

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.06.02 Физиология роста микроорганизмов

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 «Введение в физиологию роста микроорганизмов.	
Общие понятия о метаболизме микробной клетки».....	3
1.2 Лекция № 2 «Типы питания микроорганизмов, пути поступления	
питательных веществ в микробную клетку».....	5
1.3 Лекция № 3 «Дыхание микроорганизмов».....	8
1.4 Лекция №4 «Клеточный рост и размножение бактериальных клеток».....	11
1.5 Лекция № 5 «Периодическое и непрерывное культивирование».....	14
1.6 Лекция №6 «Действие физических факторов на рост микроорганизмы».....	16
1.7-8 Лекция №7-8 «Действие химических факторов на рост микроорганизмов».....	20
1.9 Лекция №9 «Действие биологических факторов на рост микроорганизмов».....	23
1.10 Лекция №10 «Адаптация микроорганизмов к экстремальным средам и	
условиям».....	31
2. Методические материалы по проведению практических	
занятий	35
2.1 Практическое занятие № ПЗ-1 «Водное занятие по дисциплине.	
Инструктаж по технике безопасности».....	35
2.2 Практическое занятие № ПЗ-2 «Методы стерилизации».....	36
2.3 Практическое занятие № ПЗ-3 «Характеристика питательных сред,	
используемых в лаборатории».....	38
2.4 Практическое занятие № ПЗ-4 «Приготовление и стерилизация питательных	
сред».....	41
2.5 Практическое занятие № ПЗ-5 «Посев и культивирование аэробов и	
анаэробов».....	42
2.6 Практическое занятие № ПЗ-6 «Определение концентрации микробных	
клеток с помощью стандартного образца мутности».....	44
2.7 Практическое занятие № ПЗ-7 «Определение концентрации микробных	
клеток с помощью камеры Горяева».....	46
2.8 Практическое занятие № ПЗ-8 «Определение концентрации микробных	
клеток нефелометрическим способом».....	47
2.9 Практическое занятие № ПЗ-9 «Подсчёт количества микробных клеток	
на мембранных фильтрах».....	48
2.10 Практическое занятие № ПЗ-10 «Подсчёт колониеобразующих единиц	
(КОЕ)».....	49
2.11 Практическое занятие № ПЗ-11 «Синхронизация роста культур».....	50
2.12 Практическое занятие № ПЗ-12 «Математическое моделирование	
при изучении роста микроорганизмов».....	51
2.13 Практическое занятие № ПЗ-13 «Хранение микробных культур».....	54
2.14 Практическое занятие № ПЗ-14 «Влияние физических факторов	
на рост микроорганизмов».....	55
2.15-16 Практическое занятие № ПЗ-15-16 «Влияние химических факторов	
на рост микроорганизмов».....	57
2.17 Практическое занятие № ПЗ-17 «Влияние биологических факторов	
на микроорганизмы».....	58
2.18-19 Практическое занятие № ПЗ-18-19 «Адаптация микроорганизмов к	
экстремальным средам и условиям воздействие факторов	
окружающей среды».....	60

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Введение в физиологию роста микроорганизмов. Общие понятия о метаболизме микробной клетки»

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Химический состав микробной клетки
2. Метаболизм микроорганизмов. Типы питания и дыхания
3. Рост и размножение микроорганизмов

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1.4.3 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1. Химический состав прокариотической клетки.
Микробные ферменты

Вода составляет основную часть микробной клетки, на ее долю приходится в среднем 75-85 %. Часть воды находится в связанном, а часть в свободном состоянии. На долю сухого вещества приходится в среднем 15-25 %, в нем содержатся органические и минеральные элементы. На долю углерода приходится 45-55 %, на долю кислорода – 30-40 %, на долю азота – 8-10 %, водорода – 6-8 %, фосфора – 3 %, серы, калия, натрия по 1 %, кальция, магния, хлора – по 0,5 %, железа – 0,2 %, на все остальные элементы – менее 0,3 %.

Белки среди органических соединений занимают первое место, в клетке патогенных микробов на их долю приходится более 50 % от сухого вещества. Белки встречаются в форме протеинов и протеидов. Белки принимают активное участие в размножении, передаче наследственной информации, являются основным структурным материалом, осуществляют двигательную, каталитическую, транспортную, гормональную, защитную и др. К белкам относятся ферменты. Микробные клетки синтезируют различные ферменты, относящиеся ко всем 6 классам. Ферментативный состав определяется геномом клетки и является стабильным признаком, поэтому используется в лабораторной практике при идентификации микроорганизма. Ряд ферментов способствует проявлению патогенных свойств микроорганизмов. Одни ферменты локализованы в цитоплазме, другие – в ЦПМ, третьи – в периплазматическом пространстве, четвертые – выделяются в окружающую среду. На этом основано деление ферментов на экзо – и эндоферменты. Экзоферменты расщепляют макромолекулы до более простых молекул, которые поступают в клетку. Эндоферменты обеспечивают протекание метаболических реакций внутри клетки. Ферменты, которые постоянно синтезируются в определенных концентрациях называются конститутивными. Ферменты, концентрация которых возрастает в зависимости от наличия соответствующего субстрата называются индуцибельными. Функциональная активность ферментов зависит от температуры, pH среды.

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные биологические полимеры, несущие генетическую информацию. Содержание нуклеиновых кислот может быть от 10 до 30 % от сухого вещества.

Углеводы. На их долю в микробной клетке приходится от 12 до 28 % от сухого вещества. Углеводы выполняют энергетическую роль. Углеводами богаты капсульные микроорганизмы.

Липиды. Ряд микроорганизмов содержит липиды в значительных количествах. У дрожжей, риккетсий, грибов их содержание доходит до 40 %, а у микобактерий – до 60 %.

У других групп микроорганизмов содержание липидов - 3-7 %. Липиды входят в состав токсинов, играют роль резервных веществ, поддерживают определенную структуру цитоплазмы и повышают устойчивость микробов к действию кислот, спиртов, щелочей.

2. Наименование вопроса №2. *Метаболизм микроорганизмов. Типы питания и дыхания.*

Метаболизм представляет собой совокупность двух противоположных, но взаимосвязанных процессов – катаболизма, или энергетического метаболизма и анаболизма, или пластического (конструктивного) метаболизма. С первым связано дыхание, со вторым - питание.

Питание микроорганизмов. Микроорганизмы, как и все живые существа, нуждаются в питательных веществах. Они поступают из окружающей среды. Известны 2 способа питания: голозойный; голофитный. Голозойный тип характерен для животных. Голофитный – для микроорганизмов, которые не имеют специальных органов пищеварения и питательные вещества проникают в них через свою поверхность. Микробная клетка потребляет за сутки в 20-30 раз больше своей массы.

В конструктивном метаболизме главная роль принадлежит соединениям углерода. Все микроорганизмы по способности усваивать различные источники углерода делятся на 2 группы: аутоотрофы (синтезируют все углеродосодержащие соединения из CO_2); гетеротрофы (используют органические соединения углерода). Гетеротрофы могут быть: сапрофитами (используют органические остатки отмерших организмов); паразитами (используют органические соединения углерода живых организмов). Паразиты могут быть облигатными или факультативными. Но эта классификация не отражает всего многообразия типов питания, поэтому были предложены новые термины, указывающие на источник энергии и доноров электронов. В зависимости от источника энергии микроорганизмы подразделяют на фототрофы (способны использовать энергию света); хемотрофы (способны использовать энергию окислительно-восстановительных реакций). В зависимости от природы доноров электронов хемотрофы подразделяются на хемолитотрофы (источником электронов являются неорганические вещества) и хемоорганотрофы (источником электронов являются органические соединения). Все патогенные микроорганизмы относятся к хемоорганотрофам.

Микроорганизмы нуждаются также в источниках азота. Одни могут усваивать атмосферный азот или азот из неорганических соединений и будут называться аминокислототрофами. Другие – ассимилируют только азотосодержащие органические соединения и будут называться аминокислотогетеротрофами.

Микроорганизмы, которые не способны синтезировать какое-либо соединение, но нуждающееся в нем называются ауксотрофами, а такие соединения называются факторами роста. Очень часто факторами роста являются пуриновые и пиримидиновые основания, витамины, г.о. группы В, аминокислоты (лейцин, тирозин, аргинин).

Транспорт питательных веществ в микробную клетку осуществляется 3 путями:

- пассивной диффузией (протекает без затрат энергии, по градиенту концентрации, так поступает, например, вода, CO_2 , N_2);
- облегченной диффузией (протекает без затрат энергии, но при участии мембранных белков – транслоказ);
- активным транспортом (протекает с энергетическими затратами против градиента концентрации при участии белков – пермеаз (каждая пермеаза переносит определенное соединение) или мембранных белков – транслоказ).

Дыхание бактерий (энергетический метаболизм). Дыхание или биологическое окисление основано на окислительно-восстановительных реакциях, идущих с образованием АТФ. При окислении происходит отдача донорами (молекулами или атомами) водорода или электронов, при восстановлении происходит присоединение водорода или электронов к акцептору. Последним может быть молекулярный кислород

(такое дыхание называется аэробным) или нитраты, сульфаты (такое дыхание называется анаэробным). Если донорами и акцепторами водорода являются органические вещества, то такой процесс называется брожением.

По типу дыхания микроорганизмы подразделяются на 4 группы:

- облигатные аэробы (растут при свободном доступе кислорода);
- микроаэрофилы (развиваются при низкой концентрации кислорода, до 1 %);
- факультативные анаэробы (развиваются как при доступе кислорода, так и при его отсутствии);
- облигатные анаэробы (развиваются при полном отсутствии кислорода).

3. Наименование вопроса № 3. *Рост и размножение микроорганизмов.*

Термин «рост» означает увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или группы бактерий. Достигнув определенного размера, клетка начинает делиться. Большинство прокариот размножаются бинарным делением, некоторые почкованием, грибы – спорами.

При размножении наиболее важные процессы происходят в нуклеоиде. Репликация ДНК происходит полуконсервативным путем. Правильное расхождение дочерних цепей обеспечивается связью с ЦПМ. Параллельно с репликацией ДНК идет образование перегородки. Вначале с 2-х сторон идет вращение 2-х слоев ЦПМ, затем между ними синтезируется пептидогликан. На последней стадии дочерние клетки отделяются друг от друга. Если разделившиеся клетки сохраняют межклеточные связи, образуются цепочки.

Размножение бактерий определяется временем генерации, т.е. периодом в течение которого осуществляется деление клетки. Продолжительность генерации зависит от вида, возраста, питательной среды, температуры и др. факторов.

Фазы развития микробной популяции на несменяемой питательной среде. Процесс размножения на несменяемой питательной среде происходит неравномерно и в нем различают несколько фаз. Эту фазность принято показывать графически в виде кривой, которая отражает зависимость \log числа живых клеток (ось ординат) от времени (ось абсцисс):

- лаг-фаза или фаза покоя (культура приспосабливается к питательной среде, размножения нет, длится в среднем 4-5 часов);
- логарифмическая фаза или экспоненциальная (характеризуется максимальным увеличением клеток в геометрической прогрессии, длится 5-6 часов);
- стационарная фаза (наступает равновесие между количеством образующихся и отмирающих клеток, длится около 2 часов);
- фаза отмирания (наблюдается не только отмирание, но и изменение клеток, в эту фазу спорообразующие бактерии образуют споры, через несколько недель или месяцев культура погибает).

1. 2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Типы питания микроорганизмов, пути поступления питательных веществ в микробную клетку»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Классификация микроорганизмов по типу питания
2. Транспорт питательных веществ в микробную клетку

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса №1. Классификация микроорганизмов по типу питания

Широкому распространению микроорганизмов способствует разнообразие типов питания. Микроорганизмы нуждаются в углеводе, азоте, сере, фосфоре, калии и других

элементах. В зависимости от источников углерода для питания бактерии делятся на ауотрофы (от греч. Autos - сам, trophe - пища), использующие для построения своих клеток диоксид углерода CO₂ и другие неорганические соединения, и гетеротрофы (от греч. Heteros - другой, trophe - пища), питающиеся за счет готовых органических соединений. Ауотрофными бактериями являются нитрифицирующие бактерии, находящиеся в почве; серобактерии, обитающие в воде с сероводородом; железобактерии, живущие в воде с закисным железом, и др.

Гетеротрофы, утилизирующие органические остатки отмерших организмов в окружающей среде, называются сапрофитами. Гетеротрофы, вызывающие заболевание у человека и животных, относят к патогенным и условно-патогенным. Среди патогенных микроорганизмов встречаются облигатные и факультативные паразиты (parasites - нахлебник). Облигатные паразиты способны существовать только внутри клетки, например риккетсии, вирусы и некоторые простейшие.

В зависимости от окисляемого субстрата, называемого донором электронов или водорода, микроорганизмы делят на две группы. Микроорганизмы, использующие в качестве доноров водорода неорганические соединения, называют литотрофными (от греч. Lithos - камень), а микроорганизмы, использующие в качестве доноров водорода органические соединения, органотрофами.

Учитывая источник энергии, среди бактерий различают фототрофы, т. е. фотосинтезирующие (например, сине-зеленые водоросли, использующие энергию света), и хемотротрофы, нуждающиеся в химических источниках энергии.

Все многообразие бактерий, существующих сейчас, можно свести к нескольким группам

1. Хемоорганотрофы. Окисляют трудноусваиваемые вещества. Например, некоторые представители аминобактерий (Aminobacter), метиловых бактерий (Methylobacterium), флавобактерий (Flavobacterium), псевдомонад (Pseudomonas).
2. Хемоорганогетеротрофы. Большинство видов бактерий.
3. Хемолитоавтотрофы. Водородные, нитрифицирующие, серо-, железобактерии.
4. Хемолитогетеротрофы. Некоторые водородные бактерии.
5. Фотоорганотрофы. Довольно редкий механизм питания, при котором окисляются неусваиваемые вещества. Встречается у некоторых пурпурных бактерий.
6. Фотоорганогетеротрофы. Часть пурпурных и цианобактерий.
7. Фотолитоавтотрофы. Некоторые зеленые, пурпурные и цианобактерии.
8. Фотолитогетеротрофы. Гелиобактерии, часть пурпурных, зеленых и цианобактерий.

Кроме того, часть бактерий относят к миксотрофному типу. Они могут одновременно использовать различные типы питания. Так, представитель родобактерий (Rhodobacteraceae) параккоккпантотрофус (Paracoccus pantotrophus) обладает органогетеротрофным и литоавтотрофным типом питания. А цианобактерии не только синтезируют органику фототрофным путем, но и могут потреблять готовые органические вещества, разлагая их до неорганических

Типы питания и получения энергии микроорганизмами

Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	Тип питания	организмы-представители
Химические реакции	Неорганические вещества	CO ₂	Хемолито-автотрофия	Прокариоты (водородные, нитрифицирующие и др. бактерии)
		Органические вещества	Хемолито-гетеротрофия	Прокариоты (водородные, метановые и др. бактерии)
	Органические вещества	CO ₂	Хемоорганотрофия	Прокариоты (метилотрофы,

Свет	Неорганические вещества	Органические вещества	Хемоорганогетеротрофия	Животные и многие прокариоты
		CO ₂	Фотолитоавтотрофия	Растения, цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии
	Органические вещества	Органические вещества	Фотолитогетеротрофия	Прокариоты (некоторые цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии)
		CO ₂	Фотоорганавтотрофия	Прокариоты (некоторые пурпурные бактерии)
		Органические вещества	Фотоорганогетеротрофия	Прокариоты (галобактерии, цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии)

Считается, что тип питания не жестко связан с конкретным видом, особенно это относится к фототрофным бактериям, которые днем используют внешний источник энергии -- свет, а ночью актуальным становится эндогенные запасные вещества разной природы. Что же касается типов питания, указанных в таблице 1, то фотоавтотрофы (фотолитоавтотрофы) представлены не только большой группой цианобактерий, но и водорослями, зелеными растениями, а также анаэробными пурпурными бактериями. Фотогетеротрофы представлены несерными пурпурными бактериями; хемоорганавтотрофы используют несовместимую с центральным метаболизмом вещества, для них, как для пропионовокислых бактерий, характерна и гетеротрофная фиксация углекислого газа.

Хемоорганогетеротрофы представлены основной массой микробов-деструкторов (бактерий, грибов) и всеми животными.

Хемолитоавтотрофы представлены тионовыми, нитрифицирующими бактериями и рядом других, использующих энергию окисления минеральных соединений для хемосинтеза. хемолитогетеротрофы наряду с хемосинтезом утилизируют ряд простых органических соединений.

Обмен веществ (метаболизм) разных живых организмов имеет сходные механизмы, но у микробов есть ряд особенностей:

1. Благодаря высокой интенсивности метаболизма вес перерабатываемых веществ в 30-40 раз больше веса самого микроорганизма.
2. В питании участвует вся поверхность клетки.
3. Пища перерабатывается выделяемыми ферментами снаружи, а внутрь клетки поступают образовавшиеся после этого более простые соединения.
4. Чрезвычайно высокая адаптация к изменяющейся среде обитания.

Хемотрофы. Этот тип микробов использует энергию окислительно-восстановительных реакций. Это наиболее многочисленная группа бактерий, к которой кроме других относится большинство почвенных и болезнетворных микробов. Суть процесса состоит в поэтапном окислении органических или неорганических веществ, сопровождающемся выделением энергии. Химические реакции могут быть двух видов: аэробными, то есть бескислородными. Процессы первого типа принято называть дыханием, а второго - брожением. Хемотрофы являются единственными живыми организмами Земли, которые не зависят от энергии света Солнца.

Фототрофы. К этой группе относятся бактерии, использующие для синтеза органики энергию света, которая преобразуется с помощью фотосинтетических пигментов. Такими пигментами могут быть: Хлорофилл; Бактериохлорофилл. В первом случае фотосинтез происходит с выделением или кислородным фотосинтезом. Он наблюдается у цианобактерий. Во втором случае используется пигмент, относящийся к хлорофиллам, но реагирующий на свет с другой длиной волны, который не могут поглощать ни растения, ни водоросли, ни цианобактерии. При этом выделение кислорода не происходит (аноксигенный или бескислородный фотосинтез). Примером могут служить пурпурные, зеленые и гелиобактерии. Существует теория, что для фотосинтеза могут быть использованы и другие источники света. Так, обнаруженный в окрестностях подводного термального источника вид GSB1, относящийся к серобактериям, обитает на глубине более 2 км, куда не проникает солнечный свет. Предполагается, что бактериохлорофилл этого вида поглощает длинные световые волны термального источника.

2. Наименование вопроса №2. Транспорт питательных веществ в микробную клетку.

Через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану внутрь клетки прокариотов проникают только небольшие молекулы, поэтому белки, полисахариды и др. биополимеры в начале расщепляются экзоферментами до более простых соединений, которые транспортируются внутрь клетки. Проникновение питательных веществ в клетку происходит с помощью различных механизмов: 1. пассивная диффузия - вещества поступают в клетку за счет диффузии по градиенту концентрации, т. е. вследствие того, что концентрация вне клетки выше, чем внутри; 2. облегченная диффузия - также совершается по градиенту концентрации, но с участием ферментов-переносчиков, так называемых пермеаз. Этот фермент присоединяет к себе молекулы вещества на внешней стороне цитоплазматической мембраны и отдает его на внутренней стороне в неизменном виде. Затем свободный переносчик перемещается снова к наружной стороне мембраны, где связывает новые молекулы вещества. При этом каждая пермеаза переносит какое-то определенное вещество. Эти 2 механизма переноса не требуют энергетически затрат. Активный перенос происходит также с участием пермеаз, причем осуществляется против градиентов концентрации. Микробная клетка может накопить вещество в концентрации, в тысячи раз превышающих ее в внешней среде. Такой процесс требует затрат энергии, т.е. расходуется АТФ. Транслокация радикалов - это четвертый механизм передачи веществ. Это активный перенос химически измененных молекул, с участием пермеаз. Например, такое простое вещество, как глюкоза, переносится в фосфорилированном виде. Выход веществ из бактериальной клетки происходит путем пассивной диффузии или путем облегченной диффузии с участием пермеаз.

Микробная клетка не всегда способна синтезировать все необходимые ей молекулы, поэтому нуждается в так называемых факторах роста (витамины, азотистые основания, аминокислоты, углеводы и др.), которые должны присутствовать в окружающей среде. Такие организмы называются ауксотрофами, в отличие от прототрофов, не нуждающихся в факторах роста. Роль воды в микробных клетках сводится к растворению многих минеральных и органических соединений, гидролизу полимерных субстратов (крахмала, клетчатки, белков и др.), формированию коллоидных структур, участию в процессе бактериального фотосинтеза, поддержанию осмотического давления. Содержание воды в вегетативных клетках колеблется в пределах 75-95% и резко снижается в составе спор, грибных склероциев, при переходе организмов в анабиоз.

1. 3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Дыхание микроорганизмов»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Классификация микроорганизмов по типу дыхания
2. Анаэробные брожение, возбудители брожения
3. Аэробные окислительные процессы, возбудители

1.3.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1. Классификация микроорганизмов по типу дыхания: аэробы, анаэробы.

В 1861 г. французский ученый Л. Пастер впервые обратил внимание на уникальную способность микроорганизмов развиваться без доступа кислорода, в то время как все высшие организмы – растения и животные – могут жить только в атмосфере, содержащей кислород. Для окисления органических веществ с целью получения энергии одни микроорганизмы используют кислород воздуха, другие способны обходиться при этом без кислорода, а для третьих кислород воздуха является даже вредным. По отношению к кислороду воздуха Л. Пастер разделил микроорганизмы на две группы аэробные - это те микроорганизмы, которые нуждаются в кислороде воздуха, и анаэробные микроорганизмы, которым кислород воздуха не нужен.

Следовательно, аэробы для получения энергии осуществляют окисление органического материала кислородом воздуха. К ним относятся грибы, некоторые дрожжи, многие бактерии и водоросли. Многие аэробы окисляют органические вещества полностью, выделяя в виде конечных продуктов углекислый газ и воду.

Анаэробы – это микроорганизмы, способные к дыханию без использования свободного кислорода. Анаэробный процесс дыхания у микроорганизмов происходит за счет отнятия у субстрата водорода. Типичные анаэробные дыхательные процессы принято называть брожениями. Среди анаэробных микробов встречаются строгие, или типичные, анаэробы, на них кислород воздуха действует губительно, и факультативные, или условные, анаэробы, способные существовать как в присутствии кислорода, так и без него.

2. Наименование вопроса №2. Анаэробные брожение, возбудители брожения

Типичные виды брожения: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое. Краткая характеристика микроорганизмов-возбудителей. Конечные продукты брожения. Влияние условий на интенсивность брожения. Использование брожения при производстве продуктов пищевой промышленности и в общественном питании. Брожение - анаэробный ферментативный окислительно-восстановительный процесс превращения органических веществ, посредством которого многие организмы получают энергию, необходимую для их жизнедеятельности. К брожению способны бактерии, многие микроскопические грибы и простейшие. Брожение также может наблюдаться в клетках растений и животных в условиях дефицита кислорода. Сбраживанию подвергаются различные вещества. Это углеводы, органические кислоты, спирты, аминокислоты и другие вещества. Продуктами брожения являются различные органические кислоты (молочная, масляная, уксусная, муравьиная), спирты (этиловый, бутиловый, амиловый), ацетон, также углекислый газ и вода. Широкое распространение природе имеет брожение молочнокислое, маслянокислое, спиртовое и др. Процессы брожения с участием микроорганизмов часто используются на практике при производстве пищевых продуктов, алкогольных напитков или консервировании. Все процессы брожения протекают только в анаэробных условиях.

Молочнокислое брожение. Скисание молока известно человеку еще с древних времен, но только в 1857 г. Пастером была установлена микробная природа этого брожения. Таким образом, он впервые доказал значение микроорганизмов как возбудителей брожения. В основе молочнокислого брожения лежит гликолиз, т. е. ферментативное

расщепление глюкозы. На севере возбудителем этого брожения обычно является молочный стрептококк, вызывающий естественное скисание молока. Оптимальная температура для него 30-35°. Вторая группа возбудителей типичного брожения - палочковидные бактерии. Из них болгарская палочка обычно вызывает естественное скисание молока в южных районах. Оптимальная температура для жизнедеятельности около 40°, условный анаэроб. Многие молочные продукты, такие, как простокваша, йогурт или сыр, образуются путем брожения с участием молочнокислых бактерий. Молочнокислое брожение также играет существенную роль при квашении капусты. Получаемые продукты хорошо хранятся, так как происходящее при брожении уменьшение величины pH тормозит рост гнилостных бактерий.

Спиртовое брожение. Спиртовым брожением называется превращение микроорганизмами углеводов в этиловый спирт и углекислоту. Это брожение вызывается дрожжами, а также муковыми грибами. Впервые дрожжи наблюдал еще А. Левенгук в 1680 г. Но истинную роль дрожжей в спиртовом брожении установил Луи Пастер в 1857 г. Дрожжи, возбудители этого брожения, - факультативные анаэробы. При развитии в бескислородной среде они получают энергию за счет спиртового брожения, а в аэробных условиях - частично за счет окисления питательных веществ до углекислоты и воды. Спиртовое брожение широко используется в промышленности: в виноделии, пивоварении, винокурении и хлебопечении.

При *маслянокислом брожении* происходит процесс разложения сахара под действием бактерий в анаэробных условиях с образованием масляной кислоты, углекислого газа и водорода. Такое брожение может протекать в молоке и молочных продуктах, придавая им неприятные вкус и запах, характерные для масляной кислоты. Маслянокислые бактерии, вызывающие это брожение, представляют собой спорообразующие палочки, температурный режим их развития находится в пределах 30-40°C. Они являются строгими анаэробами и могут размножаться только при полном отсутствии кислорода воздуха или при очень незначительном его содержании. Споры, образуемые маслянокислыми бактериями, устойчивы к неблагоприятным воздействиям, выдерживают кипячение в течение нескольких минут и погибают только при длительной стерилизации. В народном хозяйстве маслянокислое брожение может принести большой вред, так как маслянокислые бактерии способны вызывать массовую гибель картофеля и овощей, прогоркание молока и вспучивание сыров, порчу консервов и т. д. На маслянокислые бактерии подавляюще действует кислая реакция среды, поэтому там, где развиваются молочнокислые бактерии, выделяющие молочную кислоту, жизнедеятельность маслянокислых бактерий приостанавливается. Если же в заквашенных овощах медленно накапливается молочная кислота, то они могут быть испорчены в результате размножения в них маслянокислых бактерий. Эти бактерии вызывают порчу пастеризованного молока, в котором исключено молочнокислое брожение, а также сырого молока при длительном хранении его на холоде, когда деятельность молочнокислых бактерий ослаблена.

Микроорганизмы выполняют много полезных и необходимых для жизни функций. В процессе собственной жизни микроорганизмы непрерывно пополняют содержание неорганических веществ в почве. Они расщепляют помет животных и ткани мертвых животных и растений. Развитие микроорганизмов внутри и снаружи на скоропортящихся пищевых продуктах вызывает в них сложные химические изменения. В результате происходят нежелательные изменения вкуса, содержания витаминов, запаха и внешнего вида. Если не остановить процесс, пищевые продукты станут непригодными для употребления. Особый интерес при изучении сохранения пищевых продуктов вызывают три типа микроорганизмов: бактерии, дрожжи и микроскопические грибы (плесени

3. Наименование вопроса №3. Аэробные окислительные процессы, возбудители

Это процессы дыхания микроорганизмов, происходящие при обязательном участии

кислорода. Брожениями они называются лишь условно за сходство с истинными брожениями, заключающимися в том, что среди продуктов жизнедеятельности бактерий, вызывающих эти процессы, обязательно образуются органические сложные вещества, имеющие запас энергии. Некоторые из этих веществ находят применение в пищевой промышленности и технике - уксусная, лимонная кислоты и др.

Уксуснокислое брожение. Уксуснокислое брожение представляет собой процесс превращения этилового спирта при участии кислорода в уксусную кислоту. Брожение является важным в хозяйственном отношении, так как позволяет получать в больших количествах уксусную кислоту - вещество, широко используемое в пищевой, текстильной и других отраслях промышленности. Такое брожение было известно ещё в глубокой древности. В оставленном на воздухе сосуде с виноградным вином или пивом через день-два на поверхности напитков появлялась сероватая плёнка, они мутнели и прокисали. Возбудителем уксуснокислого брожения является уксусный гриб (*Mycoderma aceti*). Уксуснокислые бактерии представляют собой палочковидные, бесспорные, строго аэробные организмы. Среди них есть подвижные и неподвижные бактерии. Они кислотоустойчивы, и некоторые могут развиваться при pH среды до 3,2. Оптимальная температура роста для различных уксуснокислых бактерий 20-34°C. Попадая на различные товары, уксуснокислые бактерии могут вызывать их порчу - скисание вина, пива. Они являются вредителями спиртового, дрожжевого, хлебопекарного и других производств.

Лимоннокислое брожение. Лимоннокислое брожение - это окислительный аэробный процесс превращения сахаров в лимонную кислоту плесневыми грибами. Такой способностью обладают различные грибы, но наиболее продуктивным является представитель аспергилловых грибов - аспергиллус нигер. Этот гриб в значительных количествах образует лимонную кислоту. Для получения лимонной кислоты по методу, предложенному русскими учеными С.П. Костычевым и В.С. Буткевичем, в плоских открытых сосудах сначала выращивают гриб - возбудитель брожения (на 20%-ном растворе сахара с добавкой минеральных солей при температуре 30-32°C). На растворе через два дня образуется складчатая плёнка гриба. Питательный раствор из-под неё сливают, нижнюю поверхность гриба промывают кипячёной водой и под плёнку вводят чистый раствор сахара без питательных солей и азотистых веществ. В этих условиях начинается образование лимонной кислоты. Процесс брожения заканчивается за 3-4 дня. Лимонную кислоту выделяют, очищают и используют для пищевых и технических целей. Одновременно с лимонной образуется щавелевая кислота. Лимонная кислота является ценным пищевым продуктом, применяется в кондитерском и консервном производствах, в кулинарии, при приготовлении безалкогольных напитков.

1. 4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Клеточный рост и размножение бактериальных клеток»

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Клеточный рост у микроорганизмов
2. Клеточное деление у микроорганизмов

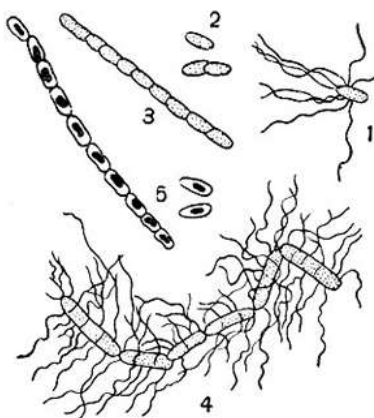
1.4.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1. Клеточный рост у микроорганизмов

Рост представляет собой увеличение количества химических компонентов микробной клетки. Для характеристики роста микроорганизмов используется понятие бактериальной массы, которое выражается плотностью бактерий (сухая масса на 1 мл). Размножение микробов описывается числом бактерий, отражающим концентрацию клеток в 1 мл. Строгой пропорциональности между увеличением числа бактерий и бактериальной массы нет. Это объясняется тем, что в популяции бактерий не все клетки являются

жизнеспособными - часть из них мертвые, некоторые находятся на разных этапах деструкции. Участвуя в создании бактериальной массы, такие клетки не участвуют в дальнейшем размножении бактерий.

Процесс роста начинается с фазы задержки роста, или лаг-фазы. В этот период происходит интенсивная метаболическая активность бактерий, результатом которой является подготовка клетки к быстрому размножению. Фаза начинается с момента внесения бактерий в среду. Продолжительность ее зависит от возраста засеянной культуры (она более длительная при внесении старой культуры), состава среды, температуры и других моментов. Рост бактериальной клетки. Увеличение биомассы клеточной протоплазмы, возникающее в результате синтеза пластического материала в процессе питания, называется ростом. Микробы растут быстро, достигая в течение короткого времени предела своей физиологической зрелости.



Цикл развития сенной палочки

1 - молодая сенная палочка; 2 - сенная палочка, сбросившая жгутики; 3 - деление цепочки клеток; 4 - образование жгутиков у цепочек; 5 - образование спор

Рост бактериальных клеток в жидких питательных средах характеризуется единообразием, чего нет на плотных питательных средах. Однако и при этом методе можно наблюдать некоторые особенности роста бактерий. Виды, образующие сухие колонии на плотных средах, дают разнообразные осадки в прозрачном бульоне. Виды, образующие мягкие и влажные колонии, в основном дают гомогенный рост, равномерно мутящий питательную среду.

Для культуры, растущей в жидкой среде, аэрация имеет большое значение. Известно, что в пробирках или колбах только верхние слои жидкости соприкасаются с атмосферным воздухом, и в силу этого некоторые облигатные аэробы, например, микобактерии туберкулеза, холерный вибрион и др., скапливаются на поверхности, образуя нежную пленку.

2. Наименование вопроса №2. Клеточное деление у микроорганизмов

Размножение бактерий происходит путем прямого деления. При этом образуется перетяжка или начинается вращение цитоплазматической мембраны внутрь, перпендикулярно продольной оси клетки с образованием диска -клеточной пластины. Эта пластина иногда может быть неполной и имеет отверстие, в центре которой соединяет обе сестринские клетки. В дальнейшем в клеточную пластину вырастает боковая стенка, которая образует поперечную перегородку, делящую клеточную пластину на две части, каждая из которых отходит к одной из образовавшихся клеток. Центральное отверстие, не разделенное поперечной перегородкой или пластиной, получило название плазмодесмоса. Плазмодесмос играет роль в соединении клеток некоторых бактерий в длинные цепочки или группы. Помимо отмеченного, процесс деления бактериальных клеток может

происходить путем перешнуровывания. Число бактериальных клеток в процессе размножения увеличивается в геометрической прогрессии. Для большинства бактерий время генерации составляет 20 - 30 минут. Рост и размножение бактерий проявляются по-разному в зависимости от условий культивирования. На плотных питательных средах проявлением роста и размножения бактерий является появление колоний, представляющих собой визуально различимые скопления бактериальных клеток. Колонии характеризуются набором определенных признаков, на основании которых можно идентифицировать чистые культуры бактерий. К этим признакам относятся: размеры (крупные, средние, мелкие, микроскопические); форма (круглые, распластанные и др.); окраска, зависящая от образования бактериями пигментов; поверхность (выпуклая, плоская, матовая, блестящая и др.); характер краев (ровный, шероховатый и др.); консистенция (однородная, пастообразная, слизистая и др.); прозрачность (прозрачные, мутные).

Деление клетки. Клетка, достигшая определенного зрелого возраста, начинает делиться, и в питательной среде одновременно наблюдается рост бактериальной популяции — культуры. Делению клетки предшествует образование цитоплазматической мембраны, которая обычно формируется в середине бактериальной клетки. В процессе деления клетки происходит репликация (удвоение) ДНК. При этом разрываются водородные связи и образуются две цепи (спирали) ДНК, каждая из них имеется в дочерних клетках. Затем одноцепочечные ДНК соединяются водородными связями и снова появляются двуцепочечные ДНК, обладающие генетической информацией. Деление клетки считается завершенным когда вновь образовавшиеся клетки разделяются цитоплазматической перегородкой.

Бактериальные клетки быстрее делятся в начальных стадиях роста популяции. В более поздних стадиях деление идет медленнее, часть материнских клеток отмирает, и у отдельных видов бактерий появляются разнообразные включения. В благоприятных условиях скорость размножения бактерий весьма высока. Каждые 15—20 минут из одной особи получаются две. По расчетам некоторых исследователей, если только за один час микроб будет давать две особи, то через сутки число микробных клеток достигает 16,5 млн. По образному определению В. Л. Омелянского, потомство одной бактерии в течение 5 суток может дать такое количество микробов, которое может заполнить бассейны всех морей и океанов. При таком размножении микробные клетки могли бы покрыть всю поверхность не только морей, океанов, но и материков. Следовательно, жизнь людей на нашей планете была бы невозможной. Однако в размножении микробов не существует абсолютного закона геометрической прогрессии. На их рост и размножение отрицательное влияние оказывают антагонистические взаимоотношения микроорганизмов, истощение питательной среды, кислородная недостаточность, накопление ядовитых продуктов жизнедеятельности микробов. Эти факторы препятствуют непрерывному делению клеток.

Многолетними исследованиями и наблюдениями Байля установлено, что в жидкой питательной среде в определенном объеме происходит максимальное развитие клеток с предельной численностью. В течение 24 часов при одинаковых условиях концентрация клеток в 1 мл жидкой среды устанавливается: для кишечной палочки и бактерии паратифа В — 1,5 млрд., бактерии дизентерии Григорьева — Шига и стафилококков — 300 млрд., палочки брюшного тифа — 800 млрд. Приведенное числовое выражение принято называть М-концентрацией (М — максимальная) микробов. При обычных условиях их выращивания М-концентрация клеток является пределом накопления микробов. Интересно отметить, что если засеять в свежую питательную среду такое количество микробов, которое равно М-концентрации, то число клеток не увеличивается, а в случае, если количество культивируемых микробов превышает М-концентрацию, — лишние погибают.

Размножение бактерий в популяции. Для понимания закономерностей размножения микробов в популяции изучаются чистые культуры. Однако микробы в естественных и искусственных условиях встречаются в ассоциациях. Бактериальной популяцией называется совокупность бактерий, размножающихся в определенном объеме жидкой среды в пробирке, колбе и т. д. При сплошном росте бактерий на поверхности плотной питательной среды в пробирке совокупность всех находящихся в ней клеток принято считать единой популяцией. В случае роста изолированных колоний каждую из них можно считать отдельной популяцией, поскольку они не сообщаются друг с другом. При выращивании микробов на плотных питательных средах выявляются некоторые особенности их роста, т. е. появляются колонии, представляющие потомство одной или нескольких клеток. Внешний вид колоний, их форма, цвет, прозрачность, величина и другие свойства являются отличительными признаками для каждого вида бактерий. Ряд видов бактерий, имеющих жгутики, на агаре дают сплошной рост, покрывающий всю поверхность чашки (вульгарный протей). Спорогенные виды отличаются по характеру колоний, образуя непрозрачные колонии с матовой поверхностью.

1.5 Лекция №5 (2 часа).

Тема: «Периодическое и непрерывное культивирование»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Периодическое культивирование
2. Непрерывное культивирование

1.5.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1. Периодическое культивирование

Рост бактерий в периодической культуре происходит до тех пор, пока содержание какого-нибудь из компонентов питательной среды не достигнет минимума, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов метаболизма, то получим так называемую периодическую культуру (популяцию клеток в ограниченном жизненном пространстве). Изменение численности популяции клеток при периодическом культивировании имеет определенную закономерность. Если по оси абсцисс отложить время, а по оси ординат – логарифм числа жизнеспособных клеток, то можно построить кривую роста бактерий. Типичная кривая роста имеет S-образную форму. Анализируя кривую можно различить несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности: 1) начальную или лаг-фазу; 2) экспоненциальную или логарифмическую фазу; 3) стационарную фазу; 4) фазу отмирания.

Лаг-фаза включает период от посева бактерий на свежую питательную среду до достижения ими максимальной скорости роста. В начале лаг-фазы бактерии приспосабливаются к новым условиям. В клетках идет синтез ферментов, нуклеиновых кислот, белков, активируются обменные процессы. Клетки интенсивно растут, и размеры их заметно увеличиваются. Деления бактерий на этой стадии практически не происходит. Длительность этой фазы зависит от полноценности питательной среды и от состояния культуры микроорганизма. Чем полноценнее питательная среда и чем моложе культура бактерий, тем короче лаг-фаза.

Экспоненциальная фаза характеризуется активным делением подавляющей массы клеток бактериальной популяции. Число клеток возрастает в геометрической прогрессии. Характеризуется постоянной максимальной скоростью или скоростью роста. Эта скорость зависит от вида бактерий. Бактерии *E. coli* при 37°C делятся каждые 20 мин, а бактерии родов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* – 5-10 часов. Во время этой фазы клетки имеют приблизительно равный размер, содержание белка в них тоже постоянно. Клетки

содержат максимальное количество РНК. Клетки на этой фазе наиболее жизнеспособны и обладают высокой биохимической активностью.

Стационарная фаза наступает тогда, когда число живых клеток достигает максимума и перестает увеличиваться, так как скорость размножения бактерий равна скорости их отмирания. Так как скорость роста зависит от концентрации субстрата, то при уменьшении этой концентрации, еще до полного использования субстрата, она начинает снижаться. Скорость роста может снижаться не только из-за нехватки субстрата, но также из-за большой плотности бактериальной популяции, из-за низкого парциального давления O_2 или накопления токсичных продуктов обмена. Клетки по химическому составу отличаются от состава клеток в экспоненциальной фазе. Клетки в стационарной фазе меньше по размеру, содержат меньше РНК, более устойчивы к физическим воздействиям и химическим агентам, чем в экспоненциальной фазе роста культур. В этот период в клетках и в среде нередко накапливаются продукты вторичного метаболизма (антибиотики, пигменты, бактериоцины и др.). Продолжительность этой фазы от нескольких часов до недели в зависимости от вида микроорганизмов. В стационарную фазу роста поведение клеток бактериальной популяции регулирует такое явление как апоптоз. Суть его сводится к тому, что при исчерпании питательного субстрата голодающая популяция разделяется на две субпопуляции, одна из которых гибнет и подвергается автолизу, а клетки другой субпопуляции, используя продукты автолиза как субстрат, продолжают размножаться.

В фазе *отмирания* происходит снижение числа живых клеток. Скорость отмирания бактерий широко варьирует в зависимости от условий и особенностей организма. Например, энтеробактерии отмирают медленно в отличие от некоторых видов бактерий рода *Bacillus*, которые отмирают быстро. Причины отмирания клеток могут быть разными. Это и накопление органических кислот (как у бактерий родов *Escherichia*, *Lactobacillus*), автолиз (лизис под действием собственных ферментов), накопление антибиотиков, бактериоцинов и другие причины.

2. Наименование вопроса №2. Непрерывное культивирование

Непрерывное культивирование- это процесс, при котором в ферментаторе поддерживаются постоянные условия среды, в результате чего микроорганизмы остаются в определенном физиологическом состоянии. Непрерывное культивирование пока не находит широкого применения, однако в настоящее время все более популярным становится периодическое культивирование с добавлением субстрата, которое представляет собой компромисс между двумя системами. Для непрерывного культивирования подаётся свежая питательная среда и удаляется избыток среды с продуктами метаболизма, поддерживается фаза экспоненциального роста. При непрерывном культивировании микроорганизмов отсутствует смена фаз развития культуры. В таких процессах скорость потока питательной среды и отвода культуральной жидкости из системы необходимо отрегулировать, чтобы концентрация клеток оставалась постоянной. В стерильных условиях непрерывный метод обеспечивает сохранение культуры в физиологически активном состоянии длительное время. Поддержание динамики равновесия в реакторе осуществляется двумя методами: турбидостатным и хемостатным.

По турбидостатному принципу концентрация биомассы поддерживается скоростью потока среды, а по хемостатному - концентрацией подаваемого субстрата. Известен также способ регулирования роста культуры по рН. При турбидостатном методе регулирования контролируются концентрации суспензии входящей жидкости, создаваемой микробными клетками. Метод осуществляется с помощью фотоэлемента или рН-электрода, если в культуральной жидкости образуются органические кислоты.

Хемостатный контроль проще, так как он происходит по входящему потоку. Этот метод регулирования применим ко всем типам микроорганизмов и клеток различных

тканей животных и растений. Биореактор в хемотратном режиме снабжен устройствами для вливания и выпуска питательной жидкости, имеет систему контроля скорости потока, перемешивание. Например, используемый ферментер Labfors 3 бактериальный (13л) позволяет контролировать до 16 параметров: температуру, рН, скорость вращения мешалки, концентрацию растворенного кислорода, контроль уровня пены, контроль массового потока газов, оптическую плотность, окислительно-восстановительный потенциал, массу, давление, анализ субстрата (например, уровень глюкозы и метанола) Преимущества хемотратного метода:

1. хемотрат дает возможность изменять скорость роста биомассы, не производя в окружающей среде никаких изменений, кроме изменений концентрации лимитирующего рост субстрата. В простой периодической культуре изменения скорости роста могут быть вызваны только качественными изменениями в составе питательной среды или количественными изменениями физико-химических условий, таких, как температура или рН. Эти методы изменения скорости роста вносят побочные эффекты, маскирующие действие самой скорости роста. Так, изменение температуры, например, независимо действует и на скорость роста и на содержание РНК у бактерий;

2. хемотрат можно использовать и прямо с противоположной целью, а именно фиксировать скорость роста при изменении окружающих условий. Это очень существенно в тех случаях, когда необходимо отдифференцировать влияние изменения условий окружающей среды и влияние изменения скорости роста;

3. хемотрат, кроме того, используется для поддержания постоянной скорости роста при лимитирующей концентрации субстрата, тогда как в периодической культуре рост, лимитированный субстратом, можно получить лишь кратковременно, причем это сопровождается изменением скорости роста. Данная функция хемотрата расширяет возможный диапазон постоянных окружающих условий и дает возможность изучать не только избыток или истощение лимитирующего рост субстрата, но и все промежуточные состояния;

4. в хемотратном методе существенно то, что он упрощает системы культуры и, следовательно, облегчает как изучение реакций организма на его окружение, так и управление процессами, протекающими в самих микроорганизмах. Преимущества этого упрощения приобретают особенно большое значение, когда возникает необходимость в изучении или управлении взаимодействием двух или более видов.

Схема непрерывного культивирования: в том случае, когда целью является получение большого количества биомассы, обычно используют простейшую, одноступенчатую систему непрерывного культивирования при которой культуру выращивают на каком-то одном определенном субстрате, обеспечивающем максимальный выход биомассы. Если желаемый продукт образуется в результате двух или более метаболических превращений, используют многоступенчатую систему непрерывного культивирования. Полунепрерывные системы основаны на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, производимого в одном или нескольких культиваторах, соединенных в батареи. Теоретической основой для промышленных процессов непрерывного культивирования является управление поведением популяции.

1. 6 Лекция №6 (2 часа).

Тема: «Действие физических факторов на рост микроорганизмы»

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Действие температуры и давления на микроорганизмы
2. Действие лучистой энергии на микроорганизмы
3. Действие ионизирующего излучения, электромагнитных колебаний и ультразвука

1.6.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1. Действие температуры и влажности на микроорганизмы

Температура — один из основных факторов, определяющих возможность и интенсивность размножения микроорганизмов. Микроорганизмы могут расти и проявлять свою жизнедеятельность в определенном температурном диапазоне и в зависимости от отношения к температуре делятся на психрофилы, мезофилы и термофилы. Температурные диапазоны роста и развития микроорганизмов этих групп приведены в.

Деление микроорганизмов на группы в зависимости от отношения к температуре

Группа микроорганизмов Отдельные представители	T(°C) миним.	T(°C) максим.	T(°C) оптим.
1. Психрофилы (холодолюбивые) (+10)- (-2) Бактерии, обитающие в холодильниках, морские бактерии		Около +30	10-15
2. Мезофилы грибов, дрожжей, бактерий	5-10	45-50	25-40 Большинство
3. Термофилы (теплолюбвые)	около 30	70-80	50-60

Бактерии, обитающие в горячих источниках. Большинство образуют устойчивые споры

Разделение микроорганизмов на 3 группы весьма условно, так как микроорганизмы могут приспосабливаться к несвойственной им температуре. Температурные пределы роста определяются терморезистентностью ферментов и клеточных структур, содержащих белки. Среди мезофилов встречаются формы с высоким температурным максимумом и низким минимумом. Такие микроорганизмы называют термотолерантными. Действие высоких температур на микроорганизмы. Повышение температуры выше максимальной может привести к гибели клеток. Гибель микроорганизмов наступает не мгновенно, а во времени. При незначительном повышении температуры выше максимальной микроорганизмы могут испытывать «тепловой шок» и после недлительного пребывания в таком состоянии они могут реактивироваться. Механизм губительного действия высоких температур связан с денатурацией клеточных белков. На температуру денатурации белков влияет содержание в них воды (чем меньше воды в белке, тем выше температура денатурации). Молодые вегетативные клетки, богатые свободной водой, погибают при нагревании быстрее, чем старые, обезвоженные. Термоустойчивость — способность микроорганизмов выдерживать длительное нагревание при температурах, превышающих температурный максимум их развития. Гибель микроорганизмов наступает при разных значениях температур и зависит от вида микроорганизма. Так, при нагревании во влажной среде в течение 15 мин при температуре 50–60 °C погибает большинство грибов и дрожжей; при 60–70 °C — вегетативные клетки большинства бактерий, споры грибов и дрожжей уничтожаются при 65–80° C. Наибольшей термоустойчивостью обладают вегетативные клетки термофилов (90–100 °C) и споры бактерий (120 °C). Высокая термоустойчивость термофилов связана с тем, что, во первых, белки и ферменты их клеток более устойчивы к температуре, во вторых, в них содержится меньше влаги. Кроме того, скорость синтеза различных клеточных структур у термофилов выше скорости их

разрушения. Термоустойчивость спор бактерий связана с малым содержанием в них свободной влаги, многослойной оболочкой, в состав которой входит кальциевая соль дипиколиновой кислоты. На губительном действии высоких температур основаны различные методы уничтожения микроорганизмов в пищевых продуктах. Это кипячение, варка, бланширование, обжарка, а также стерилизация и пастеризация. Пастеризация – процесс нагревания до 100 °С, при котором происходит уничтожение вегетативных клеток микроорганизмов. Стерилизация – полное уничтожение вегетативных клеток и спор микроорганизмов. Процесс стерилизации ведут при температуре выше 100 °С. Влияние низких температур на микроорганизмы. К низким температурам микроорганизмы более устойчивы, чем к высоким. Несмотря на то, что размножение и биохимическая активность микроорганизмов при температуре ниже минимальной прекращаются, гибели клеток не происходит, т.к. микроорганизмы переходят в состояние анабиоза (скрытой жизни) и остаются жизнеспособными длительное время. При повышении температуры клетки начинают интенсивно размножаться. Причиной гибели микроорганизмов при действии низких температур являются: нарушение обмена веществ; повышение осмотического давления среды вследствие вымораживания воды; в клетках могут образоваться кристаллики льда, разрушающие клеточную стенку. Низкая температура используется при хранении продуктов в охлажденном состоянии (при температуре от 10 до –2 °С) или в замороженном виде (от –12 до –30 °С).

Микроорганизмы могут жить и развиваться только в среде с определенным содержанием влаги. Вода необходима для всех процессов обмена веществ микроорганизмов, для нормального осмотического давления в микробной клетке, для сохранения ее жизнеспособности. У различных микроорганизмов потребность в воде не одинакова. Бактерии относятся в основном к влаголюбивым, при влажности среды ниже 20 % их рост прекращается. Для плесеней нижний предел влажности среды составляет 15%, а при значительной влажности воздуха и ниже. Оседание водяных паров из воздуха на поверхность продукта способствует размножению микроорганизмов.

При снижении содержания воды в среде рост микроорганизмов замедляется и может совсем прекращаться. Поэтому сухие продукты могут храниться значительно дольше продуктов с высокой влажностью. Сушка продуктов позволяет сохранять продукты при комнатной температуре без охлаждения. Некоторые микробы очень устойчивы к высушиванию, некоторые бактерии и дрожжи в высушенном состоянии могут сохраняться до месяца и более. Споры бактерий и плесневых грибов сохраняют жизнеспособность при отсутствии влаги десятки, а иногда и сотни лет.

Высокое давление. К высокому атмосферному или гидростатическому давлению бактерии, а особенно споры, очень устойчивы (барофильные микроорганизмы). В природе встречаются бактерии, которые живут в морях и океанах на глубине м под давлением от 100 до 900 атм. Эти бактерии являются сапрофитными и относятся к археям. Бактерии переносят давление атм, а споры бактерий - до 20000 атм. При таком высоком давлении снижается активность бактериальных ферментов и токсинов. Сочетанное действие повышенных температур и повышенного давления используется в паровых стерилизаторах (автоклавах) для стерилизации паром под давлением. Важным фактором является внутриклеточное осмотическое давление у различных микроорганизмов. Влияние осмотического давления на микробную клетку: 1) плазмолиз (потеря воды и гибель клетки) происходит с микроорганизмами, если их помещают в среду с более высоким осмотическим давлением; 2) плазмолитиз (поступление воды в клетку и разрыв клеточной стенки) – происходит с микроорганизмами при перемещении их в среду с низким осмотическим давлением.

2. Наименование вопроса №2. Действие лучистой энергии

Лучистая энергия. В природе микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию солнечной радиации. Свет необходим для жизнедеятельности фототрофов. Хемотробы могут расти и в темноте, а при длительном воздействии солнечной радиации эти

микроорганизмы могут погибнуть. Воздействие лучистой энергии подчиняется законам фотохимии: изменения в клетках могут быть вызваны только поглощенными лучами. Следовательно, для эффективности облучения имеет значение проникающая способность лучей, которая зависит от длины волны и дозы. Доза облучения, в свою очередь, определяется интенсивностью и временем воздействия. Кроме того, эффект воздействия лучистой энергии зависит от вида микроорганизма, характера облучаемого субстрата, степени обсемененности его микроорганизмами, а также от температуры. Низкие интенсивности видимого света (350–750 нм) и ультрафиолетовых лучей (150–300 нм), а также низкие дозы ионизирующих излучений либо не влияют на жизнедеятельность микроорганизмов, либо приводят к ускорению их роста и стимуляции метаболических процессов, что связано с поглощением квантов света определенными компонентами или веществами клеток и переходом их в электронно-возбужденное состояние. Более высокие дозы излучений вызывают торможение отдельных процессов обмена, а действие ультрафиолетовых и рентгеновских лучей может привести к изменению наследственных свойств микроорганизмов - мутациям, что широко используется для получения высокопродуктивных штаммов. Гибель микроорганизмов под действием ультрафиолетовых лучей связана: с инактивацией клеточных ферментов; с разрушением нуклеиновых кислот; с образованием в облучаемой среде перекиси водорода, озона и т.д. Следует отметить, что наиболее устойчивыми к действию ультрафиолетовых лучей являются споры бактерий, затем споры грибов и дрожжей, далее окрашенные (пигментированные) клетки бактерий. Наименее устойчивы вегетативные клетки бактерий. Ультрафиолетовыми лучами дезинфицируют воздух холодильных камер, лечебных и производственных помещений, используют бактерицидные свойства ультрафиолетовых лучей для дезинфекции воды.

3. Наименование вопросов №3. Действие ионизирующего излучения, электромагнитных колебаний и ультразвука

Гибель микроорганизмов под действием ионизирующих излучений вызвана: радиолизом воды в клетках и субстрате. При этом образуются свободные радикалы, атомарный водород, перекиси, которые, вступая во взаимодействие с другими веществами клетки, вызывают большое количество реакций, не свойственных нормально живущей клетке; инактивацией ферментов, разрушением мембранных структур, ядерного аппарата. Радиоустойчивость различных микроорганизмов колеблется в широких пределах, причем микроорганизмы значительно радиоустойчивей высших организмов (в сотни и тысячи раз). Наиболее устойчивы к действию ионизирующих излучений споры бактерий, затем грибы и дрожжи и далее бактерии. Губительное действие ультрафиолетовых и рентгеновских γ -лучей используется на практике. Обработка пищевых продуктов низкими дозами гамма-излучений называется радиуризацией. Электромагнитные колебания и ультразвук. Радиоволны - это электромагнитные волны, характеризующиеся относительно большой длиной (от миллиметров до километров) и частотами от $3 \cdot 10^4$ до $3 \cdot 10^{11}$ герц.

Прохождение коротких и ультракоротких волн через среду вызывает возникновение в ней переменных токов высокой (ВЧ) и сверхвысокой частоты (СВЧ). В электромагнитном поле электрическая энергия преобразуется в тепловую. Гибель микроорганизмов в электромагнитном поле высокой интенсивности наступает в результате теплового эффекта, но полностью механизм действия СВЧ-энергии на микроорганизмы не раскрыт. В последние годы сверхвысокочастотная электромагнитная обработка пищевых продуктов все более широко применяется в пищевой промышленности (для варки, сушки, выпечки, разогревания, размораживания, пастеризации и стерилизации пищевых продуктов). По сравнению с традиционным способом тепловой обработки время нагревания СВЧ-энергией до одной и той же температуры сокращается во много раз, в связи с чем полнее сохраняются вкусовые и питательные свойства продукта.

Ультразвук. Ультразвуком называют механические колебания с частотами более 20 000 колебаний в секунду (20 кГц). Природа губительного действия ультразвука на микроорганизмы связана: с кавитационным эффектом. При распространении в жидкости УЗ-волн происходит быстро чередующееся разрежение и сжатие частиц жидкости. При разрежении в среде образуются мельчайшие полые пространства – «пузырьки», заполняющиеся парами окружающей среды и газами. При сжатии, в момент захлопывания кавитационных «пузырьков», возникает мощная гидравлическая ударная волна, вызывающая разрушительное действие; с электрохимическим действием УЗ-энергии. В водной среде происходит ионизация молекул воды и активация растворенного в ней кислорода. При этом образуются вещества, обладающие большой реакционной способностью, которые обуславливают ряд химических процессов, неблагоприятно действующих на живые организмы.

Благодаря специфическим свойствам ультразвук все более широко применяют в различных областях техники и технологии многих отраслей народного хозяйства. Ведутся исследования по применению УЗ-энергии для стерилизации питьевой воды, пищевых продуктов (молока, фруктовых соков, вин), мойки и стерилизации стеклянной тары.

1. 7-8 Лекция №7-8 (4 часа).

Тема: «Действие химических факторов на рост микроорганизмов»

1.7-8.1 Вопросы лекции:

1. Роль pH и Eh на рост микроорганизмов
2. Влияние антисептических веществ на микробную клетку

1.7-8.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1. Роль pH и Eh на рост микроорганизмов

К химическим факторам, влияющим на жизнедеятельность микробов, относят: химический состав питательной среды, реакцию среды, окислительно-восстановительный потенциал среды и действие ядовитых (антисептических) веществ.

Состав питательной среды является основным показателем микроорганизмов. Он определяет ее питательную ценность, реакцию (pH) и окислительно-восстановительный потенциал (Eh). Реакция питательной среды (концентрация водородных ионов pH) играет роль фактора, определяющего границы существования живой материи. Кислотность среды воздействует на ионное состояние, а поэтому на доступность для организма многих химических веществ. Ионы водорода влияют на электрический заряд коллоидов клеточной стенки. При сдвиге pH в кислую или щелочную сторону изменяется знак заряда поверхности клетки, что приводит к изменению ее проницаемости для различных молекул и ионов питательного субстрата и нарушению нормального процесса обмена веществ. Изменение pH также влияет на степень дисперсности коллоидов цитоплазмы, активность ферментов, интенсивность и направление биохимических реакций. Так, например, дрожжи в кислой среде (pH 4,5-5,0) образуют в основном этиловый спирт (спиртовое брожение), а в щелочной среде (pH 8,2) – глицерин (глицериновое брожение). В зависимости от отношения микроорганизмов к кислотности среды их подразделяют на *ацидофилы* (кислотолюбивые), *нейтрофилы* (нейтральная зона) и *алкалофилы* (щелочелюбивые). Микроорганизмы, обладающие способностью выживать при значениях pH за пределами 4-9, рассматриваются как кислото- и щелочетолерантные. Кислотолюбивые микроорганизмы, растущие при очень низком значении pH, встречаются редко. К ацидофильным относятся уксуснокислые, молочнокислые, некоторые дрожжи и плесени. Уксуснокислые бактерии растут в пределах pH от 3 до 5, молочнокислые развиваются при pH от 3 до 8. Оптимум pH роста дрожжей находится в области 4,5 - 6.

Однако некоторые из них способны развиваться в более кислой среде – pH 2, другие - в щелочной - 8,5. К самым устойчивым к кислой среде относятся плесневые грибы, многие из них характеризуются *ацидотолерантностью* и способностью роста в широких пределах pH (от 2 до 11). Оптимальная pH для нейтральнофильных микроорганизмов находится в пределах 7,0. Типичными представителями нейтрофилов являются бактерии группы кишечных палочек (БГКП), стрептококки, бациллы, сальмонеллы и большинство других патогенных микроорганизмов. К алкалофилам относят некоторые виды бактерий и мицелиальных грибов. Клубеньковые бактерии рода Ризобиум (*Rhizobium*) активно развиваются при pH 10-12. Бациллюс цереус (*Bacillus cereus*) и Бациллус циркулянс (*Bacillus circulans*) способны развиваться при pH 10-11. Энтерококки также толерантны к щелочной среде. Многие микроорганизмы, развиваясь в питательной среде, выделяют продукты обмена, изменяющие реакцию субстрата, это является одним из факторов, обуславливающих *антогонизм* между различными группами микробов. Так, молочнокислые бактерии в процессе жизнедеятельности образуют молочную кислоту, которая подавляет развитие большинства гнилостных бактерий. Это используется при хранении кисломолочных продуктов, сыров, при консервировании силоса, квашении капусты и других продуктов. Зная отношение различных микроорганизмов к реакции среды и регулируя ее pH, можно подавлять или стимулировать их развитие.

Окислительно-восстановительный потенциал (ОВ) служит количественной мерой способности некоторых соединений или элементов отдавать электроны. Он отсчитывается относительно потенциала молекулярного водорода. Окислительно-восстановительные условия питательной среды выражаются величиной окислительно-восстановительного потенциала, который принято обозначать E_h (rH₂). Окислительно-восстановительный потенциал среды представляет собой отрицательный логарифм числа, выражающего давление (в МПа) молекулярного водорода при давлении H₂ 0,1 МПа. ОВ потенциал среды равен 0. Величина E_h минимальна при насыщении среды водородом и максимальна при насыщении ее кислородом. Она измеряется от 0 до 41 единиц. При равновесии окислительно-восстановительных процессов в среде rH₂ равен 28. Присутствие в среде окисляющих веществ (метиленового синего, резазурина, кислот, перманганата калия и др.) повышает значение потенциала. Значение же соединений, обладающих восстановительными свойствами (цистеин, тимоловая кислота), снижает потенциал. ОВ потенциал также резко уменьшается при отмирании микроорганизмов, лизисе их фагом и действии на культуры лизоцимом. Изменяя ОВ потенциал среды, можно повлиять на интенсивность размножения различных групп микроорганизмов и направленность вызываемых ими биохимических процессов. По отношению к окислительно-восстановительным условиям среды микроорганизмы разделяют на четыре основные группы: облигатные аэробы, облигатные и факультативные - анаэробы и микроаэрофилы. Облигатные анаэробы развиваются при низком значении E_h (0-14), факультативные анаэробы при E_h (0-30), аэробные микроорганизмы E_h (11-35), микроаэрофилы - E_h (10-20).

2. Наименование вопроса №2. Влияние антисептических веществ на микробную клетку

Влияние антисептических веществ на микробную клетку может проявляться различным действием. Одни подавляют жизнедеятельность или задерживают развитие чувствительных к ним микробов. Такое действие называют бактериостатическим (в отношении бактерий) или фунгистатическим (в отношении мицелиальных грибов). Другие вещества вызывают гибель микроорганизмов, оказывая на них соответственно бактерицидное или фунгицидное действие. В очень малых дозах многие химические яды оказывают даже благоприятное действие, стимулируя размножение или биохимическую деятельность микробов. В каждом конкретном случае доминирующий эффект зависит от химической природы этого антимикробного агента. Эффективность действия химических веществ на микроорганизмы зависят от природы вещества, концентрации, биологических

особенностей микроорганизмов, продолжительности воздействия, температуры, состава и pH среды. Чувствительность микроорганизмов к одному и тому же антисептику неодинакова. Из неорганических соединений сильными ядами для микробов являются: *соли тяжелых металлов* (свинца, меди, цинка, серебра, золота, ртути), *различные окислители* (хлор, хлорная известь, хлорамин, йод, бром, перманганат калия, пероксид водорода, озон, диоксид углерода, аммиак и др.), *минеральные кислоты* (борная, серная, хлористоводородная, азотная и др.), *щелочи* (гидроксид натрия, гидроксид калия и др.).

Среди органических соединений губительное воздействие оказывают органические кислоты (молочная, салициловая, масляная, уксусная, бензойная и др.), используемые в качестве консервантов в пищевой и парфюмерно-косметической промышленности. Консервант должен обладать определенными липофильными свойствами для того, чтобы проникать через гидрофобную клеточную оболочку или разрушать ее. В то же время, для антимикробного действия консерванту требуется хорошая растворимость в воде, так как развитие микроорганизмов происходит исключительно в водной фазе и поэтому консервант должен находиться именно в ней.

Эффективность конкретного консерванта неодинакова в отношении плесневых грибов, дрожжей и бактерий, то есть он не может быть эффективен против всего спектра возможных микроорганизмов, вызывающих порчу пищевых продуктов. Кроме того, к дезинфицирующим веществам этой группы относятся также диэтиловый эфир, спирты жирного и ароматического ряда (этиловый, бутиловый, амиловый, пропиловый и др.), эфирные масла, смолы, дубильные вещества, органические красители, формалин, фенол, крезол и их производные.

Ионы серебра и золота обладают олигодинамическим действием. В очень малых количествах, не поддающихся химическому обнаружению, они губительно действуют на микробные клетки. На этом основан метод дезинфекции воды с помощью серебряных фильтров. Посуда из серебра при контакте с водой сообщает ей бактерицидные свойства, этим объясняется длительное хранение «святой воды».

Химические вещества, бактерицидно действующие на микроорганизмы в небольших концентрациях, называют антисептическими или дезинфицирующими. Механизм бактерицидного действия антисептических веществ заключается в том, что в результате взаимодействия химического яда с веществами цитоплазмы в ней происходят необратимые изменения, вызывающие нарушения процессов жизнедеятельности и приводящие к гибели клетки. Соли тяжелых металлов вызывают коагуляцию белков клетки. Олигодинамическое действие серебра и др. тяжелых металлов заключается в том, что положительно заряженные ионы металлов адсорбируются на отрицательно заряженной поверхности микробов, изменяется проницаемость их цитоплазматической мембраны и при этом нарушаются процессы питания и размножения микроорганизмов. Окислители действуют на сульфгидрильные группы активных белков и влияют на другие группы (феноловые, тиоловые, индольные и аминные). Неорганические кислоты и щелочи гидролизуют белки клетки. Диоксид углерода, сероводород, цианистые соединения инактивируют ферменты клетки. Органические спирты, диэтиловый эфир, ацетон разрушают полипептидную оболочку клетки. Формалин (40%-й раствор формальдегида) присоединяется к аминок группам белков и вызывает их денатурацию. Многие антисептические вещества используются в медицине, сельском хозяйстве, в промышленности и в быту, как дезинфицирующие средства для борьбы с болезнетворными микробами. Широко применяют хлор и его соединения для дезинфекции питьевой воды, тары, оборудования, инвентаря. Антисептические вещества используют для защиты от микробных поражений текстильных материалов, древесины, бумаги и изделий из нее, других материалов и объектов. Применение антисептиков для консервирования продуктов ограничено и строго нормируется санитарным законодательством.

В нашей стране разрешено использовать немногие химические консерванты в малых дозах (от сотых до одной двух десятых процента) и только для некоторых пищевых продуктов. Для консервирования полуфабрикатов из плодово-ягодного сырья, рыбных консервов, кетовой икры используют бензойную кислоту и ее натриевую соль. В качестве консерванта для многих пищевых продуктов все чаще применяют сорбиновую кислоту и ее соли. Эта кислота менее токсична, чем бензойная и сернистая, и более активно воздействует на микроорганизмы. При концентрации 0,03-0,1% эта кислота на длительное время задерживает рост грибов, дрожжей и некоторых бактерий и при этом безвредна для людей, не придает продукту посторонних вкуса и запаха. Особенно эффективно действие сорбиновой кислоты в кислой среде pH 3-4,5. Этот консервант вводят непосредственно в продукт или обрабатывают им поверхность продукта, оберточные материалы. Для борьбы с картофельной болезнью хлеба, для предотвращения его плесневения рекомендуется введение в тесто солей пропионовой кислоты. Этот консервант можно применять и для некоторых рыбных продуктов.

1. 9 Лекция №9 (9 часа).

Тема: «Действие биологических факторов на рост микроорганизмов»

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Взаимоотношения микроорганизмов внутри сообщества.
2. Взаимодействие бактериофага и микробной клетки
3. Воздействие антибиотиков на микробную клетку

1.9.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1. Взаимоотношения микроорганизмов внутри сообщества.

Биологические факторы, обладающие свойством воздействовать на микроорганизмы, весьма разнообразны. Все живые существа объединены в устойчивые экологические системы – биоценозы. Взаимоотношения между отдельными видами микроорганизмов в пределах одного сообщества могут быть различными и проявляться в форме синергизма, сателлизма, антагонизма и др.

Синергизм. Для такого типа взаимоотношений между особями микробной ассоциации характерны одинаковые физиологические процессы у различных микроорганизмов, в результате чего имеет место увеличение количества веществ, синтезируемых микробной ассоциацией.

Сателлизм. При таком типе взаимоотношений происходит стимуляция роста одного вида микроорганизма продуктами жизнедеятельности другого.

Антагонизм. Для этого типа взаимоотношений характерно угнетение жизнедеятельности (а иногда и полное уничтожение) одних микроорганизмов веществами, синтезируемыми другими микроорганизмами.

Паразитизм – это такое отношение между членами ассоциации, при котором один из организмов (паразит) получает необходимые вещества за счет другого организма (хозяина), нанося при этом вред, что приводит к гибели хозяина.

Кроме взаимного влияния микроорганизмов друг на друга существуют и другие биологические объекты и, следовательно, и другие виды воздействия. Особый интерес представляет фагия. Это одна из форм взаимодействия между фагами (по своей природе это вирусы) и другими микроорганизмами (бактериями, актиномицетами, синезелеными водорослями).

2. Наименование вопроса №2. Действие бактериофагов на микроорганизмы

Взаимоотношения между фагом и чувствительной к нему клеткой очень сложны и не всегда завершаются лизисом клетки и размножением в ней фага. Одни бактериофаги весьма специфичны и способны лизировать клетки только одного какого-либо вида микроорганизмов (монофаги), другие — клетки разных видов (полифаги). Рассмотрим такую инфекцию клетки, которая заканчивается гибелью клетки и размножением в ней фага. Такая инфекция называется продуктивной. Важнейшей особенностью размножения фага является то, что оно может происходить только в живых клетках, находящихся в стадии роста. В мертвых клетках, а также продуктах клеточного обмена размножение фага не происходит. По характеру взаимодействия с микробной клеткой различают вирулентные и умеренные Б. Процесс взаимодействия вирулентного Б. с клеткой весьма сложный и состоит из следующих последовательно протекающих этапов (рис. 10): 1) адсорбция фаговой частицы на поверхности микробной клетки; 2) проникновение содержимого головки фаговой частицы (нуклеиновой кислоты) в микробную клетку; 3) внутриклеточное развитие фага, заканчивающееся образованием новых фаговых частиц; 4) лизис клетки и выход из нее новых фагов.

Время с момента инфицирования клетки фагом до лизиса клетки называется латентным или скрытым периодом. Продолжительность этого периода различна для разных типов фага, зависит от окружающей температуры, состава среды и других факторов. Латентный период фагов, специфичных для одних бактерий, 15—40 мин, для других — 5 ч и более. У фагов актиномицетов латентный период может быть еще продолжительнее. При низкой температуре латентный период значительно увеличивается. Из всех этапов размножения фага наиболее изучен первый — адсорбция. Адсорбция фага на клетке — реакция весьма специфичная. В клеточной стенке бактерий имеются особые структуры (рецепторы), к которым могут прикрепиться фаги. Адсорбируются на рецепторах только те фаги, к которым чувствительна клетка. Фаги, имеющие отростки, прикрепляются к микробной стенке свободным концом отростка. Нитевидные фаги, а также фаги, не имеющие отростков, адсорбируются не на микробной стенке, а на нитевидных структурах, окружающих стенку, — фимбриях. Описаны фаги, которые прикрепляются отростком к бактериальным жгутикам. У некоторых фагов процесс адсорбции может осуществляться лишь в том случае, когда в среде имеются определенные вещества — кофакторы: аминокислоты (триптофан, тирозин и др.) или соли (кальциевые, магниевые). На конце фагового отростка имеется особый фермент типа лизоцима. После адсорбции фага под влиянием этого фермента происходит растворение стенки микробной клетки и содержимое головки фага — нуклеиновая кислота — перекачивается в микробную клетку. Этим завершается второй этап процесса размножения фага. Остальные структуры фаговой частицы — оболочка головки, отросток и его субструктуры — внутрь инфицированной фагом клетки не попадают. Их роль заключается в обеспечении сохранности фаговой частицы, находящейся вне клетки, и содействии проникновению фаговой нуклеиновой кислоты в клетку при инфекции. У нитевидных фагов, в отличие от других видов фагов, внутрь клетки проникает весь белок или его часть. После проникновения нуклеиновой кислоты фага в клетку начинается сложный процесс внутриклеточного размножения фага. Под влиянием нуклеиновой кислоты фага резко изменяется весь обмен микробной клетки. Основные процессы, протекающие в инфицированной клетке, направлены на образование новых фаговых частиц. Инъекцированная ДНК подавляет синтезирующие механизмы клетки, заставляя ее синтезировать ДНК и белки бактериофага. Из образовавшихся в разных частях клетки в разное время фаговой нуклеиновой кислоты и белка формируются новые фаговые частицы (сборка Б.). Вначале формируются отдельно головки и отростки, которые затем объединяются в зрелые фаговые частицы. К этому времени внутри клетки образуется особый литический фермент, который вызывает лизис клетки изнутри. Клетка распадается, и новые зрелые частицы фага выходят наружу. Количество новых фаговых частиц, образуемых одной клеткой при фаговой инфекции, называют выходом фага или

его урожайностью. Выход фага зависит от свойств данного фага и не зависит от клетки-хозяина и ее размеров. Одни фаги отличаются очень низким выходом (5—50 частиц на клетку), у других выход значительно выше (от 1000 до 2500). Особенно высоким выходом отличаются мелкие РНК-овые фаги (свыше 20 000 частиц на клетку). Если большое количество бактериальных клеток смешать с небольшим количеством фаговых частиц, то процесс размножения фагов проходит несколько циклов. В начале инфицируется часть клеток. Первое потомство фага инфицирует оставшиеся клетки — происходит второй цикл, за ним может следовать третий и т.д., пока не будут лизированы все чувствительные к данному фагу клетки. Среди фагов встречаются такие, размножение которых возможно лишь при наличии в среде определенных кофакторов. Одни из этих веществ, как уже указывалось, необходимы для адсорбции фага; другие — для внутриклеточного размножения фага. Абсолютное большинство фагов вызывают при размножении лизис клетки и ее гибель. Лишь в последнее время было установлено, что при инфицировании клетки нитевидными фагами возможно размножение их без гибели клетки. Если произвести рассев по поверхности агаризованной питательной среды в чашках Петри смеси фага и чувствительных к нему микробов и чашки выдержать в термостате, то происходит лизис клеток в результате размножения фага. Если взять большое количество частиц фага, то лизируется большая часть или весь выросший газон культуры. Если количество фаговых частиц таково, что они распределяются только на отдельных участках газона, лизируя в этих местах культуру, то возникает колония фага. Эти колонии фага получили название бляшек, стерильных пятен. Правильнее их называть негативными колониями. Каждая негативная колония состоит из десятков и сотен миллионов фаговых частиц. Размер негативных колоний и их форма зависят в первую очередь от свойств фага, а также от состава среды и культуры микробов. У одних фагов негативные колонии очень мелкие и еле видимы невооруженным глазом, другие достигают 10 мм в диаметре и более. Колонии бывают светлые и четкие, когда лизировалась вся культура, или мутноватые, когда лизировались не все клетки. Вокруг негативных колоний некоторых фагов могут возникнуть различной формы и величины ореолы.

Лизогения и её биологическое значение. При изучении явления бактериофагии исследователи обратили внимание на то, что иногда встречаются культуры микроорганизмов, которые содержат фаги, хотя на эти культуры фагами и не воздействовали. Явление фагоносительства получило название лизогении. Оно было описано одним из основоположников учения о бактериофагах — Д'Эреллем, который считал, что такие культуры загрязняются фагом извне. Подобные культуры были названы ложнолизогенными. Ложнолизогенные культуры состоят из смеси устойчивых и чувствительных к определенному фагу клеток. Такие культуры могут быть легко освобождены от содержащихся в них фагов или путем нескольких рассевов, или с помощью специфической антифаговой сыворотки, или воздействием антифаговыми веществами. Кроме ложнолизогенных, встречаются такие содержащие фаги культуры, у которых лизо-генное состояние, т. е. способность выделять фаги, стойко сохраняется даже после многочисленных пересевов в среде с антифаговой сывороткой и многократных воздействий антифаговыми веществами. Такие культуры названы истиннолизогенными. Мы расскажем только об этих культурах, которые будем называть лизогенными. Лизогенными культурами являются такие культуры, которые обладают способностью продуцировать зрелые частицы фага без воздействия на них фагом извне. Это свойство стойко передается по наследству. В лизогенной культуре фаг находится внутри клетки. Для понимания сущности лизогении особо важное значение имел вопрос: в каком состоянии фаг находится внутри лизогенной клетки? Опыты с искусственным разрывом клеток лизогенных культур под влиянием разнообразных физических и химических факторов (ультразвука, антибиотиков, литических ферментов и т. д.) не выявили наличия в клетках зрелых частиц фага. Важное значение для понимания истинной природы лизогении имели работы А. Львова и А. Гутмана (1950). Оригинальные опыты этих

исследователей убедительно показали, что в лизогенной клетке фаг находится не в виде зрелых частиц, а в какой-то другой, неинфекционной для клетки форме. Такую форму назвали профагом. Именно умеренные фаги могут находиться в лизогенных клетках в виде профага. Клетку можно экспериментально сделать лизогенной. Такой эксперимент помог выяснить механизмы процесса, благодаря которому клетка становится лизогенной. Оказалось, что при воздействии на клетку умеренным фагом часть популяции клеток лизируется, а другая часть становится лизогенной. При этом фаг адсорбируется клеткой и его нуклеиновая кислота проникает внутрь клетки. Однако, в отличие от продуктивной инфекции, вызываемой вирулентным фагом, при лизогенизации нуклеиновая кислота фага связывается с ядерным аппаратом клетки (хромосомой) и остается в ней в виде профага. Вопросы локализации профага в клетке и формы его связи с клеткой являются важнейшими проблемами лизогении. По данным ряда исследователей, каждый профаг занимает определенное место на хромосоме лизогенной клетки. При делении клетки профаг воспроизводится со скоростью, равной скорости воспроизводства генетического материала клетки, что способствует передаче лизогенного состояния потомству. Следовательно, в лизогенной клетке профаг ведет себя как ее нормальный компонент. При лизогенизации происходит объединение генетического материала клетки с генетическим материалом фага на молекулярном уровне. Известны пока единичные случаи, когда профаг не связан с хромосомой, а расположен на мембранах клеточной цитоплазмы. Итак, в лизогенной клетке фаг является дополнительным генетическим фактором, который может неопределенно длительное время находиться внутри клетки и, как всякий генетический фактор, определять свойственные ему признаки. Лизогенные культуры устойчивы (или иммунны) к тому фагу, который они содержат, а также к близкородственным ему фагам. При размножении лизогенной культуры какая-то часть клеток популяции лизируется и освобождает зрелые частицы специфичного для этой популяции умеренного фага. Образование лизогенными культурами зрелых частиц фага получило название спонтанной индукции. Количество лизируемых клеток и количество образовавшихся зрелых частиц фага зависят от особенностей данной культуры и условий выращивания. В то же время количество клеток, освобождающих фаги, может быть резко увеличено при воздействии на лизогенную культуру некоторыми физическими и химическими факторами, получившими название индуцирующих. При индукции некоторых лизогенных культур удавалось вызывать образование зрелых частиц фага почти у всех клеток. К индуцирующим агентам относятся ультрафиолетовые (УФ), рентгеновские и гамма-излучения, перекиси, азотистый иприт и его гомологи, этиленмин, урацил, многие антибиотики. Наиболее эффективные и широко применяемые индуцирующие факторы — УФ-лучи и антибиотик митомицин С. Как отмечалось, важным свойством лизогенной культуры является ее устойчивость к содержащемуся в ней фагу. В связи с этим выделение и изучение умеренных фагов лизогенной культуры возможно лишь в том случае, когда имеется другая культура того же вида, которая чувствительна к умеренному фагу данной лизогенной культуры. Такие культуры получили название индикаторных. К лизогенным культурам, особенно широко распространенным в природе, сравнительно легко можно подобрать индикаторные культуры среди других разновидностей этого же вида. В отдельных случаях умеренный фаг лизогенной культуры может спонтанно (без внешних воздействий) или под влиянием различных факторов измениться и стать вирулентным. Тогда фаг приобретает способность лизировать все клетки данной культуры. У некоторых лизогенных культур превращение умеренного фага в вирулентный происходит сравнительно легко. Имеется ряд культур, у которых экспериментально не удавалось превратить умеренный фаг в вирулентный. Возможность возникновения вирулентных мутантов умеренных фагов имеет большое теоретическое и практическое значение. Не редки случаи, когда единственным доказательством лизогенности культуры является возникновение вирулентных мутантов ее умеренного фага. Лизогения широко распространена среди всех систематических групп

микроорганизмов. Это явление детально изучено у сальмонелл — возбудителей брюшного тифа и паратифа, у дифтерийной палочки; все культуры этих видов патогенных бактерий оказались лизогенными. Лизогения широко распространена среди стрептококков, споровых форм бактерий, клубеньковых бактерий, актиномицетов, микобактерий и др.; она выявлена и у некоторых мицелиальных грибов (пенициллов) и дрожжей. Есть все основания утверждать, что абсолютное большинство микроорганизмов являются лизогенными. Ни про одну культуру нельзя с уверенностью сказать, что она не лизогенная. За последнее время накапливается все больше данных о том, что многие лизогенные культуры содержат 2, 3, 4 и более умеренных фагов, т. е. являются полилизогенными. Например, многие актиномицеты, проактиномицеты, клубеньковые бактерии и некоторые спороносные бактерии содержат 4 и более фагов. Содержащиеся в полилизогенных культурах фаги часто резко различаются между собой по форме частиц, антигенным свойствам и спектру литического действия. Полилизогенные культуры можно экспериментально получить с помощью воздействия на них одновременно или последовательно различными умеренными фагами. Полученные таким способом культуры не отличаются от выделенных из природных источников. Как уже отмечалось, профаг лизогенной культуры способен превратиться спонтанно или при индукции в зрелую полноценную фаговую частицу. Однако в ряде случаев под влиянием различных факторов у профага возникают стойкие наследуемые изменения (мутации), в результате которых он при индукции не способен превращаться в полноценную частицу. Поэтому у таких культур возникают частицы, состоящие только из головки или только из одного отростка. Возможны и другие нарушения в структуре фаговой частицы. При индукции таких культур лизогенная клетка лизируется, но образовавшиеся частицы как неполноценные не способны к размножению на индикаторной культуре. Наиболее детально изучены дефектные фаги, у которых образуются одни лишь отростки. Такие фаги способны адсорбироваться на клетке, убить ее, но не могут размножаться. В последнее время такие дефектные фаги привлекли к себе внимание исследователей, так как было установлено, что многие описанные в литературе бактериоцины (вещества, убивающие бактерии) представляют собой дефектные фаговые частицы. Существуют два принципиально различных типа бактериоцинов. Одни из них отличаются низким молекулярным весом, не осаждаются при центрифугировании, чувствительны к ферменту трипсину, термолабильны и в электронном микроскопе не видны. Бактериоцины другого типа обладают высоким молекулярным весом, осаждаются при центрифугировании, термостабильны и в электронном микроскопе видны в виде фагоподобных частиц или отдельных компонентов фаговой частицы (преимущественно в виде отростков). О происхождении бактериоцинов первого типа и о возможной связи их с лизогенным состоянием культуры-продуцента никаких данных нет. В то же время многими исследователями показано, что образование бактериоцинов второго типа тесно связано с дефектной лизогенией продуцента. Наиболее убедительное доказательство дефектной лизогении — выявление дефектных фаговых частиц, количество которых значительно увеличивается при индукции.

Имеются все основания утверждать, что дефектная лизогения довольно широко распространена. Она выявлена у очень многих культур, например у актиномицета, продуцирующего антибиотик стрептомицин, клубеньковых бактерий, спороносных бактерий, применяемых для борьбы с вредными насекомыми. Выявлены дефектные фаговые частицы, обнаруженные у кишечной палочки и названные колицином. Кроме того, были выявлены и описаны полилизогенные культуры актиномицетов, которые одновременно содержали нормальные и дефектные фаговые частицы. Как уже отмечалось, профаг в лизогенной культуре связан с ядерным аппаратом клетки и является дополнительным генетическим фактором. Профаг в лизогенной клетке ведет себя как ген, хотя между ними имеются принципиальные различия. За последние годы достигнуты большие успехи не только в изучении сущности лизогении, но и в выяснении роли

профагов как дополнительных генетических факторов. Изменения, вызываемые профагом в лизогенной клетке, получили название лизогенных конверсии. Лизогения, несомненно, одно из самых интересных явлений в биологии микроорганизмов, теоретическое и практическое значение которого далеко выходит за пределы микробиологии. Изучение этого явления сыграло большую роль в формировании представлений о фагах, их происхождении, о взаимоотношениях фагов с клеткой-хозяином. Не исключено, что лизогенизация является одним из механизмов защиты микробной клетки от фаговой инфекции, выработанным клеткой в процессе длительной эволюции. Лизогенизация в известной степени биологически выгодна и клетке, и фагу. Клетка при лизогенизации становится устойчивой не только к данному фагу, но и к родственным ему фагам и, кроме того, приобретает дополнительные свойства.

Фаг же приобретает устойчивость к разнообразным внешним воздействиям и в то же время сохраняет потенциальную возможность перейти в вегетативное состояние и в состояние зрелой инфекционной частицы. Широкое распространение лизогении дает основание рассматривать это явление не как исключительное, а как нормальное на данном этапе эволюции микробов.

Фаги, как и микроорганизмы, способны изменять все свои свойства: форму и размеры негативных колоний, спектр литического действия, способность к адсорбции на микробной клетке, устойчивость к внешним воздействиям, антигенные свойства. Особенно часто наблюдаются изменения морфологии негативных колоний, спектра литического действия и превращение умеренных фагов в вирулентные. Большие изменения могут наблюдаться в тонкой структуре фаговой частицы — возникают дефектные частицы, лишенные головки, отростка, нитевидных образований или других субструктур. Изменения фагов могут быть наследственными (мутации) и не наследственными (фенотипические). Фенотипические изменения зависят от условий, в которых образуются фаговые частицы. Важное значение имеют изменения, вызываемые клеткой-хозяином, т.е. той культурой, на которой фаг размножается. Эти изменения большей частью носят фенотипический характер и касаются преимущественно формы негативных колоний, спектра литического действия и вирулентности. Под влиянием клетки-хозяина возможны и стойкие изменения типа мутаций. С помощью разных мутагенных факторов (лучистой энергии, химических агентов) могут быть получены разнообразные мутанты. Особый интерес представляют изменения, происходящие при одновременном размножении на одной и той же культуре двух родственных по антигенным свойствам фагов. При этом в потомстве возникают частицы каждого из этих фагов и, кроме того, формы, которые приобрели свойства обоих родителей (гибридные формы). Под влиянием фагов могут существенно изменяться все свойства микроорганизмов — морфология клеток, строение колоний, токсичность, подвижность и т.д. Изменения, вызываемые фагом, могут быть наследственными и ненаследственными. Механизмы, приводящие к изменению клеток под влиянием фагов, различные. В отдельных случаях фаг играет лишь роль отбирающего фактора: под его влиянием лизируются все чувствительные к нему клетки данной популяции и остаются лишь те клетки, которые еще до воздействия фагом были по разным причинам устойчивы к нему. При выращивании микроорганизмов в жидкой среде совместно с активным против них фагом обычно наблюдается следующее. Сначала среда мутнеет, а затем просветляется в результате лизиса клеток. В ряде случаев через некоторое время (разное для разных микробов и фагов) культуральная жидкость снова мутнеет. Помутнение среды происходит вследствие возобновления роста культуры. На агаризованных средах при нанесении фага на газон чувствительной к нему культуры можно наблюдать вначале лизис культуры в местах нанесения фага, а через некоторое время на лизированных участках появляется рост культуры, обычно в виде отдельных колоний. Культуры, ставшие устойчивыми к фагу, могут одновременно приобрести и ряд новых свойств. Этим обычно пользуются при получении фагоустойчивых культур для промышленных целей.

Бактериофаги – альтернатива антибиотикам

Сравниваемые особенности	Антибиотики	Бактериофаги
Частота развития вторичной резистентности	От незначительной до очень высокой	Не характерно
Профилактическое использование	Неэффективно, противопоказано	Широко используется
Длительность создания нового препарата	От нескольких лет до десятилетий	От нескольких дней до нескольких месяцев
Сравниваемые особенности	Антибиотики	Бактериофаги
Концентрация в инфекционном очаге	Отличается для разных препаратов, зависит от локализации процесса, скорость снижения различна	Нарастает путем саморазмножения, снижается после ликвидации инфекции
Влияние на ферментные системы организма	Характерно для препаратов	Не описано
Наличие побочных эффектов и осложнений	Аллергические, токсические, конкурентные (в отношении прочих медикаментов), дизбиотические изменения при различных органах, в том числе – тяжелые (псевдомембранозный колит, ассоциированный с Clostridium difficile))	Не характерно. Редко – аллергические реакции. Могут вызывать реакцию высвобождения при массивном разрушении микроорганизмов. Дизбиотических нарушений не вызывают, сено используются для их коррекции.
Рациональная комбинация с антибактериальными препаратами	Зависит от класса антибактериальных средств и может быть по типу суммации, потенцирования и т.д., в зависимости от точки приложения воздействия препарата на бактериальную клетку.	Всегда по типу взаимного потенцирования, по предварительным данным – вне зависимости от класса препарата.
Совместимость с другими медикаментами	Различная, (конкуренцией за ферментные системы, связывание с тканями, усиление токсических эффектов и пр.)	Полная, в том числе и с антибиотиками.
Активность в отношении патогенных микробов	Различная. Подавляют облигатную флору организма, вызывая дисбиотические нарушения. Число чувствительных штаммов организма, не вызывающих дизбиоз..	Число чувствительных штаммов составляет 70-90%. Не влияют на облигатную флору, не вызывают дизбиоз..

3. Наименование вопроса №3. Действие антибиотиков на микроорганизмы

Кроме перечисленных широко используется действие еще одной группы биологически активных веществ, способных избирательно подавлять рост, инактивировать микроорганизмы, грибы, риккетсии, простейших и др. Это обширная группа антибиотиков, в настоящее время насчитывающая около 2000 соединений различного

происхождения.

По происхождению антибиотики подразделяют на шесть групп:

1. антибиотики, образуемые грибами и лишайниками. К этой группе относят пенициллин, гризеофульвин, цефалоспорин, усниновая кислота;

2. антибиотики, продуцируемые актиномицетами. К этой группе относят стрептомицин, неомицин, канамицин, хлортетрациклин, хлорамфеникол, эритромицин, тилозин, нистатин;

3. антибиотики, продуцируемые бактериями. Эта группа менее обширна, чем группа антибиотиков грибного и актиномицетного происхождения. Способностью продуцировать антибиотики обладают в большинстве своем сапрофитные бактерии, обитающие в почве.

К этой группе относят колицин, грамицидин, пиоционин, субтилин, полимиксин. Некоторые из этих антибиотиков токсичны при парэнтеральном введении и применяются местно.

4. антибиотики животного происхождения. К этой группе относят вещества, образуемые тканями животных: эритрин, выделяемый из эритроцитов некоторых животных; экмолин, полученный из тканей рыб; лизоцим, интерферон;

5. антибиотики растительного происхождения. Многие растения способны синтезировать летучие и нелетучие вещества, обладающие бактерицидным и бактериостатическим действием на микроорганизмы. Такие соединения называют фитонцидами. Фитонциды призваны обеспечить защиту растений от возбудителей различных заболеваний. Некоторые фитонциды выделены в чистом виде. Например, аллицин – из чеснока, рафанин – из семян редиса, иманин – из зверобоя;

6. синтетические антибиотики, полученные искусственно путем биосинтеза.

По механизму действия выделяют четыре основные группы антибиотиков:

1. антибиотики, ингибирующие синтез пептидогликана клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины);

2. антибиотики, нарушающие функцию цитоплазматической мембраны (грамицидин, полиены);

3. антибиотики, разрушающие рибосомальные субчастицы и сдерживающие синтез белка (тетрациклины, амино-гликозиды, макролиды);

4. антибиотики, избирательно подавляющие синтез нуклеиновых кислот (гризеофульвин, неомицин, новобиоцин).

Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков вызвана несколькими причинами. В основном они сводятся к следующим. Во-первых, в любой совокупности микроорганизмов, сосуществующих на каком-то определенном участке субстрата, встречаются естественно устойчивые к антибиотикам варианты (примерно одна особь на миллион). При воздействии антибиотика на популяцию основная масса клеток гибнет (если антибиотик обладает бактерицидным действием) или прекращает развитие (если антибиотик обладает бактериостатическим действием). В то же самое время устойчивые к антибиотикам единичные клетки продолжают беспрепятственно размножаться. Устойчивость к антибиотикам этими клетками передается по наследству, давая начало новой устойчивой к антибиотикам популяции. В данном случае происходит селекция (отбор) устойчивых вариантов с помощью антибиотика. Во-вторых, у чувствительных к антибиотикам микроорганизмов может идти процесс адаптации (приспособления) к вредному воздействию антибиотического вещества. В этом случае может наблюдаться, с одной стороны, замена одних звеньев обмена веществ микроорганизма, естественный ход которых нарушается антибиотиком, другими звеньями, не подверженными действию препарата. При этом микроорганизм также не будет подавляться антибиотиком. С другой — микроорганизмы могут начать усиленно вырабатывать вещества, разрушающие молекулу антибиотика, тем самым нейтрализуя его действие. Например, ряд штаммов стафилококков и спороносных бактерий образует фермент пенициллиназу, разрушающий

пенициллин с образованием продуктов, не обладающих антибиотической активностью. Это явление называется энзиматической инактивацией антибиотиков. Основные пути преодоления устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, снижающей эффективность лечения, следующие: 1) изыскание и внедрение в практику новых антибиотиков, а также получение производных известных антибиотиков; 2) применение для лечения не одного, а одновременно нескольких антибиотиков с различным механизмом действия; в этих случаях одновременно подавляются разные процессы обмена веществ микробной клетки, что ведет к быстрой ее гибели и в значительной степени затрудняет развитие устойчивости у микроорганизмов; применение комбинации антибиотиков с другими химиотерапевтическими препаратами. Например, сочетание стрептомицина с парааминосалициловой кислотой (ПАСК) и фтивазидом резко повышает эффективность лечения туберкулеза; 3) подавление действия ферментов, разрушающих антибиотики (например, действие пенициллиназы можно подавить кристалли violetом); 4) освобождение устойчивых бактерий от факторов множественной лекарственной устойчивости (R-факторов), для чего можно использовать некоторые красители.

1. 10 Лекция №10 (10 часа).

Тема: «Адаптация микроорганизмов к экстремальным средам и условиям»

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Адаптация микроорганизмов к действию низких температур
2. Адаптация микроорганизмов к действию высоких температур
3. Адаптация микробов к экстремальным значениям pH
4. Адаптация микробов к высоким концентрациям солей и растворённых веществ и к условиям недостатка воды

1.10.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1. Выживание бактерий при низких температурах

Бактерии обладают весьма сложными и совершенными механизмами молекулярных адаптаций, о существовании которых еще относительно недавно нельзя было даже предположить. Давно известно, что жизнь встречается в самых суровых условиях: в горячих источниках, которые нередко отличаются повышенной кислотностью; в соленых озерах и солевых источниках; в источниках с повышенной кислотностью (например, в рудничных стоках), которые могут содержать также токсичные тяжелые металлы в высоких концентрациях; на сухих поверхностях скал и в пустынях; при температурах около точки замерзания воды и даже ниже ее. Большой интерес к адаптации микроорганизмов к разнообразным условиям окружающей среды был вызван и долгое время поддерживался поисками жизни на других планетах. Ведь зная границы жизни на Земле, можно составить представление о физических и химических пределах, в которых жизнь могла возникнуть не только на нашей, но и на других планетах. Изучение механизмов выживания бактерий также имеет очень важное значение для медицины, ветеринарии, фармакологии. Устойчивость микроорганизмов к различным факторам среды ставит вопрос о специальных, новых методах стерилизации и хранения продуктов, что играет важнейшую роль для пищевой промышленности.

Действие температуры на рост микроорганизмов может быть обусловлено ее непосредственным влиянием на скорость химических реакций и на состояние макромолекулярных компонентов клетки (вязкость мембран, конформацию белков и т.д.). В отличие от теплокровных животных микроорганизмы не могут регулировать свою температуру. Их функциональная активность определяется температурой окружающей среды. При пониженной температуре снижается не только скорость роста, но и скорость отмирания, и соответственно увеличивается выживаемость организмов. Микроорганизмы способны выжить в неустойчивых суровых условиях в состоянии, близком к анабиозу,

например в сухих долинах Антарктики и зонах вечной мерзлоты, в течение тысячелетий. Согласно современным представлениям, некоторые микроорганизмы способны развиваться при низкой температуре благодаря следующим особенностям: клетки содержат ферменты, имеющие низкую температуру активации, и в связи с этим способны наиболее эффективно функционировать при низкой температуре; при температуре выше 30 °С данные ферменты прекращают свою деятельность; проницаемость мембран несмотря на низкую температуру, остается высокой в связи с большим количеством ненасыщенных жирных кислот, содержащихся в липидах, в результате мембраны не замерзают; не утрачивается свойство образовывать полисомы при низкой температуре. Приспособление к пониженной температуре проявляется в изменении состава мембран (в ней повышается содержание ненасыщенных жирных кислот) и синтезе криопротекторов (например, глицерола). Другой механизм связан с накоплением в клетках больших количеств наиболее важных ферментов, так что даже при неоптимальной температуре их функционирование позволяет клетке поддерживать достаточную активность. Существуют автохтонные популяции микроорганизмов, которые отличаются низким, но постоянным уровнем активности и использованием для питания органических веществ, уже присутствующих в почве и зимогенные популяции, развивающиеся при поступлении в почву свежих соединений, которые они могут использовать. Автохтонную бактериальную популяцию можно отличить от зимогенной в холодных условиях с устойчивым температурным режимом на основании области температур их роста. В холодных условиях с неустойчивым режимом встречается только зимогенная популяция. Зимогенные бактерии обычно отличаются широкой областью температур роста, поскольку наиболее важным фактором для их выживания является эффективный вторичный метаболизм, который должен осуществляться при температурах ниже оптимума роста.

Микроорганизмы, выделенные из холодных местообитаний с весьма неустойчивым температурным режимом, являются психротрофами. Они способны расти при температурах на 20°C и более превышающих самую теплую температуру. Психрофильные микроорганизмы чаще всего находят в морях. Практически все психрофилы представлены грамотрицательными палочковидными формами. Психрофилию грамотрицательных бактерий обычно рассматривают в связи с особыми свойствами их мембран. В местах с неустойчивой низкой температурой, например в Антарктике, грамотрицательные бактерии, а также грамположительные аэробные и анаэробные спорообразующие организмы встречаются редко. В районах с устойчивой низкой температурой среди бактерий преобладают грамотрицательные палочковидные формы, главным образом *Pseudomonas*, *Vibrio* и другие близкие им организмы, обладающие окислительной активностью. Представители другого класса бактерий, которые распространены преимущественно в холодных условиях с неустойчивым температурным режимом, включают грамположительные кокки и палочки, относящиеся главным образом к родам *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Kurthia*, *Cellulomonas*, а также родственные им организмы. Эти бактерии преобладают в антарктических и арктических почвах, озерах, ледниках, льду и снегу, а также в ледяных пещерах и в верхних слоях атмосферы. Эти организмы отличаются тем, что они способны существовать в очень суровых условиях окружающей среды.

2. Наименование вопроса №2. Адаптация микроорганизмов к высоким температурам

С повышением температуры скорость роста микроорганизмов вначале увеличивается, достигая максимальной, но дальнейшее увеличение температуры ведет к необратимой инактивации клеточных компонентов, прежде всего денатурации белков и нуклеиновых кислот, и гибели клетки. Существуют микроорганизмы, которые не только выживают, но и размножаются, часто облигатно, при температурах, препятствующих в норме существованию каких бы то ни было форм жизни, вследствие разрушения необходимых для них макромолекул. Термофилия включает в себя множество молекулярных

механизмов и не может быть объяснена каким-либо одним свойством организма. Многочисленные сравнительные физико-химические исследования белков термофильных показали различные механизмы выживания бактерий при высоких температурах. Возможность существования термофилов при высокой температуре обусловлена следующими особенностями: составом липидных компонентов клеточных мембран, а именно высоким содержанием длинноцепочечных C17—C19 насыщенных жирных кислот с разветвленными цепями; высокой термостабильностью белков и ферментов (последние имеют низкую молекулярную массу и содержат значительное количество ионов кальция); термостабильностью клеточных ультраструктур. Липиды термофильных организмов имеют более высокие температуры плавления, чем липиды нетермофильных. Липиды мембран действуют как изоляторы, препятствующие переносу тепла из внешней среды и предотвращающие таким образом тепловую денатурацию растворимых ферментов. Большой интерес представляет термофильный ацидофил *Thermoplasma acidophilum*. Термофилия этого организма, растущего при температуре 59°C, связана с наличием длинных изопреновых цепей липидов. Большая часть содержащихся в мембране нейтральных липидов этерифицирована жирными кислотами, а основная масса глико- и фосфолипидов состоит из длинных цепей с простыми эфирными связями. Аминокислотный состав мембранного белка характеризуется относительно низким уровнем заряженных аминокислот и довольно высоким содержанием остатков цистеина. Высокое содержание кислых аминокислот, является обязательным условием для его роста в термофильных условиях. Термофилы способны контролировать физические свойства цитоплазматической мембраны, изменяя ее состав в ответ на изменение температуры.

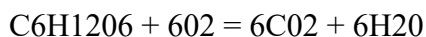
3 . Наименование вопроса №3. Адаптация микробов к экстремальным значениям pH

Концентрация ионов водорода непосредственно влияет на клетку, ее электрический заряд, состояние мембраны, возможность протекания окислительно-восстановительных. Значения реакции среды различных природных вод и растворов, где развиваются микроорганизмы (от pH 1 — 2 в кислых источниках и рудничных стоках до pH 10 в содовых озерах), покрывают почти весь теоретически возможный диапазон значений pH (0— 14). Очень высокие (кислая реакция) или очень низкие (щелочная реакция) концентрации водородных ионов обычно токсичны для большинства организмов. В зависимости от положения оптимального pH развития различают ацидофильные, нейтрофильные и алкалофильные микроорганизмы. Большинство естественных местообитаний имеет нейтральный или близкий к нему (слабокислый или слабощелочной) pH. В таких местообитаниях развиваются организмы, называемые алкалы - или ацидотолерантными и умеренными алкалы- или ацидофилами. Меньше примеров алкалофильных организмов, требующих для своего роста значений pH до 10 и выше (уробактерии и многие цианобактерии). Среди бактерий обнаружено несколько видов, устойчивых к щелочной среде (pH 8,5 и выше). Сюда следует отнести *Bacillus pasteurii* — бактерию, расщепляющую мочевину и хорошо растущую при реакции среды, близкой к pH 11. *B. alcalophilus*, выделенная из сточной воды, способна расти в диапазоне pH 9— 11,5. Выделены и другие бациллы, очень устойчивые к щелочной среде. Цианобактерии могут развиваться в природной среде с pH 7,5—10, некоторые из этих бактерий имеют оптимум pH. Изменения pH окружающей среды могут вызывать у многих микроорганизмов компенсаторные ферментативные сдвиги. Образующиеся в результате амины приводят к снижению кислотности среды. Следовательно, устойчивость клеток к высокой кислотности или щелочности, вероятно, объясняется их структурными или метаболическими особенностями. Все организмы, растущие при экстремальных значениях pH, располагают, механизмами для поддержания внутриклеточного pH на уровне, близком к нормальным физиологическим величинам. Такие кислотолабильные молекулы, как АТР и ДНК, не смогли бы существовать, если бы внутриклеточная концентрация водородных ионов была такой же, как и во внешней среде. Однако по отношению к

внутриклеточной среде трудно применить классическую концепцию рН. Согласно этой концепции, рН является применяемым на практике показателем концентрации или активности ионов водорода в водном растворе, между тем как внутриклеточное содержимое представляет собой коллоидный, а не истинный водный раствор. Измерение величины внутриклеточного рН не дает информации относительно недиссоциированных протонов, связанных с донорными молекулами. Внутриклеточный рН имеет определенную ценность, так как он дает представление об общих условиях, существующих внутри клетки. В поддержании градиентов рН в клетке важную роль играет как природа клеточной стенки и мембраны, так и клеточный метаболизм.

4. Наименование вопроса №4. Адаптация микробов к высоким концентрациям солей и растворённых веществ и к условиям недостатка воды

В живых клетках вода служит средой, в которой молекулы разных размеров взаимодействуют между собой. Структура воды, в которой находятся растворенные вещества, контролирует все жизненно важные процессы в клетке: действие ферментов и регуляцию их активности, ассоциацию и диссоциацию органелл, структуру мембран и их функционирование. Известно, что многие внутриклеточные компоненты микроорганизмов нуждаются в высоких концентрациях Na^+ и K^+ . Белки галофилов содержат много аспартата и глутамата, т.е. они более «кислые», в белках устанавливаются новые гидрофобные взаимодействия, приводящие к более плотной упаковке глобул. На поверхности клеток работает механизм «белкового щита» (S-слои), когда наружу экспонируются COOH -группы аминокислот, удерживающие Na^+ . Эти же группы формируют «гидратированную» оболочку клеток за счет электростатического ориентирования диполей воды. Галофилы осуществляют активный транспорт ионов из клетки, таким образом поддерживая некоторый «осмостаз». Также клетки иногда заменяют Na^+ на K^+ . Для удержания воды в цитоплазме в условиях высокой солености у галофильных микроорганизмов существуют разнообразные механизмы. Основным механизмом приспособления к осмотическому состоянию среды служит синтез микроорганизмами осмопротекторов (осмолитов, или совместимых растворителей) — низкомолекулярных органических веществ, концентрация которых в цитоплазме уравнивает внешнее давление. Для микроорганизмов, развивающихся на суше, большое значение имеет приспособление к сухости и контакту с воздухом. Основными механизмами защиты от высыхания служит образование слизистых капсул или переживающих клеток (спор, конидий, цист). Высокую устойчивость на воздухе обнаруживают многие микобактерии с высоким содержанием липидов в клеточной стенке. Типичными компонентами микроценозов, развивающихся на поверхности камня и в почве, являются микрококки, артробактеры, нокардии, проактиномицеты и актиномицеты. В целом грамположительные бактерии актиномицетной линии рассматривают как континентальную ветвь эволюции прокариот, приспособившуюся к жизни в наземных условиях. Существует предположение о том, что при недостатке воды бактерии используют метаболическую воду, образующуюся в клетке в результате окисления органического вещества кислородом воздуха. Так, из 1 кг глюкозы микроорганизм может получить около 600 г воды по уравнению



Устойчивость к обезвоживанию у разных бактерий неодинакова. Например, численность жизнеспособных клеток *Pseudomonas*, внесенных в воздушно-сухую почву после выдерживания в течение месяца, снижается в 100 раз. В то же время *Azotobacter* остается жизнеспособным в почве даже через десятки лет ее хранения в воздушно-сухом состоянии. Выживаемость азотобактера обусловлена его цистами.

5. Наименование вопроса №5. Реакции микроорганизмов на тяжёлые металлы, токсичные вещества, интенсивное облучение в окружающей среде

Среди микроорганизмов есть формы, устойчивые к действию общих клеточных и метаболических ядовитых веществ (фенол, окись углерода, сероводород и др.), отдельные виды обладают способностью использовать эти соединения в качестве источников питания. Считают, что устойчивость микроорганизмов к токсичным веществам во многих случаях определяется плазмидами. В выработке устойчивости бактерий к токсичным веществам участвуют трансмиссивные плазмиды, несущие гены множественной устойчивости — R-факторы (от англ. resistance — устойчивость). R - факторы обуславливают устойчивость микроорганизмов к нескольким (девять и более) группам веществ — солям тяжелых металлов, а также антибиотикам, лекарственным веществам, и др. Микробы способны концентрировать тяжелые металлы внутри клеток или на их поверхности. Известны следующие соотношения концентраций различных металлов, содержащихся в морской воде и планктоне: кадмий—1:910, кобальт—1:4600, медь—1:7000, железо — 1:87 000, свинец — 1:41 000, марганец — 1:9400, титан— 1:20 000 и цинк—1:65 000. В общем конечная концентрация металла внутри клетки может быть на несколько порядков выше его концентрации в окружающей среде. В одних случаях накопление соответствующих соединений оказывается летальным, а в других — нет. На поглощение ионов металлов могут оказывать влияние физиологическое состояние клеток и условия окружающей среды. Изложенное выше показывает, что у некоторых микроорганизмов выработались специфические механизмы взаимодействия с тяжелыми металлами, мышьяком и сурьмой, присутствующими в окружающей среде, иногда в концентрациях, которые токсичны для многих других микробов и высших форм жизни. Микроорганизмы могут использовать эти вещества в качестве источников энергии или акцепторов электронов в процессе дыхания. В ряде случаев у микробов выработались способы удаления этих веществ из среды путем их осаждения, адсорбции или улетучивания. Эти реакции вносят вклад в детоксикацию среды, которая становится более пригодной не только для микробов, катализирующих такие реакции, но и для других организмов, неспособных развиваться без подобной «помощи».

Хорошо известно, что излучения разных радиаций обладают потенциальной способностью оказывать на живые организмы разрушительное воздействие. Одноклеточные организмы выработали дополнительные средства защиты от летального или повреждающего воздействия облучения. Одноклеточные организмы располагают множеством защитных механизмов, причем многие виды используют не один, а большее число способов борьбы с радиационными повреждениями. Одним из универсальных механизмов адаптации к световому излучению высокой интенсивности и защиты от токсичных форм фотосенсибилизированного кислорода является синтез каротиноидных пигментов. Характерным примером может служить яркая окраска микроорганизмов, живущих в условиях высокой освещенности (в воздухе, на поверхности скал, обнажений горных пород, в высокогорье и т.д. Пигменты действуют как «энергетические ловушки», препятствующие радиации или ее продуктам достигать ДНК или любых других жизненно важных мишеней. Летальный эффект УФ-облучения существенно снижается, если облученные клетки подвергаются затем воздействию видимого света с длинами волн от 360 до 420 нм. Реактивации клеток видимым светом относится его защитное действие. В этом случае увеличение выживаемости клеток наблюдается при освещении их видимым светом перед УФ-облучением. Этот феномен объясняют тем, что видимый свет индуцирует задержку клеточного деления. В результате такой задержки остается больше времени для репарации повреждений, вызываемых УФ-облучением.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

2.1 Практическое занятие №1 (2 часа).

Тема: «Водное занятие по дисциплине. Инструктаж по технике безопасности»

2.1.1 Задание для работы:

1. Познакомиться с объёмом дисциплины, видом промежуточной аттестации, с балльно-рейтинговой системой.
2. Познакомиться с литературой, необходимой для подготовки к занятиям.
3. Прослушать инструктаж по технике безопасности и расписаться в контрольном листе.

2.1.2 Краткое описание проводимого занятия:

Правила техники безопасности в бактериологической лаборатории.

Работа в бактериологических лабораториях сопряжена с опасностью заразиться самим или заразить других патогенными микроорганизмами. Для студентов ветеринарных вузов лабораторией служит кафедра микробиологии. Сотрудники бактериологических лабораторий и кафедры микробиологии, аспиранты, студенты, приходящие на занятия или для работы в научно-студенческих кружках, обязаны ознакомиться с правилами техники безопасности и строго их соблюдать.

Входить в помещение лаборатории и работать в ней разрешается только в специальной одежде — халате и головном уборе (шапочка, косынка). Халат должен быть застегнут, волосы подобраны.

Не разрешается вносить посторонние предметы; личные вещи (портфели, сумки) оставляют в отведенных для этой цели местах.

Категорически запрещается курить и принимать пищу.

Перед началом работы проверяют исправность приборов (газовых и спиртовых горелок). О всех неисправностях сообщают ответственному лицу лаборатории, на учебных занятиях — преподавателю.

Не разрешается зажигать одну горелку от другой во избежание взрыва. Для зажигания горелок используют только спички.

Электроприборы включают с разрешения преподавателя или обслуживающего персонала кафедры. Запрещается касаться проводов и контактных частей электросети.

Рабочее место и оборудование содержат в чистоте, соблюдают опрятность в работе.

Исследуемый материал должен рассматриваться как особо опасный. При работе с ним необходимо соблюдать принятые в микробиологической практике технические правила, исключающие возможность заражения работника.

Движение культур микроорганизмов (посев, хранение, уничтожение) регистрируют согласно действующей инструкции в специальном журнале.

В случае попадания материала или культур микроорганизмов на пол, стол и т. д. обрабатывают эти поверхности дезинфицирующим раствором.

После окончания работы использованный материал (патологический материал, бактериальные, грибные культуры, инструменты и др.) студенты отдают преподавателю или лаборанту для обеззараживания, рабочее место тщательно убирают и дезинфицируют; моют и дезинфицируют руки, халаты и головные уборы складывают в полиэтиленовые пакеты.

После ознакомления с правилами техники безопасности на кафедре микробиологии студенты расписываются в журнале преподавателя.

2.1.3 Результаты и выводы:

1. Ответить на вопросы по технике безопасности

2.2 Практическое занятие №2 (3 часа).

Тема: «Методы стерилизации»

2.2.1 Задание для работы:

1. Познакомится с оборудованием для проведения стерилизации.
2. Провести стерилизацию методом кипячения, УФ-лучами, в сухожаровом шкафу.
3. Заполнить таблицу.

2.2.2 Краткое описание проводимого занятия

Методы стерилизации. 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.

Стерилизация сухим нагретым воздухом. Метод применяют для стерилизации чистой стеклянной посуды. Для этого используют сухожаровой шкаф (печь Пастера) — специальный сушильный шкаф с двойными стенками. Снаружи он облицован теплонепроницаемым материалом. В его верхней части находится термометр. Между теплонепроницаемой обшивкой и внутренним металлическим корпусом на дне помещен автоматический электронагревательный элемент. При включении сушильного шкафа в электросеть воздух внутри него нагревается. По достижении заданной температуры отмечают время начала стерилизации. Режим стерилизации: при температуре 155... 160°C — экспозиция 2 ч, при 165... 170 °C — 1...1,5ч, при 180 °C — 1ч. По истечении времени стерилизации нагревание прекращают, и лишь "когда температура снизится примерно до 45 °C, шкаф открывают. Нельзя стерилизовать сухим жаром воспламеняющиеся вещества, питательные среды, резиновые предметы. Для стерилизации этим методом нужно замонтировать чистую, сухую стеклянную лабораторную посуду и поместить её в сухожаровой шкаф, установить режим 170°C и стерилизовать 1,5 часа. По истечении этого времени шкаф отключить, дождаться падения температуры до 45°C и выгрузить посуду.

Кипячение. Этим методом обычно стерилизуют металлические инструменты, стеклянные и резиновые изделия путем кипячения в дистиллированной воде (лучше в 2%-ном растворе соды) в течение 30-45 мин с момента закипания воды. Стерилизацию осуществляют в специальных стерилизаторах, представляющих собой металлическую коробку с плотно закрывающейся крышкой и вставной решеткой (возможен электрический подогрев).

На решётку настилить два-три слоя марли и разложить металлический инструментарий (пинцеты, скальпели, ножницы). У режущих инструментов поверхность обернуть марлей или ватой. После стерилизации воду осторожно слить, а инструменты использовать только после их охлаждения.

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами. Под влиянием ультрафиолетовых лучей микроорганизмы погибают, причем максимальная бактерицидная активность наблюдается у лучей с длиной волны 253,7-257,5 нм. Источником их являются ртутно-кварцевые и аргоно-ртутные лампы, работающие на принципе газового разряда, возникающего в парах ртути при определенном напряжении тока, подаваемого на электроды лампы. Около 70% испускаемых лампой лучей составляет ультрафиолетовый спектр с длиной волны 253,7 нм. Микробиологический бокс продезинфицировать и включить ртутно-кварцевые лампы на 1 час. Строго соблюдать меры предосторожности.

2.2.3 Результаты и выводы

1. Ответы на вопросы о проведённой работе.
2. Представление заполненной таблицы

Метод стерилизации	Действующие факторы	Режим стерилизации	Контроль качества стерилизации

2.3 Практическое занятие №3 (2 часа).

Тема: «Характеристика питательных среды, используемых в лаборатории»

2.3.1 Задание для работы:

1. Познакомится с требованиями, предъявляемыми к питательным средам, и различными их классификациями.
2. Познакомится с прописями наиболее часто используемых сред.
3. Составить таблицу с информацией о некоторых питательных средах (МПА, МПБ, МПЖ, ППЖ, сред Гисса, среды Эндо, Левина, Плоскирева, ЖСА, кровяном и сыровоточном агаре, среде Кит-Тароцци, глюкозо-кровяном агаре, висмут-сульфит-агаре, агаре Сабуро, сусло-агар).

2.3.2 Краткое описание проводимого занятия:

Среды необходимы для накопления, выделения и сохранения микроорганизмов, а также для выращивания культур с целью исследования их обмена веществ или получения ценных продуктов метаболизма.

Требования, предъявляемые к средам. Среды должны соответствовать следующим условиям: 1) быть питательными, то есть должны содержать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов клетки - источники углерода, азота, зольные элементы, микроэлементы, факторы роста (витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать); 2). иметь оптимальную концентрацию водородных ионов (рН), так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества; 3). быть изотоничными для микробной клетки, т.е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5% раствору натрия хлорида; 4). быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды; 5). плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию; 6). обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, то есть соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RН2. Окислительно-восстановительный потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов; 7) быть по возможности унифицированными, т.е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов.

По консистенции среды бывают жидкие (мясо-пептонный бульон), полужидкие и плотные (мясо-пептонный агар). Основу многих питательных сред составляет мясная вода, которую готовят из свежего нежирного говяжьего мяса. Для приготовления плотных сред к мясной воде прибавляют 1,5- 2,5% агар-агара (полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей) или 10-15% желатина, которые используются для уплотнения среды. При приготовлении полужидких сред вносят 0,1- 0,2% агара.

По составу среды делят на простые и сложные. К первым относят мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь (кровяной агар), сыворотку (сыровоточный агар), углеводы и другие вещества,

необходимые для роста и размножения того или иного микроорганизма.

По происхождению среды для культивирования делят также на три группы: естественные или натуральные, синтетические и полусинтетические. Натуральные среды состоят из продуктов животного и растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. К ним относят: овощные и фруктовые соки, животные ткани, молоко, молочную сыворотку, пивное сусло, мелассу, отвары и экстракты, полученные из природных субстратов. Эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав и используются, главным образом, для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей. К числу натуральных сред, широко применяемых в лабораторной практике, относятся мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, солодовое (неохмеленное пивное) сусло, дрожжевые среды, обезжиренное молоко и т. д.

В состав синтетических сред входят только определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. В большинстве случаев их готовят на водопроводной воде без добавления микроэлементов, так как они в небольших количествах всегда в ней содержатся. При изучении потребностей микроорганизмов в отдельных компонентах минеральных солей для приготовления синтетических сред используют дистиллированную воду. В этом случае микроэлементы вносят в среду обязательно. Синтетические среды используют для исследований, связанных с изучением обмена веществ микроорганизмов.

Среды, в состав которых, наряду с соединениями известной химической природы (углеводы, соли аммония или нитраты, фосфаты и т. д.), входят вещества неопределенного состава (дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт, меласса, гидролиз, молочная сыворотка, барда и т. д.), относят к полусинтетическим. Эти среды обычно используются в биотехнологии для промышленного культивирования микроорганизмов с целью получения витаминов, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

По назначению различают универсальные среды, содержащие питательные вещества, в присутствии которых растут многие виды микроорганизмов (мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар); специальные среды, которые применяют для выращивания микроорганизмов, не размножающихся на универсальных средах; селективные, дифференциально-диагностические, накопительные, оптимальные среды. Селективные среды служат для выделения определенного вида микроорганизмов, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Жидкие селективные среды называют средами накопления. Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды позволяют достаточно быстро отличить одни виды микроорганизмов от других по ферментативной активности, например, среды Гисса с углеводами и индикатором. Состав этих сред подбирают с таким расчетом, чтобы он позволил четко выявить наиболее характерные свойства определенного вида. Примером индикаторной среды для выявления бактерий семейства из группы кишечной палочки является агаризованная среда Эндо, которая содержит лактозу и фуксин, обесцвеченный сульфатом натрия, *E.coli* ферментирует лактозу, фуксин освобождается и окрашивает колонии кишечной палочки в красный цвет.

Накопительные среды были предложены голландским ученым М. Бейеринком. В них интересующий исследователя компонент среды дается в избытке, чтобы выяснить, какой микроорганизм или группа микроорганизмов его используют, поскольку именно он или они будут доминировать в этой среде.

Приготовление обычных питательных сред. Основой для приготовления этих сред служит мясная вода, содержащая экстрактивные вещества.

Посуда. Питательные среды готовят в кастрюлях, эмалированных или из нержавеющей стали. Готовые питательные среды разливают во флаконы, пробирки, чашки. Новую стеклянную посуду кипятят в 1—2% растворе соляной кислоты для

нейтрализации растворимой щелочи, затем тщательно промывают в проточной воде и сушат. Посуду, бывшую в употреблении, стерилизуют, затем моют, прополаскивают и сушат. Сухие флаконы, колбы, пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками.

Мясная вода. 500 г свежей говядины или телятины освобождают от костей, жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, фарш заливают 1 литром водопроводной воды, хорошо размешивают. Оставляют на сутки в прохладном месте или помещают на 2 часа в термостат. Мясную пасту отжимают через марлю, кипятят в течение 5 минут. Для свертывания белков дают остыть. Фильтруют через ватный фильтр, доливают водой до первоначального объема. Мясную воду разливают во флаконы, стерилизуют 20-30 минут при 120°C и сохраняют в темном месте. Она имеет вид прозрачной желтоватой жидкости слабокислой реакции (рН 6,2—6,4), без белков. В мясной воде содержится небольшое количество аминокислот, солей, углеводов, факторов роста и экстрактивных веществ. Для приготовления обычных питательных сред к мясной воде прибавляют сухой пептон, который является первичным продуктом гидролиза белка и состоит из смеси полипептидов и аминокислот, полученных путем пептического или триптического переваривания.

На мясокомбинатах для производства сухого пептона используют фибрин, кровь и другие отходы. Сушат пептон в распылительной вакуум-сушилке.

Жидкий пептон можно приготовить в лабораторных условиях путем пептического переваривания белков.

Мясо-пептонный бульон (МПБ). В 1 л мясной воды растворяют при подогревании и помешивании 10 г пептона (1%) и 5 г (0,5%) хлористого натрия. Рекомендуется брать 3 части хлористого натрия и 2 части двузамещенного фосфорнокислого натрия. Смесь вводится в количестве 0,5%. Фосфорнокислый натрий стабилизирует реакцию среды и служит дополнительным источником фосфора. Устанавливают рН среды до 7,6—7,8, кипятят 30—45 минут до выпадения осадка.

Охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, доливают водой до первоначального объема, проверяют рН.

Разливают по пробиркам, флаконам и стерилизуют 15—20 минут в автоклаве при 120°C.

Концентрированный мясо-пептонный бульон готовят на особой мясной воде (1 кг мяса заливают 1 л воды). Такой бульон служит для выращивания анаэробных и других микробов.

Мясо-пептонный агар (МПА). К мясо-пептонному бульону для придания плотности добавляют 2—2,5% мелко нарезанного и промытого агар-агара.

Агар-агар получают путем специальной обработки морских водорослей. Он является веществом полисахаридной природы, содержит незначительное количество азота и не представляет собой питательный субстрат. Студень, образуемый агар-агаром, расплавляется при 70—100°C и застывает при 40—50°.

Кипятят, помешивая, до полного расплавления агара. В некоторых случаях для просветления среды прибавляют белок одного куриного яйца, смешанного с двойным количеством холодной воды. Среду помещают в автоклав на 45 минут при 115°C. Свернувшиеся хлопья белка адсорбируют взвешенные частицы и осаждаются на дно.

Проверяют и исправляют реакцию среды. Отстаивают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр в горячем автоклаве или в специальной металлической воронке с двойными стенками, между которыми находится горячая вода.

Разливают среду через стеклянную воронку с зажимом в пробирки и флаконы и стерилизуют в автоклаве при 120°C в течение 15—20 минут.

Из расплавленного стерильного мясо-пептонного агара готовят скошенный и прямой агар (агар столбиком). В первом случае пробирки укладывают горизонтально до полного застывания, во втором — пробирки помещают в штатив вертикально.

В настоящее время бактериологические лаборатории широко используют сухие питательные среды в виде порошков, хранящихся в герметически закрытых банках и

пакетах.

Кроме обычных питательных сред (МПБ и МПА), имеются специальные и дифференциально-диагностические среды. Готовят среды по прописи, указанной на этикетке, навеску порошка растворяют в определенном объеме дистиллированной воды, среду разливают в пробирки и стерилизуют при соответствующей температуре. Постоянство состава, стандартность среды, простота и удобство в работе, легкость транспортировки и хранения являются большим преимуществом сухих питательных сред. Для определения рН плотных питательных сред их расплавляют. Определяют рН с использованием рН-метров или (менее точно) с помощью индикаторной бумаги. После установления соответствующего рН среду кипятят, фильтруют, осветляют, разливают во флаконы, пробирки и стерилизуют. Следует учитывать, что после стерилизации среда становится более кислой.

Стерилизация питательных сред. Стерилизацию питательных сред осуществляют различными способами в зависимости от тех ингредиентов, которые входят в их состав. Синтетические среды и все агаровые среды, не содержащие в своем составе нативного белка и углеводов, стерилизуют 15—20 мин в автоклаве при температуре 115—120°C. Среда с углеводами и молоком (в состав которого входит лактоза), питательный желатин стерилизуют текучим паром при температуре 100°C дробно или в автоклаве при 112°C. Среда, в состав которых входят белковые вещества (сыворотка крови, асцитическая жидкость), обеспоживаются тиндализацией или фильтрованием. Для стерилизации питательных сред, содержащих в своем составе нативные белки, пользуются фильтрацией через мембранные фильтры Зейтца. Подготовленные к употреблению питательные среды проверяют на стерильность. Для этого их ставят в термостат при температуре 37°C. Среда, простерилизованная в автоклаве, выдерживают в термостате 1 сутки, простерилизованная текучим паром — 3 суток.

2.2.3 Результаты и выводы

1. Ответы на вопросы о питательных средах.
2. Представление заполненной таблицы

Название питательной среды	Состав и способ приготовления	Для каких микроорганизмов предназначена

2.4 Практическое занятие №4 (3 часа).

Тема: «Приготовление и стерилизация питательных сред»

2.4.1 Задание для работы:

1. Приготовить и простерилизовать МПА и МПБ.
2. Приготовить и разлить по чашкам среду Эндо.

2.4.2 Краткое описание проводимого занятия

Приготовление 1 литра мясо-пептонного бульона (МПБ). К 1 л мясной воды добавить 1 % пептона и 0,5 % хлорида натрия, установить рН (с помощью рН-метра) дробным добавлением 10%-го раствора гидроксида натрия или гидроксида калия до рН 7,2-7,6. Профильтровать через бумажный фильтр, разлить по колбам, пробиркам и стерилизовать при 120 °C 15...20 мин.

Приготовление мясо-пептонного агара (МПА): к 1 л МПБ добавить 1,5 % измельчённого агара-агара, нагреть до расплавления агара, довести до кипения, в горячем виде проверить рН, затем, если необходимо, доводят его до нужного значения (7,2...7,6), профильтровать через ватно-марлевый фильтр. Профильтрованный горячий агар разлить

по пробиркам и флаконам, стерилизовать автоклавированием при 1 атм 20...30 мин. После автоклавирования пробирки с расплавленным МПА оставляют при комнатной температуре до уплотнения в наклонном положении (для получения скошенной поверхности агара).

Среда Эндо содержит лактозу в качестве субстрата и предназначена для дифференциации бактерий, различающихся по способности расщеплять лактозу.

К 1000 мл расплавленного МПА (рН 7,4) температурой 70 °С добавить 1 г лактозы, предварительно растворенной в небольшом количестве дистиллированной кипяченой воды. В отдельных пробирках приготовить: 2...3 мл спиртового раствора основного фуксина; 10 мл 10%-го водного раствора сульфата натрия.

В стерильную пробирку внести 1 мл раствора фуксина и добавить раствор сульфата натрия до обесцвечивания фуксина. Приготовленную смесь вылить в расплавленный агар, перемешать и разлить по чашкам Петри. Готовая среда бесцветна, при росте на ней микроорганизмов, расщепляющих лактозу, среда закисляется, обесцвеченный фуксин восстанавливается, и колония микроорганизма, например эшерихий, приобретает красный цвет с металлическим оттенком. Среду готовят за сутки до ее использования. Выпускают также сухую среду Эндо. Перед употреблением определенную навеску порошка вносят в дистиллированную воду, кипятят и разливают по чашкам Петри.

2.4.3 Результаты и выводы

1. Ответить на вопросы о составе и приготовлении питательных сред.
2. Представить пробирки, флаконы и чашки Петри с питательными средами.
3. Сделать выводы о том, на что нужно обращать особое внимание при приготовлении питательных сред.

2.5 Практическое занятие №5 (2 часа).

Тема: «Посев и культивирование аэробов и анаэробов»

2.5.1 Задание для работы:

1. Произвести посев микробных культур аэробов и анаэробов на МПА, на агар Цейслера, в МПБ, ПЖА, в среду Китт-Тароцци.
2. Провести культивирование аэробов и анаэробов..

2.5.2 Краткое описание проводимого занятия

Первым этапом бактериологического метода является посев или пересев бактериальной культуры на различные типы питательной среды. Материалом для посева могут быть пересеваемые культуры бактерий, различные выделения животных и человека, ткани трупа, вода, почва, продукты питания. Жидкий материал для посева берут петлей или пипеткой. При взятии петлей жидкость должна образовать в кольце петли тонкую прозрачную пленку - "зеркало". Пипетками пользуются в том случае, когда материал засевают в большом или точно отмеряемом объеме. Способ взятия плотного материала определяется его консистенцией. При посевах чаще всего пользуются бактериальной петлей. Все манипуляции, связанные с посевом и выделением микробных культур, производят над пламенем горелки. Бактериальную петлю прокалывают над пламенем непосредственно перед взятием материала, затем петлю остужают. Для этого при пересеве микробной культуры с пробирки горячую петлю погружают в конденсационную жидкость, а при пересеве с чашек Петри прикасаются к поверхности питательной среды, свободной от микробного роста. Достаточно остуженная петля не вызывает шипения конденсационной жидкости и не растапливает агар при соприкосновении со средой. После окончания посева петлю прожигают повторно для уничтожения находящейся на ней микробной культуры или инфицированного микроорганизмами материала. Пипетки и шпатели, используемые для посевов и опускают в дезинфицирующий раствор. После

посева на чашках Петри со стороны дна, на пробирках в верхней трети надписывают название засеянного материала, ставят номер анализа и дату посева.

Техника посевов на плотные и жидкие питательные среды:

1. При посеве в жидкую питательную среду петлю с находящимся на ней материалом погружают в среду. Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стенке сосуда, а затем смывают жидкой средой. Жидкий материал, набираемый в пастеровскую или градуированную пипетку, вливают в питательную среду.

2. При посеве на скошенный мясопептонный агар пробирку берут в левую руку между I и II пальцами, чтобы основание пробирки находилось на поверхности кисти руки и посев осуществлялся под контролем глаза. Пробку из пробирки вынимают правой рукой V и IV пальцами, не прикасаясь к той части пробки, которая входит внутрь пробирки. Остальные 3 пальца правой руки остаются свободными для взятия бактериальной петли, посредством которой производится посев. Петлю держат, как пишущее перо. После вынимания пробки пробирку с питательной средой держат в наклонном положении во избежание попадания в нее посторонних микроорганизмов из воздуха. Петлю с находящимся на ней пересеваемым материалом вводят в пробирку до дна, опускают плашмя на поверхность питательной среды и скользящими движениями наносят штрих снизу вверх, от одной стенки пробирки к другой.

3. При посеве на поверхность плотной питательной среды в чашки Петри чашку держат в левой руке. Дно ее с одной стороны придерживают I и II пальцами, а с другой — IV и V пальцами. Крышку, приоткрытую настолько, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходили петля или шпатель, фиксируют I и III или I и II пальцами (рис.). Небольшое количество исследуемого материала втирают бактериальной петлей в поверхность питательной среды у края чашки. Затем петлю прожигают, чтобы уничтожить избыток находящегося на ней материала. Линию посева начинают с того места, в котором находится материал. Бактериальную петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхности, и проводят штрихи по всей среде или по секторам, разграфив предварительно дно чашки (при условии, что среда прозрачна) на несколько равных частей. Нужно стараться, чтобы штрихи, наносимые петлей, располагались как можно ближе друг к другу, так как это удлиняет общую линию посева и дает возможность для равномерного распределения засеваемого материала по поверхности плотной питательной среды можно пользоваться вместо петли тампоном или шпателем.

При обилии в засеваемом материале микробов они растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды. Такой характер микробного роста получил название сплошного, или газонного. Посев газоном производят, когда нужно получить большие количества микробной культуры одного вида.

4. Из материала, подлежащего посеву в толщу плотной питательной среды, готовят взвесь в стерильной водопроводной воде или в изотоническом растворе. Набирают 0,1—1 мл взвеси в пипетку (в зависимости от степени предполагаемого микробного загрязнения) и выливают в пустую стерильную чашку Петри. Вслед за этим чашку заливают 15 - 20 мл мясопептонного агара, расплавленного и остуженного до температуры 40 - 45 °С (при такой температуре пробирка со средой, приложенная к щеке, не должна вызывать ощущения ожога). Для равномерного распределения исследуемого материала в питательной среде закрытую чашку с содержимым слегка вращают по поверхности стола.

5. Посев уколом в столбик питательной среды производят в пробирку со средой, застывшей в виде столбика. Пробирку берут в левую руку, как обычно, и в центре столбика до дна пробирки вкалывают петлю с находящимся на ней материалом.

Поскольку микроорганизмы по-разному относятся к **молекулярному кислороду**, это определяет и различия в способах их культивирования. **Культивирование аэробных микроорганизмов** проводят следующим образом: 1) на поверхности плотных сред или в тонком слое жидких сред, когда микроорганизмы получают кислород непосредственно из

воздуха; 2) в жидких средах (глубинное культивирование). В этом случае микроорганизмы используют растворенный в среде кислород. В связи с низкой растворимостью кислорода, для обеспечения роста аэробных бактерий в толще среды, требуется постоянное аэрирование.

Культивирование анаэробных микроорганизмов более сложно, чем выращивание аэробов, так как здесь должен быть сведен до минимума контакт микроорганизмов с молекулярным кислородом. Для создания анаэробных условий используют различные приемы. Их подразделяют на физические, химические и биологические. Все они основаны на том, что микроорганизмы культивируют в каком-то замкнутом пространстве. К физическим методам создания анаэробных условий относится **культивирование в микроанаэроостате** – вакуумном аппарате для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью. Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав: азот с 5 % CO_2 и 10 % H_2 . К химическим методам относится: 1) *использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород*. В качестве поглотителей молекулярного кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реактивы; 2) *использование восстанавливающих агентов*, которые добавляют в большинство сред для снижения окислительно-восстановительного потенциала среды: тиогликолат натрия, цистеин, аскорбиновая кислота.

Как пример биологического способа создания анаэробных условий - **выращивание совместно с аэробными или факультативно-анаэробными бактериями**. Например, питательную среду в чашке Петри разделяют желобком на две половины, на одну половину засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой – анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется только после полного использования кислорода аэробом.

Для культивирования анаэробных бактерий используют и другие методы, ограничивающие доступ воздуха к растущей культуре: 1) выращивание в высоком слое среды; 2) выращивание в толще плотной среды; 3) культивирование в вязких средах, в которых диффузия молекулярного кислорода в жидкость уменьшается с увеличением ее плотности; 4) заливка среды с посевом высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина.

Посевы аэробов и анаэробов в большинстве случаев помещают в термостат.

2.5.3 Результаты и выводы

1. Продемонстрировать приёмы посева на разные питательные среды.
2. Представить посевы аэробов и анаэробов для контроля их роста после культивирования.

2.6 Практическое занятие №6 (2 часа).

Тема: «Определение концентрации микробных клеток с помощью стандартного образца мутности»

2.6.1 Задание для работы:

1. Приготовить взвесь микроорганизмов разных видов в физиологическом растворе.
2. Определить концентрацию микробных клеток помощью стандартного образца мутности.

2.6.2 Краткое описание проводимого занятия

Для определения концентрации микроорганизмов может быть использован метод, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой взвеси со стандартным образцом мутности. Визуальные методы оптической стандартизации микробных взвесей

основаны на принципе установления равенства показателей мутности двух сред – исследуемой взвеси и стандартного образца мутности. Для этого исследуемую взвесь и стандартный образец сравнивают между собой в проходящем или отраженном свете с помощью специальной сравнительной таблицы. Если при одинаковом освещении видимость просвечивающихся через пробирки с исследуемой взвесью и стандартным образцом линий элементов сравнительной таблицы одинакова, то считают, что мутность исследуемой взвеси равна мутности стандартного образца. Зная показатель мутности стандартного образца и его числовой микробный эквивалент, рассчитывают концентрацию микробных клеток в исследуемой взвеси.

Международный стандартный образец мутности Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Международный стандартный образец мутности ВОЗ (International Reference Preparation of Opacity (IRP), World Health Organization), равный 10 МЕ мутности (международным единицам мутности) – это утвержденный ВОЗ первичный эталон мутности для стандартизации бактериальных взвесей визуальным методом, который выпускается под эгидой ВОЗ (International Laboratory for Biological Standard, National Institute for Biological Standards and Control, London, England).

Стандартные образцы мутности (СО мутности), равные 10 МЕ, 5 МЕ и 20 МЕ мутности соответственно, предназначены для стандартизации бактериальных взвесей визуальным методом и обеспечения единства определения концентрации микробных клеток в бактериальных взвесах при микробиологических исследованиях. СО мутности аттестованы с использованием 5-го Международного стандартного образца мутности ВОЗ (№76/522), одна международная единица которого соответствует мутности взвеси коклюшных бактерий, содержащей $1,1 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл.

Мутность экземпляра СО, равная 10 МЕ, ориентировочно соответствует следующим концентрациям других микробных клеток в 1 мл (коэффициент):

- 11·10⁹ клеток/мл для бактерий коклюшной группы;
- 0,93·10⁹ клеток/мл для бактерий кишечной группы;
- 1,7·10⁹ клеток/мл для бруцеллезных бактерий;
- 2,2·10⁹ клеток/мл для холерного вибриона;
- 5,0·10⁹ клеток/мл для туляремиальных бактерий (франциселл).

Для экземпляра СО 5 МЕ концентрация микробных клеток в 2 раза меньше, чем для СО 10 МЕ.

Для экземпляра СО 20 МЕ концентрация микробных клеток в 2 раза больше, чем для СО 10 МЕ.

В случае, если исследуемый микроорганизм не указан в тексте выше, допускается использование значения концентрации для микроба, наиболее близкого по размеру к исследуемому.

Определение общей концентрации (ОК) микробных клеток с использованием СО мутности. Исходную взвесь микроорганизмов развести стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до тех пор, пока ее мутность не будет равна мутности стандартного образца, что определяют в соответствии с инструкцией по применению СО мутности по специальной сравнительной таблице.

Исследуемую микробную взвесь перемешивают встряхиванием или пипетированием в стерильной емкости до гомогенного состояния и переносят в пробирку, входящую в комплект с СО мутности, в объеме 6-7 мл, что соответствует объему жидкости в пробирке с СО. Для проведения испытания с использованием СО работают только с пробирками, поставляемыми в комплекте с СО мутности.

Перед началом измерения стандартный образец встряхнуть в течение 10–15 секунд до полного исчезновения осадка.

Совместить пробирки с СО мутности и исследуемой взвесью микроорганизмов в вертикальном положении на уровне глаз, плотно приложить пробирки к сравнительной

таблице, освещение источником рассеянного света должно быть таким, чтобы пробирки не экранировали друг друга от источника света. Источником света - рассеянный дневной свет. Проводить испытания при прямом солнечном свете не допускается. В случае одинаковой четкости просматриваемых элементов сравнительной таблицы через пробирку с СО и пробирку с исследуемой микробной взвесью, мутность их считают одинаковой и равной мутности, указанной на этикетке СО.

Погрешность визуального определения мутности с помощью СО мутности составляет около 10 %.

Не допускается оставлять экземпляры СО мутности под действием бактерицидного облучателя, а также замораживание.

Расчет ОК микробных клеток проводят по формуле:

$$OK = \frac{V_0 + V_i}{V_0} \cdot k, \quad \text{где:}$$

V_0 - объем исходной взвеси, мл;

V_i – объем стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, использованного для разведения исходной взвеси, мл;

k – коэффициент: концентрация исследуемых микробных клеток в мл, соответствующая 10 МЕ, КОЕ/мл.

Итоговое значение общей концентрации микробных клеток рассчитывают как среднее арифметическое значений ОК по трем образцам.

2.6.3 Результаты и выводы

1. Ответить на вопросы по методике определения.
2. Представить расчёты концентрации микробных клеток.

2.7 Практическое занятие №7 (2 часа).

Тема: «Определение концентрации микробных клеток с помощью камеры Горяева»

2.7.1 Задание для работы:

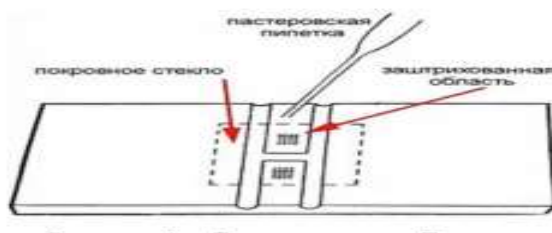
1. Приготовить взвесь микроорганизмов разных видов в физиологическом растворе.
2. Определить концентрацию микробных клеток с помощью камеры Горяева.

2.7.2 Краткое описание проводимого занятия

Наиболее распространенным методом определения общего числа клеток в 1 мл суспензии является их подсчет под микроскопом с использованием счетной камеры. Существует несколько видов счетных камер, принципиальное устройство которых одинаково: Тома-Цейсса, Бюркера, Горяева, камера подсчета с сеткой Нейбауэра.

Счетная камера Горяева представляет собой специальное предметное стекло с нанесенными на него поперечными прорезями, образующими три поперечно расположенные плоские площадки. Средняя площадка продольной прорезью разделена еще на две площадки, каждая из которых имеет выгравированную на ней сетку с квадратами определенной площади. По обе стороны средней площадки в камере Горяева расположены две других на 0,1 мм выше средней. Плоскости этих площадок служат для притирания покровного стекла до появления так называемых Ньютоновских колец.

После притирания покровного стекла создается камера, закрытая с двух боковых сторон, а с двух других имеющая капиллярные пространства, через которые с помощью пастеровской пипетки камеру заполняют разведением взвеси микроорганизма.



Подсчет клеток проводят под микроскопом, который настраивают таким образом, чтобы была видна нанесенная на камеру сетка и клетки микроорганизма, равномерно распределенные на ней. Считают число клеток в 5 горизонтальных и 15 диагональных больших квадратах, после чего определяют число клеток (х) в 1мл исследуемой взвеси по формуле:

$$x = \frac{a}{20} \cdot N \cdot k \cdot b = \frac{a \cdot 225 \cdot 1111}{20} \cdot b = a \cdot 12499 \cdot b,$$

где:

a – число клеток в 20 квадратах;

N = 225 – число больших квадратов в камере Горяева;

$$k = \frac{1}{v} = \frac{1}{0,0009} = 1111$$

– коэффициент, равный величине, обратной объему камеры Горяева (v=0,9

мм³=0,9·10⁻³мл);

b – разведение исходной взвеси микроорганизма.

При подсчете с использованием камеры Горяева необходимо соблюдать следующие основные правила:

- использовать только стандартные покровные стекла;
- проводить подсчет только чистых культур;
- избегать недостаточного заполнения и переполнения камеры;
- избегать наличия пузырьков воздуха в камере;
- учитывать все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата;
- подсчет клеток производить с объективом 8× (10×), реже 40×. С иммерсионным объективом работать нельзя.

2.7.3 Результаты и выводы

1. Ответить на вопросы по методике определения.
2. Представить расчёты концентрации микробных клеток.

2.8 Практическое занятие №8 (2 часа).

Тема: «Определение концентрации микробных клеток нефелометрическим способом»

2.8.1 Задание для работы:

1. Приготовить взвесь микроорганизмов разных видов в физиологическом растворе.
2. Определить концентрацию микробных клеток нефелометрическим способом.

2.8.2 Краткое описание проводимого занятия

К непрямым методам определения концентрации клеток микроорганизмов относятся визуальные методы, методы, основанные на светопоглощении (турбидиметрия), светорассеянии (нефелометрия), электропроводности микробных взвесей (кондуктометрия) и др. Рост микроорганизмов в питательной среде обычно приводит к изменению ее мутности. Мутность – это способность оптически неоднородной среды рассеивать проходящий свет. Мутность взвесей микроорганизмов является оптическим эквивалентом концентрации содержащихся в них микробных клеток. Мутность зависит как от свойств микроорганизмов (размер, показатель преломления), так и от их количества в единице объема. Мутность микробных взвесей определяют путем сравнения со стандартными образцами мутности. Мутность микробной взвеси может быть определена путем измерения оптической плотности при определенной длине волны.

Интенсивность пучка света, проходящего через пробу, уменьшается за счет рассеивания света (нефелометрия). Светорассеяние зависит не только от количества клеток в суспензии, но также от их размеров и формы.

Для очень разбавленных суспензий используют метод нефелометрии вследствие его большей чувствительности. Действие нефелометра основано на сравнении интенсивности света, рассеянного испытуемой средой, с интенсивностью рассеяния эталона.

При испытании пробу ярко освещают, а затем измеряют интенсивность прошедшего излучения или излучения, рассеянного под определенным углом. Для определения количества клеток в среде используют калибровочный график, отображающий зависимость между величиной светорассеяния и числом клеток в единице объема взвеси. Для построения калибровочного графика измеряют величину светорассеяния в ряде проб с известным содержанием клеток. Калибровочные графики индивидуальны для каждого микроорганизма.

2.8.3 Результаты и выводы

1. Ответить на вопросы по методике определения.
2. Представить расчёты концентрации микробных клеток.

2.9 Практическое занятие №9 (2 часа).

Тема: «Подсчёт количества микробных клеток на мембранных фильтрах»

2.9.1 Задание для работы:

1. Приготовить взвесь микроорганизмов разных видов в физиологическом растворе.
2. Подсчитать количество микробных клеток на мембранных фильтрах

2.9.2 Краткое описание проводимого занятия

Этот метод рекомендуется использовать для определения количества микроорганизмов во взвесах с низкой концентрацией клеток. Определенный объем

исследуемой суспензии профильтровать через мембранный фильтр с нанесенной сеткой. Размер пор фильтра 0,22 или 0,45 мкм. Затем микроорганизмы на фильтре окрасить карболовым эритрозином и подсчитать в 20 полях зрения с помощью микроскопа, оснащенного

Расчет общего
в 1 мл произвести по

$$x = \frac{S \cdot N \cdot 10^6}{s \cdot V},$$

окулярным микрометром.
количества микроорганизмов (x)
формуле:

где: S –фильтрующая площадь (мм²);

10⁶ – переводной коэффициент квадратных миллиметров в квадратные микрометры;

N – среднее количество бактерий в одном квадрате;

s – площадь квадрата окулярного микрометра, мкм²;

V– объем профильтрованной жидкости, мл.

2.9.3 Результаты и выводы

1. Ответить на вопросы по методике определения.
2. Представить расчёты концентрации микробных клеток.

2.10 Практическое занятие №10 (2 часа).

Тема: «Подсчёт колониеобразующих единиц (КОЕ)»

2.10.1 Задание для работы:

1. Приготовить взвесь микроорганизмов разных видов в физиологическом растворе.
2. Посеять на питательную среду и подсчитать количество КОЕ.

2.10.2 Краткое описание проводимого занятия

Сущность метода заключается в посеве определенного объема из серии десятикратных разведений суспензии исследуемых микроорганизмов на плотную питательную среду, инкубации и подсчете образовавшихся колоний, учитывая, что каждая колония – результат размножения одной жизнеспособной клетки микроорганизма.

Посев осуществляют одним из чашечных методов, указанных в разделе «Микробиологическая чистота», а именно: глубинным, поверхностным, двуслойным или модифицированным агаровым методом. При этом из каждого разведения производят посев на набор чашек с плотной питательной средой (так называемый, метод параллельных высевов).

При учете результатов определяют среднее количество колоний, выросших при посеве каждого разведения. Для получения достоверных результатов отбирают чашки, где число колоний бактерий находится в пределах от 30 до 300, а колоний грибов – от 10 до 100.

Если чашки из двух последовательных разведений попадают в эту область, количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл рассчитывают как их среднее значение.

Рассчитывают среднее количество КОЕ (N) в 1 мл по формуле:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

где:

c – сумма подсчитанных колоний на всех чашках;

n_1 – количество чашек первого разведения;

n_2 – количество чашек второго разведения;

d – коэффициент первого разведения;

0,1 – коэффициент, учитывающий кратность первого и второго разведения.

Пример: В двух последовательных разведениях 10^{-6} и 10^{-7} были получены результаты: 168; 215 и 14; 25 колоний соответственно.

Количество микроорганизмов в исходной суспензии равно:

$$N = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-6}} = 1,9 \cdot 10^8 \text{ КОЕ/мл.}$$

2.10.3 Результаты и выводы

1. Ответить на вопросы по методике определения.
2. Представить расчёты КОЕ.

2.11 Практическое занятие №11 (2 часа).

Тема: «Синхронизация роста культур»

2.11.1 Задание для работы:

1. Приготовить взвесь из разнородных микроорганизмов в физиологическом растворе.
2. Провести центрифугирование при

2.11.2 Краткое описание проводимого занятия

Синхронные культуры – это популяции микроорганизмов, в которых все клетки находятся на одинаковой стадии клеточного цикла и делятся одновременно. Такие культуры часто необходимы для изучения процессов обмена веществ на протяжении цикла клеточного деления.

Способы, вызывающие синхронное деление, весьма разнообразны и многочисленны. В зависимости от характера воздействия их можно разделить на 3 большие группы: 1-я – механический отбор (селективные методы); 2-я – действие физических факторов и 3-я – химико-биологические воздействия.

Методы, основанные на механическом отборе однородных по некоторым признакам клеток из асинхронно делящейся популяции, называются естественными или селективными. Некоторые из них получили наиболее широкое распространение в микробиологических исследованиях, например, фракционное фильтрование и дифференциальное центрифугирование. К этой же группе методов можно отнести исследования J. Yonng и Ph. Fits-James, получивших синхронное размножение *Bacillus cereus* за счет развития популяции из отобранных спор. Таким образом, 1-я группа методов синхронизации заключается в механическом отборе клеток из популяции в зависимости от их объема, массы или определенной формы существования, как это имеет место в

случае отбора спор. Применение селективных методов основано на предположении, что такие свойства, как объем и масса клеток, отражают в известной мере определенное физиологическое состояние. Эти методы имеют то преимущество, что не создают никакого препятствия в обмене веществ у отдельных клеток, как это бывает при использовании других методов.

Следующая группа методов (2-я) связана с физическими воздействиями, также ведущими популяцию к синхронному размножению. В этом направлении наибольшее распространение получили температурные воздействия. Синхронизация популяций с помощью изменения температуры культивирования достигается однократным (шок) или многократным (сдвиги температуры между двумя уровнями) действием более высокой или более низкой температуры по сравнению с оптимальной для данного вида микроорганизмов. Такое температурное воздействие, блокируя процесс деления, не останавливает роста и развития клеток, что в конечном итоге приводит популяцию в однородное состояние. После снятия шока от 70 до 90 % клеток делится синхронно. Этот вид воздействия в основном применяется для синхронизации бактерий, простейших и клеток культуры ткани

Общепринятый метод синхронизации культур основан на физическом выделении гомогенной в физиологическом отношении фракции клеток из гетерогенной популяции. Такой подход называют синхронизацией путем селекции, что позволяет избежать проблем, связанных с нарушением метаболизма. Любая гетерогенная популяция бактериальных клеток содержит в своем составе клетки готовые к делению, клетки только что разделившиеся и клетки находящиеся в стадии роста (наращивания цитоплазматической массы). Готовые к делению и только что разделившиеся клетки имеют самую высокую плотность, несмотря на различия их в размерах, а клетки, находящиеся в стадии роста, имеют наименьшую плотность, что и позволяет разделить их на различные фракции методом центрифугирования в градиенте плотности. Для более точного фракционирования клеток, помимо градиенты плотности, избирают скорость и время центрифугирования, в зависимости от видовых особенностей культуры. Фракция с наибольшей плотностью (осадок) обычно содержит и молодые (дочерние) и зрелые (готовые к делению) клетки, а фракция с наименьшей плотностью (надосадочная жидкость) состоит из однородной гомогенной популяции клеток, находящихся в одинаковой стадии роста. Именно эта фракция используется в качестве посевного материала для осуществления синхронного роста. Провести центрифугирование разнородной микробной взвеси. После центрифугирования отобрать из центрифужной пробирки самую легкую фракцию клеток, её перенести в емкость подогретой ростовой средой. Синхронность культуры поддержать в течение 2-4 циклов деления клеток.

2.11.3 Результаты и выводы

1. Ответить на вопросы о синхронных культурах и методиках их получения.
2. Представить результаты проведённой синхронизации.

2.12 Практическое занятие №12 (2 часа).

Тема: «Математическое моделирование при изучении роста микроорганизмов»

2.12.1 Задание для работы:

1. Произвести математический расчёт количества микробных клеток, которые будут получены в процессе роста микробной популяции.

2.12.2 Краткое описание проводимого занятия

Уравнение, которое было получено при анализе процесса размножения

$$\frac{du}{dt} = ku - gu^2$$

клеток в питательной среде: (III.1) , для [решения](#) которого воспользуемся методом разделения переменных:

$$\frac{du}{ku - gu^2} = dt$$

, откуда поиск функции $U(T)$ производится интегрированием:

$$\int \frac{du}{ku - gu^2} = \int dt$$

. [Решение](#) для левой части уравнения можно записать, используя математические таблицы неопределенных интегралов. Сравнивая табличное выражение (13) в Приложении I с последним уравнением, замечаем, что при $A = -G$; $B = K$; $C = 0$; $U = X$ они совпадают и $\Delta = 4Ac - B^2 = -B^2 = -K^2$, то есть $\Delta < 0$. Поэтому интегрирование левой и правой части приводит к равенству:

$$\frac{1}{k} \ln \left| \frac{-2gu + k - k}{-2gu + k + k} \right| + C = t \Rightarrow \ln \left| \frac{gu}{gu - k} \right| = kt - kC, \Rightarrow$$

при $k > gu$ имеем: $gu - k < 0$, то есть $|gu - k| = k - gu$. Тогда

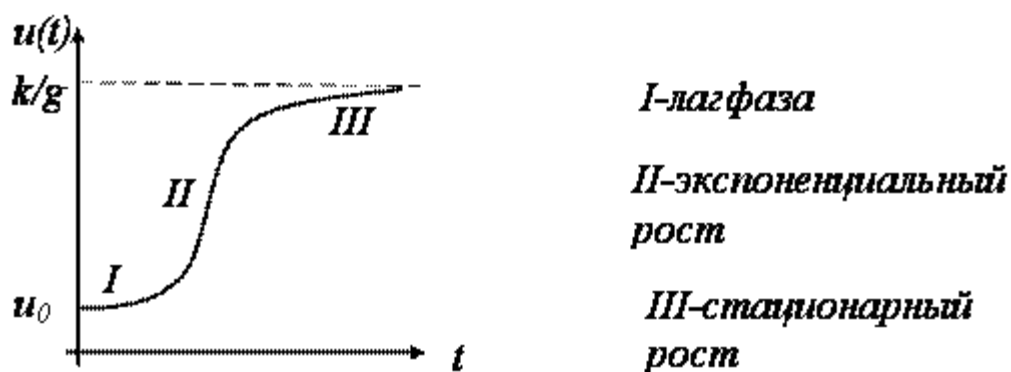
$$\begin{aligned} \frac{gu}{k - gu} &= e^{-kC} e^{kt} \Rightarrow \frac{k - gu}{gu} = Ae^{-kt} \text{ (где } A = e^{kC}) \Rightarrow \\ \Rightarrow \frac{k}{gu} - 1 &= Ae^{-kt} \Rightarrow u(t) = \frac{k/g}{A \exp[-kt] + 1} \end{aligned}$$

Условие $K > Gu$ является оправданным потому, что в начальный момент времени ($t = 0$, $u = u_0 = 1$ (одна клетка)) скорость роста должна быть положительной величиной. Иначе процесса роста наблюдаться не будет.

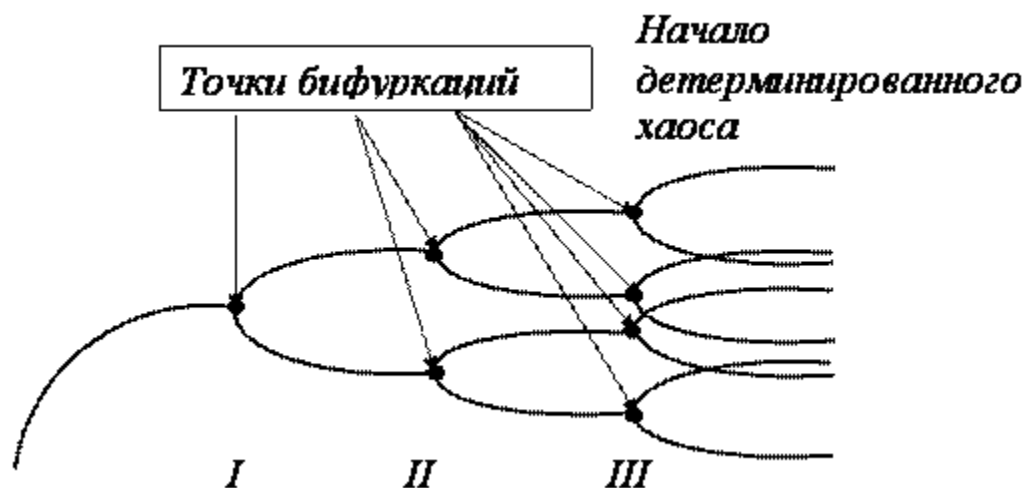
$$u(t) = \frac{k/g}{A \exp[-kt] + 1}.$$

Проведем анализ полученного [решения](#) :

При $T \rightarrow 0$, $\exp[-Kt] \rightarrow 1$, а $U(T) \rightarrow Const = U_0$. С течением времени знаменатель дроби в решении $U(T)$ за счет экспоненциальной функции уменьшается и количество клеток растет. Если на начальной стадии величина $A \exp[-Kt] \gg 1$, то рост клеток «идет» почти по экспоненциальному закону, а затем, при $T \rightarrow \infty$ величина $A \exp[-Kt]$ становится близкой к нулю и количество клеток «выходит» на стационарную фазу роста: $U(T) \rightarrow K/G$.



На рисунке изображена диаграмма роста бактерий в питательной среде, соответствующая особенностям функции $U(T)$. Большая часть ростовых процессов, рассматриваемая в экспериментальной биологии и демографии, имеет аналогичный вид и на диаграмме анализируемого процесса обычно выделяются: фаза накопительная (I), называемая лаг – фазой, (II) – фаза размножения (экспоненциального роста) и (III) – стационарная фаза. Переход от фазы экспоненциального роста к стационарной фазе обычно ассоциируют с моментом возникновения «экологических» проблем, связанных с накоплением в среде продуктов отхода от деятельности организмов. Исследование уравнения роста при произвольных значениях коэффициентов K и G Математическими методами приводит к дискретному аналогу дифференциального уравнения III.1. Если состояние системы фиксируется *He* непрерывно, а в определенный момент времени ($T = 1, 2$ и т. д.), то уравнение для каждой переменной $U(T)$ переходит в уравнение с переменной UT , которое относительно легко решается численными методами. Так, например, рост популяции какого-либо биологического вида с численностью $U(T)$, фиксируемой по годам (T равно 1 году), может быть описан так называемым логистическим уравнением: $UT+1 = CuT(1 - UT)$, в котором первое слагаемое CuT характеризует рост популяции, а второе $-CuT^2$ (нелинейный член) – определяет ее убыль (см. §8, ЧастьI). Как показал анализ решения, многое зависит от параметра C : однозначность или неоднозначность поведения системы при различных условиях при наличии небольших флуктуаций параметров. При $C < 1$ популяция вымирает, при $1 < C < 3$ численность растет, при $3 < C < 3,4$ наблюдается две ветви (бифуркация), между которыми происходят колебания численности, при $3,4 < C < 3,54$ имеется 4 ветви и т. д. и численность начинает "скакать" между ними. При $C > 3,57$ движение приобретает хаотичный характер (детерминированный хаос). Состояния "перемешиваются".



В более сложных системах на каждом переходном этапе точки бифуркаций становятся точками ветвлений и диаграмма процесса принимает вид дерева графа – особой математической структуры, характеризующей множество точек с заданным отношением связи между ними, называемыми ребрами графа. Рис. 7 является частным случаем такой математической структуры. Примерами графов являются алгоритмы разветвленных программ, нейронные сети, транспортные сети, денежные потоки в экономике и многое другое. Последние годы особый интерес почти во всех науках, где используются математические модели эволюционных процессов или процессов роста, привлекают так называемые «растущие» ориентированные (направленные) графы.

2.12.3 Результаты и выводы

Представить результаты математических расчётов количества микроорганизмов микробной популяции в результате культивирования.

2.13 Практическое занятие №13 (2 часа).

Тема: «Хранение микробных культур»

2.13.1 Задание для работы:

1. Произвести субкультивирование музейных культур.
2. Произвести заливку суточных культур стерильным вазелиновым маслом.

2.13.2 Краткое описание проводимого занятия

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 ультранизких 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 культур 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 пересевуют 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 лиофилизированных 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 °С до – 80 °С) либо используют рефрижераторы с азотом: газовой фазой (– 150 °С) или жидко-фазовой (– 196 °С). Считается, что грамположительные бактерии более устойчивы к замораживанию, чем грамотрицательные. Чтобы оживить замороженные культуры, их быстро оттаивают при 37 °С. 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.

Произвести субкультивирование 20 музейных культур с помещением их в последующем в холодильник. Залить суточные культуры музейных штаммов стерильным вазелиновым маслом с последующим помещением их в холодильник.

2.13.3 Результаты и выводы

1. Ответить на вопросы о методах хранения микробных культур.
2. Отчитаться о проделанной работе по субкультивированию музейных культур и заливке суточных культур стерильным вазелиновым маслом.

2.14 Практическое занятие №14 (2 часа).

Тема: «Влияние физических факторов на рост микроорганизмов»

2.14.1 Задание для работы:

1. Произвести воздействие на микробные культуры различных температурных режимов культивирования и оценить их степень влияния.
2. Произвести воздействие на микробные культуры солнечного света и ультрафиолетового излучения.

2.14.2 Краткое описание проводимого занятия

Действие высоких температур на микроорганизмы. Повышение температуры выше максимальной может привести к гибели клеток. Гибель микроорганизмов наступает не мгновенно, а во времени. При незначительном повышении температуры выше максимальной микроорганизмы могут испытывать «тепловой шок» и после недлительного пребывания в таком состоянии они могут реактивироваться. *Механизм губительного действия высоких температур связан с денатурацией клеточных белков.* На температуру денатурации белков влияет содержание в них воды (чем меньше воды в белке, тем выше температура денатурации). Молодые вегетативные клетки, богатые свободной водой, погибают при нагревании быстрее, чем старые, обезвоженные. *Термоустойчивость* – способность микроорганизмов выдерживать длительное нагревание при температурах, превышающих температурный максимум их развития. Гибель микроорганизмов наступает при разных значениях температур и зависит от вида микроорганизма. Так, при нагревании во влажной среде в течение 15 мин при температуре 50–60 °С погибает большинство грибов и дрожжей; при 60–70 °С – вегетативные клетки большинства бактерий, споры грибов и дрожжей уничтожаются при 65–80° С. Наибольшей термоустойчивостью обладают вегетативные клетки термофилов (90–100 °С) и споры бактерий (120 °С). Высокая термоустойчивость термофилов связана с тем, что, во первых, белки и ферменты их клеток более устойчивы к температуре, во вторых, в них содержится меньше влаги. Кроме того, скорость синтеза различных клеточных структур у термофилов выше скорости их разрушения. Термоустойчивость спор бактерий связана с малым содержанием в них свободной влаги, многослойной оболочкой, в состав которой входит кальциевая соль дипиколиновой кислоты. На губительном действии высоких температур основаны различные методы уничтожения микроорганизмов в пищевых продуктах. Это кипячение, варка, бланширование, обжарка, а также стерилизация и пастеризация.

Произвести исследования влияния температуры ($t = 10, 22, 37, 42, 60^{\circ}\text{C}$) на рост микроорганизмов.

К низким температурам микроорганизмы более устойчивы, чем к высоким. Несмотря на то, что размножение и биохимическая активность микроорганизмов при температуре ниже минимальной прекращаются, гибели клеток не происходит, т.к. микроорганизмы переходят в состояние *анабиоза* (скрытой жизни) и остаются жизнеспособными длительное время. При повышении температуры клетки начинают интенсивно размножаться. Причинами *гибели микроорганизмов при действии низких температур* являются: нарушение обмена веществ; повышение осмотического давления среды вследствие вымораживания воды; в клетках могут образоваться кристаллики льда, разрушающие клеточную стенку. Низкая температура используется при хранении продуктов в охлажденном состоянии (при температуре от 10 до -2°C) или в замороженном виде (от -12 до -30°C).

Произвести исследования влияния низкой температуры на микробные культуры ($t = -12, -2, 6-8^{\circ}\text{C}$).

В природе микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию солнечной радиации. Свет необходим для жизнедеятельности фототрофов. Хемотробы могут расти и в темноте, а при длительном воздействии солнечной радиации эти микроорганизмы могут погибнуть.

Воздействие лучистой энергии подчиняется законам *фотохимии*: изменения в клетках могут быть вызваны только поглощенными лучами. Следовательно, для эффективности облучения имеет значение проникающая способность лучей, которая зависит от длины волны и дозы. Доза облучения, в свою очередь, определяется интенсивностью и временем воздействия. Кроме того, эффект воздействия лучистой энергии зависит от вида микроорганизма, характера облучаемого субстрата, степени обсемененности его микроорганизмами, а также от температуры. Низкие интенсивности видимого света (350–750 нм) и ультрафиолетовых лучей (150–300 нм), а также низкие дозы ионизирующих излучений либо не влияют на жизнедеятельность микроорганизмов, либо приводят к ускорению их роста и стимуляции метаболических процессов, что связано с поглощением квантов света определенными компонентами или веществами клеток и переходом их в электронно-возбужденное состояние. Более высокие дозы излучений вызывают торможение отдельных процессов обмена, а действие ультрафиолетовых и рентгеновских лучей может привести к изменению наследственных свойств микроорганизмов – *мутациям*, что широко используется для получения высокопродуктивных штаммов. *Гибель микроорганизмов под действием ультрафиолетовых лучей* связана: с инактивацией клеточных ферментов; с разрушением нуклеиновых кислот; с образованием в облучаемой среде перекиси водорода, озона и т.д.

Произвести исследование влияния рассеянного солнечного света (2 часа) и УФ-лучей (40 минут) на рост микроорганизмов.

2.14.3 Результаты и выводы

Представить результаты проведённой работы с выводами.

2.15-16 Практическое занятие №15-16 (2 часа).

Тема: «Влияние химических факторов на рост микроорганизмов»

2.15-16.1 Задание для работы:

1. Провести исследования воздействия на микроорганизмы различных значений pH и различных концентраций соли.
2. Провести исследования действия на микроорганизмы 70% этиловым спиртом, салициловой кислотой, раствором перекиси водорода, раствором перманганата калия, серебром.

2.15-16.2 Краткое описание проводимого занятия

Влияние концентрации водородных ионов (pH среды). В зависимости от отношения к pH среды микроорганизмы делятся на три группы: *нейтрофилы* - предпочитают нейтральную реакцию среды. Растут в диапазоне значений pH от 4 до 9. К нейтрофилам относятся большинство бактерий, в том числе гнилостные бактерии; *ацидофилы* (кислотолюбивые). Растут при pH 4 и ниже. К ацидофилам относятся молочнокислые, уксуснокислые бактерии, грибы и дрожжи; *алкалофилы* (щелочелюбивые). К этой группе относятся микроорганизмы, которые растут и развиваются при pH 9 и выше. Примером алкалофилов является холерный вибрион. Если pH не соответствует оптимальной величине, то микроорганизмы не могут нормально развиваться, так как активная кислотность оказывает влияние на активность ферментов клетки и проницаемость цитоплазматической мембраны. Для бактерий кислая среда более опасна, чем щелочная (особенно для гнилостных бактерий). Это используется для консервирования продуктов путем маринования или квашения. При мариновании к продуктам добавляют уксусную кислоту, при квашении создаются условия для развития молочнокислых бактерий, которые образуют молочную кислоту и тем самым способствуют подавлению роста гнилостных бактерий.

Приготовить питательные среды с разными значениями pH (4, 5, 6, 8,9) и оценить рост микроорганизмов на этих средах.

Химические вещества. Многие химические вещества действуют губительно на микроорганизмы. Такие вещества называют *антисептиками*. Их действие зависит от концентрации и продолжительности воздействия, а также от pH среды и температуры. Из неорганических соединений наиболее сильно действуют на микроорганизмы соли тяжелых металлов (золота, меди и, особенно, серебра). Например, ионы серебра адсорбируются на поверхности клетки, вызывая изменения свойств и функций цитоплазматической мембраны. Бактерицидным действием обладают многие окислители (хлор, йод, перекись водорода, калий марганцево-кислый), минеральные соли (сернистая, борная, фтористо-водородная). Эти вещества вызывают активные окислительные процессы, не свойственные метаболизму клетки, а также разрушают ферменты. Органические соединения (формалин, фенол, карболовая кислота, спирты, органические кислоты - салициловая, уксусная, бензойная, сорбиновая) также могут губительно воздействовать на микроорганизмы.

Провести культивирование микроорганизмов на средах с содержанием соли от 1% до 20%.

Осуществить кратковременное воздействие на микробные культуры 70% этиловым спиртом, салициловой кислотой, раствором перекиси водорода, раствором перманганата калия, серебром.

2.15-16.3 Результаты и выводы

Представить полученные результаты и выводы, сделанные на основе результатов.

2.17 Практическое занятие №17 (2 часа).

Тема: «Влияние биологических факторов на микроорганизмов»

2.17.1 Задание для работы:

1. Провести исследования воздействия на микроорганизмы антибиотиков.
2. Выявить микробный антагонизм разными методами.

2.17.2 Краткое описание проводимого занятия

Микробный антагонизм (от греч. *antagonizomai* — борюсь, соперничаю), при котором один вид микробов угнетает развитие других, довольно широко распространен в природе. Антагонистические отношения между микроорганизмами выработались на протяжении длительного периода эволюции в борьбе за существование. Такие взаимоотношения особенно выражены у микроорганизмов, которые конкурируют с другими видами в местах естественного обитания. Например, в почве находится множество различных видов микроорганизмов, многие из которых выделяют вещества, губительно действующие на другие виды микробов. Эти вещества называли антибиотиками (от греч. *anti* — против, *bios* — жизнь). В настоящее время их широко используют для лечения инфекционных заболеваний человека, животных и растений. Открытие, изучение и использование антибиотиков является одним из выдающихся достижений нашего времени. Антибиотические вещества можно не только получить в результате жизнедеятельности микроорганизмов, но и выделить из тканей животных, растений. Поэтому в настоящее время антибиотиками называют продукты обмена любых организмов, способные избирательно убивать микроорганизмы или подавлять их рост. С открытием противоопухолевых антибиотиков сфера их применения расширилась: появились антибиотики, задерживающие рост новообразований.

Методика определения антибиотикочувствительности. Расплавленную питательную среду (агар Мюллера-Хинтона) разливают в чашки Петри. Толщина слоя агара в чашке должна составлять $4,0 \pm 0,5$ мм, что достигается при внесении в чашку Петри

диаметром 90 мм строго 20 мл агара. Перед посевом чашки со средой досушивают в термостате, проконтролировав отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек. Бактериальную взвесь, приготовленную из суточной культуры и содержащую примерно 10^9 КОЕ/мл, наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулюма пипеткой. После инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с антибиотиками с помощью стерильного пинцета. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15-20 мм. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри инкубируют в термостате при температуре 37°C в течение 18-24 ч. Учёт результатов проводят после инкубации, измеряя диаметр зон задержки роста тестируемого микроорганизма с помощью штангенциркуля или линейки. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг диска указывает на устойчивость исследуемой культуры к данному антибиотику. При зоне задержки роста до 14 мм говорят о малой чувствительности к антибиотику, от 15 до 25 мм – о достаточной чувствительности, свыше 25 мм – о высокой чувствительности.

Антагонизм микробов может выявиться при совместном выращивании двух и более видов микробов на жидкой или твердой среде. Согласно широко используемому в микробиологии *методу перпендикулярных штрихов* на поверхности агаровой среды в чашке Петри высевают штрихом экспоненциальную культуру исследуемого штамма, например, лактобактерий и инкубируют при оптимальной для него температуре (30 и 37°C соответственно для мезофильных и термофильных форм) в течение определенного времени (например, 24 или 48 ч) для образования и диффузии в агар ингибиторных соединений. Затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры лактобактерий подсевают штрихом экспоненциальную культуру тест-штамма (например, *E. coli*), слегка касаясь штриха лактобактерии. Чашку вновь инкубируют, но теперь при условиях (температура и продолжительность), благоприятных для роста тест-культуры. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемой лактобактерии судят по величине зоны ингибирования тест-штамма на границе со штрихом роста лактобактерии. На одной чашке к лактобактерии можно подсеять несколько тест-культур и, таким образом, выявить спектр антагонистического действия данной лактобактерии. Используемая агаровая среда должна обеспечивать хороший рост как испытуемого штамма лактобактерий, так и тест-штамма (или тест-штаммов). Чашки можно инкубировать в аэробных условиях, либо (при необходимости) в анаэробе.

При использовании *метода блоков* испытуемую культуру лактобактерий высевают глубинным способом в питательный агар в чашке Петри и инкубируют в оптимальных, строго соблюдаемых, условиях для образования и накопления в агаре ингибиторных соединений. Затем стерильным пробочным сверлом вырезают агаровый диск (блок) с выросшей культурой лактобактерии и устанавливают его в другой чашке Петри на поверхности агаровой среды, только что засеянной культурой тест-штамма. Чашку выдерживают в течение определенного времени в холодильнике (во избежание преждевременного роста тест-штамма) для диффузии ингибиторных соединений из блока в толщу агара с тест-штаммом, а затем инкубируют в определенных условиях, оптимальных для тест-штамма. О степени антагонистической активности испытуемой лактобактерии судят по величине зоны ингибирования роста тест-штамма вокруг агарового блока. Для тест-штамма в чашке Петри целесообразно формировать двухслойный агар: на дно чашки наливают 15 см^3 незасеянной расплавленной плотной (2 % агара) питательной среды (нижний слой), после застывания которой на ее поверхность наслаивают 5 см^3 полужидкой (0,35 % агара) среды, содержащей тест-культуру (верхний слой); это обеспечивает более равномерное распределение тест-штамма по всей поверхности чашки. В отличие от метода перпендикулярных штрихов, метод блоков дает

возможность сравнить на одной чашке несколько (4-8) штаммов лактобактерий к данной тест-культуре. Преимуществом метода блоков является то, что он позволяет использовать разные по составу питательные среды: одну (блок) - для испытуемой лактобактерии, другую - для использования данного тест-штамма. Кроме того, он удобен для изучения влияния состава питательной среды на продукцию ингибиторных соединений исследуемым штаммом лактобактерий.

Метод лунок в принципе схож с вышеописанным методом агаровых блоков, но в этом случае взамен установки блока в слое агара, содержащего тест-штамм, пробочным сверлом вырезается лунка диаметром 5-7 мм и в нее помещают определенное количество (например, 0,2 см³) жидкой или полужидкой среды с выросшей культурой исследуемого штамма лактобактерий. Чашку выдерживают в холодильнике для диффузии ингибиторных веществ из лунки в толщу агара, далее - в термостате для роста тест-штамма, после чего измеряют зону ингибирования тест-штамма вокруг лунки. Методом лунок можно определять антагонистическую активность чистых и смешанных молочных культур лактобактерий, например, сравнить по этому показателю различные коммерческие кисломолочные продукты. К недостаткам метода можно отнести опасность подтекания жидкости с культурой лактобактерий из лунки в щель между агаром и дном чашки, что ведет к искажению результата. Избежать подтекания можно путем формирования лунки, не доходящей до дна чашки, используя при заливке чашки агаровой средой соответствующие шаблоны (как это делается для электрофореза в агарозном геле). Альтернативный вариант - использование двухслойного агара (нижний слой - плотный, верхний - полужидкий агар, каждый слой по 10 см³/чашку), при этом лунка вырезается только в верхнем слое. Метод лунок рекомендуют использовать для выбраковки штаммов-антагонистов при составлении заквасочных комбинаций лактобактерий (тест на «биологическую совместимость»).

2.17.3 Результаты и выводы

Представить полученные результаты и сделать выводы на их основании.

2.18-19 Практическое занятие №18-19 (4 часа).

Тема: «Адаптация микроорганизмов к экстремальным средам и условиям воздействие факторов окружающей среды»

2.18-19.1 Задание для работы:

1.

2.18-19.2 Краткое описание проводимого занятия

Кроме генотипической, существует *модификационная изменчивость*, которая рассматривается как ответ на изменение условий окружающей среды и наблюдается до тех пор, пока действует фактор, вызывающий эти изменения. Модификационная изменчивость (ее называют еще фенотипической изменчивостью) проявляется на уровне фенотипа и не затрагивает генотип. Фенотипическая изменчивость проявляется у подавляющего большинства особей в популяции, в то время как при мутационной изменчивости изменение генотипа происходит только у единичных клеток. Модификация есть результат пластичности клеточного метаболизма, приводящего к фенотипическому проявлению «молчащих» генов в конкретных условиях. Таким образом, модификационные изменения имеют место в рамках неизменного клеточного генотипа. Существует несколько проявлений модификационных изменений. Наиболее известны *адаптивные модификации*, т. е. ненаследственные изменения, полезные для организма и содействующие его выживанию в изменившихся условиях. Причины

адаптивных модификаций кроются в механизмах регуляции действия генов. Их примером может служить адаптация клеток бактерий *E. coli* к лактозе как новому субстрату: в этих условиях начинают синтезироваться индуцибельные ферменты, т. е. происходит фенотипическое проявление генов, «молчащих» при отсутствии лактозы в среде.

У ряда бактерий обнаружена универсальная адаптивная реакция в ответ на различные стрессовые воздействия (высокие и низкие температуры, резкий сдвиг pH и др.). В данном случае адаптивная реакция проявляется в интенсивном синтезе небольшой группы сходных белков, которые получили название *белки теплового шока*, а явление – *синдром теплового шока*. При стрессовых воздействиях на бактериальную клетку в ней ингибируется синтез обычных белков, но индуцируется синтез небольшой группы белков, функции которых заключаются в противодействии стрессовому воздействию путем защиты важнейших клеточных структур, в первую очередь нуклеоида и мембран. Считается, что адаптивные модификации расширяют возможности организма к выживанию и размножению в более широком диапазоне условий внешней среды. Возникающие модификации могут быть относительно стабильными, они могут сохраняться на протяжении нескольких поколений или, наоборот, очень лабильными. *Значение адаптивных модификаций*: вносят определенный вклад в процесс эволюции; расширяют возможности организма к выживанию и размножению в более широком диапазоне условий внешней среды. Возникающие в этих условиях наследственные изменения подхватываются естественным отбором и таким путем происходит более активное освоение новых экологических ниш и достигается более эффективная приспособляемость к ним.

Температурная адаптация микроорганизмов, в частности образование термофильных форм микробов, дает много ценного для изучения изменений наследственных свойств организмов под влиянием сред. Возникновение теплолюбивых форм микробов проходит не в результате беспричинных «мутаций», а при воздействии соответствующих условий внешней среды. Однако типичные мезофильные микроорганизмы не могут сразу превратиться в термофилов. В опытах большинства исследователей приспособление микробов к повышенным температурам происходило весьма медленно. Нередко при попытках выделения культур, переносящих относительно высокую температуру, получались нежизнеспособные формы, погибавшие при нескольких пересевах. По представлениям ряда учёных, под влиянием супрооптимальных температур в культуре возникают клетки, способные лучше развиваться при повышенной температуре. Если свойства новых клеток созвучны внешней обстановке, то они оказываются более жизнеспособными, чем исходные культуры. Мезофильные микроорганизмы при соответствующих условиях могут быть превращены в термофилов, но этот процесс проходит с известным трудом, и оптимальные условия для его ускорения пока не выяснены.

Приготовить питательные среды (МПБ и среды Эндо) с различным содержанием хлорида натрия (1, 2, 4 %) и провести ряд пассажей на этой среде *E. coli*. Выделить микробные клетки, у которых произошла адаптация к повышенным количествам поваренной соли.

Провести ряд пассажей *B. subtilis* и культивировании при повышенных температурах (40, 42 ° C). Выделить клетки, способные расти при повышенных температурах.

2.18.-19. 3 Результаты и выводы

Доложить о проведенной работе и полученных результатах.