой нуклеотидной последовательности геномов ряда микроорганизмов.**

ПЦР стала возможной благодаря открытию уникального фермента **taq-ДНК-полимеразы** - Особенность этого фермента заключается в его термостойкости и высокой рабочей температуре – оптимум работы 72 С.

Принцип метода полимеразной цепной реакции

ПЦР – метод амплификации ДНК *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определённую последовательность ДНК в миллиарды раз. Возможность получения огромного количества копий одного строго определённого участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.

В основе метода ПЦР лежит природный процесс – **комплементарное достраивание ДНК матрицы**, осуществляемое с помощью фермента **ДНК-полимеразы**. Эта реакция носит название репликации ДНК.

Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий:

- 1) **Денатурация ДНК** (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК);
- 2) **Образование коротких двухцепочечных участков ДНК** (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК);
- 3) **Синтез новой цепи ДНК** (комплементарное достраивание обеих нитей).

Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (Таq-полимеразы) позволило сделать процесс репликации ДНК циклическим и использовать его для работы *in vitro*.

Создание программируемых термостатов (амплификаторов), которые по заданной программе осуществляют циклическую смену температур, создало предпосылки для широкого внедрения метода ПЦР в практику лабораторной клинической диагностики.

При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов получить достаточное количество ДНК копий для идентификации их методом электрофореза.

Комплементарное достраивание цепи начинается в определенных стартовых блоках – **коротких двунитевых участках**. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК можно направить процесс синтеза новой цепи только в этом участке, а не по всей длине ДНК цепи.

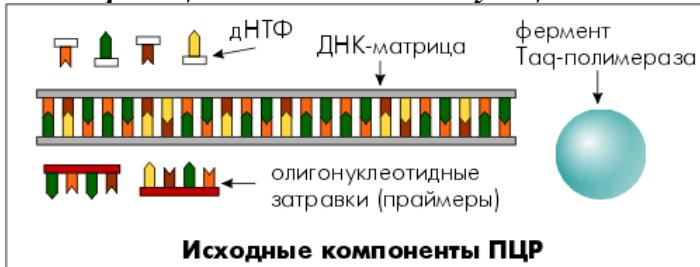
Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки (20 нуклеотидных пар) - **праймеры**. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического

фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.

Для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК амплификация включает несколько (20-40) циклов.

Таким образом, ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.

Для проведения амплификации необходимы следующие компоненты:



- **ДНК-матрица** (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент);

- **Праймеры**, комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента). Выбор специфического фрагмента и подбор праймеров играет важнейшую роль в специфичности проведения амплификации, что сказывается на качестве проведения анализа;

- **Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов** (дНТФ) (смесь четырех дНТФ, являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК);

- **Фермент Таq-полимераза** (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК);

- **Буферный раствор** (реакционная среда, содержащая ионы Mg²⁺, необходимые для поддержания активности фермента).

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах:

1 этап: Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали). Протекает при 93-95 градусах в течение 30-40 сек.

2 этап: Присоединение праймеров (отжиг). Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50-65 градусов. Время отжига -20-60 сек.

3 этап: Достраивание цепей ДНК. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) и проходит при температуре 70-72 градусов. Время протекания синтеза – 20-40 сек.

Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей.

Таким образом, происходит накопление ампликонов в растворе по формуле 2^n , где n -число циклов амплификации. Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двуцепочечная молекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около 10⁸ молекул ампликона. Этого количества достаточно для

достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний

1.Прямое определение наличия возбудителей.

Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.

2.Высокая специфичность.

В исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов.

3.Высокая чувствительность

Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. В течение нескольких часов с помощью ПЦР из одного фрагмента молекулы ДНК можно получить более 50 млрд. идентичных молекул. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10-100 клеток в пробе.

4.Универсальность процедуры выявления различных возбудителей

Метод основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований. Это дает возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы.

5.Высокая скорость получения результата анализа

Для проведения ПЦР-анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции, и автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-4.5 часа.

6.Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.

Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов. Применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

Методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от больного, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т.д.). Простые требования к условиям хранения транспортировки материала от пациента в лабораторию не требуют сохранения возбудителя в живом виде, по сравнению с бактериологическими и вирусологическими методами.

Ограничения метода ПЦР

• перекрестная контаминация от пробы к пробе, приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов;

• контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, т.к. в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации.

ПЦР – исследование включает в себя 3 стадии:

- выделение ДНК из образцов;
- проведение полимеразной цепной реакции;
- регистрация результатов (методом электрофореза в агарозном геле)

Необходимо территориально разделить различные стадии проведения анализа, размещая их в отдельных помещениях:

Пре-ПЦР- помещение - обработка клинических образцов, выделение ДНК, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР. В этих помещениях

запрещается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами, ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории.

Пост-ПЦР-помещение - детекция продуктов амплификации. В этом помещении допускается использовать другие методы детекции инфекций.

Работа 1

Задание: Зарисовать схему постановки и учета полимеразной цепной реакции.

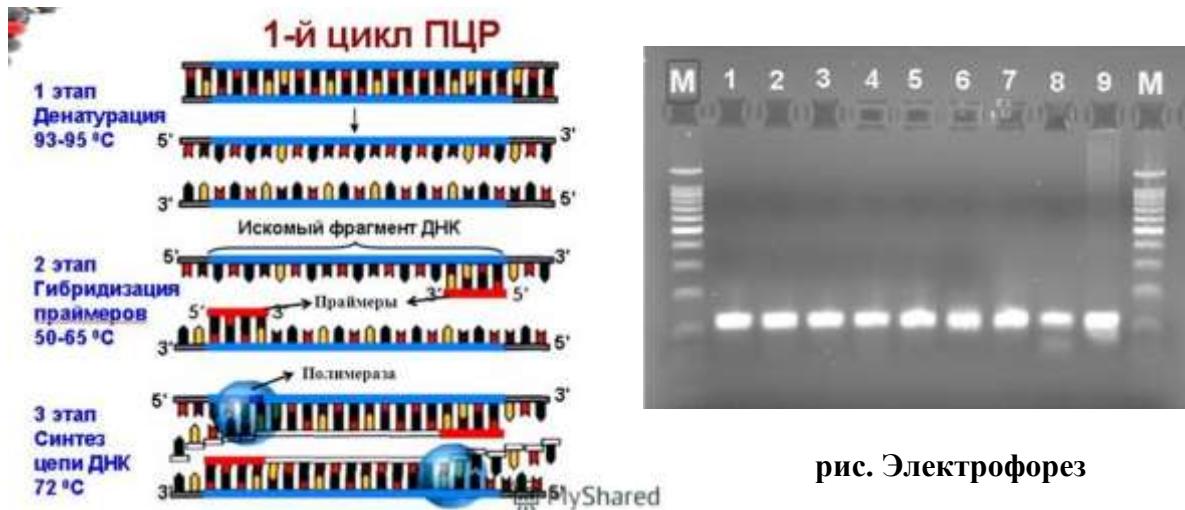


рис. Электрофорез

рис. Схема ПЦР

Контрольные вопросы: 1. История открытия ПЦР. 2. Этапы постановки ПЦР. 3. ингредиенты реакции ПЦР. 4. Учет результатов постановки ПЦР. 5. Преимущества использования ПЦР в микробиологии. 6. Недостатки использования ПЦР в микробиологии.

2.21 Лабораторная работа №25-26 (4 часа).

Тема: «Методы количественного учета микроорганизмов».

2.21.1 Цель работы: Изучить методы количественного учета микроорганизмов

2.21.2 Задачи работы: Ознакомиться с методами учета фиксированных и живых микроорганизмов

2.21.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Стерильные биологические пробирки с ватными пробками, стерильные чашки Петри, стеклянные емкости для приготовления питательных сред, компоненты питательных сред: пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, овсяная мука (или хлопья), сахароза, NaNO_3 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, KCl , FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, агар, дистиллированная вода, технические и аналитические весы, водяная баня, потенциометр, спиртовки.

2.21.4 Описание (ход) работы:

Подсчет клеток микроорганизмов под микроскопом. Подсчитать клетки микроорганизмов под микроскопом можно, используя счетные камеры, капилляры

Перфильева, препараты фиксированных и окрашенных клеток. Основное ограничение большинства указанных методов — необходимость довольно высоких концентраций клеток в единице исследуемого субстрата.

Подсчет клеток в счетных камерах. Этот метод рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов — дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых относительно крупных бактерий. Обычно используют камеру Горяева — Тома.

Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского—Брида). Метод широко используется для определения численности микроорганизмов в различных естественных субстратах — почве, загрязненных водах, молоке, в оптически непрозрачных питательных средах, содержащих нерастворимые в воде компоненты, например, крахмал, соевую муку. Преимущество метода заключается также в том, что фиксированные окрашенные препараты хорошо сохраняются, поэтому подсчет можно проводить в удобное для исследователя время.

Подсчет клеток на мембранных фильтрах. Этот метод рекомендуется использовать для определения численности микроорганизмов в субстратах с низкой плотностью клеток. Его применяют при определении количества микроорганизмов в различных водоемах, при санитарно-бактериологических и некоторых других исследованиях. Фильтрование пробы определенного объема позволяет сконцентрировать на поверхности фильтра содержащиеся в пробе клетки микроорганизмов. Затем их окрашивают и подсчитывают.

При выявлении и количественном учете микроорганизмов широко применяют люминесцентную микроскопию. Препараты микроорганизмов готовят непосредственно из исследуемой суспензии и ее разведений либо концентрируют клетки на специально обработанных не флуоресцирующих фильтрах. Препараты и фильтры с микроорганизмами обрабатывают акридином оранжевым или другими красителями. Принципы подсчета при люминесцентной и светлопольной микроскопии одинаковы, однако окрашенные флуорохромами клетки более четко видны на темном фоне препарата и хорошо отличимы от небиологических объектов.

При характеристике развития микробной популяции, санитарной оценке кормов, продуктов питания, при вычислении показателя вирулентности микроорганизма необходимо устанавливать количество микробных клеток в единице объема того или иного материала.

Косвенные методы определения численности микроорганизмов основаны на измерении величины параметров, значения которых зависят от количества микроорганизмов: биомасса, светорассеяние, подсчет колониеобразующих единиц (метод Кога).

Метод измерения светорассеяния. Количество света, рассеиваемого суспензией бактерий, пропорционально их концентрации. Этот показатель достаточно точно можно измерить при помощи фотоэлектроколориметра. Зависимость между оптической плотностью и концентрацией клеток различна для бактерий разных видов. Поэтому при работе с таким прибором для каждого вида бактерий необходимо строить свою калибровочную кривую зависимости.

На практике широко используют простой субъективный метод, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой бактериальной суспензии с так называемым «стандартом мутности», выпускаемым Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Стандарт представляет собой взвешенные в воде частицы стекла «Пирекс» и состоит из трех запаянных пробирок-эталонов (5, 10 и 20 международных единиц). Мутность стандарта на 10 ед. соответствует следующим концентрациям: для бактерий кишечной группы — $0,93 \cdot 10^9$ кл/мл; коклюшной группы — $11 \cdot 10^9$ кл/мл; для бруцеллезных бактерий — $1,7 \cdot 10^9$ кл/мл; туляремийных микробов — $5 \cdot 10^9$ кл/мл.

Мерной пипеткой вносят 0,1-0,5 мл исследуемой бактериальной супензии в пустую пробирку, соответствующую по диаметру и толщине стенок пробирке «стандarta мутности». К супензии добавляют физиологический раствор до оптической плотности стандарта на 10 ед. Физиологический раствор вносят небольшими мерными порциями, записывая его количество и сравнивая мутность опытной и стандартной пробирок невооруженным глазом на фоне специальной шрифтовой таблицы. Зная, во сколько раз развели исследуемую бактериальную супензию, чтобы уравнять ее оптическую плотность со стандартом, можно рассчитать содержание микробных клеток в 1 мл исходной супензии.

Например, в пробирку поместили 0,1 мл супензии бактерий, содержащей неизвестное количество клеток. Для уравнивания оптической плотности исследуемой супензии со стандартом мутности 10 ед. в пробирку добавили 0,9 мл физиологического раствора, т. е. исходную супензию развели в 10 раз. Известно, что супензия данного вида бактерий при оптической плотности 10 ед. содержит $1,3 \cdot 10^9$ кл/мл. Следовательно, концентрация исследуемой супензии составляет $1,3 \cdot 10^{10}$ кл/мл.

При работе с бактериями, для которых нет данных о содержании микробных клеток в 1 мл относительно «стандarta мутности», необходимо предварительно методом прямого счета определить их количество в супензии, например, оптической плотностью 10 ед.

Определение количества живых микроорганизмов. Метод основан на принципе Коха, что бактериальная колония — это результат деления единичной клетки на плотной питательной среде (исключение составляют бактерии, образующие цепочки из клеток). Метод включает три этапа: приготовление разведения, посев на плотные питательные среды определённого объёма бактериальной взвеси, учёт количества колоний, выросших после инкубации на плотной питательной среде.

Определение биомассы взвешиванием. Этот метод широко применяют для оценки роста микроорганизмов в жидких питательных средах. Можно использовать его и для определения массы клеток, выращенных на плотной питательной среде, однако в этом случае микроорганизмы необходимо предварительно тщательно смыть с поверхности среды физиологическим раствором или водой и перевести в супензию. Метод не может быть использован при культивировании микроорганизмов на средах, в состав которых входят соединения, не растворимые в воде.

Определение биомассы состоит из трех последовательных операций: доведения массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения, отделения клеток микроорганизмов от культуральной жидкости, определения их массы. Чаще всего определяют массу сухих клеток, хотя иногда можно ограничиться определением сырой биомассы. Биомассу обычно выражают в граммах или миллиграммах на литр культуральной жидкости.

Доведение массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения. Фильтры помещают в сушильный шкаф и высушивают в течение 1—2 ч при температуре 80—85° и 90—100°. Затем фильтры вынимают и переносят в эксикатор с безводным хлористым кальцием (CaСl) или концентрированной серной кислотой. Эксикатор ставят около аналитических весов, на которых будет проводиться взвешивание. Через час фильтры взвешивают с точностью до 0,0001 г. Высушивание и взвешивание повторяют, соблюдая указанную последовательность операций, пока масса не достигнет постоянного значения.

Мицелий актиномицетов и грибов отделяют фильтрованием. Бумажный фильтр помещают в стеклянную воронку и фильтруют через него точно измеренный объем культуры, от 5 до 10 мл. Осадок на фильтре многократно промывают подкисленной дистиллированной водой.

Для отделения бактерий используют мембранные фильтры. Размеры пор мембранных фильтра должны быть меньше величины клеток, биомассу которых

определяют. Мембранный фильтр помещают на пористую пластинку специального держателя, вставленного в колбу. Чтобы ускорить фильтрование, колбу подключают к водоструйному насосу. Осадок несколько раз промывают подкисленной дистиллированной водой. Подробно порядок работы с мембранными фильтрами.

Определение биомассы. Чтобы определить массу сухих клеток, центрифужную пробирку или фильтр с осадком клеток микроорганизмов помещают в сушильный шкаф, высушивают и взвешивают. Режим высушивания и взвешивания тот же, который использовали и при определении массы пробирок или фильтров. Сухую биомассу определяют по формуле:

$$M = (A - B) * 1000 / V,$$

где M — сухая биомасса в г/л; A — масса центрифужной пробирки (фильтра) с осадком в г; B — масса центрифужной пробирки (фильтра) без осадка в г; V — объем культуральной жидкости, взятый для центрифугирования (фильтрования) в мл. Точность метода определяется полнотой отмывания клеток от компонентов среды и тщательностью взвешивания.

Работа

Задание. Определить количество микроорганизмов в бактериальной суспензии методом Коха.

Мерной пипеткой объемом 1 мл добавляют 1 мл культуры *E. coli* в бактериологическую пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора, подогретого до 37...38 °C (разведение 10-1). Далее аналогичным способом готовят разведения культуры от 10⁻² до 10⁻⁸. Для каждого разведения используют новую пипетку того же объема и класса. Из пяти последних пробирок суспензию бактерий по 0,1 мл наносят на поверхность подсущенного МПА в две чашки Петри. Внесенный материал стерильным шпателем распределяют по поверхности питательной среды. Посевы инкубируют при 37...38 °C 24 ч.

Учет результатов: в чашках Петри, где выросло более 150...300 и менее 10 колоний, результаты не учитывают. Выбирают чашки Петри с параллельными посевами (из одного разведения), содержащими 10... 150 колоний. Подсчитывают колонии на чашках из одного разведения, суммируют, определяют среднее число колоний и с учетом степени разведения рассчитывают содержание жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц) в 1 мл исходной суспензии бактерий.

Контрольные вопросы: 1. Определение количества жизнеспособных микроорганизмов методом Коха. 2. Определение количества микроорганизмов с помощью стандарта мутности. 3. Использование показателя светорассеивания для определения численности микроорганизмов.

2.22 Лабораторная работа №27-28 (4 часа).

Тема: «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

2.22.1 Цель работы: Изучить классификации антибиотиков.

2.22.2 Задачи работы:

1. Изучить классификации антибиотиков.
2. Рассмотреть осложнения, развивающиеся при антибиотикотерапии.
3. Освоить способ определения антибиотикочувствительности микроорганизмов.

2.22.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бумажные диски, пропитанные антибиотиками, супензия клеток микроорганизмов; пробирки с 20 мл стерильной агарилизованной среды; стерильные чашки Петри; термостат; линейки.

2.22.4 Описание (ход) работы:

Антибиотики - химические вещества биологического происхождения (природные), а также их полусинтетические производные и синтетические аналоги, которые избирательно тормозят рост и размножение или губительно действуют на микроорганизмы и опухоли.

Антибиотики классифицируют по способу получения, по происхождению, по химической структуре, по механизму антимикробного действия.

По способу получения выделяют:

- биосинтетические антибиотики (природные). В условиях специальных производств культивируют микроорганизмы-продуценты, которые выделяют антибиотики в процессе жизнедеятельности.

- полусинтетические антибиотики. Получают путем биосинтеза с последующей химической модификацией (например присоединение радикалов). В результате улучшаются антимикробные и фармакологические свойства препарата.

- синтетические антибиотики (аналоги природных). Имеют структуру природных, но синтезированы химически.

По происхождению выделяют:

растительные (фитонциды), животной природы, микробные (синтезируемые грибами, актиномицетами (80% антибиотиков), бактериями). Первые две группы природных антибиотиков не получили широкого применения в медицине.

Антибиотики оказывают на микробные клетки воздействия, результатом которых может явиться бактерицидный, бактериостатический, бактериолитический, либо антибиотикозависимый эффект.

По механизму действия среди антибиотиков выделяют:

1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки (муреина):

- Бета-лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбопенемы).

Блокируют образование гетерополимерных цепей на внешней поверхности ЦПМ за счет ингибирования пенициллин-связывающих белков (белков-ферментов - транспептидаз), участвующих в образовании поперечных шивок. Ингибирование ПСБ приводит к накоплению в бактериальной клетке предшественников ПГ и запуску системы аутолиза. В результате действия аутолитических ферментов и увеличения осмотического давления цитоплазмы происходит бактериолизис.

- Гликопептиды (ванкомицин, клиндамицин).

Блокируют объединение предшественников пептидогликана в гликопептидные цепи, связывая D-аланин. Поскольку пептидогликана нет в стенках животных клеток, то эти антибиотики обладают очень низкой токсичностью для макроорганизма, и их можно применять в высоких дозах (мегатерапия);

- Липопептиды формируют каналы в КС при необратимом соединении гидрофобной части молекулы липопептида с клеточной мембраной грамположительных бактерий. В результате происходит деполяризация клеточной мембранны из-за выхода калия, что приводит к гибели бактериальной клетки.

2. Вызывающие повреждение цитоплазматической мембранны

Полиеновые антибиотики обладают ярко выраженной противогрибковой активностью, изменяя проницаемость клеточной мембранны путем взаимодействия

(блокирования) со стероидными компонентами, входящими в ее состав именно у грибов, а не бактерий;

Полипептидные антибиотики лизируют фосфолипидные компоненты ЦПМ. Только местное применение.

3. Подавляющие белковый синтез

— нарушение синтеза белка может происходить на всех уровнях, начиная с процесса считывания информации с ДНК и кончая взаимодействием с рибосомами — (аминогликозиды), с 50S субъединицами рибосом (макролиды) или с информационной и РНК (на 30S субъединице рибосом — тетрациклины).

4. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот — эти антибиотики обладают не только антимикробной, но и цитостатической активностью, и поэтому используются как противоопухолевые средства. Один из антибиотиков относящихся к этой группе — рифампицин, ингибитор ДНК-зависимую РНК-полимеразу, и тем самым блокирует синтез белка на уровне транскрипции (блокирует синтез мРНК).

Осложнения при химиотерапии

Все основные осложнения при химиотерапии можно разделить на 2 группы:

- *осложнения терапии со стороны микроорганизма;*
- *осложнения со стороны макроорганизма:*

— *аллергические реакции* Наличие аллергической реакции на один из препаратов той или иной группы, является абсолютным противопоказанием для использования и других препаратов этой группы, так как возможна перекрестная гиперчувствительность;

— *прямое токсическое (органотоксическое) действие химиопрепаратов* — так, противоопухолевые антибиотики обладают гемато-, гепато- и кардиотоксичностью, а все аминогликозиды — ототоксичностью и нефротоксичностью.

— *побочное токсическое (органотропные) эффекты* — эти осложнения связаны не с прямым, а опосредованным действием химиопрепаратов на различные системы макроорганизма. Хлорамфеникол (левомицетин) может подавлять синтез белков не только в микробной клетке, но и в клетках костного мозга, вызывая у части больных развитие стойкой лейкопении

— оценивая влияние антибиотиков на *функциональную активность иммунной системы*, следует помнить, что все антимикробные агенты снижают напряженность иммунитета. Однако, ряд бета-лактамных антибиотиков, например, цефалоспорин 4-го поколения — цефпиром, а также макролиды, фторхинолоны усиливают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, а цефтазидим при системном применении и биопарокс — при местном — обладают истинной иммуностимулирующей активностью.

— *реакции обострения* — применение бактерицидных антибиотиков в первые дни заболевания при общем тяжелом состоянии больного нередко приводит к резкому ухудшению его состояния. Вплоть до развития *инфекционно-токсического шока*. В основе этого явления лежит массовая гибель возбудителей, сопровождающаяся освобождением большого количества эндотоксина и других токсических продуктов распада бактериальных клеток. Такие выраженные реакции обострения чаще развиваются у детей, так как процессы детоксикации у них развиты слабее, чем у взрослых;

— *развитие дисбактериоза* — нарушения качественного и количественного состава нормальной микрофлоры — также одно из частых осложнений химиотерапии. Оно чаще возникает на фоне использования антибиотиков широкого спектра действия. Одним из наиболее тяжелых клинических проявлений дисбиоза является кандидоз полости рта, гениталий или кишечника.

1. Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов

Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов проявляется развитием лекарственной устойчивости.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам удобно определять с помощью

выпускаемых промышленностью бумажных дисков, пропитанных определёнными антибиотиками. Метод основан на способности антибиотических веществ диффундировать в агаровых средах и образовывать зоны, в которых не развиваются чувствительные к этим антибиотикам микроорганизмы.

По чувствительности к антибиотикам микроорганизмы можно разделить на следующие группы в соответствии с величиной диаметра зоны задержки роста:

- высокочувствительные (более 25 мм);
- чувствительные (15-20 мм);
- малоочувствительные (10-14 мм);
- устойчивые (менее 10 мм).

Работа

Задание.

1. Приготовить однородную суспензию клеток в стерильной водопроводной воде (в 1 мл суспензии должно содержаться около 2 млрд клеток, что определяют по стандарту мутности).

2. 1 мл суспензии внести в пробирку с 20 мл стерильной расплавленной и остуженной до 50⁰С агаризованной средой.

3. Содержимое пробирки перемешать и вылить в стерильную чашку Петри.

4. После застывания среды, поместить на неё бумажные диски на равном расстоянии друг от друга и на 1,5-2 см от края чашки.

5. Чашки выдержать при комнатной температуре для лучшей диффузии антибиотиков в толщу агаризованной среды, а затем 24 ч при 28-30⁰С.

6. Отметить наличие зон отсутствия роста и измерить их. Результаты занести в таблицу. Сделать выводы.

Таблица

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам

№	Название антибиотика	Диаметр зоны задержки роста, мм	Степень чувствительности к антибиотику
1			
2			
3			
4			
5			

Контрольные вопросы: 1. Что такое антибиотики? 2. Существующие принципы классификации антибиотиков 3. Осложнения, возникающие при химиотерапии. 4. Как используются антибиотики в ветеринарии? 5. Какими методами определяют чувствительность микроорганизмов к антибиотикам?

2.24 Лабораторная работа №29 (2 часа).

Тема: «Межмикробные взаимодействия».

2.24.1 Цель работы: Изучить межмикробные взаимодействия микроорганизмов

2.24.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с симбиотическими и антибиотическими взаимодействиями микроорганизмов.

2. Овладеть методами определения антагонистической активности бактерий.

2.24.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: культуры микроорганизмов, чашки с питательной средой, пробирки, бактериологические петли, спиртовки, термостат, физиологический раствор.

2.24.4 Описание (ход) работы:

В основном эти взаимоотношения можно условно подразделить на две большие группы: благоприятные — синергизм и неблагоприятные — антагонизм.

Можно отметить следующие формы взаимоотношений между микроорганизмами: сосуществование, метабиоз, симбиоз, конкуренция, хищничество, паразитизм, антагонизм.

Симбиоз характеризуется взаимовыгодным влиянием микроорганизмов друг на друга в единой ассоциации (совокупности).

Конкуренция наблюдается тогда, когда совместно развивающиеся организмы нуждаются в одних и тех же питательных веществах и условиях развития.

Хищничество заключается в поглощении клеток одних микроорганизмов другими для использования их в качестве питания.

Паразитизм характеризуется тем, что один вид микроорганизма (паразит) поселяется в клетке другого (хозяина) и питается за счет хозяина.

Абсолютные (облигатные) Паразиты не могут развиваться в отсутствие хозяина. Известны паразитические формы бактерий и плесневых грибов, развивающиеся в клетках или в гифах хозяев. Примером паразитизма в известной мере может также служить явление бактерио- и актинофаги.

Антагонизм — подавление развития одних форм микробов другими с помощью вырабатываемых ими антимикробных веществ. Этими веществами могут быть: химические соединения неспецифического действия (кислоты, спирты, перекиси и др.), которые подавляют рост микробов при высоких концентрациях; антибиотики, обладающие специфичностью действия и проявляющие антимикробные свойства при низких концентрациях.

Микробиоценоз - (микробное сообщество, ассоциация) - совокупность популяций разных видов микроорганизмов, обитающих в определенном биотопе (напр., в полости рта, в водоеме). В биотопах окружающей среды, а также у здоровых людей и животных М., как правило, состоит из большого числа видов. напр., в полости рта человека обитает более 300 популяций, относящихся к облигатным и факультативным, аутохтонным и аллохтонным, а также заносным видам. Во внутренней среде организма М., как правило, менее разнообразны и менее многочисленны. Количественный и качественный состав М. зависит от условий обитания, миграционного потока с соседних биотопов, изменчивости микробов, а также от типа и выраженности внутривидовых взаимоотношений. В старых, давно сложившихся биотопах количественный и качественный состав М. относительно специфичен, стационарен и обладает выраженной способностью к аутостабилизации. В молодых биотопах, напр., Ожеговых ранах, а также в старых биотопах в случаях изменения условий обитания, напр., при развитии патологического процесса или при длительном воздействии антимикробных факторов, резко обостряются конкурентные взаимоотношения между сочленами М. и организмом хозяина. М. может утратить свою специфичность, стационарность и способность к аутостабилизации, что приводит к развитию *дисбактериоза*.

Антибиоз (от др.-греч. ἀντί- — против, βίος — жизнь) — антагонистические отношения видов, когда один организм ограничивает возможности другого, невозможность сосуществования организма, например из-за интоксикации некоторыми организмами (антибиотиками, фитонцидами) среды обитания других организмов. Случай, когда негативное воздействие направлено лишь в одну сторону называется аменсализмом, обоюдное^[1] негативное влияние организмов описывается термином конкуренция. Термин

введён микробиологом Зельманом Ваксмэном в 1942 году.^[2] Пример — отношения молочнокислых и гнилостных бактерий.

Биологически активные вещества (БАВ) — химические вещества, необходимые для поддержания жизнедеятельности живых организмов, обладающие высокой физиологической активностью при небольших концентрациях по отношению к определенным группам живых организмов или их клеткам, злокачественным опухолям, избирательно задерживающие или ускоряющие их рост или полностью подавляющие их развитие

Работа

Задание: Определить антагонистическую активность штаммов *E. faecium* в отношении условно-патогенных микроорганизмов чашечным методом. Провести учет, оформить протокол.

Метод отсроченного антагонизма применяется главным образом для исследования антагонистической активности бактерий, продуцирующих бактериоцины. Испытуемые клетки засевают макролониями (« пятнами ») 0,3 – 0,5 см в диаметре на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри. На одной чашке можно проверить до 10 штаммов. Выросшие в результате инкубирования в течение 48 часов в оптимальных условиях бактерии стерилизуют в парах хлороформа (30 мин) и заливают тонким слоем агаризованной 0,7 % среды, в которую предварительно вносят 0,1 мл тест-культуры. Результаты учитывают через 24 часа инкубирования при температуре, оптимальной для роста индикаторных бактерий. Степень антагонистической активности характеризуется размером зон задержки роста тест-культуры вокруг макролонии антагониста.

Контрольные вопросы: 1. Характеристика основных типов симбиотических взаимоотношений микроорганизмов. 2. Характеристика основных типов антагонистических взаимоотношений микроорганизмов.

2.23 Лабораторная работа №30 (2 часа).

Тема: «Коллоквиум».

2.23.1 Цель работы: Оценить знания студентов по пройденному материалу

2.23.2 Задачи работы: проверить навыки студентов, полученные ранее

2.23.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: Культуры микроорганизмов, чашки Петри с плотной питательной средой, бактериологические петли, шпатели, физиологический раствор, диски, пропитанные антибиотиками, линейки, биохимические тесты.

2.23.4 Описание (ход) работы:

Контрольные вопросы

1. Характеристика и классификация антибиотиков.
2. Осложнения, возникающие при химеотерапии. Использование антибиотиков в ветеринарии.
3. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
4. Методы определение количества жизнеспособных микроорганизмов.
5. История открытия ПЦР. Этапы постановки ПЦР. Учет результатов постановки ПЦР.
6. Преимущества и недостатки использования ПЦР в микробиологии.

7. Таксономическое значение набора ферментов у микроорганизмов?
2. Способы определения сахаролитических свойств микроорганизмов.
3. Способ определения индола?
4. Способ определения сероводорода?
5. Способ определения протеолитической активности микроорганизмов.
6. Способ определения каталазной активности микроорганизмов

2.25 Лабораторная работа №31-32 (4 часа).

Тема: «Факторы вирулентности патогенных микроорганизмов».

2.25.1 Цель работы: Изучить факторы вирулентности патогенных микроорганизмов

2.25.2 Задачи работы:

1. Освоить способы определения факторов вирулентности микроорганизмов

2.25.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Культуры микроорганизмов, пробирки, физиологический раствор, чашки Петри с ЖСА, бактериологические петли, спиртовки, термостат, плазма.

2.25.4 Описание (ход) работы:

Вирулентность — биологическое свойство микробы, характеризующее степень его патогенности в момент исследования. В отличие от патогенности вирулентность является не видовым, а индивидуальным признаком микробы, который может усиливаться или ослабляться вплоть до полного исчезновения под влиянием различных факторов внешней среды.

Посев культуры на кровяной агар для определения продукции гемолизинов.

Определение ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий:

- плазмокоагулаза определяется в реакции плазмокоагуляции с цитратной кроличьей плазмой;
- гиалуронидаза определяется по способности культуры гидролизовать гиалуроновую кислоту;
- лецитиназу определяют на среде ЖСА (желточно-солевой агар) по наличию венчика вокруг колонии;
- ДНК-азу определяют на питательной среде, в которую добавляют раствор ДНК, по просветлению среды вокруг колонии после нанесения на поверхность среды НСl.

Работа 1

Задание: Определить плазмокоагулазную активность микрорганизмов.

Для реакции применяют плазму в разведении 1:5 в количестве 0,5 мл (на 1 мл плазмы добавляют 4 мл стерильного физиологического раствора).

Разведенную плазму разливают в стерильные пробирки (без пробок) по 0,5 мл и в каждую вносят по одной петле 18-20 часовой агаровой культуры стафилококка (или к 0,5 мл плазмы добавляют 0,5 мл 18 часовой бульонной культуры стафилококка).

Контроль реакции ставится в заведомо коагулазоположительной и коагулазоотрицательной культурой. Кроме того, для исключения самопроизвольного свертывания плазмы необходимо также ставить контроль незасеянной плазмы. Пробирки помещают в термостат при 37 град.С и проверяют наличие свертывания плазмы через 3 часа, затем пробирки вынимают, оставляют при комнатной температуре на 18-20 часов. Окончательный учет реакции проводится на следующий день.



Работа 2

Задание: Определить лецитовителлазную активность микрорганизмов

На чашку с ЖСА посеять испытуемую культуру штрихом или бляшкой. Чашки инкубируют в термостате при 37 град.С в течение 18-25 часов. При положительном результате вокруг колоний стафилококка образуется радужный венчик, что обусловлено выделением фермента лецитовителлазы и разложением лецитина, находящегося в среде. Реакцию следует учитывать в отраженном свете. Лецитовителлазной активностью обладает 60-75% штаммов золотистого стафилококка человеческого происхождения и 5-10% штаммов стафилококка животного происхождения.



Контрольные вопросы: 1. Характеристика основных факторов вирулентности условно-патогенных микроорганизмов. 2. Способ определения плазмокоагулазной активности микроорганизмов. 3. Способ определения лецитовителлазной активности микроорганизмов.

2.26 Лабораторная работа №33 (2 часа).

Тема: «Хранение микроорганизмов».

2.26.1 Цель работы: Изучить способы хранения микроорганизмов

2.26.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с задачами хранения микрорганизмов
2. Ознакомиться со способами хранения микрорганизмов

2.26.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ампулы с лиофильно высушенными микроорганизмами, культуры микроорганизмов, пробирки с микроорганизмами под минеральным маслом.

2.26.4 Описание (ход) работы:

Основные задачи хранения культур: поддержание их жизнеспособности, сохранение стабильности таксономически важных признаков, а также любых других определенных свойств, представляющих интерес для науки и практики.

В коллекциях жизнеспособность микроорганизмов поддерживается преимущественно следующими методами: 1) периодическими пересевами (субкультивирование); 2) под минеральным маслом; 3) высушиванием; 4) лиофилизацией; 5) в условиях низких и ультразвуковых температур.

Субкультивирование – традиционный метод хранения культур (чаще всего аспорогенных) и заключается он в пересевах культур на свежие питательные среды один-два раза в месяц. Между пересевами микроорганизмы хранят в темноте при температурах 5 – 20 °С. При использовании этого метода хранения культуры должны быть **соблюдены три условия:** 1) подходящая поддерживающая среда; 2) идеальная температура хранения; 3) необходимая частота пересевов.

Преимуществом метода является простота и удобный визуальный контроль за чистотой культуры или ее морфологической изменчивостью, а к **недостаткам** следует отнести возможность заражения, краткосрочность хранения, трудоемкость работы и большой расход реактивов.

Хранение под минеральным маслом заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной агаризованной питательной среде и заливают стерильным вазелиновым маслом. Слой масла (0,5 – 1,0 см) замедляет скорость обменных процессов микроорганизмов и предохраняет поверхность среды от высыхания. Покрытые маслом культуры хранят в холодильнике. Большинство сапрофитных бактерий сохраняют жизнеспособность в течение 8 – 14 лет, дрожжи и мицелиальные грибы пересевают через 2 – 3 года.

Хранение под маслом имеет **следующие преимущества:** относительно длительное сохранение стабильности свойств микроорганизмов, сокращение затрат на пересевы, возможность использования в любой микробиологической лаборатории. **Недостаток метода** – слабая разработанность протоколов для многих групп бактерий.

Высушивание – простейший метод хранения микроорганизмов, в процессе которого происходит обезвоживание микробных клеток. В высушенных (до остаточной влажности 10 – 12 %) клетках биохимические реакции приостанавливаются или протекают очень медленно. Процесс высушивания лучше всего переносят спорообразующие виды. Широко применяют воздушное высушивание микроорганизмов на различных адсорбентах: в стерильной почве, песке, глине, фильтровальной бумаге, стеклянных бусах, крахмале и т. д. Адсорбенты защищают микроорганизмы от сильного высыхания, связывают свободную воду и поддерживают определенный уровень влажности. Разновидностью метода является *L*-высушивание: микроорганизмы в суспензионной среде высушивают под вакуумом в стеклянных ампулах, погруженных в водяную баню с контролируемой температурой.

Преимущества метода. Высушенные культуры микроорганизмов легко хранить и транспортировать, они широко используются для хранения хлебопекарных и кормовых дрожжей, бактериальных удобрений (нитрагин, азотобактерин), энтомопатогенных препаратов.

Лиофилизация заключается в удалении воды из замороженных суспензий под вакуумом, т. е. при этом вода испаряется, минуя жидкую фазу. Выживаемость лиофилизованных клеток зависит от специфических особенностей вида и штамма, стадии роста и концентрации клеток, состава защитных сред, режима лиофилизации, условий реактивации. После лиофилизации для выведения клеток из состояния анабиоза создают условия, снижающие осмотический шок и стресс, возникающий при вскрытии ампул. Лучше всего восстановление свойств происходит на богатых натуральных средах.

Преимущества метода. Этот метод считается одним из самых экономичных и эффективных методов длительного хранения микроорганизмов. При его использовании

многие разнородные группы бактерий и бактериофагов сохраняются в жизнеспособном состоянии 30 и более лет. **Недостаток метода** – сложная и недостаточно разработанная технология способа хранения, требуется специальное оборудование.

Хранение микроорганизмов при низких и ультранизких температурах используется в тех случаях, когда культуры не выдерживают лиофилизации (некоторые автотрофные бактерии, спирохеты, микоплазмы, водные фикомицеты, различные вирусы). Микроорганизмы замораживают либо в рефрижераторах (от -12°C до -80°C) либо используют рефрижераторы с азотом: газово-фазовый (-150°C) или жидк.-фазовый (-196°C). Считается, что грамположительные бактерии более устойчивы к замораживанию, чем грамотрицательные. Чтобы оживить замороженные культуры, их быстро оттаивают при 37°C .

Преимущества криогенного сохранения микроорганизмов: малая вероятность заражения культуры, сохранение в стабильном состоянии свойств микроорганизмов, небольшие временные и материальные затраты, возможность использования замороженных культур в качестве прямого инокулята. Недостаток метода – сложная и недостаточно разработанная технология способа хранения, требуется специальное оборудование.

Работа

Задание: Приготовить пробирки с высокими столбиками агара, произвести посев уколом, инкубировать. Залить стерильным вазелиновым маслом.



Контрольные вопросы: 1. Задачи хранения микроорганизмов. 2. Хранение микроорганизмов под минеральным маслом. 3. Лиофильная сушка микроорганизмов.

2.27 Лабораторная работа №34 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие».

2.23.1 Цель работы: Проверить знания студентов, полученные за весь период обучения

2.23.2 Задачи работы: Проверить навыки студентов, полученные за весь период обучения.

2.23.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: культуры микроорганизмов, чашки Петри, питательные среды, пробирки, антибиотики, спиртовки, бактериологические петли, микроскопы, физиологический раствор, предметные стекла, красители, иммерсионное масло.

2.23.4 Описание (ход) работы:

Контрольные вопросы:

1. Устройство светового микроскопа. Виды световой микроскопии
2. Электронная микроскопия.
3. Позитивная и негативная окраска микроорганизмов
4. Правила приготовления микропрепараторов.
5. Строение и химический состав клеточной стенки бактерий. Основные отличия грамположительных и грамотрицательных бактерий. Сущность метода окраски по Граму.
6. Капсулы: их строение и биологическое значение. Методы выявления капсул бактерий.
7. Внутрицитоплазматические включения и их назначение. Запасные вещества микроорганизмов и способы их выявления.
8. Классификация питательных сред. Способы стерилизации питательных сред.
9. Устройство и принцип работы автоклава.
10. Дробная стерилизация. Пастеризация. Стерилизация фильтрованием. Стерилизация стеклянной посуды, стерилизация инструментов и приборов.
11. Характеристика микробного превращения соединений серы, железа, азота и фосфора.
12. Охарактеризуйте возбудителей микробного брожения (масляно-кислого, спиртового, гомоферментативного и гетероферментативного молочно-кислого).
13. Ферменты: характеристика, классификация. Способы обнаружения внеклеточных ферментов у микроорганизмов.
14. Характер роста бактерий и дрожжей в жидкой и на плотной питательной среде. Культуральные свойства микроорганизмов: форма, профиль, структура, край, поверхность, консистенция колоний.
15. Этапы выделения чистой культуры микроорганизмов. Методы выделения чистых культур, основанные на механическом разобщении и биологических свойствах микроорганизмов.
16. Методы создания анаэробных условий для культивирования бактерий. Состав элективных питательных сред для анаэробных бактерий.
17. Характеристика и классификация антибиотиков. Осложнения, возникающие при химеотерапии. Использование антибиотиков в ветеринарии. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
18. Методы определение количества жизнеспособных микроорганизмов.
19. История открытия ПЦР. Этапы постановки ПЦР. Учет результатов постановки ПЦР. Преимущества и недостатки использования ПЦР в микробиологии.
20. Таксономическое значение набора ферментов у микроорганизмов?
21. Способы определения сахаролитических свойств микроорганизмов.
22. Способ определения индола, сероводорода. Способ определения протеолитической и каталазной активности микроорганизмов.
23. Характеристика основных типов симбиотических и антагонистических взаимоотношений микроорганизмов.
24. Способ определения факторов вирулентности микроорганизмов.
25. Задачи хранения микроорганизмов. Хранение микроорганизмов под минеральным маслом. Лиофильная сушка микроорганизмов.