

Министерство образования Республики Беларусь
Белорусский государственный университет
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

СОГЛАСОВАНО
Заведующий кафедрой
_____ С.Л.Василенко

31 октября 2025 г.

СОГЛАСОВАНО
Декан факультета
_____ В.В.Хрусталев

27 ноября 2025 г.

Введение в специальность

Электронный учебно-методический комплекс для специальности:
6-05-0511-03 «Микробиология»

Регистрационный № 2.4.3-24 / 696

Авторы:

Лысак Владимир Васильевич, профессор кафедры микробиологии БГУ,
кандидат биологических наук, доцент;
Комар Елена Ивановна, старший преподаватель кафедры микробиологии
биологического факультета, БГУ

Рассмотрено и утверждено на заседании Совета биологического факультета.
Протокол № 4 от 27.11.2025 г.

Минск 2025

УДК 579(075.8)
Л 886

Утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ
Протокол № 4 от 27.11.25 г.

А в т о р ы:

Лысак Владимир Васильевич, профессор кафедры микробиологии биологического факультета БГУ, кандидат биологических наук доцент;

Комар Елена Ивановна, старший преподаватель кафедры микробиологии биологического факультета, БГУ

Рецензенты:

кафедра биотехнологии учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет» (заведующий кафедрой Леонтьев В.Н., кандидат химических наук, доцент);

Алещенкова З.М., главный научный сотрудник Государственного научного учреждения «Институт микробиологии НАН Беларусь», доктор биологических наук, профессор

Лысак, В. В. Введение в специальность : электронный учебно-методический комплекс для специальности 6-05-0511-03 «Микробиология» / В. В. Лысак, Е. И. Комар ; БГУ, Биологический фак., Каф. микробиологии. – Минск : БГУ, 2025. – 106 с.: ил. – Библиогр.: с. 105–106.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов высшего образования специальности 6-05-0511-03 «Микробиология». Содержание ЭУМК посвящено изучению морфологии и структурной организации клеток микроорганизмов; классификация микроорганизмов по типу питания микроорганизмов, по отношению к кислороду, по отношению к pH среды; представлены принципы систематики прокариот; типы взаимоотношений между микро- и макроорганизмами. Кратко описаны методы культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях, характеристика питательных сред и способы стерилизации. Уделено внимание значению микроорганизмов в природе и применению их в различных областях биологии, медицины, сельского хозяйства и промышленности. А также освещены основные направления развития современной микробиологии; направления развития микробиологии в Республике Беларусь.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА.....	5
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....	7
1.1. Введение.....	7
1.1.1. Предмет и задачи микробиологии	7
1.1.2. История развития микробиологии	10
1.2. Систематика прокариот	16
1.2.1. Принципы систематики.....	16
1.2.2. Генетические критерии систематики.....	18
1.2.3. Фенотипические критерии систематики	20
1.2.4. Серологические критерии систематики	21
1.2.5. Современная классификация прокариот	21
1.3. Морфология и структурная организация клеток прокариот	26
1.3.1. Морфология прокариот	26
1.3.2. Структурная организация бактериальной клетки	29
1.5. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы	54
1.5.1. Действие факторов химической природы	54
1.5.2. Действие факторов физической природы	57
1.6. Питание микроорганизмов. Закономерности микробного роста.....	62
1.6.1. Питание микроорганизмов.....	62
1.7. Значение микроорганизмов в природе и жизнедеятельности человека....	65
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....	69
2.1. Программа лабораторных занятий	69
2.2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов	69
2.3. Стерилизация в микробиологии	77
2.4. Микроскопия в микробиологии	81
2.5. Микроскопические методы исследования в микробиологии.....	84
2.6. Принципы культивирования (выращивания) микроорганизмов. Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов	89
2.7. Выделение чистых культур микроорганизмов. Накопительные культуры микроорганизмов; методы их получения. Чистые культуры микроорганизмов, методы их получения.....	92
3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.....	100

3.1. Перечень рекомендуемых средств диагностики.....	100
3.2. Примерный перечень заданий для управляемой самостоятельной работы студентов.....	100
3.3. Примерная тематика реферативных работ.....	102
3.4. Примерный перечень вопросов к зачету	103
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ.....	105
4.1. Рекомендуемая литература	105
4.2. Электронные ресурсы.....	105

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Введение в специальность» создан в соответствии с учебными планами БГУ: №6-5.6-36/01, №6-5.6-36/02, утвержденными 15.05.2023, №6-5.6-36/22з. от 31.05.2023.

Содержание разделов ЭУМК соответствует образовательным стандартам высшего образования по данным специальностям. Учебная дисциплина относится к компоненту учреждения образования и входит в модуль «Введение в специальность» (специальность 6-05-0511-03 «Микробиология»).

Цель учебной дисциплины учебной дисциплины «Введение в специальность» – получение студентами глубоких, системных знаний о мире микроорганизмов, их свойствах, распространении и роли в природе, характерных особенностях процессов жизнедеятельности, а также об их значении для человека.

Задачи учебной дисциплины:

- 1) ориентироваться в большом разнообразии микроорганизмов;
- 2) сформировать четкие представления о морфологии и физиолого-биохимических особенностях микроорганизмов;
- 3) изучить возможности использования микроорганизмов в научных исследованиях и практической деятельности человека;
- 4) оценить вклад различных ученых в становление микробиологии как науки.

Требования к компетенциям:

Освоение учебной дисциплины «Введение в специальность» должно обеспечить формирование следующей **специализированной** компетенции:

СК – 1. Использовать знания о направлениях развития и достижениях микробиологии, современных методах микробиологических исследований при выборе профиля и видов профессиональной деятельности.

В ЭУМК существенное место отводится изучению основных направлений и достижений микробиологии на современном этапе развития, морфологии и структурной организации клеток прокариот. Кратко описано историческое развитие микробиологии с рассказом об ученых, внесших существенный вклад в становление микробиологии как науки. Уделено внимание значению микроорганизмов в природе и применению их в различных областях биологии, медицины, сельского хозяйства и промышленности. В ЭУМК также описаны питательные среды, способы стерилизации, микроскопические методы исследования.

Цель ЭУМК – оказание методической помощи студентам в получении современных знаний по учебной дисциплине «Введение в специальность», систематизации учебного материала в процессе подготовки к итоговой аттестации.

В структуру ЭУМК входит:

1. Теоретический раздел (включает конспект лекций по учебной дисциплине).

2. Практический раздел.

3. Раздел контроля знаний. Контроль самостоятельной работы студентов (содержит перечень контрольных мероприятий управляемой самостоятельной работы студентов; темы реферативных заданий и примерный перечень вопросов для подготовки к зачету).

4. Вспомогательный раздел (включает список рекомендуемой литературы).

Работа студента с ЭУМК должна включать ознакомление с тематическим планом учебной дисциплины, представленным в учебной программе учреждения высшего образования, в которой можно получить информацию о тематике лекций, лабораторных занятий и рекомендуемой литературе. Для подготовки к лабораторным занятиям рекомендуется использовать материалы, представленные в теоретическом и практическом разделах ЭУМК, а также материалы для контроля самостоятельной работы студентов. В ходе подготовки к зачету целесообразно ознакомиться с требованиями к компетенциям по учебной дисциплине, изложенными в учебной программе учреждения высшего образования, а также перечнем вопросов к зачету.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1.1. Введение

1.1.1. Предмет и задачи микробиологии

Микробиология (от греч. *mikros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – наука) – наука о микроскопически малых существах, называемых микроорганизмами. Микробиология изучает морфологию, физиологию, биохимию, систематику, генетику и экологию микроорганизмов, их роль и значение в круговороте веществ, патологии человека, животных и растений, в экономике.

К микроорганизмам относятся преимущественно одноклеточные организмы – бактерии, археи, микроскопические грибы и водоросли, простейшие, а также организмы с неклеточной организацией – вирусы.

Микроорганизмы в таксономическом отношении очень неоднородная группа, представители которой отличаются друг от друга морфологией, строением, физиологией, типами конструктивного и энергетического метаболизма, а также особенностями питания клетки, но общим их признаком являются малые размеры особей. Например, в среднем линейные размеры бактерий находятся в пределах 0,5 – 3,0 мкм, но есть среди бактерий свои «гиганты» и «карлики». В частности, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 500 мкм; длина клеток бактерии *Achromatium oxaliferum* составляет 15 – 100 мкм при поперечнике примерно 5 – 33 мкм, а продольные размеры клеток спирохет могут достигать 250 мкм. Самые крупные на сегодняшний день прокариотические микроорганизмы – это *Euploiscium fishelsoni*, *Tiomargarita namibiensis* и *Tiomargarita magnifica*. Клетки прокариот *Euploiscium fishelsoni* имеют форму толстой палочки с заостренными концами и обитают в кишечнике глубоководной рыбы-хирурга. Их размеры достигают 600 мкм в длину и 100 мкм в диаметре. Клетки прокариот *Tiomargarita namibiensis*, обнаруженные в прибрежных водах Намибии и Чили, кокковидные, до 750 мкм в диаметре. Нитевидные бактерии вида *Tiomargarita magnifica* обнаружены в мангровых зарослях Карибского моря. Они являются самыми крупными представителями из известных бактерий. Их средняя длина составляет 10 мм, а некоторые особи достигают 20 мм, что делает бактерии вида *Tiomargarita magnifica* видимыми невооруженным глазом. Самые мелкие из известных прокариот – микоплазмы, наноархеи и трепонемы, диаметр клеток которых составляет 0,05 – 0,1 мкм. Следовательно, размеры известных в настоящее время прокариот колеблются от 0,05 мкм до 20 мм.

Размеры клеток дрожжей, мицелиальных грибов, простейших и водорослей находятся в пределах 10 – 100 мкм.

У микроорганизмов из-за малых размеров очень велико отношение площади поверхности клетки к ее объему, что создает благоприятные условия для активного обмена с внешней средой. Показано, что метаболическая активность микроорганизмов в расчете на единицу биомассы намного выше, чем у более крупных клеток растений и животных.

Одной из наиболее существенных особенностей микроорганизмов является высокая пластичность их метаболизма, что приводит к быстрому приспособлению к меняющимся условиям окружающей среды. Указанное свойство также связано с малыми размерами клеток.

Клетки микроорганизмов могут вместить в себя только несколько сотен тысяч белковых молекул. Поэтому ненужные в данных условиях существования ферменты не могут в клетках микроорганизмов содержаться про запас. Они синтезируются только тогда, когда соответствующее питательное вещество (субстрат) появляется в среде. Такие ферменты называются *индивидуальными*, они могут составлять до 10 % общего белка, содержащегося в клетке в данный момент времени. Таким образом, для микроорганизмов характерно большее разнообразие ферментных систем и более мобильные способы регуляции обмена веществ, чем для макроорганизмов.

Другим следствием высокой пластичности метаболизма микроорганизмов является, по определению В. И. Вернадского, их «всюдность». Микроорганизмы можно обнаружить в арктических и антарктических областях, горячих источниках, высоких слоях атмосферы, шахтах с большим содержанием сероводорода и этим они отличаются от всех растений и животных, которые часто распространены лишь на отдельных континентах или в географических зонах.

Отличительным свойством микроорганизмов является также их способность к быстрому размножению. В оптимальных условиях, например, бактерии *Escherichia coli* могут делиться каждые 20 мин (рисунок 1).

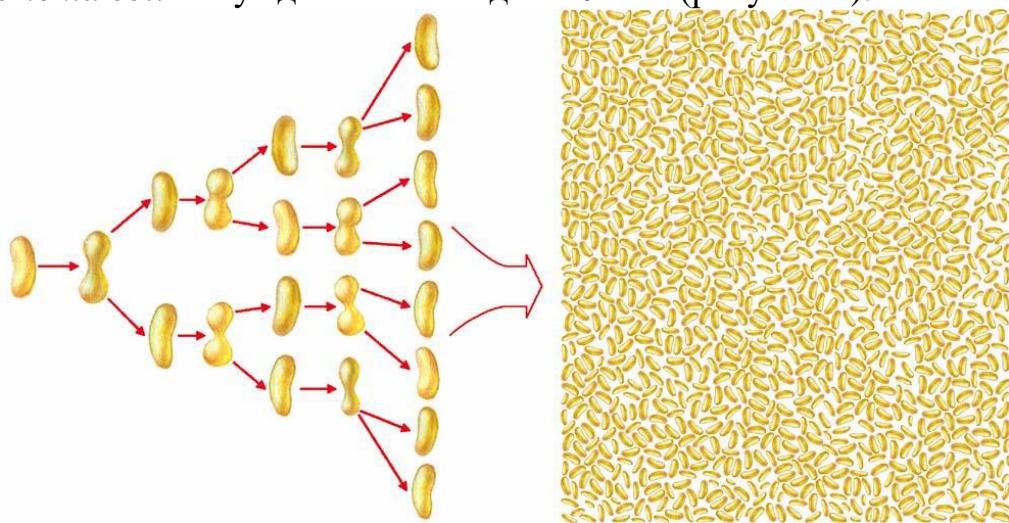


Рисунок 1 – Размножение бактериальных клеток.

У микроорганизмов отсутствует дифференцировка на ткани и органы, что также делает их непохожими на растения и животные.

В соответствии с современными принципами классификации все микроорганизмы в зависимости от строения клетки делятся на эукариотические (истинноядерные) и прокариотические (доядерные) (таблица 1). К эукариотическим микроорганизмам относятся водоросли, грибы и простейшие, к прокариотическим – бактерии и археи.

Таблица 1 – Различия в строении клеток прокариот и эукариот.

Признак	Прокариотическая клетка	Эукариотическая клетка
Организация генетического материала	Нуклеоид, состоящий чаще всего из одной замкнутой в кольцо или линейной хромосомы. Имеются гистоподобные белки. Гены не несут инtronов (за исключением архей). Гены организованы в опероны. Митоз и мейоз отсутствуют	Ядро, содержащее обычно более одной хромосомы. Есть белки гистоны. Гены имеют экзонноинtronную организацию. Опероны отсутствуют. Митоз и мейоз осуществляются
Локализация ДНК	В нуклеоиде и плазмидах	В ядре и некоторых органеллах. У некоторых дрожжей в плазмидах
Цитоплазматические органеллы	Отсутствуют (кроме рибосом)	Имеются
Рибосомы в цитоплазме	70S-типа	80S-типа
Движение цитоплазмы	Отсутствует	Имеется
Жгутики	Состоит из одной фибриллы, построенной из субъединиц белка флагеллина	Состоит из микротрубочек, собранных в группы
Комpartmentализация клеток	Слабо выражена	Клетка разделена мембранами на отдельные отсеки
Клеточная стенка (там, где она имеется)	Содержит пептидогликан муреин (за исключением архей)	Пептидогликан муреин отсутствует

Кроме строения клетки, прокариотические и эукариотические микроорганизмы различаются и по другим признакам:

- прокариотические микроорганизмы морфологически относительно слабо дифференцированы, поэтому основными формами бактерий, за немногими исключениями, считаются кокки, прямые и изогнутые палочки;
- многие группы прокариот способны существовать только в анаэробных условиях (без молекулярного кислорода), получая необходимую для роста энергию в результате брожения или анаэробного дыхания;
- значительное количество прокариот может специфически получать энергию путем окисления неорганических веществ;
- большая группа прокариот (фототрофные) обладает способностью использовать энергию солнечного света и строить необходимые им вещества либо из органических соединений, либо из углекислого газа;
- среди прокариот различных таксономических групп широко распространена способность к фиксации молекулярного азота;
- у подавляющего большинства прокариот размножение осуществляется путем бинарного поперечного деления, приводящего к образованию двух одинаковых дочерних клеток.

Деление клеток прокариот начинается, как правило, после завершения цикла репликации ДНК. У большинства грамположительных бактерий и нитчатых цианобактерий деление происходит путем синтеза поперечной перегородки, идущей от периферии к центру. Поперечная перегородка формируется из цитоплазматической мембраны и пептидогликанового слоя. Расхождение образовавшихся дочерних клеток происходит в результате лизиса срединного слоя поперечной перегородки с помощью ферментов автолизинов. Клетки большинства грамотрицательных бактерий делятся путем перетяжки, которая формируется при сужении в центральной части клетки цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Диаметр клетки в центре постепенно уменьшается, как будто кто-то перетягивает ее пополам. Отверстие между образовавшимися отсеками становится уже, пока не исчезнет совсем и перетяжка не разделит клетку на две части.

Для представителей группы почкообразующихся бактерий, а также многих цианобактерий характерен другой способ размножения – почкование. При этом в определенном месте на поверхности клетки образуется почка, в которую переходит копия нуклеоида. Почка разрастается в дочернюю клетку и отделяется от материнской клетки.

Некоторые одноклеточные цианобактерии размножаются множественным делением. Оно начинается с предварительной репликации хромосомы и увеличения размеров вегетативной клетки, которая затем претерпевает ряд быстрых последовательных бинарных делений, происходящих внутри клетки. Это приводит к образованию большого количества мелких клеток, получивших название **баеоцитов**. Освобождение баеоцитов происходит путем разрыва материнской клеточной стенки. Таким образом, в основе множественного деления лежит принцип равновеликого бинарного деления. Отличие его от бинарного деления обычного типа состоит в том, что при множественном делении после бинарного деления не происходит роста образовавшихся дочерних клеток, они снова начинают делиться.

Актиномицеты размножаются либо фрагментами мицелия, либо путем образования неполовых спор. Эти способы размножения характерны и для эукариотических микроорганизмов, однако отличаются от них тем, что у последних этим процессам предшествует митотическое деление ядра, а у бактерий и архей митоз отсутствует.

1.1.2. История развития микробиологии

Открытие микроорганизмов связано с именем голландского естествоиспытателя **Антони ван Левенгука** (1632–1723), который, заинтересовавшись строением льняного волокна, отшлифовал несколько грубых линз.

Позднее он достиг большого совершенства при изготовлении линз и назвал их «микроскопиями» (рисунок 2).

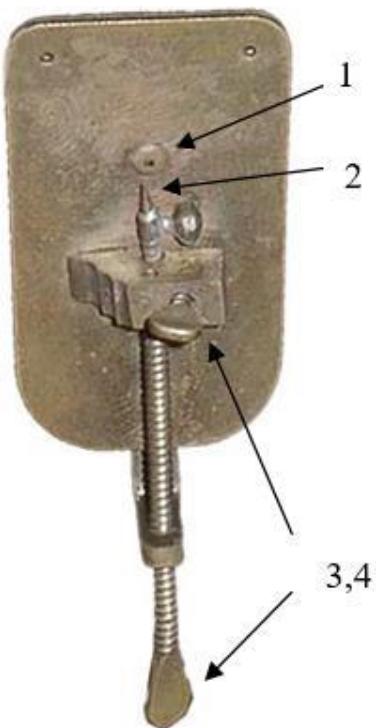


Рисунок 2 – Устройство одного из микроскопов А. ван Левенгуга: 1 – линза; 2 – булавка, к которой прикрепляется объект; 3, 4 – фокусирующие винты.

Открытие А. ван Левенгуга привлекло всеобщее внимание. Оно явилось основой развития микробиологии, изучения форм микроорганизмов и их распространения во внешней среде. Это был *морфологический*, или *описательный* период развития микробиологии, который продолжался с конца XVII до середины XIX в. Этот период для микробиологии был малоплодотворным, так как оптические приборы того времени не позволяли отличить один вид микроорганизма от другого, не могли дать представление о биологических свойствах и роли микроорганизмов в природе.

Начало изучению физиологии и биохимии микроорганизмов, выяснению их роли в природе и жизни человека положил французский ученый **Луи Пастер** (1822 – 1895). С его работ начался *физиологический* период микробиологии. Л. Пастер впервые в противоположность мнению химиков показал, что процессы брожения и гниения обусловливаются жизнедеятельностью микроорганизмов, специфических для каждого вида брожения. Он установил, что эти процессы могут осуществляться без доступа молекулярного кислорода в анаэробных условиях. Таким образом, Пастер открыл принципиально новое биологическое явление – анаэробиоз. Благодаря своим исследованиям Пастер смог установить природу «болезней» вина и пива, показав, что их скисание и прогоркание также являются результатом жизнедеятельности микроорганизмов. Он предложил способ предохранения вина и пива от скисания и прогоркания (способ борьбы с контаминацией пищевых продуктов): их кратковременный прогрев до температуры 70 – 80 °С, названный впоследствии *пастеризацией*.

К области теоретических открытий Пастера относятся его работы о невозможности самозарождения жизни. Оппоненты Пастера утверждали, что в субстратах, подвергающихся брожению или гниению, их возбудители самозарождаются. Безупречными экспериментами Пастер показал, что в сосудах со стерильным бульоном, закрытых ватными пробками во избежание контакта с воздухом, самозарождение микроорганизмов невозможно. Рост микроорганизмов наблюдается тогда, когда в сосуд с питательной средой попадает воздух, содержащий микроорганизмы, или питательная среда подвергается недостаточной термической обработке, при которой устойчивые к температуре споры бактерий не погибают.

Неоценимый вклад внес Пастер в медицинскую микробиологию. В процессе исследований он установил, что не только брожение, болезни пива и вина, шелковичных червей обусловлены жизнедеятельностью микроорганизмов, но и многие болезни человека и животных также вызываются микроорганизмами. Они, подобно возбудителям брожения, очень специфичны: каждый вид патогенных микроорганизмов вызывает строго определенное заболевание. Пастер доказал микробную природу таких заболеваний человека и животных, как сибирская язва, куриная холера, бешенство. Кроме того, он разработал способ борьбы с возбудителями этих заболеваний с помощью вакцин – культур патогенных микроорганизмов с ослабленными вирулентными свойствами.

Л. Пастер с полным основанием может считаться основоположником общей, промышленной, медицинской и ветеринарной микробиологии.

Прогресс микробиологии в конце XIX в. был неразрывно связан с работами знаменитого немецкого ученого **Роберта Коха** (1843 – 1910), занимавшегося изучением возбудителей инфекционных заболеваний.

Свои исследования Кох начал с изучения сибирской язвы и показал, что возбудителями этого заболевания являются бактерии вида *Bacillus anthracis*. Позднее он открыл возбудителей туберкулеза (бактерии вида *Mycobacterium tuberculosis*), которые в его честь были названы «палочкой Коха».

В 1905 г. Коху за исследования туберкулеза была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Он и его ученики открыли возбудителей и других заболеваний – азиатской холеры, дифтерии, брюшного тифа, столбняка, гонореи.

Исследования специфических возбудителей позволили Коху сформулировать ряд подходов, необходимых для идентификации возбудителя заболевания, которые вошли в историю медицинской микробиологии как постулаты Коха:

1. Микроорганизм обнаруживают в каждом случае конкретного предполагаемого заболевания, а также в условиях, ответственных за патологические изменения и клиническое течение болезни.

2. Микроорганизм не выделяют при других болезнях как случайный или не патогенный паразит.

3. После изоляции из организма больного и выделения чистой культуры патогенный микроорганизм должен вызвать аналогичное заболевание у восприимчивого животного.

Р. Кох и его ученики обогатили микробиологию новыми методами исследований:

- разработали методы окраски микроорганизмов анилиновыми красителями;
- усовершенствовали технику микроскопирования – конденсор Аббе и иммерсионные объективы, что дало возможность выявлять плохо различимые бактериальные формы;
- ввели в микробиологическую практику плотные питательные среды, на которых микроорганизмы способны формировать колонии, что в свою очередь позволяет невооруженным глазом определять количество жизнеспособных микроорганизмов в пробе. Для создания плотных питательных сред в качестве уплотнителя испробовали жидкость глаза убойного скота, крахмал, затем желатин и наконец агар-агар (вещество, состоящее из двух кислых полисахаридов – агарозы и агаропектина, содержащихся в клеточных стенках красных водорослей);
- разработали методику выделения чистых культур бактерий из изолированных колоний на плотных средах;
- разработали стеклянные емкости для культивирования микроорганизмов на плотных средах (стажер Р. Коха – Р. Петри), которые называются чашками Петри;
- внедрили в микробиологическую практику дезинфекцию как способ удаления микроорганизмов с поверхностей.

Родоначальником русской микробиологии является **Л. С. Ценковский** (1822 – 1887).

Он впервые дал научно обоснованную классификацию микроорганизмов, установил близость бактерий к сине-зеленым водорослям. Л. С. Ценковский интересовался также проблемами медицинской микробиологии и создал вакцину против сибирской язвы, которая в его честь получила название «живая вакцина Ценковского» и до настоящего времени успешно применяется в ветеринарной практике.

Велика заслуга в развитии микробиологии **И. И. Мечникова** (1845 – 1916). Он открыл явление фагоцитоза и впервые показал, что защита организма от болезнестворных микроорганизмов – сложная биологическая реакция, в основе которой лежит способность фагоцитов захватывать и разрушать посторонние тела, попавшие в организм.

В 1909 г. за исследования по фагоцитозу Мечникову была присуждена Нобелевская премия в области иммунологии.

Исследования Мечникова не ограничивались формулированием фагоцитарной теории. Он изучал патогенез холеры и биологию холероподобных вибрионов, показал возможность заражения шимпанзе сифилисом и предложил метод лечения сифилиса моноклеридом ртути.

И. И. Мечников является также основоположником учения о микробном антагонизме, послужившем основой для развития науки об антибиотикотерапии. Он показал, что молочнокислые бактерии подавляют гнилостные бактерии.

На принципе микробного антагонизма Мечников обосновал теорию долголетия и предложил для продления человеческой жизни использовать простоквашу, которая впоследствии получила название «мечниковской». В настоящее время эта теория подтверждена многочисленными экспериментами и положена в основу развития отдельной отрасли биотехнологии, связанной с получением и использованием пробиотиков.

Пробиотиками называют живые культуры микроорганизмов (среди них преобладают молочнокислые бактерии), которые вводят в организм, обеспечивая заселение ими кишечного тракта. В процессе роста и развития такие культуры осуществляют, прежде всего, коррекцию нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта и выполняют еще ряд полезных функций.

Соратником И. И. Мечникова был микробиолог и эпидемиолог **Н. Ф. Гамалея** (1859 – 1949), который внес большой вклад в изучение туберкулеза, холеры, бешенства, организовал в России первую бактериологическую станцию и ввел в практику вакцинацию людей против бешенства.

Он создал также противохолерную и оспенную вакцины, впервые описал явление лизиса бактерий под действием агентов, которые впоследствии были названы бактериофагами.

Н. Ф. Гамалея считается одним из основоположников не только медицинской микробиологии, но и имmunологии и вирусологии, поэтому его имя присвоено Институту эпидемиологии и микробиологии в Москве.

Большой вклад в развитие микробиологии внес **Д. И. Ивановский** (1864 – 1920), который в 1892 г. открыл вирус, вызывающий мозаичную болезнь табака.

Открытие Ивановского послужило толчком к обнаружению возбудителей вирусных заболеваний человека и животных.

Д. И. Ивановский по праву считается основоположником новой ветви микробиологии – вирусологии.

Создание учения об экологии почвенных микроорганизмов неразрывно связано с именем выдающегося русского исследователя **С. Н. Виноградского** (1856 – 1953).

С. Н. Виноградский внес значительный вклад в познание физиологического многообразия микроорганизмов. Он открыл процесс хемосинтеза, показав на примере нитрифицирующих бактерий, серобактерий и железобактерий, что в природе существуют микроорганизмы, способные извлекать энергию при окислении восстановленных неорганических соединений.

Виноградский также доказал, что автотрофные бактерии могут расти на минеральных средах, получая необходимую для этого роста энергию путем окисления восстановленных неорганических соединений и используя в качестве источника углерода углекислый газ, т. е. открыл новый хемолитоавтотрофный тип

питания микроорганизмов. Заслугой Виноградского является и то, что он впервые выделил из почвы анаэробные бактерии, способные фиксировать молекулярный азот, названные им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*.

Для выделения в лабораторных условиях бактерий с определенными свойствами (определенной физиологической группы) Виноградский предложил создавать специфические (элективные) условия, способствующие преимущественному развитию данной группы микроорганизмов, т. е. он разработал метод накопительных культур.

С.Н. Виноградский опубликовал свыше 300 научных работ по экологии и физиологии почвенных микроорганизмов и поэтому его по праву считают родоначальником почвенной микробиологии.

Принцип выделения микроорганизмов, основанный на методе накопительных культур, был успешно развит голландским микробиологом **М. Бейеринком** (1851 – 1931). Он впервые выделил из почвы чистые культуры клубеньковых бактерий (симбиотических азотфиксаторов) и аэробных свободноживущих азотфиксирующих бактерий *Azotobacter chroococcum*. Кроме того, Бейеринк выделил чистые культуры сульфатредуцирующих бактерий, которые составляют важное звено в круговороте серы. Ему принадлежат работы по изучению денитрификации и ферментов разных групп микроорганизмов.

Ученик С. Н. Виноградского **В. Л. Омелянский** (1867 – 1928) многое сделал для изучения нитрифицирующих, азотфиксирующих и пектинолитических бактерий.

Он впервые выделил целлюлозоразрушающие бактерии, описал их физиологию и химизм брожения клетчатки. В. Л. Омелянский написал первый учебник по микробиологии на русском языке.

Таким образом, выдающиеся ученые во второй половине XIX в. заложили прочный фундамент общей микробиологии, на котором в XX в. эта наука достигла расцвета.

Развитие микробиологии в XX в. ознаменовалось крупными открытиями в области биохимии и генетики микроорганизмов. Так, в 1925 г. **Г. А. Надсон** (1867 – 1940) впервые получил индуцированные мутации дрожжей посредством облучения клеток рентгеновскими лучами. Он также изучал роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе и их геологическую деятельность.

В середине 50-х годов XX в. **А. Клюйвер** (1888 – 1956) и **К. ван Ниль** (1897 – 1985) провели сравнительное биохимическое изучение относительно далеко отстоящих друг от друга физиологических групп микроорганизмов. Они обнаружили, что закономерности процессов энергетического и конструктивного метаболизма для всех микроорганизмов едины. На основании этого А. Клюйвер и К. ван Ниль сформулировали основы теории биохимического единства жизни.

В 1941 г. американские исследователи **Дж. Бидл** (1903 – 1989) и **Э. Татум** (1909 – 1975), изучая проявление индуцированных мутаций у грибов рода *Neurospora*, сумели приблизиться к пониманию функций генов и сформулиро-

вали свой знаменитый постулат «один ген – один фермент». Это открытие совпало по времени с серией достижений генетики микроорганизмов, и его можно считать началом «генетического» периода в истории развития микробиологии.

В 1944 г. американские ученые **О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти** доказали роль ДНК в хранении и передаче наследственной информации, осуществив эксперименты по генетической трансформации у бактерий.

Исследования **Дж. Ледерберга, Э. Татума, Н. Циндера и У. Хейса** в период с 1946 по 1952 г. показали наличие половой дифференциации у бактерий. Они открыли и изучили трансдукцию и конъюгацию, а также закономерности рекомбинации генетического материала у бактерий при этих способах обмена генетической информацией.

В 1953 г. **Дж. Уотсон и Фр. Крик** расшифровали строение молекулы ДНК, раскрыли генетический код, механизмы репликации ДНК и регуляции синтеза белка.

Успехи в области генетики микроорганизмов обусловили развитие нового направления – молекулярной генетики, являющейся основой генетической инженерии. Генетическая инженерия внесла потенциально новые идеи и методы в производство широкого спектра биологически активных веществ. Открытия и достижения, полученные на микроорганизмах, явились также основой для возникновения таких новых научных направлений, как молекулярная биология, молекулярная биотехнология, молекулярная вирусология, белковая инженерия и др.

Современный период развития микробиологии тесно связан с научно-техническим прогрессом, потребностями народного хозяйства и здравоохранения. Он характеризуется комплексностью исследований, направленных как на решение общебиологических проблем, так и задач, связанных с рациональным использованием природных ресурсов, охраной окружающей среды, развитием сельского хозяйства, здравоохранения, микробиологической, горнодобывающей и биотехнологической промышленности.

1.2. Систематика прокариот

1.2.1. Принципы систематики

Систематика (таксономия) прокариот является одним из наиболее важных и сложных, но менее разработанных разделов микробиологии. Задачами систематики являются классификация, номенклатура и идентификация организмов.

Классификация – распределение множества организмов по группам (таксонам).

Основной таксономической категорией является вид. Виды объединяются в роды, роды – в семейства, семейства – в порядки, далее следуют классы, отделы, царства. В микробиологии существуют также более мелкие таксономические единицы, чем вид: подвид (*subspeciens*), разновидность. Подвиды могут различаться по физиологическим (*biovar*), морфологическим (*morphovar*) или по антигенным (*serovar*) свойствам. Большое значение в микробиологии имеют такие понятия, как **клон** – чистая культура, полученная из одной клетки, и **штамм** –

культуры бактерий одного вида, выделенные из различных источников либо из одного источника в разное время или полученные в ходе генетических манипуляций. Разные штаммы одного и того же вида бактерий могут отличаться друг от друга по целому ряду свойств, например, по чувствительности к антибиотикам, способности к синтезу токсинов, ферментов и др.

Номенклатура – присвоение названий отдельным группам и видам микроорганизмов. В систематике прокариот, так же как и в ботанике, зоологии, принята бинарная номенклатура, согласно которой прокариотам присваивается название, состоящее из двух слов: первое определяет их принадлежность к конкретному роду, второе – к виду. Например, *Clostridium botulinum* и *Clostridium tetani* – два различных вида бактерий, относящихся к одному роду. Названия прокариотам присваивают в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры прокариот.

Идентификация устанавливает принадлежность микроорганизмов к определенному таксону на основании наличия конкретных признаков. В большинстве случаев идентификация заключается в определении родовой и видовой принадлежности микроорганизмов.

Определение прокариот до вида важно не только с позиции чисто познавательной, общебиологической, но и связано с решением ряда прикладных и научных задач. Особенно это важно для медицинской, ветеринарной и промышленной микробиологии, где действующими объектами являются микроорганизмы, и мельчайшие неточности в определении вида могут привести к нежелательным последствиям.

В настоящее время в микробиологии приняты два различных подхода к систематике, обусловливающих существование двух систем классификации: филогенетической (естественной) и фенетической (искусственной). В основу **филогенетической** классификации положена идея создания системы прокариот, объективно отражающей родственные отношения между разными группами бактерий и историю их эволюционного развития. **Фенетическая** классификация преследует, в первую очередь, практические цели, заключающиеся в том, чтобы быстрее установить принадлежность микроорганизма к определенному таксону. Наиболее четко последняя получила свое выражение в Определителе бактерий Берджи (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*), периодически издаваемом Обществом американских бактериологов с привлечением к его написанию крупных специалистов из других стран, изучающих те или иные группы бактерий. Первое издание Определителя было выпущено в 1923 г. группой американских бактериологов под руководством Д. Берджи.

При классификации прокариот учитывается большое количество различных свойств и признаков. Свойства и признаки, характерные для всех прокариот данной группы и нехарактерные для микроорганизмов других групп, называют **критериями систематики**. Чем больше общих признаков имеют сравниваемые организмы, тем больше и оснований для включения их в одну таксономическую группу. В связи с тем, что количество признаков, используемых для классификации микроорганизмов, значительно возросло, в конце 50-х годов XX в. возникла

нумерическая (численная) таксономия, основанная на принципах классификации французского ботаника М. Адансона (1757). В основе нумерической таксономии лежит принцип сопоставления организмов по возможно большему количеству учитываемых признаков при допущении, что все они для систематики равнозначны. Однако допущение о равнозначности всех признаков является и основным недостатком нумерической таксономии.

При идентификации прокариот приоритетным является использование генетических (молекулярно-биологических), фенотипических и серологических подходов и критериев систематики.

1.2.2. Генетические критерии систематики

Наиболее объективными и дающими представление о филогенетических связях между микроорганизмами являются генетические (молекулярно-биологические) критерии. К ним относятся определение относительного содержания ГЦ-пар в ДНК, молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот, определение нуклеотидных последовательностей в молекулах ДНК или РНК, применение генетических зондов (ДНК-зондов), рестрикционный анализ ДНК, методы генетического анализа (изучение переноса генов, генетических скрещиваний, картирование хромосом прокариот и др.).

Относительное содержание ГЦ-пар в ДНК представляет собой стабильный признак прокариот, не зависящий ни от возраста, ни от условий культивирования, ни от отдельных перестроек генов в хромосоме (т. е. данное свойство практически не изменяется под влиянием большинства мутаций).

Молекулы ДНК разных микроорганизмов отличаются друг от друга относительным содержанием пуриновых и пириимидиновых оснований, которые формируют комплементарные пары в антипараллельных цепях ДНК. Близкородственные микроорганизмы имеют идентичное или сходное содержание ГЦ-пар в ДНК, а далеко отстоящие в генетическом отношении сильно отличаются по относительному содержанию этих азотистых оснований.

Нуклеотидный состав ДНК бактерий можно определить химическими и физическими методами. К химическим относится метод хроматографии на бумаге. К физическим относятся метод определения содержания азотистых оснований по температуре плавления ДНК и метод ультрацентрифугирования ДНК в градиенте плотности хлорида цезия.

Более тонким методом оценки генетического сходства организмов является **метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот**, с помощью которого определяют число и степень сходства гомологичных участков в геномах сравниваемых видов. Главным достоинством этого метода является то, что он впервые позволил провести количественную оценку родства микроорганизмов. В основе метода лежит способность денатурированных (одноцепочечных) ДНК в подходящих условиях реассоциировать, т. е. соединяться с образованием двухцепочных молекул ДНК.

Как уже отмечалось, сравнивать генотипы прокариот можно с помощью **методов генетического анализа**. Известно, что перенос генетической информации

и рекомбинация ее с ДНК реципиента может происходить только между двумя родственными организмами. Осуществлению межвидового, межродового переноса генов могут препятствовать внешние барьеры, например, различия в строении поверхностных структур клеток, что ограничивает конъюгацию или необходимое для трансдукции прикрепление бактериофага. Таким же препятствием является ферментативное расщепление «чужой» ДНК после ее проникновения в клетку в результате рестрикции со стороны хозяина. Образование генетических рекомбинантов служит значительно более точным показателем уровня генетической гомологии, чем гибридизация *in vitro*, поскольку включение каждого отдельного фрагмента молекулы ДНК донора зависит от степени его гомологии с ДНК реципиента именно в том небольшом специфическом участке хромосомы, в котором должна произойти рекомбинация.

В последние годы в таксономических исследованиях нашел применение такой метод изучения строения генома прокариот, как *рестрикционное картирование*. Ферменты рестриктазы способны распознавать специфические нуклеотидные последовательности и в строго определенных участках (сайтах рестрикций) «разрезать» молекулы ДНК на фрагменты (рестрикты). Расположение фрагментов ДНК, продуктов расщепления, разделенных с помощью электрофореза в агарозном геле, дает существенную информацию о типе и количестве специфических нуклеотидных последовательностей в хромосомах изучаемых организмов и позволяет судить об их сходстве или различии. Этот метод привлекателен в силу того, что дает возможность выявить сравнительно тонкие различия в последовательностях нуклеотидов ДНК и поэтому его можно использовать для дифференциации микроорганизмов на внутривидовом уровне.

Метод молекулярных, или генных, зондов (ДНК-зондов) основан на реакции гибридизации между фрагментом нуклеотидной последовательности (зондом), несущим наиболее специфический и консервативный для данного вида прокариот ген, с полимерной ДНК изучаемого микроорганизма. С помощью этого метода можно идентифицировать любой биологический объект. Точность метода зависит от используемого зонда (его «чистоты»). Наилучшими ДНК-зондами являются полученные путем химического синтеза олигонуклеотидные последовательности, расположение нуклеотидов в которых соответствует таковому в участке гена (или всего гена), ответственного за определенную функцию бактерий. ДНК-зонды метят различными способами, например флуоресцентными красителями, радиоизотопами или биотином. Разрешающая способность метода может быть значительно повышена с помощью цепной ДНК-полимеразной реакции.

В основе *полимеразной цепной реакции (ПЦР)* лежит многократное реплицирование специфического участка нуклеотидной последовательности, катализируемое ДНК-зависимой ДНК-полимеразой, и использование праймера (от англ. *primer* – запал, средство воспламенения) – фрагмента ДНК, несущего наиболее специфичную для данного микроорганизма нуклеотидную последовательность гена (или участка гена). С помощью праймера обнаруживают искомый

фрагмент идентифицируемого микроорганизма. Чувствительность метода исключительно высока и за несколько часов он позволяет увеличить число копий исследуемого фрагмента ДНК в 10^6 – 10^8 раз. ПЦР может быть использована для идентификации ДНК любого микроорганизма, если для него имеется соответствующий праймер. Применение ПЦР особенно показано в тех случаях, когда трудно выделить чистую культуру возбудителя какого-либо заболевания из-за сложности методов культивирования, малого количества возбудителя в исследуемом образце, высокой антигенной изменчивости и т. д. ПЦР незаменима для обнаружения во внешней среде так называемых некультивируемых, но жизнеспособных форм бактерий, в том числе патогенных (холерного вибриона, сальмонелл, легионелл и др.). Тест-системы с праймерами для проведения ПЦР в целях обнаружения возбудителей различных заболеваний разработаны и внедряются в практику.

Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) дает возможность проводить сопоставительный анализ последовательностей в различных молекулах ДНК и РНК. Поскольку секвенирование всего генома прокариот в настоящее время – трудоемкая и дорогостоящая процедура, то чаще всего анализируются нуклеотидные последовательности рибосомных РНК – 16S-рРНК. Эта РНК универсально распространена, функционально постоянна и, кроме того, достаточно консервативна, чтобы установить глубокие эволюционные связи. Чем больше различий в последовательности нуклеотидов 16S-рРНК у двух бактерий, тем раньше началось расхождение между ними и, следовательно, тем дальше отстоят они друг от друга в филогенетических отношениях.

1.2.3. Фенотипические критерии систематики

В классификации прокариот используют набор фенотипических признаков: морфологических, культуральных, физиологических и биохимических.

Описание *морфологических признаков* включает определение формы, размеров клеток и их взаимного расположения, типа жгутикования, наличия капсулы, способности образовывать споры, особенностей внутреннего строения. К категории морфологических признаков относится и окраска по методу Грама, связанная со строением клеточной стенки. Однако только морфологических признаков для идентификации прокариот недостаточно. Если, например, выделены подвижные грамотрицательные палочки, не образующие эндоспоры и имеющие длину 6 мкм, то определить их видовую принадлежность только на основании этого невозможно, ибо указанными признаками обладают прокариоты многих видов.

При характеристике *культуральных признаков*, т. е. таких, которые проявляются при выращивании прокариот в различных условиях, отмечают особенности роста прокариот на плотной питательной среде (размер, окраска, форма, характер колоний) и в жидких питательных средах (образование осадка, пленки, взвеси, хлопьев и т. д.). Однако и этих признаков недостаточно, так как у культур различных видов они могут проявляться сходным образом.

К числу **физиологических признаков** относятся возможность использовать те или иные источники углерода и азота, потребность в факторах роста, тип энергетических процессов (аэробное и анаэробное дыхание, брожение), отношение к температуре, влажности, кислотности среды и другим факторам внешней среды.

Разнообразными являются **биохимические признаки** прокариот, которые обусловлены наличием тех или иных ферментов, образованием определенных продуктов метаболизма (кислоты, спирты, газы и др.), типом запасных веществ, химическим составом клеток и т. д.

1.2.4. Серологические критерии систематики

Серологические (от лат. *serum* – сыворотка) критерии систематики основаны на специфических реакциях взаимодействия антигенов (компоненты клеточных стенок, жгутиков, капсул, ДНК и токсинов) идентифицируемых микроорганизмов с антителами, содержащимися в сыворотках. Между антигенами и соответствующими им антителами происходит связывание, что положено в основу методов серологической диагностики.

Такие серологические реакции, как агглютинация, преципитация, связывание комплемента, иммунофлуоресценция, иммуноферментный и радиоиммунный анализ, позволяют легко и быстро проводить предварительную идентификацию микроорганизмов.

Для постановки серологических реакций необходима сыворотка, которую получают из крови лабораторного животного, иммунизированного коллекционным (известной видовой и штаммовой принадлежности) микроорганизмом. Она содержит антитела, специфичные к данному штамму. Полученную сыворотку используют в серологических реакциях для выявления родственных микроорганизмов, обладающих такими же антигенными детерминантами, как и коллекционный штамм.

Серологические методы являются важным инструментом в диагностике и лечении инфекционных заболеваний человека и животных, поскольку с их помощью можно не только идентифицировать возбудителя заболевания, но и обнаружить в крови больных и переболевших специфические антитела к соответствующим возбудителям. Серологические методы, пожалуй, остаются единственными методами диагностики при невозможности или трудностях выделения возбудителя, сравнительно редко дают ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

1.2.5. Современная классификация прокариот

В современной систематике прокариот сложилась ситуация, характерная и для классификации других организмов: достигнуты успехи в создании филогенетической системы классификации, отражающей основные направления эволюционного развития и родство представителей определенных таксонов, но сохраняют свое значение искусственные фенотипические классификации, более удобные для идентификации микроорганизмов.

В настоящее время отсутствует сколько-нибудь детализированная эволюционная система прокариот и, скорее всего, решение этой проблемы – дело неблизкого будущего. Особенности прокариот в области морфологической, физиологобиохимической, генетической организации говорят о неприменимости к ним хорошо разработанных принципов, используемых при построении системы высших организмов.

Не останавливаясь на исторических аспектах проблемы систематики прокариот, следует отметить, что наиболее приемлемой филогенетической системой классификации прокариот является система, основанная на сопоставлении последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК.

На основании рассчитанных коэффициентов сходства 16S- и 18S-рРНК сравниваемых организмов в 80-е гг. XX в. К. Вёзе с сотрудниками предложили трехдоменную систему классификации живых организмов: *Eucarya*, *Bacteria*, *Archaea*.

К домену *Eucarya* отнесены все эукариоты. К *домену Bacteria* отнесено подавляющее большинство прокариот – бактерии. В *домен Archaea*, получивший название архей, вошли сравнительно малоизученные прокариоты, часто обитающие в экстремальных условиях.

Система классификации прокариот, основанная на сопоставлении последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК, положена в основу 2-го издания многотомной энциклопедии прокариот – Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Руководство по систематике бактерий Берджи), вышедшей в свет в 2001-2007 гг. В этом труде при классификации бактерий учитываются также и организация их геномов в сочетании с фенотипическими свойствами. Важно отметить, что и по фенотипическим свойствам представители трех доменов существенно различаются между собой (таблица 2).

Таблица 2 – Сопоставительный анализ фенотипических свойств представителей трех доменов.

Свойство	Домены		
	Эукариоты	Археи	Бактерии
Организация клеток	Эукариоты	Прокариоты	Прокариоты
Муреин в клеточной стенке	Отсутствует	Отсутствует	Присутствует
Тип рибосом	80S	70S	70S
Наличие инtronов в генах	Да	Есть в генах, кодирующих тРНК, рРНК и некоторые белки	Нет
Наличие оперонов	Нет	Да	Да
Наличие плазмид	Редко	Да	Да
Жирные кислоты в липидах мембран	Присутствуют	Отсутствуют	Присутствуют

Свойство	Домены		
	Эукариоты	Archaea	Bacteria
Митоз и мейоз	Есть	Нет	Нет
Мембранные органеллы	Есть	Нет	Нет
Первая аминокислота в синтезирующем полипептиде	Метионин	Метионин	N-формилметионин
Чувствительность синтеза белка к антибиотику хлорамфениколу	Устойчив	Устойчив	Чувствителен
Чувствительность синтеза мРНК к антибиотику рифампицину	Устойчив	Устойчив	Чувствителен
Чувствительность белка к дифтерийному токсину	Чувствителен	Чувствителен	Устойчив
Диссимиляционная редукция S	Нет	Есть	Есть
Фиксация молекулярного азота	Нет	Есть	Есть
Хемолитотрофия	Нет	Есть	Есть

В настоящее время в составе *домена Bacteria* насчитывается от 84 до 92 филогенетических групп (филумов, типов). Следует подчеркнуть, что некоторые из этих ветвей содержат бактерии, которые не выделены в виде чистых культур и поэтому еще детально не изучены. Для представителей данных видов известны только последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК. Большинство филогенетических ветвей бактерий представлено грамотрицательными бактериями и только две филогенетические ветви – бактериями, имеющими клеточную стенку грам-положительного типа. Самой крупной и разнообразной по составу является ветвь грамотрицательных бактерий протеобактерий (*Proteobacteria*).

Протеобактерии – очень гетерогенная в морфологическом, физиологическом и биохимическом плане группа грамотрицательных бактерий. Для представителей этой группы характерны все типы энергетического метаболизма и питания. Клетки большинства видов Протеобактерий имеют палочковидную, сферическую или вибриоидную форму, размножаются в основном бинарным делением, но для некоторых видов характерно почкование и образование плодовых тел в сложном клеточном цикле. В этой группе имеются как подвижные за счет жгутиков, так и неподвижные бактерии. По отношению к молекулярному кислороду Протеобактерии бывают облигатными аэробами, облигатными и факультативными анаэробами. Группа Протеобактерий на основании различий в 16S-рРНК разделена на пять подгрупп: альфа, бета, гамма, дельта и эпсилон. Краткая характеристика Протеобактерий, к которым по составу 16S-рРНК наиболее близки митохондрии и хлоропласти большинства эукариот, приведена в таблице 3.

Таблица 3 – Грамотрицательные бактерии филогенетической группы *Proteobacteria* (Протеобактерии)

Основные фенотипические группы	Наиболее распространенные роды
Ферментирующие палочки вибрионы	Энтеробактерии, <i>Vibrio</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Zymomonas</i>
Палочки и кокки, обладающие аэробным дыханием	<i>Pseudomonas</i> , <i>Zoogloea</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Azomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Legionella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Rickettsia</i>
Бактерии, образующие чехлы	<i>Sphaerotilus</i> , <i>Leptothrix</i> , <i>Crenothrix</i>
Бактерии, образующие простеки	<i>Caulobacter</i> , <i>Hypomicrobium</i>
Паразиты бактерий	<i>Bdellovibrio</i>
Спириллы и магнитоспириллы	<i>Spirillum</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Magnetospirillum</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter</i>
Миксобактерии	<i>Polyangium</i> , <i>Myxococcus</i>
Бактерии, восстанавливающие сульфаты и серу	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfosarcina</i> , <i>Desulfuromonas</i>
Нитрификаторы	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosospira</i> , <i>Nitrosococcus</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrococcus</i>
Бактерии, окисляющие серу и железо	<i>Thiobacillus</i> , <i>Thiomicrospira</i> , <i>Thermothrix</i> , <i>Beggiatoa</i> , <i>Thiothrix</i> , <i>Gallionella</i>
Бактерии, окисляющие водород	<i>Alcaligenes</i> , <i>Ancylobacter</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Spirillum</i>
Метилотрофные бактерии	<i>Methylomonas</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylococcus</i>
Фотосинтезирующие пурпурные бактерии	Серные: <i>Chromatium</i> , <i>Thiospirillum</i> , <i>Thiocapsa</i> ; несерные: <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodocyclus</i>

Кроме Протеобактерий к грамотрицательным относятся следующие основные группы бактерий: водородные термофилы, зеленые нитчатые бактерии, зеленые серные бактерии, цианобактерии, спирохеты, цитофаги, бактероиды, хламидии, планктомицеты, deinококки, хлорофлексусы, фузобактерии, фиробактерии, термодесульфобактерии, термотоги, лептоспириллы, ацидбактерии и др.

Филогенетические группы грамположительных бактерий – *Actinobacteria* и *Firmicutes*. Группа *Actinobacteria* («актиномицетная ветвь») представлена следующими родами бактерий, имеющими в ДНК высокое содержание ГЦ-пар: *Geodermatophilus*, *Frankia*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* и др. Группа *Firmicutes* («клостридиальная ветвь» – главным образом грамположительные бактерии с низким содержанием ГЦ-пар в ДНК) состоит из следующих родов: *Clostridium*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Caryophanon*, *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Sporosarcina*, *Bacillus*, *Desulfotomaculum*, *Helicobacterium*,

В настоящее время в составе *домена Archaea* выделяют от 7 до 26 филумов (типов). Из них наиболее изучены *кренархеоты* (*Crenarchaeota*) и *эвриархеоты* (*Euryarchaeota*). Представители других филумов архей (*Korarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Lokiarchaeota*, *Thorarchaeota* др.) содержат единичные штаммы, полученные в виде чистых культур, а основное их большинство не поддается культивированию в лабораторных условиях и идентифицировались только по анализу нуклеиновых кислот из проб, полученных из мест их обитания. Для них известны последовательности генов, кодирующих молекулы 16S-рРНК. Деление архей на филумы подтверждается результатами секвенирования целых геномов этих микроорганизмов.

Заканчивая рассмотрение филогенетических ветвей прокариот, следует отметить, что предложенная филогенетическая система, основанная на исследовании нуклеотидных последовательностей только одного гена рибосомной РНК – не более чем одна из технически удобных и разработанных систем упорядочения многочисленных организмов в целях их идентификации, поэтому построить логически верную таксономию прокариот только с учетом этого признака не представляется возможным.

Наиболее признанной и используемой фенетической (искусственной) классификацией прокариот является классификация, представленная в девятом издании Определителя бактерий Берджи. В этом издании прокариоты на основании строения пограничного слоя клетки разделены на четыре основные категории (отдела): 1) *Gracilicutes* (от лат. *cutes* – кожа, *gracilis* – тонкий) – грамотрицательные прокариоты, имеющие клеточные стенки; 2) *Firmicutes* (от лат. *fimus* – прочный) – грамположительные прокариоты, имеющие клеточные стенки; 3) *Tenericutes* (от лат. *tener* – мягкий, нежный) – прокариоты, лишенные клеточных стенок; 4) *Mendosicutes* (от лат. *mendosus* – ошибочный) – археи, клеточные стенки которых отличаются от аналогичных структур других прокариот.

В отдел *Gracilicutes* входят прокариоты различной морфологии с грамотрицательной клеточной стенкой. Размножение происходит в основном бинарным делением, некоторые прокариоты размножаются почкованием. Эндоспор не образуют. Большинство подвижны: встречаются все типы передвижения – с помощью жгутиков, скольжением, изгибанием. Отдел включает аэробные, анаэробные и факультативные анаэробные прокариоты; фототрофные и хемотрофные прокариоты. Отдел подразделяют на три класса: *Scotobacteria*, *Oxyphotobacteria*, *Anoxyphotobacteria*. В класс *Scotobacteria* входят грамотрицательные прокариоты, не использующие световую энергию для целей метаболизма, а получающие ее только в результате окислительно-восстановительных реакций. Название класса происходит от греч. *scotos* – темнота. Это самый крупный класс прокариот. В класс *Anoxyphotobacteria* входят пурпурные бактерии, зеленые бактерии и гелиобактерии, осуществляющие аноксигенный фотосинтез (без выделения молекулярного кислорода). Класс *Oxyphotobacteria* представлен цианобактериями, осуществляющими оксигенный фотосинтез (с выделением молекулярного кислорода). Этот тип фотосинтеза аналогичен фотосинтезу, протекающему в растениях.

В отдел *Firmicutes* включены прокариоты с грамположительной клеточной стенкой. Клетки могут иметь разную форму: палочки, кокки, нитевидные, ветвящиеся. Некоторые представители образуют эндоспоры. Большинство из них неподвижны; подвижные формы имеют перитрихиальное жгутикование. В состав отдела входят аэробные, анаэробные и факультативно анаэробные прокариоты. Отдел состоит из двух классов: *Firmibacteria*, *Thallobacteria*. Класс *Firmibacteria* включает большое количество не имеющих тенденции к ветвлению грамположительных прокариот. Класс *Thallobacteria* включает прокариоты, клетки которых способны «ветвиться».

Отдел Tenericutes представлен прокариотами, не имеющими клеточной стенки. В связи с отсутствием клеточной стенки форма клеток непостоянна: в чистой культуре одного вида одновременно присутствуют кокковидные, палочковидные, нитевидные, грушевидные, дисковидные и другие клетки. Размножение прокариот, входящих в этот отдел, происходит бинарным делением, почкованием. Окрашивание по Граму отрицательное. Характерно образование мелких, врастающих в агар колоний. Могут быть сапротрофными, паразитами или патогенами. Отдел состоит из одного класса *Mollicutes* (микоплазмы).

Отдел Mendosicutes образован прокариотами с ригидной клеточной стенкой, но не содержащей пептидогликана муреина. Большинство представителей – строгие анаэробы, многие из которых имеют жгутики. Виды характеризуются экологическим и метаболическим разнообразием, способностью жить в экстремальных условиях.

В заключение следует подчеркнуть, что большинство микроорганизмов, существующих в природных сообществах, еще должно быть выделено в чистые культуры. Считается, что в настоящее время культивировать можно только 0,1 % всего микробного разнообразия, а остальных представителей бактерий вырастить и идентифицировать не удается, хотя уже в чистую культуру выделены и описаны около 5 тыс. видов прокариот.

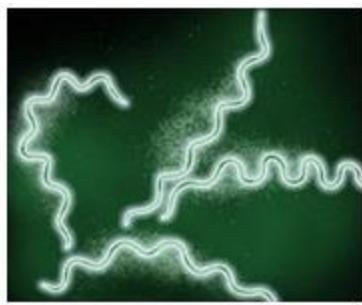
1.3. Морфология и структурная организация клеток прокариот

1.3.1. Морфология прокариот

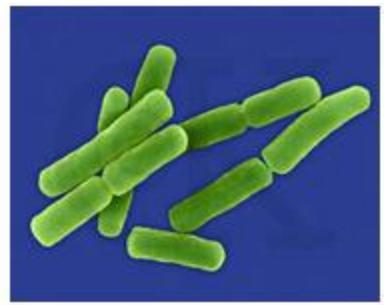
Для прокариот характерны клетки трех основных форм: шаровидная (сферическая), или кокковидная (от греч. *kokkos* – зерно), цилиндрическая (палочковидная) и извитая (рисунок 3).



A



Б



В

Рисунок 3 – Микрофотографии клеток прокариот: *A* – сферических; *Б* – извилистых; *В* – палочковидных.

Кокковидные прокариоты обычно имеют форму правильного шара диаметром 1,0 – 2,0 мкм, но могут быть овальными, эллипсоидными, бобовидными. Кокковидные прокариоты способны делиться в нескольких плоскостях, при этом после деления клетки могут не расходиться и формировать различного вида скопления (рисунок 4).

Если деление кокков происходит в одной плоскости, то могут образовываться пары клеток – *диплококки* (от лат. *diplos* – двойной) и цепочки клеток разной длины – *стрептококки* (от греч. *streptos* – цепочка). Кокки, делящиеся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и не расходящиеся после этого, образуют тетрады кокков (*тетракокки*) (от лат. *tetra* – четыре). Когда деление клеток происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются пакеты из восьми кокков в виде тюков кубической формы (*сарцины*) (от лат. *sarcina* – связка, тюк). У некоторых видов бактерий при делении кокков в нескольких плоскостях могут образовываться неправильные по форме скопления, напоминающие гроздья винограда – *стафилококки* (от лат. *staphyle* – гроздь винограда).

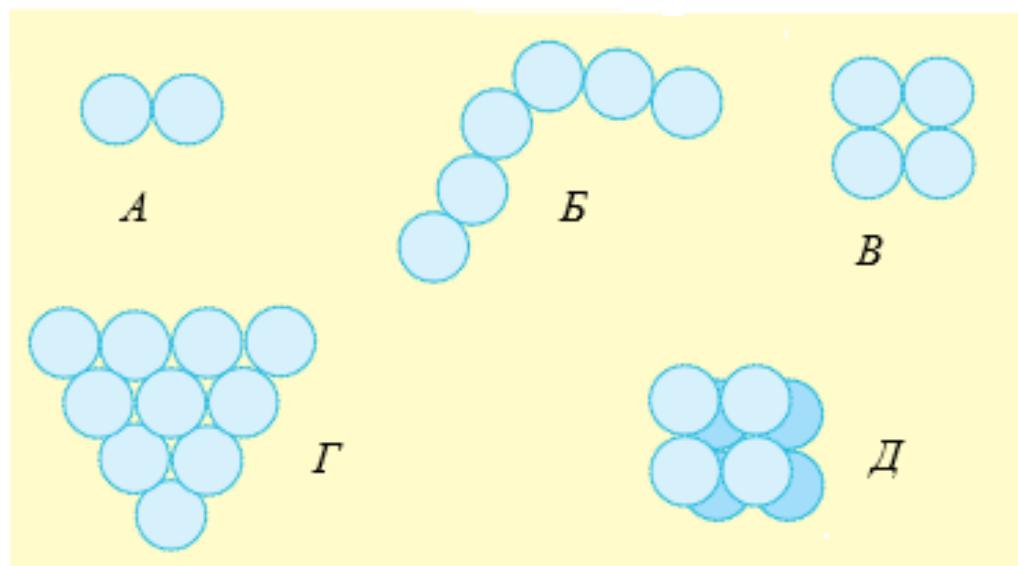


Рисунок 4 – Типы скоплений кокковидных клеток: *А* – диплококки; *Б* – стрептококки; *В* – тетракокки; *Г* – стафилококки; *Д* – сарцины.

Палочковидные (цилиндрические) клетки сильно отличаются по отношению длины клетки к ее поперечнику. Они делятся только в одной плоскости – перпендикулярно оси цилиндра. Клетки при этом могут располагаться поодиночке (монопрокариоты), образовывать пары (диплопрокариоты) или цепочки (стрептопрокариоты) (рисунок 5).

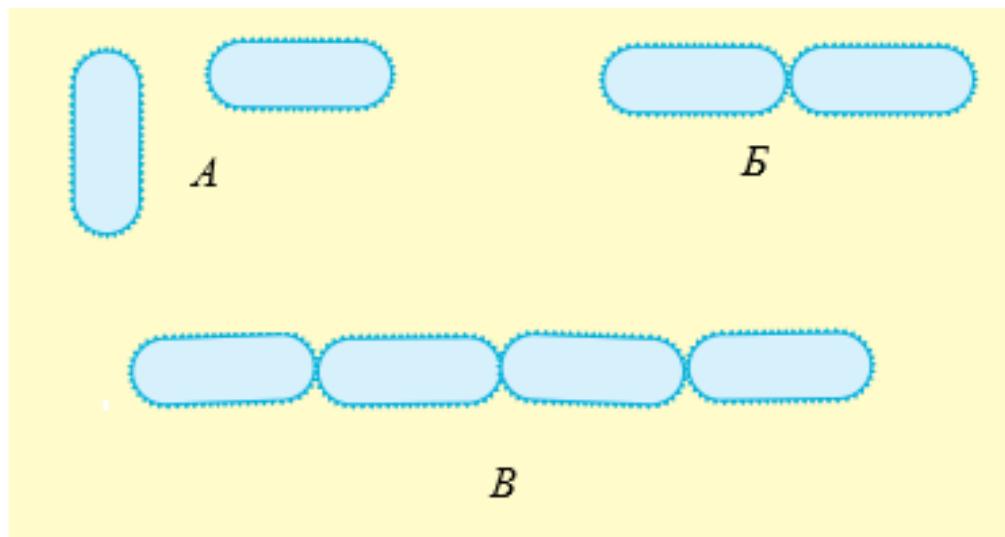


Рисунок 5 – Типы расположения палочковидных клеток: *A* – монопрокариоты; *B* – диплопрокариоты; *C* – стрептопрокариоты.

Извитые клетки могут иметь разное число завитков. В зависимости от формы и количества завитков различают три типа клеток: *вибрионы* (от греч. *vibrio* – извиваюсь, изгибаюсь) имеют один завиток, не превышающий четверти оборота спирали (изогнутые клетки наподобие запятои); *спириллы* (от греч. *speira* – спираль) имеют 3 – 5 крупных завитков и *спирохеты* – большое количество мелких завитков (рисунок 6).

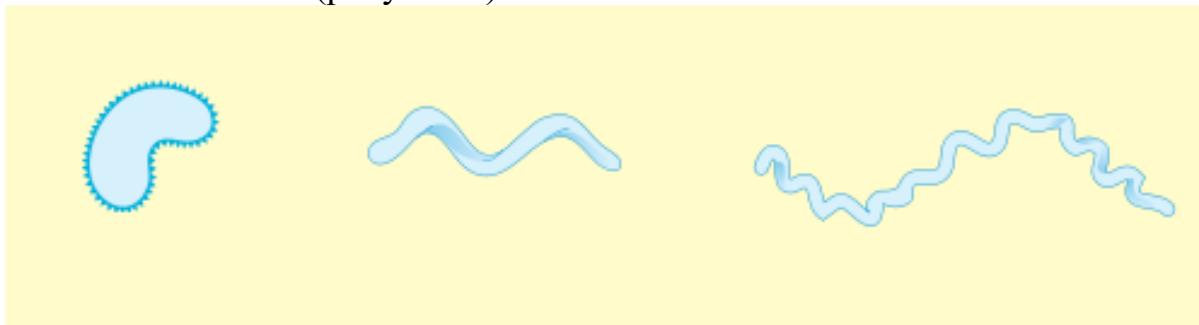


Рисунок 6 – Типы извивых клеток: *A* – вибрионы; *B* – спириллы; *C* – спирохеты.

Кроме описанных форм, которые преобладают среди прокариот, известны и клетки иных типов: клетки с выростами; булавовидной формы; веретенообразные; ланцетовидные; разветвленные и неразветвленные нитчатые; имеющие вид кольца, замкнутого или разомкнутого в зависимости от стадии роста; ветвящиеся; напоминающие шестиугольную звезду; пластинкообразные; в виде кусочековбитого стекла, квадратиков и т. д.

Форма клеток большинства прокариот является устойчивым видовым признаком. Однако существуют прокариоты, обладающие морфологической изменчивостью (плеоморфизмом), в зависимости от условий имеющие вид палочек, кокков или обнаруживающие слабое ветвление. У некоторых видов прокариот при прохождении цикла развития также наблюдается изменение формы клеток.

1.3.2. Структурная организация бактериальной клетки

Клетка прокариот, несмотря на относительно малые размеры, имеет все основные структурные компоненты, необходимые для осуществления обмена веществ (рисунок 7).

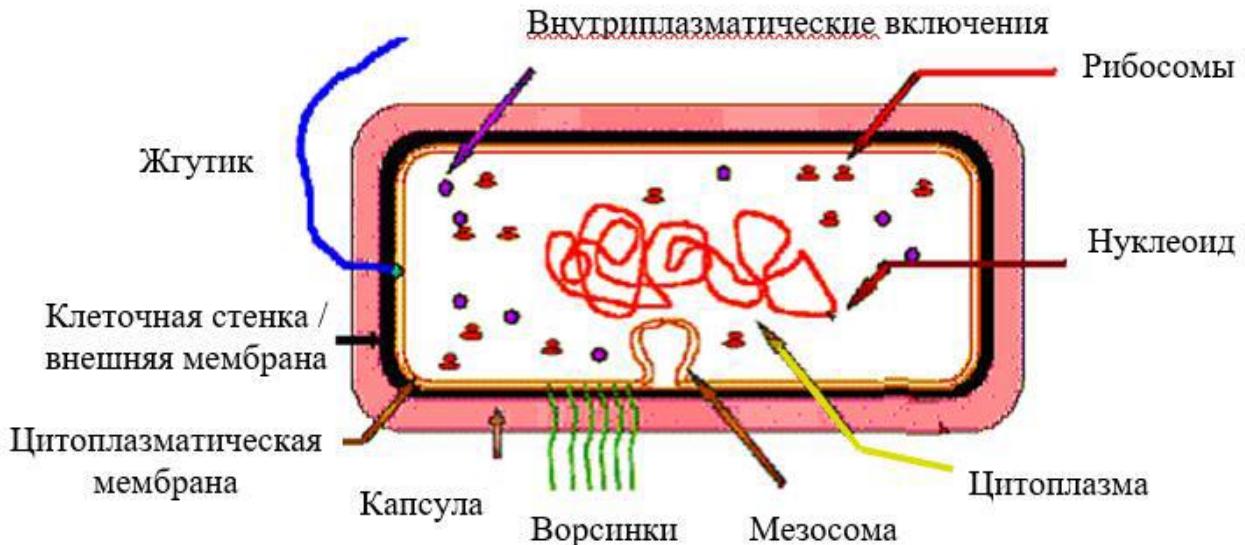


Рисунок 7 – Схематическое строение бактериальной клетки.

Как и любая другая, прокариотическая клетка имеет цитоплазму, которая окружена цитоплазматической мембраной. Цитоплазма и цитоплазматическая мембрана составляют протопласт, снаружи от него расположены поверхностные структуры. К их числу относятся клеточная стенка, капсулы, чехлы, слизистые слои, жгутики, ворсинки, гликокаликс, S-слои и т. д.

1.3.2.1. Клеточная стенка

Клеточная стенка является обязательным структурным элементом клеток прокариот, исключение составляют микоплазмы и L-формы. На долю клеточной стенки приходится от 5 до 50 % сухих веществ клетки.

По строению и химическому составу клеточная стенка прокариот отличается от таковой эукариотических организмов. Основным компонентом клеточной стенки большинства бактерий является муреин, относящийся к классу веществ пептидогликанов. **Муреин** – гетерополимер, построенный из цепочек, в которых чередуются остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенные между собой β -1,4-гликозидными связями. Такие неразветвленные гетерополимерные цепи (гликан) образуют основу муреина. Благодаря пептидным связям гетерополимерные цепи связаны между собой и образуют мешкообразную гигантскую молекулу – муреиновый мешок, который выполняет функцию опорного каркаса клеточной стенки (рисунок 8).

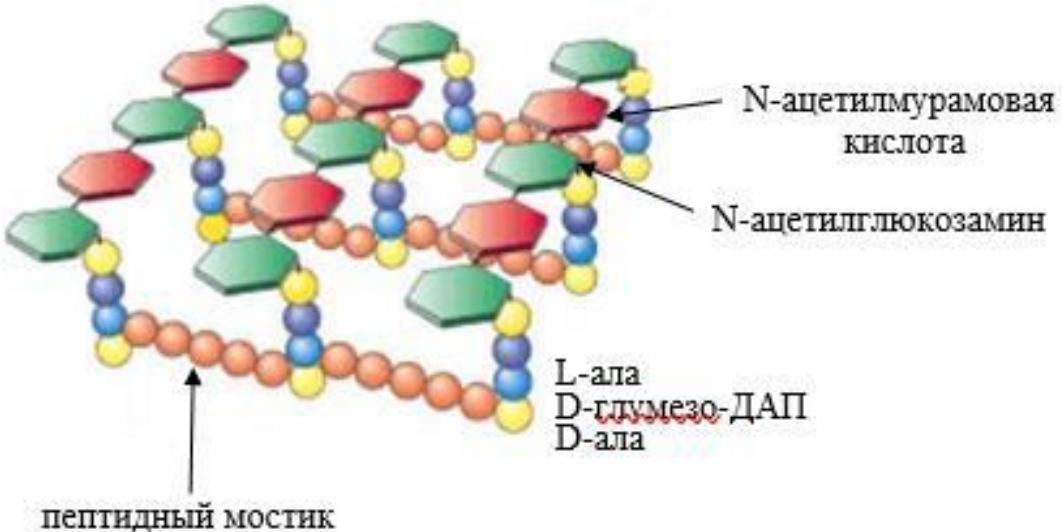


Рисунок 8 – Схематическое изображение структуры однослойного поперечносшитого муреинового мешка.

Эти структурные элементы составляют ахиллесову пяту бактерий, используемую врачами в борьбе с инфекцией. Для борьбы с инфекцией бактериальной этиологии применяют лекарственные препараты, специфически воздействующие только на клеточные стенки бактерий или на процесс их синтеза, но не на клетки растений, животных и человека.

Химический состав и строение клеточной стенки постоянны для определенного вида бактерий и являются важным диагностическим признаком, который используется для идентификации бактерий.

В зависимости от строения клеточной стенки бактерии делятся на две большие группы: грамположительные и грамотрицательные. Существует метод окраски, позволяющий разделить бактерии на эти две группы. Он был предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом. Этот метод основан на различной способности микроорганизмов удерживать в клетке красители трифенилметанового ряда – кристаллический фиолетовый или генциановый фиолетовый, что в свою очередь зависит от химического состава и ультраструктуры клеточной стенки бактерий.

Рассмотрим, как построены и чем отличаются клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка грамположительных бактерий под электронным микроскопом выглядит как гомогенный плотный слой, толщина которого колеблется для разных видов от 20 до 80 нм (рисунок 9). Муреин в клеточной стенке грамположительных бактерий составляет 50 – 90 % ее сухой массы. Пептидогликановый слой проходит в поперечном направлении еще одним полимером – тейхоевыми кислотами. Тейхоевые кислоты – это полиолфосфаты, состоящие из глицерола или рибита с большим количеством разнообразных заместителей (D-аланин, L-серин, глицин, глюкоза и N-ацетилглюкозамин). Тейхоевые кис-

лоты придают муреиновому мешку определенную степень свободы при растяжении и сжатии и действуют наподобии пружин в матрасе. Тейхоевые кислоты благодаря своей анионной полиолфосфатной природе прочно связывают ионы магния. Предполагают, что они могут в клетке выполнять роль своеобразного ионообменника. В условиях фосфатного голодания синтез тейхоевых кислот прекращается, они заменяются на тейхуроновые кислоты.

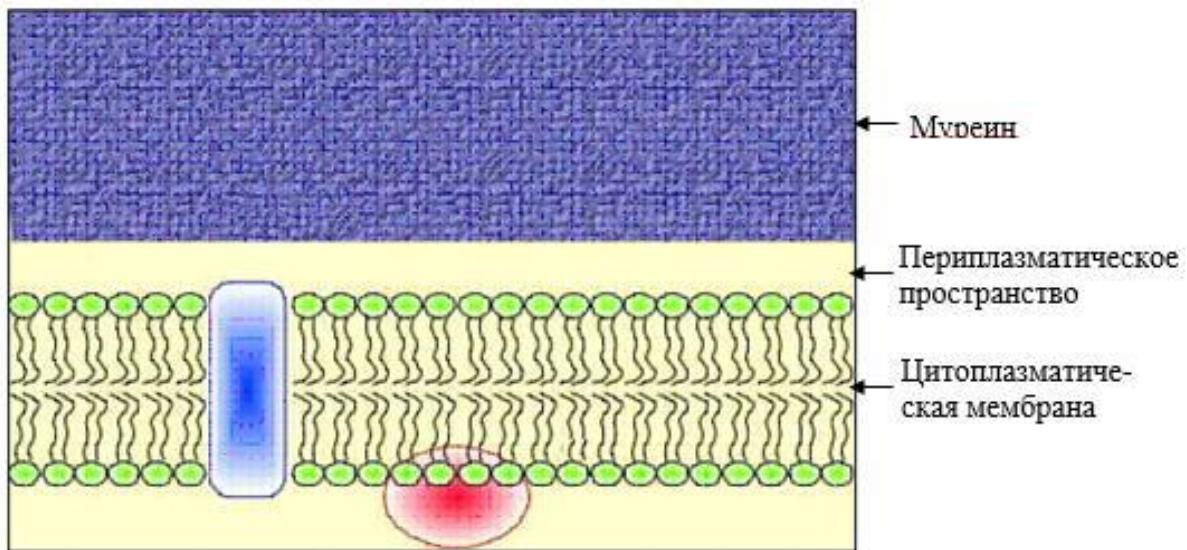


Рисунок 9 – Схематическое строение клеточной стенки грамположительных бактерий

К грамположительным бактериям относятся следующие виды: *Bacillus subtilis*, *Sarcina ventriculi*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* и др. (рисунок 10).

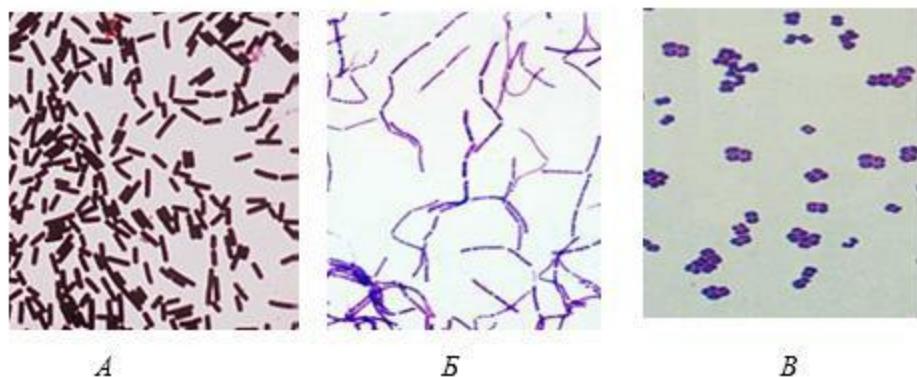


Рисунок 10 – Микрофотографии грамположительных бактерий: А – *Clostridium perfringens*; Б – *Bacillus subtilis*; В – *Sarcina ventriculi*.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее составляет 14 – 17 нм (рисунок 11). Внутренний слой клеточной стенки представлен муреином, на долю которого приходится 1 – 10 % ее сухой массы. Структурные микрофибриллы пептидогликана грамотрицательных бактерий сшиты менее компактно, поэтому поры в их пептидогликановом слое значительно шире, чем в молекулярном каркасе грамположительных бактерий.

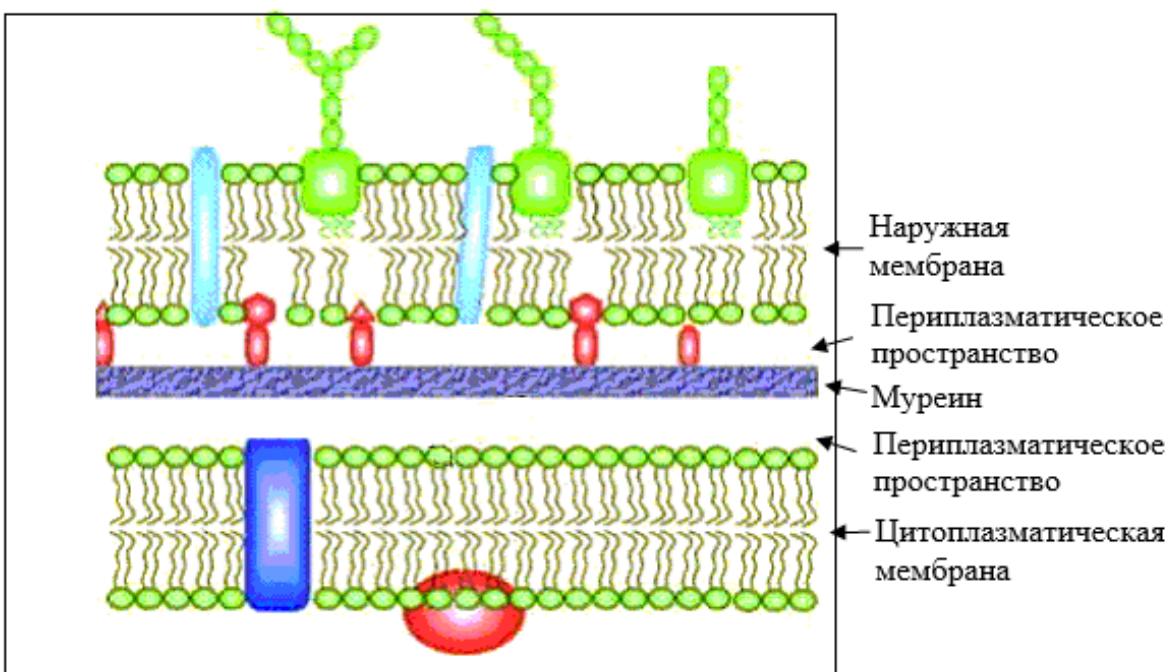


Рисунок 11 – Схематическое строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Внешний слой клеточной стенки – наружная или внешняя мембрана. По сравнению с цитоплазматической мембраной она является сильно асимметричным липидным бислоем, в котором внутренний слой состоит из фосфолипидов, представленных почти на 90 % фосфатидилэтаноламином. Внешний слой наружной мембраны состоит из липополисахаридов. Они имеют сложную химическую структуру, являются антигенами, обладают токсичностью и придают поверхности клетки отрицательный заряд.

Наружная мембрана является дополнительным барьером при поступлении веществ в клетку. Она непроницаема для гидрофильных веществ, таких как углеводы, аминокислоты, белки и др. Перенос таких веществ через нее происходит с помощью каналообразующих белков, которые представляют собой наполненные водой гидрофильные поры в липофильной мембране и поэтому называются **поринами**. С помощью поринов осуществляется пассивный транспорт через мембрану растворенных гидрофильных веществ. Наружная мембрана осуществляет контакт клеток между собой, с поверхностью субстрата, а также клетками организма-хозяина при патогенезе.

Одной из отличительных особенностей грамотрицательных бактерий является отсутствие в их клеточной стенке тейхоевых кислот.

Компоненты клеточной стенки у грамотрицательных бактерий разделены электронно-прозрачным слоем, а также четко отделены от цитоплазматической мембраны. Пространство между цитоплазматической и наружной мембраной получило название **периплазматического**. В периплазматическом пространстве находятся белки, такие как протеиназы, нуклеазы, периферические белки цито-

плазматической мембранны, рестриктазы, пермезы и, так называемые, субстратсвязывающие белки, которые участвуют в переносе некоторых субстратов в цитоплазму.

К грамотрицательным бактериям относятся следующие виды: *Escherichia coli*, *Pectobacterium carotovorum*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* (рисунок 12) и др.

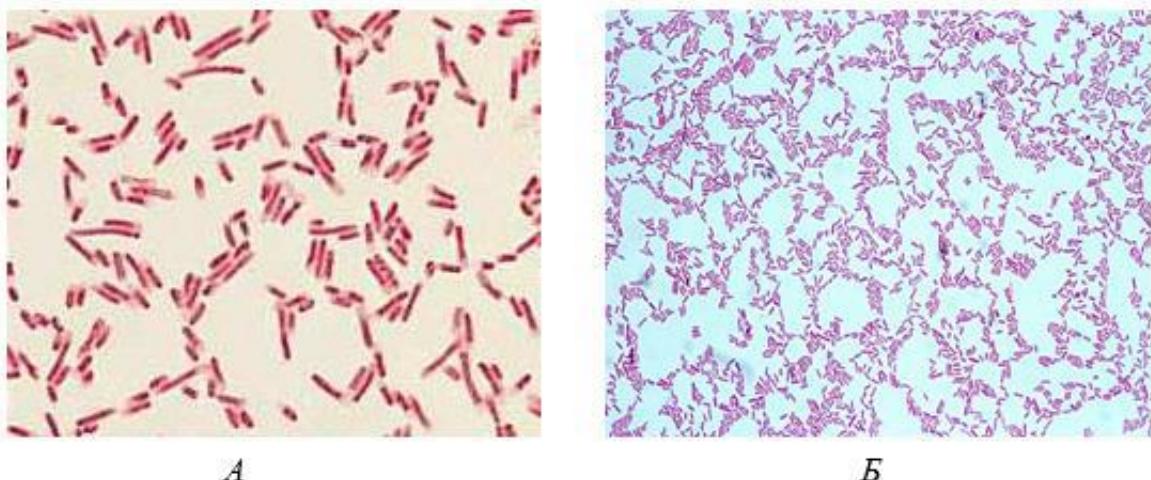


Рисунок 12 – Микрофотографии грамотрицательных бактерий: А – Микрофотографии грамотрицательных бактерий: А – *Escherichia coli*; Б – *Pseudomonas aeruginosa*.

Клеточная стенка бактерий выполняет следующие функции:

- механическую защиту клетки от воздействий факторов окружающей среды;
- обеспечивает поддержание формы бактериальной клетки;
- дает возможность клетке существовать в гипотонических растворах;
- осуществляет транспорт веществ и ионов (характерно для грамотрицательных бактерий, имеющих наружную мембрану, которая является дополнительным барьером для их поступления; основным барьером служит цитоплазматическая мембрана);
- препятствует проникновению в клетку токсических веществ (также более характерно для грамотрицательных бактерий, имеющих наружную мембрану);
- на клеточной стенке находятся рецепторы, на которых адсорбируются бактериофаги и бактериоцины;
- в клеточной стенке находятся антигены (липополисахариды у грамотрицательных бактерий и тейховые кислоты у грамположительных бактерий);
- на клеточной стенке находятся рецепторы, ответственные за взаимодействие клеток донора и реципиента при конъюгации бактерий.

Вместе с тем следует отметить, что клеточная стенка не является жизненно важной структурой, так как в определенных условиях она может быть удалена и бактериальные клетки при этом существуют в виде протопластов или сферопластов.

Протопластами называют клетки округлой формы, полностью лишенные остатков клеточной стенки и окруженные только цитоплазматической мембраной. Их образование характерно чаще для грамположительных бактерий. **Сферопласти** отличаются от протопластов тем, что у них сохраняются остатки клеточной стенки, а образуются они преимущественно из клеток грамотрицательных бактерий.

Протопласты и сферопласты можно получить в лабораторных условиях, обрабатывая клетки бактерий лизоцимом, разрушающим муреин; антибиотиками пенициллинового ряда (пенициллин, ампициллин, карбенициллин и др.) или циклосерином, подавляющими синтез муреина. Фермент лизоцим действует на β -1,4-гликозидные связи муреина и тем самым разрушает его у бактерий со сформировавшейся клеточной стенкой. Антибиотики пенициллинового ряда и циклосерин оказывают действие только на растущие бактерии, нарушая синтез муреина клеточной стенки, именно они препятствуют поперечной сшивке пептидогликановых цепей, т. е. образованию пептидных связей.

Протопласты и сферопласты стабильно сохраняются в гипертонических или изотонических условиях. Для создания гипертонических условий чаще всего используют сахарозу или маннит в концентрациях 0,1 – 1,0 М. В гипотонических условиях протопласты и сферопласты лопаются и образуют «тени».

Протопласты и сферопласты в 3-10 раз крупнее исходных клеток бактерий. В гипертонических или изотонических условиях они осуществляют обмен веществ, характерный для исходных клеток, т. е. сохраняют дыхательную активность, синтезируют необходимые биополимеры, образуют эндоспоры, если процесс споруляции уже был инициирован. Можно наблюдать рост сферопластов и протопластов, а иногда и их деление. В отличие от исходных клеток, на них не адсорбируются бактериофаги и бактериоцины.

При снятии действующего на образование муреина фактора (пенициллин, циклосерин, лизоцим и др.) протопласты, как правило, отмирают, реже регенерируют клеточную стенку и возвращаются в исходное состояние, но могут превращаться в L-формы. Сферопласты revertируют (превращаются) в нормальные бактериальные клетки, либо превращаются в L-формы, либо отмирают.

Бактерии, частично или полностью лишенные клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию, принято называть **L-формами**.

L-формы образуются в результате несбалансированного роста нормальных бактериальных клеток в длину и толщину и поэтому плеоморфные. В культурах L-форм обнаруживаются клетки размером 0,2-50 мкм. Они шаровидные, нитевидные, присутствуют и бесструктурные массы. L-формы проходят через бактериальные фильтры и легко разрушаются при механических воздействиях.

В отличие от протопластов и сферопластов, клетки L-форм имеют хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран, т. е. у них содержатся

мезосомы, а в отличие от нормальных клеток L-формы часто содержат крупные вакуоли.

L-формы обладают пониженным уровнем метаболической активности по сравнению с исходными бактериями. Они нечувствительны к любым агентам, действующим на клеточную стенку.

Культивировать L-формы можно только на специальных средах с высоким осмотическим давлением. L-формы лучше растут на плотной, чем в жидкой среде. На плотной среде они образуют колонии, врастающие в агар и имеющие характерную форму перевернутой шляпы. Колонии растут медленно, хотя иногда достигают значительных размеров.

У L-форм не функционируют нормальные механизмы клеточного деления. В основном они делятся с образованием элементарных тел, которые отпочковываются от поверхности клетки или от мембраны вакуоли.

Бактерии, у которых отсутствует клеточная стенка, существуют и в природе: это микоплазмы. Первым описанным представителем микоплазм явился возбудитель плевропневмонии крупного рогатого скота. Подобные микроорганизмы обнаружены и у других животных – овец, коз, крыс, собак, а также у человека, всем им было дано общее название PPLO (плевропневмониеподобные организмы). Кроме того, микоплазмы могут существовать как сапрофиты в естественных условиях, а также вызывать заболевания.

1.3.2.2. Цитоплазматическая мембрана и ее производные

Цитоплазматическая мембрана составляет в зависимости от вида бактерий 8 – 15 % сухой массы клетки. Химический состав ее представлен белково-липидным комплексом, в котором на долю белков приходится 50 – 75 %, на долю липидов – 15 – 50 %. Главным липидным компонентом мембранны являются фосфолипиды. Белковая фракция цитоплазматической мембраны представлена структурными белками, обладающими ферментативной активностью. Белковый состав цитоплазматической мембраны разнообразен. Так, в цитоплазматической мембране бактерий вида *Escherichia coli* содержится около 120 различных белков. Кроме того, в составе мембран обнаружено небольшое количество углеводов.

Цитоплазматическая мембрана бактерий по химическому составу в целом сходна с мембранами эукариотических клеток, но мембранны бактерий богаче белками, содержат необычные жирные кислоты и в основном не имеют стеринов.

К строению цитоплазматической мембраны бактерий приложима жидкостно-мозаичная модель, разработанная для мембран эукариот. Согласно этой модели, мембрана состоит из бислоя липидов. Гидрофобные «концы» молекул фосфолипидов и триглицеридов направлены внутрь, а гидрофильные «головки» – наружу. В двойной слой липидов встроены белковые молекулы (рисунок 13). По расположению и характеру взаимодействия с липидным бислоем белки цитоплазматической мембраны подразделяются на периферические и интегральные.

Периферические белки связаны с поверхностью мембраны и легко вымываются из нее при изменении ионной силы растворителя или при воздействии хелатирующими агентами. Обычно они растворяются в нейтральных буферных растворах и переходят в них без липидных компонентов. К периферическим белкам относятся НАДН-дегидрогеназы, малатдегидрогеназы, а также некоторые белки, входящие в АТФазный комплекс и др.

АТФазный комплекс представляет собой группу определенным образом расположенных белковых субъединиц, контактирующих с цитоплазмой, периплазматическим пространством и образующих канал, через который осуществляется перемещение протонов.

К **интегральным белкам** относятся белки, частично или полностью погруженные в толщу мембраны, а иногда и пронизывающие ее насеквось, т. е. интегральные белки как бы плавают в бислое липидов. Связь интегральных белков с липидами определяется главным образом гидрофобными взаимодействиями. Эти взаимодействия настолько прочны, что белки могут быть отделены от других элементов мембраны только при обработке детергентами, органическими растворителями, растворами мочевины. В растворе они обычно ассоциированы с липидами, и часто нуждаются в их присутствии для проявления ферментативной активности. К интегральным белкам мембранные бактерий *E. coli* относятся, например, цитохром *b*, железосерные белки, сукцинатдегидрогеназа и др.

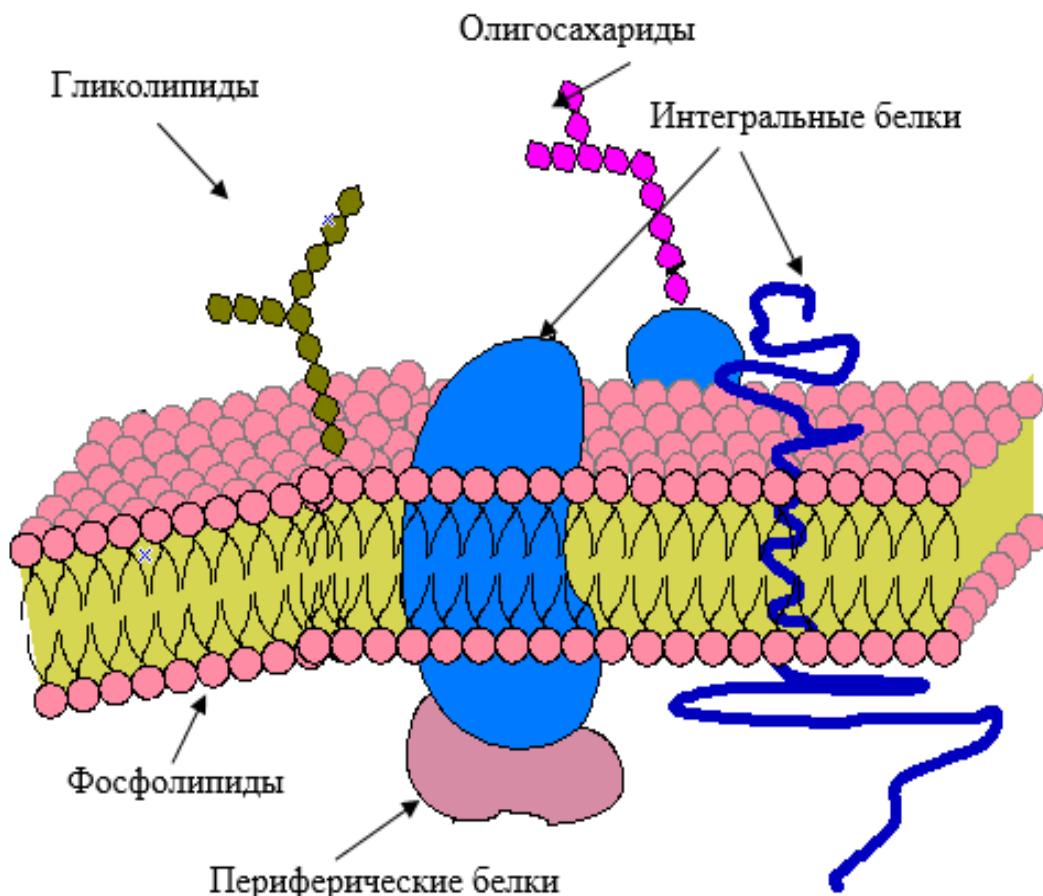


Рисунок 13 – Структура цитоплазматической мембраны.

Цитоплазматическая мембрана выполняет ряд существенных для клетки функций:

- поддержание внутреннего постоянства цитоплазмы клетки. Это достигается за счет уникального свойства цитоплазматической мембранны – ее избирательной проницаемости. Она проницаема для воды и низкомолекулярных веществ, но не проницаема для ионизированных соединений. Транспорт таких веществ внутрь клетки и выход наружу осуществляется за счет специализированных транспортных систем, которые локализуются в мембране. Такие транспортные системы функционируют за счет механизмов активного транспорта и системы специфических ферментов пермеаз;
- с вышеуказанной особенностью цитоплазматической мембранны связана и функция транспорта веществ в клетку и вывод их наружу;
- в цитоплазматической мембране локализуются электронтранспортная цепь и ферменты окислительного фосфорилирования;
- топлазматическая мембрана связана с синтезом клеточной стенки и капсулы за счет наличия в ней специфических переносчиков для образующих их молекул;
- в цитоплазматической мембране закреплены жгутики. Энергетическое обеспечение работы жгутиков связано с цитоплазматической мембраной.

У прокариот, принадлежащих к разным таксономическим группам, обнаружены **мезосомы**, которые образуются при впячивании цитоплазматической мембранны в цитоплазму (некоторые исследователи считают, что мезосома – это артефакт, возникающий при фиксации клеток для электронной микроскопии).

Мезосомы прокариот разнообразны по форме, размерам и локализации в клетке. Выделяют три основных типа мезосом: *ламеллярные* (пластиначатые), *везикулярные* (имеющие форму пузырьков) и *тубулярные* (трубчатые). В клетках некоторых прокариот обнаруживаются также мезосомы смешанного типа: состоящие из ламелл, трубочек и пузырьков. Сложно организованные и хорошо развитые мезосомы характерны для грамположительных бактерий. У грамотрицательных бактерий они встречаются значительно реже и относительно просто организованы. По расположению в клетке различают мезосомы, образующиеся в зоне клеточного деления и формирования поперечной перегородки; мезосомы, к которым прикреплен нуклеоид; мезосомы, сформированные в результате инвагинации периферических участков цитоплазматической мембранны.

Существуют разные точки зрения относительно роли мезосом в клетках прокариот. Согласно одной из них, мезосомы служат для усиления мембранных функциональных активностей клетки, так как в мембранах, образующих мезосомы, находятся ферменты, участвующие в энергетическом метаболизме прокариот. Кроме того, считают, что мезосомы играют роль в репликации ДНК и последующем расхождении ее копий по дочерним клеткам. Мезосомы участвуют в процессе инициации и формирования поперечной перегородки при клеточном делении.

Развитая система внутрицитоплазматических мембран характерна для большинства фотосинтезирующих прокариот. Поскольку в этих мембранах локализован фотосинтетический аппарат клетки, они получили название фотосинтетических мембран. Все фотосинтетические мембранны – производные цитоплазматической мембранны, возникшие в результате ее разрастания и глубокого впячивания (инвагинации) в цитоплазму. Фотосинтетические мембранны образуют у этих прокариот ***тилакоиды***.

Для нитрифицирующих и метанокисляющих прокариот характерно образование ***ламелл***.

Магнитосомы – внутриклеточные кристаллы магнетита, покрытые липопротeinовой мембраной. Они характерны для магнитоспирилл. Одним из свойств магнитоспирилл является способность ориентироваться относительно силовых линий магнитного поля земли. Эти бактерии могут усваивать железо, которое превращаются в кристаллы магнетита, обладающего сильными ферромагнитными свойствами.

1.3.2.3. Транспорт веществ в клетку прокариот

Различают следующие способы поступления веществ в клетку прокариот: простая, или пассивная, диффузия; облегченная диффузия; активный транспорт и транслокация групп.

Простая, или пассивная, диффузия – неспецифическое поступление веществ в клетку за счет разницы концентраций, т. е. происходит передвижение молекул из более концентрированного раствора в менее концентрированный – по градиенту концентрации. Этот процесс не связан с затратой энергии. Таким путем осуществляется транспорт низкомолекулярных веществ, особенно кислорода, липофильных соединений (спирты, жирные кислоты), воды, по-видимому, ядов и других чужеродных для клетки веществ, а также удаление продуктов обмена. Скорость перемещения путем простой диффузии невелика.

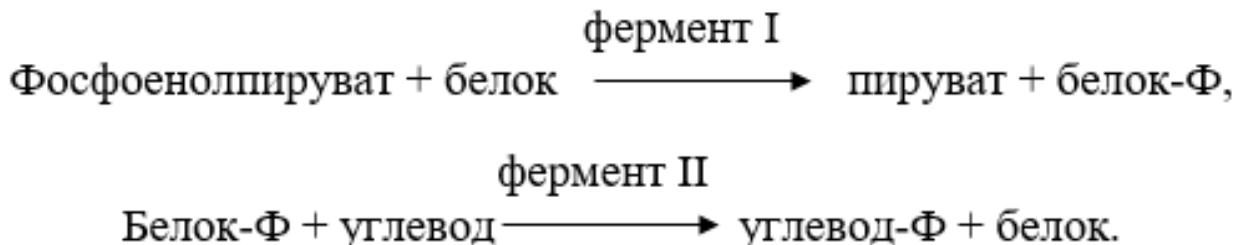
Перенос веществ при ***облегченной диффузии*** также происходит по градиенту их концентрации. Этот процесс не требует затраты энергии и осуществляется с участием специфических пермеаз. Скорость транспорта зависит от концентрации субстрата в среде.

Активный транспорт – основной механизм избирательного переноса веществ через цитоплазматическую мембрану в клетку против градиента концентрации. Этот процесс, так же как и облегченная диффузия, протекает при участии локализованных в цитоплазматической мемbrane переносчиков белковой природы – пермеаз, которые высокоспецифичны к субстрату. В отличие от облегченной диффузии, для активного транспорта необходимы затраты энергии либо в виде АТФ, либо за счет протондвижущей силы энергизированной мембранны. От активного транспорта зависит сродство клеток к субстрату, т. е. основной признак, определяющий и набор, и концентрацию используемых веществ.

У многих бактерий, особенно грамотрицательных, в активном транспорте принимают участие особые ***субстратсвязывающие белки***, не идентичные пер-

меазам и не входящие в структуру мембранны, а локализованные в периплазматическом пространстве. У субстратсвязывающих белков отсутствует катализическая активность, но они обладают очень высоким сродством к определенным питательным веществам и различным аминокислотам, углеводам, неорганическим ионам. Выделено и изучено более 100 различных субстратсвязывающих белков, которые образуют прочные комплексы со своими субстратами и необходимы для их активного переноса через мембрану. Субстратсвязывающие белки функционируют только в комплексе со специфическими пермеазами, осуществляющими активный перенос субстрата через мембрану. Необходимая для этого метаболическая энергия используется для снижения сродства пермеазы к своему субстрату на внутренней стороне мембранны по сравнению с ее сродством к нему на внешней стороне. В результате этих превращений происходит изменение скорости выхода субстрата наружу, она становится во много раз меньше скорости его поступления в клетку.

Если во всех вышеупомянутых способах переноса веществ через цитоплазматическую мембранны они поступают в клетку в химически неизмененном виде, то при *транслокации группы* происходит химическая модификация переносимых молекул. Так происходит поступление в клетку многих прокариот углеводов, в процессе которого они фосфорилируются. Источником фосфатной группы служат фосфоенолпируват и фосфорибозилпирофасфат, от которых фосфат с помощью фермента (фермента I), находящегося в цитоплазме, переносится на молекулу специального термостабильного белка, а с него при участии второго фермента (фермента II), локализованного в цитоплазматической мембранны и обнаруживающего высокое сродство к определенным углеводам, фосфатная группа переносится на углевод на наружной стороне цитоплазматической мембранны:



Фосфорилированные углеводы проникают через цитоплазматическую мембранны и накапливаются в цитоплазме, например глюкоза поступает в клетку в виде глюкозо-6-фосфата. Система переноса углеводов получила название *фосфотрансферазной*. Перенос веществ с помощью фосфотрансферазной системы является выгодным с энергетической точки зрения. Хотя при этом и происходит затраты богатой энергией фосфатной связи фосфоенолпирувата (фосфорибозил-пирофосфата), в процессе переноса образуется молекула глюкозы в фосфорилированной форме (глюкозо-6-фосфат), а это делает ненужным фосфорилирование глюкозы за счет АТФ на первом этапе ее катаболизма.

1.3.2.5. Цитоплазма и внутрицитоплазматические включения

Цитоплазма – это содержимое клетки, окруженное цитоплазматической мембраной. Фракция цитоплазмы, имеющая гомогенную консистенцию и содержащая набор растворимых РНК, ферментных белков, продуктов и субстратов метаболических реакций, получила название **цитозоля**. Другая часть цитоплазмы представлена структурными элементами: рибосомами, внутрицитоплазматическими включениями, нуклеоидом и мембранными структурами.

Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70S. Рибосомы на 60 % состоят из РНК и на 40 % из белка. Они образованы двумя субъединицами – 30S и 50S. По величине и некоторым другим особенностям рибосомы бактерий сходны с рибосомами митохондрий и хлоропластов. Меньшая субъединица 30S содержит молекулу 16S-рРНК. Субъединица 50S состоит из двух типов молекул рРНК (23S- и 5S-).

Бактериальная клетка содержит от 5 до 90 тыс. рибосом, число их тем больше, чем больше скорость роста клетки.

Рибосомы служат местом синтеза белка. Синтез белка осуществляется агрегатами, состоящими из рибосом, РНК – матричной (мРНК) и транспортных (тРНК). Такие агрегаты называются **полирибосомами** или **полисомами**. Полирибосомы могут быть связаны с мембранными структурами или же находиться свободно в цитоплазме.

Различия между рибосомами бактерий (70S) и эукариот (80S) имеют решающее значение для борьбы с инфекционными заболеваниями, так как некоторые антибиотики, действуя бактерицидно или бактериостатически, частично или полностью подавляют синтез белка, протекающий на рибосомах 70S-типа, но не затрагивают функционирования рибосом 80S-типа.

Внутрицитоплазматические включения подразделяются на активно функционирующие структуры и продукты клеточного метаболизма, не выделяющиеся наружу, а откладываемые внутри клетки.

К первой группе внутриплазматических включений относятся **газовые вакуоли**, или **аэросомы**, обнаруженные у бактерий, обитающих в воде. Аэросомы снижают удельную массу бактериальной клетки и благодаря этому поддерживают ее во взвешенном состоянии в водоеме. Аэросома представляет собой скопление газовых пузырьков (везикул), которые имеют веретенообразную форму. Их оболочка состоит только из белка, т. е. устроена не так, как обычная мембрана. Белковые молекулы ориентированы таким образом, что внутренняя сторона оказывается гидрофобной, а наружная – гидрофильной.

К первой группе включений относятся также **хлоросомы** зеленых бактерий и **фикобилисомы** цианобактерий. В этих структурах локализованы пигменты, поглощающие кванты света и передающие энергию возбуждения на фотопротекционные химические центры, т. е. они принимают непосредственное участие в фотосинтезе. Это эллипсовидные образования, окруженные тонкой белковой оболочкой (толщиной 2,5 – 3,0 нм), которая состоит из отдельных глобул.

Карбоксисомы, или **полиэдрические тела**, содержатся в клетках некоторых автотрофных прокариот. Они имеют форму многогранника диаметром 90 – 100

ным, окруженного однослойной белковой оболочкой. В карбоксисомах содержится рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза – ключевой фермент, катализирующий фиксацию CO_2 в цикле Кальвина в процессе фото- и хемосинтеза.

Ко второй группе включений (продуктам клеточного метаболизма) относятся **запасные вещества** – полифосфаты, полисахариды, жиры, сера. Эти вещества накапливаются, если в питательной среде находятся соответствующие исходные соединения, но вместе с тем рост бактерий ограничен или вообще невозможен из-за недостатка каких-то отдельных компонентов питания или же присутствия ингибиторов. Запасные вещества содержатся в клетках в осмотически инертной форме, т. е. не растворимы в воде. В условиях, благоприятных для роста, когда в этих веществах возникает потребность, они снова вкладываются в метаболизм.

Из полисахаридов в клетках микроорганизмов откладываются гликоген, крахмал и крахмалоподобное вещество гранулоза. Запасные вещества полисахариды образуются из молекул α -D-глюкозы, которые связаны α -1,4- гликозидными связями. Благодаря такому типу связей полиглюкозные цепи не вытянуты в длину, а закручены винтообразно. Много крахмала имеют клетки бактерий рода *Neisseria* и вида *Acetobacter pasteurianus*. Гранулоза содержится в большом количестве в клетках бактерий рода *Clostridium*. Гликоген, или «животный крахмал», синтезируется у бактерий вида *E.coli*, у бактерий рода *Salmonella*, у бацилл, дрожжей и других микроорганизмов. Установлено, что гликоген у бактерий встречается чаще, чем крахмал. Запасные полисахариды используются микроорганизмами в качестве источников углерода и энергии.

Жиры накапливаются в виде гранул и (или) капелек, преломляющих свет по-иному, чем содержимое цитоплазмы, и поэтому хорошо различимы в световом микроскопе. Запасным жироподобным веществом многих бактерий (например, представителей рода *Pseudomonas*) является поли- β -гидроксимасляная кислота. Это полиэфир, растворимый в хлороформе и состоящий примерно из 60 остатков β -оксибутиратов. Доля этого вещества в сухой биомассе клеток может достигать 80 %. Поли- β -гидроксимасляная кислота является хорошим источником углерода и энергии. Микроорганизмы могут накапливать также триглицериды (нейтральные жиры). Особенно много их запасается в клетках дрожжей и других грибов. Кроме того, микробактерии могут содержать до 40 % восков.

Полифосфаты откладываются в гранулах, называемых **волютиновыми** или **метахроматиновыми зернами**. Название «метахроматиновые зерна» обусловлено тем, что они вызывают характерные изменения цвета (метахромазию) некоторых красителей (метиленового синего, толуидинового синего). Полифосфаты играют роль фосфатных депо и источников энергии.

У многих бактерий, таких как пурпурные и бесцветные серобактерии, зеленые серные бактерии и других, окисляющих сульфид до сульфата, в процессе метаболизма в клетке откладывается молекулярная сера в виде шариков, сильно преломляющих свет. Количество накапляемой серы зависит от содержания H_2S в окружающей среде. Серу служит источником энергии и донором электронов.

Специфическими запасными веществами цианобактерий являются **цианофитиновые гранулы**, состоящие из полипептида, в который входят аргинин и аспарагиновая кислота в эквимолярных количествах. Остов молекулы полипептида построен из остатков аспарагиновой кислоты, соединенных пептидными связями, а к их β -карбоксильным группам присоединены остатки аргинина. Цианофитиновые гранулы служат резервом азота, который используется цианобактериями при его недостатке в среде.

Некоторые спорообразующие бактерии (например, *Bacillus thuringiensis*) содержат **параспоральные тельца** белковой природы, токсичные для отдельных видов насекомых.

1.3.2.6. Жгутики и движение прокариот

Большинство прокариот передвигаются при помощи жгутиков. Рассмотреть жгутики можно только в электронном микроскопе. В световом микроскопе без специальных методов обработки отдельные жгутики не видны.

По расположению и числу жгутиков на поверхности клетки прокариоты подразделяются:

- на **монотрихи** – имеют один жгутик (например, бактерии родов *Caulobacter* и *Vibrio*);
- **лофотрихи** – имеют на одном или на обоих полюсах клетки пучок жгутиков (например, бактерии родов *Pseudomonas*, *Chromatium*);
- **амфитрихи** – имеют по жгутику на обоих полюсах клетки (например, бактерии рода *Spirillum*);
- **перитрихи** – большое количество жгутиков, располагающихся по всей поверхности клетки (например, бактерии вида *E.coli* и рода *Erwinia*) (рисунок 14).

Жгутики представляют собой спирально закрученные нити, состоящие из специфического белка **флагеллина**. Флагеллин построен из субъединиц с относительно малой молекулярной массой. Субъединицы располагаются по спирали вокруг внутреннего свободного пространства. Аминокислотный состав флагеллина у разных видов прокариот может варьировать.

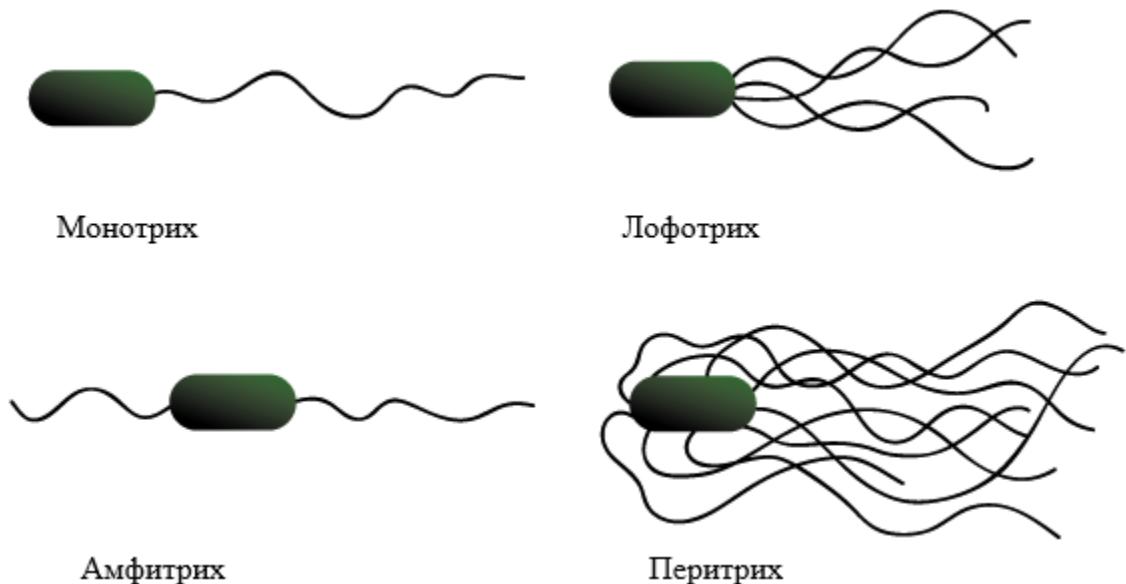


Рисунок 14 – Типы жгутикования у прокариот.

Жгутик состоит из трех частей: нити, крюка и базального тельца (рисунок 15). С помощью базального тельца, в которое входит центральный стержень и кольца, жгутик закреплен в цитоплазматической мембране и клеточной стенке. Количество колец у грамотрицательных и грамположительных бактерий различно. У грамотрицательных бактерий имеются четыре кольца: L, P, S, M. Из них L и P – наружная пара колец; S и M – внутренняя пара колец. L-кольцо закреплено в наружной мембране, P – в пептидогликановом слое клеточной стенки, S и M – в цитоплазматической мембране.

У грамположительных бактерий базальное тельце устроено проще. Оно состоит только из двух колец: S и M, т. е. только из внутренней пары колец, которые размещаются в цитоплазматической мембране.

Жгутики прокариот по характеру работы подобны корабельному винту. Если клетка имеет много жгутиков, они при движении собираются в пучок, который образует своеобразный пропеллер. Пучок жгутиков, быстро вращаясь против часовой стрелки, создает силу, заставляющую прокариоты двигаться почти по прямой линии. После того как направление вращения жгутиков изменяется, пучок расплетается и клетка останавливается, вместо поступательного движения она начинает хаотически вращаться, ее ориентация изменяется. В тот момент, когда все жгутики прокариот снова начнут синхронно вращаться против часовой стрелки, образовав пропеллер, толкающий клетку, направление ее поступательного движения будет отличаться от первоначального. Таким способом прокариоты могут изменять направление своего движения.

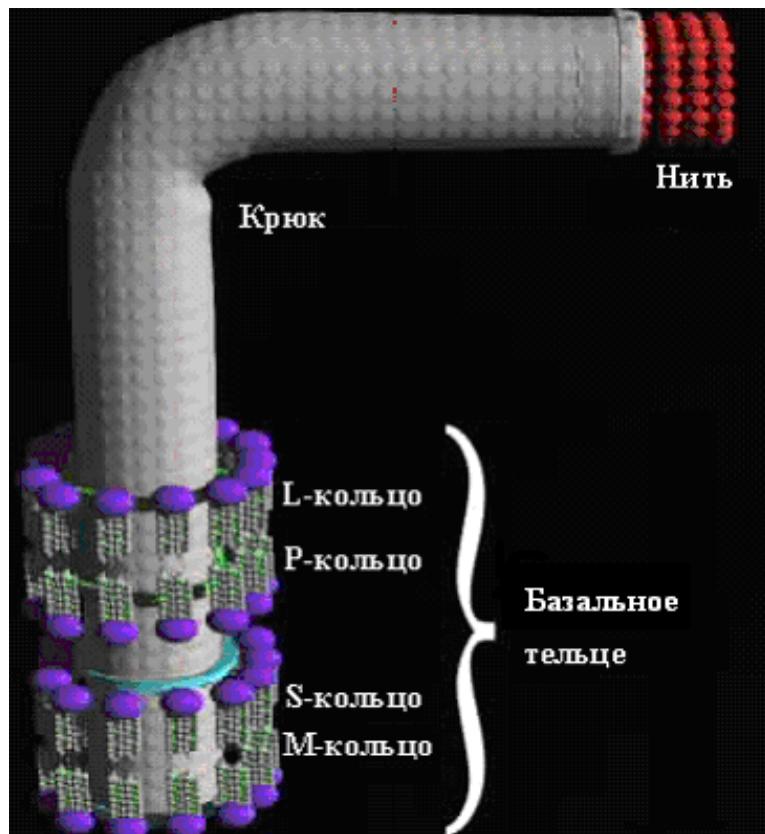


Рисунок 15 – Структура жгутика грамотрицательных бактерий.

Своеобразный тип движения характерен для спирохет. Клетка спирохет состоит из протоплазматического цилиндра, представленного пептидогликановым слоем и цитоплазматической мембраной, и окруженного внешним чехлом. Вокруг протоплазматического цилиндра в периплазматическом пространстве находятся пучки нитчатых структур – *аксиальные фибриллы*, которые, как и жгутики, состоят из белка флагеллина. Эти структуры обеспечивают движение спирохет как в жидкой среде, так и на разделе фаз жидкой и плотной среды (рисунок 16).

Число аксиальных фибрилл колеблется от 2 до 100. Один конец каждой аксиальной фибриллы прикреплен вблизи полюса протоплазматического цилиндра, а другой – свободен. Клетка содержит по два набора фибрилл, прикрепленных субполярно у каждого полюса клетки. Каждая аксиальная фибрилла тянется практически вдоль всей длины клетки, а в центральной части клетки аксиальные фибриллы перекрываются.

Фибриллы, вращаясь или сокращаясь, обусловливают характерное для спирохет движение: путем изгибаия, вращения вокруг оси, волнообразно, винтообразно.

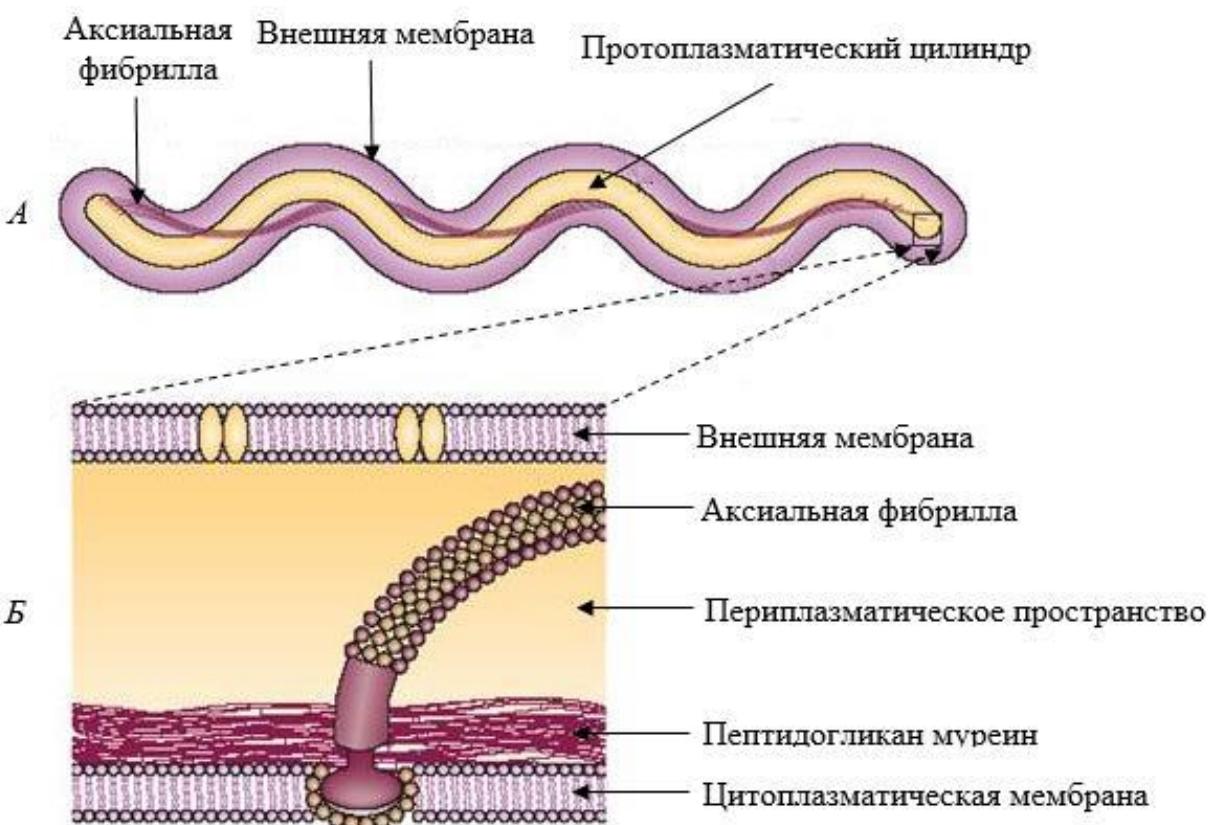


Рисунок 16 – Клетка спирохет в продольном разрезе (A) и увеличенное в размере место прикрепления аксиальной фибриллы у полюса протоплазматического цилиндра (B).

У некоторых прокариот установлен *скользящий тип передвижения*. Способность к скольжению выявлена у некоторых микоплазм, миксобактерий, цианобактерий, нитчатых серобактерий и др. Скорость при таком типе передвижения небольшая: 2 – 11 мкм/с. Активно передвигающиеся клетки имеют преимущества перед неподвижными: они могут передвигаться по поверхности твердого субстрата, поэтому способны использовать такие сложные нерастворимые соединения, как хитин и целлюлозу. Способность к скользящему движению помогает перемещаться в толще гетерогенных субстратов, таких как почва, донные осадки и небольшие каналы в гниющей древесине, помогает выбирать оптимальное положение в отношении кислорода, солнечного света, температуры и других факторов внешней среды.

Общим для всех микроорганизмов, способных к скольжению, является выделение слизи. Механизмы скольжения могут быть разными. Например, флавобактерии вида *Flavobacterium johnsoniae* скользят при помощи белков внешней мембраны, на которые передается усилие с белков цитоплазматической мембраны. Движение вперед по поверхности происходит за счет отталкивания. Многие миксобактерии (например, *Muhsosoccus xanthus*) выделяют поверхностно-активные вещества с одного конца клетки. На разных концах клетки возникают различия в величине поверхностного натяжения, которые и толкают ее вперед.

У клеток некоторых цианобактерий скользящий тип движения связан с присутствием белкового слоя, который состоит из правильно расположенных фибрилл, аналогичных нитям жгутиков, но находящихся внутри клеточной стенки. В клеточной стенке этих бактерий также обнаружены структуры, очень схожие с базальными тельцами жгутиковых форм. Вращательное движение белковых фибрилл, которое «запускается» этими структурами, приводит к появлению на поверхности клетки «бегущей волны» или движущихся микроскопических выпуклостей клеточной стенки, в результате чего клетка отталкивается от твердого или вязкого субстрата.

Для подвижных прокариот характерны **таксисы**, т. е. направленная двигательная реакция в ответ на определенный фактор. В зависимости от природы различают хемотаксис, фототаксис, магнитотаксис и вискозитаксис.

Хемотаксис – движение прокариот относительно источника химического вещества. Для каждого микроорганизма все химические вещества в этом плане могут быть разделены на две группы: инертные и вызывающие таксисы, или эффекторы. Среди эффекторов выделяют: атTRACTАНты – вещества, которые притягивают бактерии; репелленты – вещества, которые отпугивают прокариоты.

Фототаксис – движение к источнику света или от него, свойственное фототрофным бактериям.

Магнитотаксис – способность прокариот передвигаться по силовым линиям магнитного поля Земли или магнита. Выявлен в клетках бактерий, содержащих магнитосомы и распространенных в водных экосистемах разного типа.

У ряда прокариот выявлен **вискозитаксис** – способность реагировать на изменение вязкости раствора и передвигаться в направлении ее увеличения или уменьшения.

За чувствительность прокариот к градиенту концентраций определенных факторов ответственны специфические рецепторы. Рецептор реагирует на эффектор и передает сигнал определенного типа на базальное тельце жгутика.

1.3.2.7. Ворсинки (или фимбрии)

Ворсинки, или фимбрини, – поверхностные структуры, которые состоят из белка пилина и не выполняют функцию движения. По размерам они короче и тоньше жгутиков. Число фимбринов на поверхности клетки колеблется от 1–2 до нескольких тысяч, их имеют как кокковидные, так и палочковидные бактерии.

Различают два типа фимбринов: общие и специфические.

Ворсинки общего типа выполняют функцию прикрепления клеток прокариот к поверхности субстрата (живого или мертвого) или к другой клетке.

Они являются адгезинами и обеспечивают микробные контакты с неживыми объектами, тканями и клетками в восприимчивых организмах человека и животных. С их помощью происходит колонизация тканей хозяина сапротрофными и патогенными микроорганизмами, а также формирование на тканях и органах микробных биопленак. Например, уропатогенные бактерии для заселения эпителия мочевого пузыря должны иметь специфические ворсинки, которыми они прикрепляются к рецепторам эпителия, содержащим маннозу, и в результате

предотвращается вымывание бактерий с мочой. Специальные ворсинки осуществляют ту же функцию в почках, препятствуя удалению вызывающих пиелонефрит клеток бактерий из почек и мочевыводящих каналов. Таким образом, ворсинки выступают в роли одного из факторов вирулентности патогенных бактерий. Кроме того, с помощью ворсинок образуются биопленки нормальной микробиоты человека и других животных.

Специфические ворсинки – половые пили, обнаруженные у клеток-доноров, т. е. у клеток, содержащих половой фактор (F-плазмиду) или другие конъюгативные плазмиды. Если в клетке бактерий находится половой фактор, то на их поверхности синтезируются половые F-пили. На клетках, содержащих другие конъюгативные плазмиды (R-, Col-, Ti- и др.), синтезируются соответствующие половые пили. Количество половых пилей на поверхности клетки 1–2. Половые пили имеют вид полых белковых трубочек длиной от 0,5 до 10 мкм. Они играют определяющую роль в образовании конъюгационных пар при переносе генетического материала от клетки донора в клетку реципиента в процессе конъюгации.

1.3.2.8. Капсулы, слизи, чехлы, гликокаликс и S-слои

Многие микроорганизмы производят на поверхности клетки слизистое вещество. В зависимости от толщины слизистого слоя принято различать **микрокапсулу** толщиной до 0,2 мкм (она видима лишь в электронном микроскопе). Связь микрокапсул с клеточной стенкой настолько прочна, что ее иногда предлагаю рассматривать как элемент клеточной стенки. **Макрокапсулу** представлена слоем слизи толщиной более 0,2 мкм. **Слизью** называют вещество, окружающее клетку, имеющее аморфный, бесструктурный вид и легко отделяющееся от поверхности клетки прокариот, а по толщине часто превосходящее ее диаметр.

Капсулы и слизь не являются обязательными структурами клеток прокариот, так как прокариоты, их образующие, в результате мутаций легко могут превращаться в бескапсулевые формы, и эти изменения не приводят к какому-либо нарушению клеточной активности.

В большинстве случаев капсула образована полисахаридами (например, у бактерий вида *Streptococcus mutans*, некоторых представителей родов *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Corynebacterium* и др.). Капсулы же других видов бактерий состоят из полипептидов, представленных полимерами, в которых содержится много D- и L-форм глутаминовой кислоты. Примером такой капсулы является капсула бактерий вида *Bacillus anthracis*. Для ряда бактерий показана также способность синтезировать капсулу, состоящую из волокон целлюлозы. Так построена капсула у бактерий вида *Sarcina ventriculi*.

Слизи по химической природе являются полисахаридами. Особенно обильное их образование наблюдается у многих микроорганизмов при выращивании на среде с сахарозой. Например, бактерии вида *Leuconostoc mesenteroides* (относящиеся к молочнокислым бактериям) быстро превращают раствор, содержащий

тростниковый сахар, в декстрановый гель, за что их на сахарных заводах называют «бактериями лягушачьей икры».

Капсулы и слизи выполняют следующие функции:

- защитную – предохраняют клетку от действия различного рода неблагоприятных факторов внешней среды (механических повреждений, высыхания и т. п.);
- создают дополнительный осмотический барьер;
- способны выступать в качестве фактора вирулентности у некоторых бактерий (например, у *Streptococcus pneumoniae*);
- служат барьером для бактериофагов и бактериоцинов, препятствуя их адсорбции на клетках бактерий;
- являются источником запасных питательных веществ;
- объединяют клетки в цепочки, колонии;
- обеспечивают прикрепление клеток к поверхности субстрата.

Капсулные полисахариды, образуемые прокариотами, имеют большое практическое значение. Например, ксантан, внеклеточный полисахарид бактерий вида *Xanthomonas campestris*, добавляют в качестве стабилизатора и загустителя во многие пищевые продукты. Их также добавляют к буровому шламу при бурении нефтяных скважин, т. к. они устойчивы в растворах электролитов. В настоящее время производство микробных ксантанов достигает 30 000 т/год. Декстрыны, синтезируемые бактериями вида *Leuconostoc mesenteroides* и некоторыми другими прокариотами, также находят применение в пищевой промышленности и медицине. Например, декстрин с молекулярной массой 75 000 Да используют как заменитель плазмы крови, а с молекулярной массой 40 000 Да – в качестве антитромболитика при полостных операциях.

В отличие от капсул и слизистых слоев, чехлы имеют сложную тонкую структуру; в их составе выявляют несколько слоев разного строения. Чехлы обычно имеют и более сложный химический состав. Например, чехол бактерий *Sphaerotilis natans* содержит 36 % углеводов, 11 – гексозамина, 27 – белков, 5,2 – липидов и 0,5 – фосфора. Чехлы ряда бактерий, метаболизм которых связан с окислением восстановленных соединений металлов, часто инкрустированы их окислами.

Следует отметить, что между капсулами, чехлами и слизистыми слоями у прокариот обнаружено много переходных форм, что часто не позволяет точно отличить капсулу от слизистых клеточных выделений или капсулу от чехла.

У прокариот, способных формировать биопленки, может образовываться **гликокаликс**. Это сеть из полисахаридных тяжей для прикрепления к поверхности неподвижных предметов в водных средах или к тканям растений и животных. Гликокаликс образован высокополимерными мукополисахаридами. Гликокаликс не имеет постоянной прочной связи с клеточной стенкой бактерий.

Некоторые прокариоты образуют на поверхности клетки **S-слои** – кристаллические белковые образования правильной формы, плотно прилегающие друг к другу. У грамотрицательных бактерий S-слои прилегают к внешней мембране,

у грамположительных – к муреиновому мешку. S-слои защищают клетку прокариот от резких изменений концентраций различных ионов, действия ферментов, бактериофагов, бактериоцинов и бактерий-хищников, а также способствуют клеточной агрегации и помогают удерживать форму клетки.

1.3.2.9. Эндоспоры и другие покоящиеся формы бактерий

Эндоспоры бактерий – особый тип покоящихся клеток, в основном грамположительных бактерий. Эндоспоры формируются эндогенно, т. е. внутри материнской клетки, которая называется спорангием. Бактериальная эндоспора отличается от вегетативной клетки тем, что она характеризуется повышенной резистентностью к нагреванию, действию ультрафиолетовых лучей, антибиотиков и других факторов. Споры некоторых бактерий выдерживают кипячение в течение двух часов, они также могут длительное время сохраняться в покоящемся состоянии. Эти особенности спор являются свойствами, требующими в практической деятельности человека применения особых приемов для их уничтожения.

К спорообразующим бактериям относится большое число грамположительных видов прокариот приблизительно из 15 родов, характеризующихся морфологическим и физиологическим разнообразием. Лучше всего процесс спорообразования изучен у представителей родов *Bacillus* и *Clostridium*.

Поскольку одна клетка у большинства бактерий образует одну эндоспору и увеличения числа бактерий при ее прорастании не происходит, то спорообразование не рассматривают как способ размножения бактерий. Эндоспоры представляют собой стадию покоя и приспособлены к перенесению неблагоприятных условий. Переход бактерий к спорообразованию (споруляции) наблюдается обычно при истощении питательного субстрата, недостатке источников углерода, азота, фосфора, изменении pH и т. д. Процесс спорообразования энергозависим, поэтому от источника поступления энергии споруляцию разделяют на эндотрофную и экзотрофную. Эндотрофная споруляция осуществляется за счет внутреннего запаса энергии клетки и не нуждается в дополнительных веществах. В случае экзотрофных процессов используется экзогенная энергия, поступающая извне.

Способность к образованию спор детерминируется генами *spo*, которых, например, у бактерий *Bacillus subtilis* (по данным Г. Халворсена) более 100. Каждый из *spo*-генов отвечает за те или иные стадии споруляции.

Процесс спорообразования можно разделить на три стадии или этапа (рисунок 17).

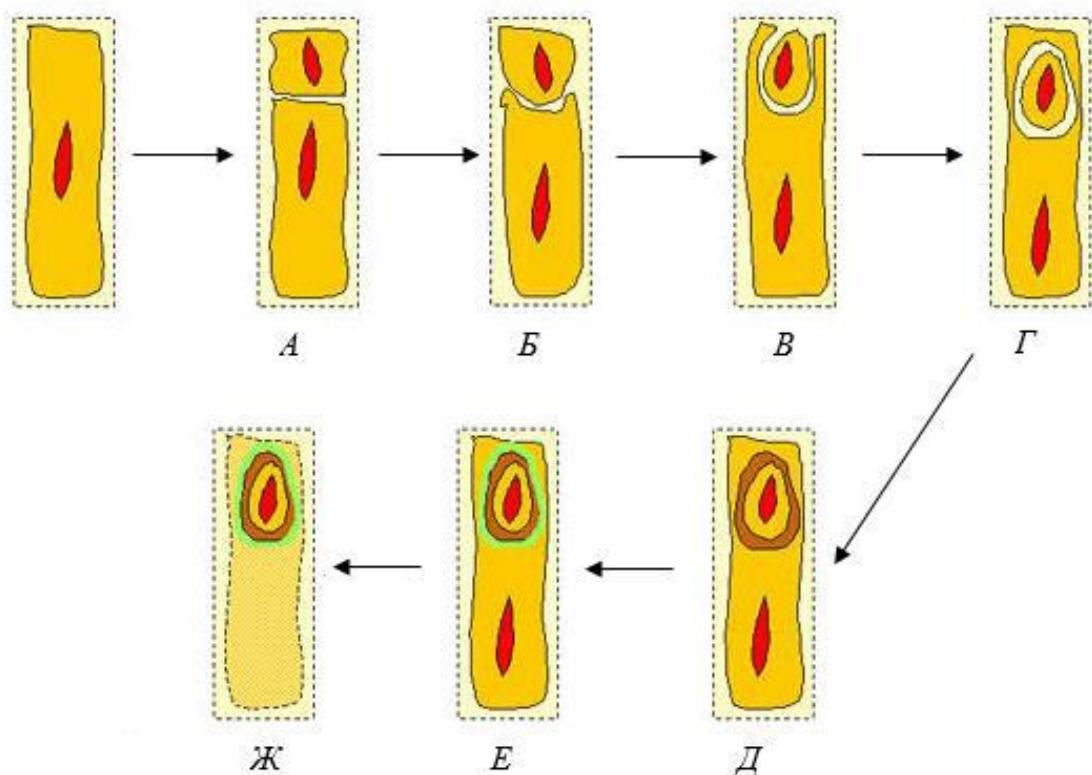


Рисунок 17 – Схема процесса спорообразования: *А* – отделение протопласта споры; *Б, В, Г* – образование предспоры; *Д, Е, Ж* – формирование споры.

Первый этап – подготовительный. В вегетативной клетке бактерий, переходящей к спорообразованию, прекращаются ростовые процессы, завершается репликация ДНК и изменяется метаболизм, а именно распадается значительная часть белков материнской клетки, образуется специфическое для спор вещество – дипиколиновая кислота, которая не встречается в вегетативных клетках.

Дипиколиновая кислота находится в эндоспорах в виде дипиколината кальция, и именно это соединение обеспечивает высокую терморезистентность спор.

Второй этап – формирование споры – начинается с особого неравного деления клетки. Цитоплазматическая мембрана вегетативной клетки образует впячивание (инвагинацию) от периферии к ее центру и отделяет часть протопласта материнской клетки. В результате этот протопласт содержит один нуклеоид с участком уплотненной цитоплазмы. Образования клеточной стенки между обоими протопластами (как при обычном делении) в данном случае не происходит. Вместо этого протопласт будущей споры обрастаает цитоплазматическая мембрана материнской клетки, а образующаяся структура носит название *предспора* или *проспоры*.

Предспора расположена внутри материнской клетки и ограничена от нее двумя мембранными. Каждая из этих мембран участвует в синтезе оболочек споры. Мембрана протопласта споры участвует в синтезе снаружи от себя *стенки зародышевой клетки* (зародыша). Мембрана, происходящая от материнской цитоплазматической мембранны, участвует в синтезе вовнутрь от себя

коры споры, или **кортекса**. Кортекс состоит из многослойного муреина, но более кислого, чем муреин клеточной стенки материнской клетки.

Кроме кортекса и стенки зародыша, синтезируется еще **наружная оболочка споры**, которая в значительной степени представлена полипептидами. У большинства видов спорообразующих бактерий эндоспора заключена еще в один дополнительный наружный слой – **экзоспориум**, в состав которого входят белки, липиды, углеводы.

По мере формирования многослойных покровов предспора превращается в спору (рисунок 18).

Таким образом, эндоспора состоит из следующих структурных элементов: нуклеоида; уплотненной цитоплазмы (за счет дегидратации, перехода белков в связанное состояние, снижения активности некоторых ферментов и синтеза дипиколината кальция); покровных слоев, представленных цитоплазматической мембраной, клеточной стенкой зародыша, кортексом, внутренней оболочкой, наружной оболочкой, экзоспориумом.

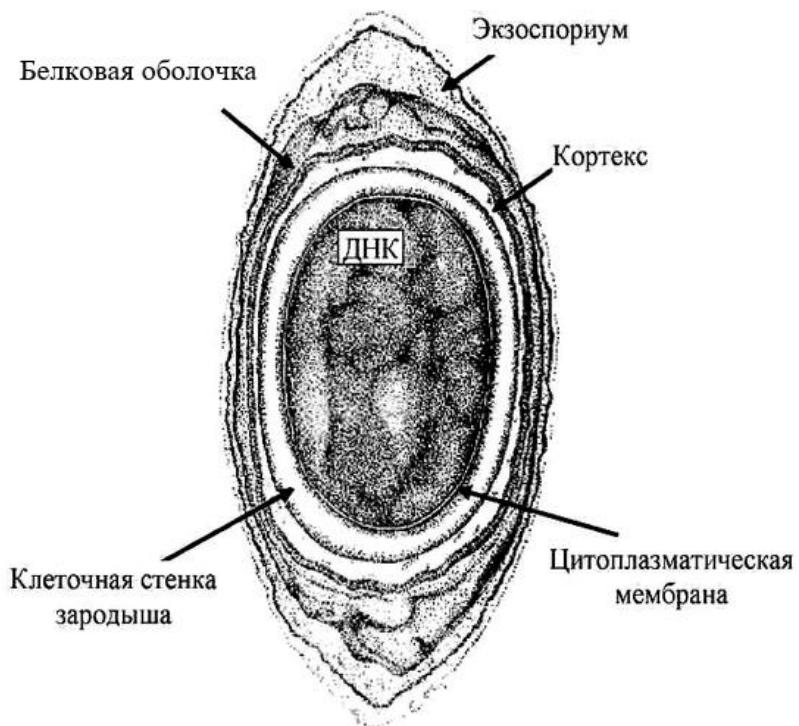


Рисунок 18 – Схема строения зрелой споры.

Третий этап – созревание споры. Спора приобретает характерную форму и занимает определенное положение в клетке (рисунок 19). Диаметр споры может превышать или не превышать ширину вегетативной клетки. В результате этого бактериальная клетка со спорой может принимать форму веретена или теннисной ракетки. Споры в клетке могут располагаться центрально (например, у *Bacillus megaterium*), субтерминально (например, у *Clostridium botulinum*) или терминально (например, у *Clostridium tetani*).

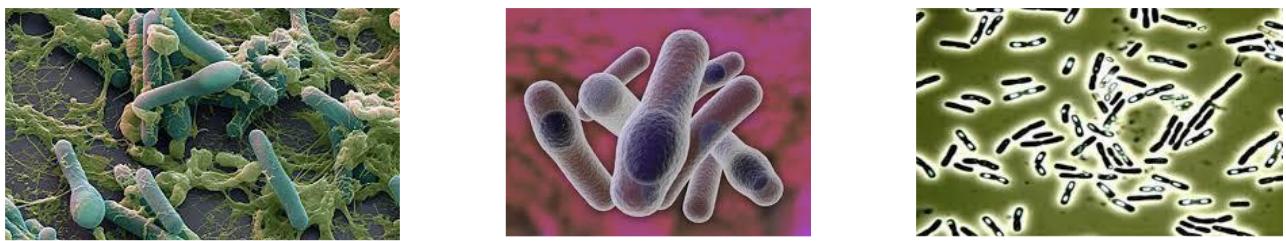


Рисунок 19 – Форма эндоспор и расположение их в клетках бактерий различных видов рода *Bacillus*.

Споры освобождаются при лизисе спорангия. Зрелые споры не проявляют метаболической активности. Они чрезвычайно устойчивы к воздействию высокой температуры, разного рода излучений и химических агентов. Терморезистентность обусловлена, как уже отмечалось, очень низким содержанием воды и наличием дипиколината кальция.

При попадании в благоприятные условия споры прорастают в вегетативные клетки. Прорастания спор начинается с поглощения воды и гидратации структур споры, сопровождающихся активацией ферментов и возрастанием дыхания. Литические ферменты разрушают многослойные покровы споры, в среду выделяются дипиколинат кальция, аминокислоты и пептиды. Спора при этом теряет до 25 – 30 % сухой массы. В месте разрыва оболочки споры образуется ростовая трубка новой вегетативной клетки. В формировании клеточной стенки молодой клетки участвует внутренняя мембрана споры и частично кортекс. Прорастание спор длится около 4 – 5 ч.

Прорастание спор можно индуцировать, подвергнув их прогреванию до 60 – 70 °C в течение нескольких минут или кратковременному кипячению (10 мин при 100 °C). Тепловой шок должен проводиться непосредственно перед высевом спор, так как процесс активации обратим.

К другим покоящимся формам бактерий относятся цисты, экзоспоры, миксоспоры. Как и эндоспоры, все эти покоящиеся формы предназначены для перенесения бактериями неблагоприятных условий. **Экзоспоры** возникают путем почкования материнской клетки. Они сходны по своим свойствам с эндоспорами бацилл. Образование экзоспор характерно для метанокисляющих бактерий. **Цисты** – это шарообразные толстостенные клетки, формирование которых характерно для бактерий рода *Azotobacter*. В цисту превращается вся вегетативная клетка. **Миксоспоры** образуются также путем превращения всей клетки. Формирование миксоспор характерно для миксобактерий рода *Muhaboccus*.

1.3.2.10. Нуклеоид

Генетический материал прокариот представлен молекулой (молекулами) ДНК, уложенной в компактную структуру и локализованной в ограниченных участках цитоплазмы, не имеющей, в отличие от эукариот, собственной ядерной мембранны. Учитывая эти особенности, генетический аппарат прокариот принято называть **нуклеоидом**.

Тот факт, что в состав нуклеоида входит ДНК, впервые удалось показать Ж. Кейрнсу с помощью метода радиоавтографии. Для этого бактерии *E. coli* выращивали на среде, содержащей предшественник тимина тимидин, меченный тритием (^{3}H). Известно, что ДНК – единственное вещество в клетке, которое содержит тимин. Если клетки бактерий, включившие тритий в тимин, лизировать с помощью лизоцима на мембранном фильтре, то можно получить радиоавтограф развернутой молекулы бактериальной ДНК. Такие радиоавтографы убедительно доказывают, что ДНК бактерий *E. coli* имеет форму нити, замкнутой в кольцо. Эта замкнутая в кольцо молекула ДНК включает несколько тысяч генов, расположенных линейно, и называется **хромосомой**.

Важную роль как для сохранения целостности структуры, так и для функционирования генома бактерий играет прикрепление нуклеоида к цитоплазматической мембране. При щадящих способах нуклеоиды выделяются вместе с «фрагментами» мембранны. С использованием различных методов было показано, что имеются фиксированные точки прикрепления нуклеоида к мембране: точка начала репликации и точка завершения репликации. Кроме того, нуклеоид имеет «скользящие участки» прикрепления к мембране, в частности тот участок, в котором в данный момент идет репликация, и большое количество «неспецифических» точек контакта с мембраной.

Хотя каждая бактериальная клетка у большинства видов бактерий содержит одну хромосому, часто в интенсивно растущей культуре количество ДНК на клетку может достигать массы, равной 3, 4, 8 и более хромосом. Из этого следует, что термины «нуклеоид» и «хромосома» не всегда совпадают. В зависимости от условий нуклеоид бактериальной клетки может состоять из одной или нескольких копий одной и той же хромосомы. Так, у бактерий *Azotobacter chroococcum* в экспоненциальной фазе роста (наиболее интенсивного роста и размножения) на одну клетку приходится 20–25 копий хромосомы, у бактерий *Desulfovibrio gigas* – 9–17 копий хромосомы.

Уже отмечалось, что большинство бактерий имеют одну хромосому. Однако у различных видов родов *Brucella* и *Vibrio*, видов *Rhodobacter sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Leptospira interrogans* клетки имеют по две хромосомы, различающиеся между собой по величине. У *Burkholderia cepacia* имеются даже три хромосомы. Эти данные были получены посредством пульс-фореза, позволяющего разделить по подвижности в геле очень крупные молекулы ДНК.

Сравнительно недавно считалось, что хромосомная ДНК бактериальной клетки, как правило, замкнута в кольцо, что доказывалось с помощью метода радиоавтографии. Кроме того, о кольцевой структуре хромосомы у бактерий *E. coli*, *Salmonella typhimurium* и *Bacillus subtilis* свидетельствуют и данные генетического анализа: были построены кольцевые генетические карты без каких-либо промежутков между группами сцепления. Наконец, физические карты хромосом, построенные с использованием ферментов рестриктаз, разрезающих хромосому в участках специфических нуклеотидных последовательностей, также свидетельствовали о кольцевой организации хромосом. Такие хромосомы в силу своей структуры не могли быть разделены в геле при пульс-форезе. Однако в

1989 г. была опубликована статья о необычном поведении при пульс-форезе хромосомы бактерий *Borrelia burgdorferi* – возбудителя клещевого спирохетоза. Эта ДНК входила в гель и двигалась в нем точно так же, как заведомо линейные хромосомы дрожжей, взятые в качестве контроля. Оказалось, что терминальные участки ДНК линейной хромосомы у боррелий заканчивались шпилечными структурами.

У других спирохет (лептоспир и трепонем) хромосома была кольцевой. Линейная хромосома была обнаружена и у фитопатогенных бактерий *Rhodococcus fascians*.

Позже появились данные о том, что после обработки протеазами выделенная из клеток кольцевая ДНК ряда видов актиномицетов превращается в линейную. Это было неожиданным, так как для актиномицетов уже существовали физические кольцевые карты. Однако выяснилось, что хромосомы актиномицетов оказались «псевдокольцевыми»: они были замкнуты не за счет непрерывного перехода цепочки ДНК правого полукружия хромосомы в левое, а за счет взаимодействия белковых молекул, расположенных на свободных концах ДНК линейной хромосомы и замыкающих их, протеазы же разрывают эту связь. Таким образом, у актиномицетов оказался другой, чем у боррелий, тип организации хромосом.

1.5. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы

Факторы внешней среды, влияющие на жизнеспособность микроорганизмов, подразделяют на химические и физические. Они действуют на микроорганизмы по-разному. С одной стороны, оказывают стимулирующее действие, например, при использовании определенных химических веществ, необходимых микроорганизмам для поддержания их жизнедеятельности; поддержании оптимальной температуры, обеспечивающей наиболее высокую скорость роста клеток, и т. п.

С другой стороны, действие химических и физических факторов может вызывать торможение метаболизма либо приводить клетки микроорганизмов к гибели. В зависимости от этого все физические и химические факторы подразделяют на микробостатические и микробоцидные. Факторы внешней среды, полностью или частично угнетающие рост и задерживающие развитие микроорганизмов, относят к **микробостатическим**. **Микроцидные** факторы вызывают гибель микроорганизмов. В зависимости от концентрации или дозы действующего агента, продолжительности контакта и вида микроорганизма один и тот же фактор может оказывать как микробостатическое, так и микроцидное действие.

1.5.1. Действие факторов химической природы

Химические вещества по механизму действия на клетки микроорганизмов могут быть разделены на:

- повреждающие клеточную стенку или цитоплазматическую мембрану;
- повреждающие ферменты, участвующие в обмене веществ;
- нарушающие синтез основных биополимеров клетки.

К первой группе относятся химические вещества, повреждающие структуру клеточной стенки (лизоцим и др.), нарушающие избирательную проницаемость цитоплазматической мембранны (фенолы, хлороформ, крезолы, нейтральные мыла, детергенты, эфиры, ионы водорода, спирты, толуолы). Действие фенолов, хлороформа, крезолов, эфиров, толуолов, спиртов связано в первую очередь с растворением липидов цитоплазматической мембранны, что приводит к нарушению ее проницаемости и разрушению. Кроме того, этанол в достаточно высокой концентрации (70 % и больше) вызывает коагуляцию белков и оказывает микробоцидное действие. Детергенты способны накапливаться в липопротеиновых мембранах (за счет того, что они, как и мембранны, имеют полярную структуру) и вызывать нарушение их функций. Поскольку эти вещества обладают широким спектром antimикробного действия, их обычно применяют для дезинфекции различных поверхностей, материалов и объектов окружающей среды.

Концентрация ионов водорода в окружающей среде действует на микроорганизмы двояко:

1. непосредственно на избирательную проницаемость цитоплазматической мембранны;
2. косвенно или опосредованно через:
 - а) влияние на ионное состояние и доступность многих ионов и метаболитов;
 - б) стабильность макромолекул;
 - в) равновесие зарядов на поверхности клетки.

Концентрация ионов водорода во внешней среде влияет и на равновесие электрических зарядов на поверхности клетки: при низких значениях pH увеличивается суммарный положительный заряд, при высоких – суммарный отрицательный заряд. Кроме того, в кислой среде разрушаются ДНК и АТФ, а в щелочной – РНК и фосфолипиды.

В зависимости от отношения к реакции среды микроорганизмы могут быть разделены на несколько групп:

нейтрофилы – оптимальное значение pH для роста составляет 6 – 8, а рост возможен, как правило, в диапазоне от 4 до 9. К этой группе относится большинство известных микроорганизмов. Типичными нейтрофилами являются штаммы бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis* и др.;

ацидофилы – оптимальная кислотность среды для роста ниже 4 единиц pH. Среди них различают **факультативные** (интервал для роста pH 1 – 9, оптимум 2 – 4) и **облигатные** ацидофилы (интервал для роста pH 1 – 5, оптимум 2 – 4). В природе экстремально кислые условия встречаются в некоторых озерах, болотах, горячих источниках. Типичными представителями облигатных ацидофилов служат микроорганизмы родов *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Acetobacter*, *Aspergillus* и др.;

алкалофилы – оптимальные условия для развития находятся в пределах значений pH 9,0 – 10,5, которые встречаются в щелочных почвах, в местах скопления экскрементов животных. Среди алкалофилов различают **факультативные** алкалофилы (интервал pH для роста 5 – 11, оптимум pH 9,0 – 10,5), к которым относятся денитрифицирующие и сульфатвосста-навливающие прокариоты, многие аммонификаторы. **Облигатные** алкалофилы растут при высоких значениях pH – 8,5 – 11,0, при оптимуме 9,0 – 10,5. К таким прокариотам относятся бактерии видов *Bacillus pasteurii*, *Vibrio cholerae* некоторые цианобактерии, а также археи родов *Natronococcus*, *Natronobacterium* и др.

Однако следует отметить, что хотя микроорганизмы и могут осуществлять процессы жизнедеятельности в условиях различной кислотности или щелочности среды, реакция внутри их клеток поддерживается всегда близкой к нейтральной. Это достигается благодаря наличию в цитоплазме буферных систем и низкой проницаемости мембранны для ионов водорода.

Способность к росту при низких или высоких значениях pH обеспечивает микроорганизму определенные преимущества, так как в этих условиях мала конкуренция со стороны большинства других организмов.

К группе химических веществ, оказывающих микробоцидное действие на микроорганизмы, повреждающих ферменты и вызывающих нарушение обмена веществ, относятся ионы тяжелых металлов, оксид углерода, цианиды, некоторые активные окислители – перманганат калия, пероксид водорода, хлорная известь, йод.

Ионы тяжелых металлов (Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) могут взаимодействовать с гидроксильными, сульфидрильными, карбоксильными группами, а также аминогруппами, вызывая изменения свойств белков и коферментов. В частности, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ связывают SH-группы и тем самым глубоко изменяют третичную и четвертичную структуры ферментных белков. Они также блокируют сульфидрильную группу кофермента A. В результате ингибиования ферментных систем нарушаются дыхание, синтез РНК и белков.

Цианиды действуют как дыхательные яды – связывая железо, они блокируют функцию терминального дыхательного фермента цитохром-оксидазы. Оксид углерода подавляет дыхание, конкурируя со свободным кислородом за цитохромоксидазу, т. е. действует путем «конкурентного торможения». Окислители KMnO_4 , йод, H_2O_2 и другие вызывают резкое усиление окислительных процессов, приводящее к отмиранию клетки.

К группе химических веществ, нарушающих синтез клеточных компонентов, относятся структурные аналоги соответствующих соединений – антиметаболиты. Рассмотрим несколько примеров. Структурным аналогом сукцинат является малонат:

В присутствии малоновой кислоты даже в низких концентрациях подавляется превращение сукцината в фумарат. При этом нормальный метаболит сукцинат конкурирует со своим структурным аналогом малонатом за каталитический

центр фермента сукцинатдегидрогеназы. В основе этого конкурентного ингиби-рования лежит структурное сходство ингибиторов с нормальными клеточными метаболитами.

Вторым примером конкурентного ингиби-рования является включение производных сульфаниловой кислоты (сульфаниламидов) в фолиевую кислоту (витамин В9) вместо *n*-аминобензойной кислоты. Это основано на том, что они имеют структурное сходство:

Большинство бактерий способно синтезировать фолиевую кислоту из более простых компонентов. Если в состав питательной среды внести сульфаниламид, то он будет включаться в фолиевую кислоту, что приведет к синтезу неполноп-ченного витамина и в конечном счете к остановке роста клеток. В организме животных и человека фолиевая кислота не образуется, они ее получают в готовом виде с пищей. В их клетках сульфаниламид не может включаться в этот витамин и не способен, таким образом, оказывать ингиби-рующее действие, что используется в терапии инфекционных заболеваний.

К микробстатическим агентам, которые ограничивают рост нежелательной микробиоты в продуктах питания, косметических средствах и других, относятся **консерванты**. Данные вещества не должны обладать токсичными, мутагенными или канцерогенными свойствами по отношению к организму человека. Наименее токсичными и чаще других применяемыми консервантами являются поваренная соль и сахар. Их добавление в продукты уменьшает концентрацию свободной воды и тем самым ограничивает развитие микробиоты. Для этих целей широко используются органические кислоты: лимонная, молочная, уксусная, пропионовая, бензойная, сорбиновая, а также их соли. Действие данных соединений основано на снижении pH продукта, что отрицательно сказывается на развитии нейтрофильных и алкалофильных организмов. Кроме того, многие органические кислоты оказываются токсичными для микроорганизмов.

Для консервирования фруктов, ягод, соков, вин используют диоксид серы (SO_2), а также жидкые сульфиты. Долгое время для консервирования мясных и рыбных продуктов широко применяли нитриты и нитраты, которые эффективно ингиби-руют рост таких опасных возбудителей, как *Clostridium botulinum*, вызывающих порчу богатых белком продуктов. Однако выяснилось, что эти соли могут взаимодействовать с вторичными и третичными аминами, образуя нитрозамины – высоко канцерогенные соединения, поэтому применение нитритов и нитратов в пищевых продуктах сейчас ограничено.

1.5.2. Действие факторов физической природы

Все физико-химические процессы, обеспечивающие функциональную ак-тивность клетки, а также состояние ее макромолекул, в большей или меньшей степени зависят от температуры. При высокой температуре белки, нуклеиновые кислоты и другие компоненты клетки могут необратимо инактивироваться, что приводит к ее гибели. При слишком низкой температуре также нарушаются про-цессы биосинтеза, ограничивая развитие микроорганизмов.

Каждый вид микроорганизмов характеризуется определенным температурным диапазоном, в пределах которого его представители способны расти, а также температурным оптимумом – значением, при котором наблюдается самая высокая скорость роста популяции (самое малое время генерации). В связи с этими параметрами микроорганизмы принято делить на три основные группы: мезофилы, психрофилы и термофилы, которые в свою очередь подразделяют на отдельные подгруппы:

Большинство известных видов прокариот относится к **мезофилам**, для них оптимальные температуры роста лежат в пределах 20 – 42 °С. Типичным представителем мезофилов являются бактерии *E. coli*, оптимальная температура роста которых 37 °С.

Микроорганизмы, способные нормально расти при низких (0 – 20 °С) температурах, называют **психрофильными**. Психрофильные бактерии делятся на облигатные и факультативные. Основное различие между ними заключается в том, что облигатные психрофилы не способны к росту при температуре выше 20 °С, а верхняя температурная граница роста факультативных психрофилов намного выше. **Облигатные психрофилы** – узкоспециализированные микроорганизмы, обитающие в постоянно холодной среде; их оптимум ниже 15 °С, максимум – около 20 °С; при 30 °С они отмирают. Некоторые из психрофилов способны развиваться при 0 °С и ниже. Самая низкая температура, при которой зарегистрирован рост психрофильных микроорганизмов, составляет (-12) °С Облигатные психрофилы обитают в холодных почвах, морях Арктики и Антарктики, на вечных снегах высокогорных районов, их находят в пробах из горных ледников, в воде колодцев и родников. Эти микроорганизмы играют существенную роль в круговороте веществ в регионах с постоянно низкими температурами. В качестве представителей облигатных психрофилов можно привести бактерии *Bacillus psychrophilus*, железобактерии (например, рода *Gallionella*) и др.

Факультативные психрофилы распространены значительно шире и встречаются в почвах и водах не только холодной, но и умеренной зоны. Многие из них вызывают порчу пищевых продуктов при низких температурах.

Оптимум для роста факультативных психрофилов соответствует 25 – 30 °С, т. е. они способны расти в условиях, благоприятных для мезофильных организмов. К этой группе относятся некоторые виды бактерий родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter* и др.

Способность психрофилов развиваться при низкой температуре связывают с особенностями строения их клеток:

- в клетках содержатся особые ферменты, активные при низких температурах за счет пониженного содержания слабых связей в белковых молекулах и менее выраженных взаимодействий между доменами, что позволяет им сохранять пластичность при низкой температуре. В составе ферментов психрофилов содержится больше α-спиралей и меньше складчатых слоев, чем в составе ферментов мезо- и термофилов;
- проницаемость мембран остается высокой при охлаждении благодаря содержанию в липидах в большом количестве полиненасыщенных

жирных кислот или других длинноцепочечных углеводородов с множеством двойных связей, вследствие чего мембранные не застывают и остаются в жидкокристаллическом состоянии при низких температурах. Например, в мембранах антарктических бактерий обнаружены необычные углеводороды с девятью двойными связями;

- рибосомы способны функционировать при низких температурах.

К **термофильным** относят микроорганизмы, которые растут при температуре выше 45 – 50 °С. Группу термофилов делят на четыре подгруппы:

1) **термотолерантные** – растут при температуре от 10 до 55 – 60 °С, оптимальная область находится в пределах 35 – 40 °С (как у мезофилов). Основное их отличие от мезофилов – способность расти при повышенных температурах. Примером термотолерантных микроорганизмов являются бактерии вида *Methylococcus capsulatus*;

2) **факультативные термофилы** имеют температурный максимум 50 – 65 °С и минимум менее 20 °С, оптимум приходится на область температур, близких к верхней границе роста. Примером факультативных термофилов являются гомоферментативные молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*. Они обитают на поверхности многих растений, откуда попадают в различные продукты – их легко обнаружить в молочных продуктах, солениях, маринадах, вине, фруктовых соках. Лактобациллы постоянно присутствуют в полости рта, кишечном тракте многих теплокровных животных и человека;

3) **облигатные термофилы** способны расти при температурах до 70 °С и не растут при температуре ниже 40 °С. Оптимальная температурная область облигатных термофилов примыкает к их верхней температурной границе роста (65 – 70 °С). Представители облигатных термофилов – бактерии вида *Bacillus stearothermophilus* и др.;

4) **экстремальные термофилы** имеют следующие температурные параметры для роста: оптимум в области 75 – 75 °С, минимальная граница роста – 60 °С и выше, максимальная – около 90 °С. Эти микроорганизмы распространены в горячих источниках, особенно в районах активной вулканической деятельности. Представители – прокариоты родов *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Thermoplasma* и др.

5) **гипертермофилы** имеют следующие температурные параметры для роста: оптимум в области 80 – 90 °С, минимальная граница роста – 70 °С, максимальная – 113 – 121 °С. Представителями гипертермофилов являются многие археи, обитающие в высокотермальных кислых источниках и грунтах в зонах вулканического происхождения, например, видов *Pyrodictium occultum* и *Archaeoglobus veneficus*.

Природу термоустойчивости объясняют рядом структурных и биохимических особенностей этих микроорганизмов:

- липиды, входящие в состав клеточных мембран, содержат в большом количестве насыщенные жирные кислоты. В связи с этим они имеют

более высокую температуру плавления по сравнению с липидами, содержащими ненасыщенные жирные кислоты;

- у экстремально термофильных микроорганизмов обнаружено повышенное содержание гуанина и цитозина в ДНК, что придает стабильность и повышает температуру плавления этих молекул;
- ферменты термофилов гораздо устойчивее к нагреванию в сравнении с соответствующими белками мезофильных бактерий. Часто такая высокая термостабильность достигается в результате изменения первичной структуры белковой молекулы. В качестве примера можно привести следующий: при сравнении ферментов лактатдегидрогеназ мезофильных и термофильных бактерий рода *Bacillus* обнаружено увеличенное содержание основных аминокислот аргинина и лизина в активном центре лактатдегидрогеназ у термофилов.
- Устойчивость ферментов термофилов обеспечивается также ионами Ca^{2+} , кофакторами и другими агентами, которые связываются с ними.

Термофильные бактерии имеют большое практическое значение. Обладая очень интенсивным метаболизмом, они являются активными продуцентами витаминов, ферментов, органических кислот, кормового белка и других ценных веществ. Эти их свойства широко используются в микробиологической промышленности, так как применение мезофильных микроорганизмов в ней ограничено из-за того, что в результате культивирования часть энергии выделяется в виде тепла и происходит разогрев субстрата (питательной среды), что приводит к гибели мезофильных микроорганизмов.

Термофильные бактерии играют также большую роль в биологической очистке бытовых отходов и образовании метана.

Микроорганизмы подвержены воздействию различных видов **электромагнитных излучений**. Эффект воздействия зависит от дозы облучения и длины волны. Наиболее длинноволновая радиация (радиоволны – длина волны более 1100 нм) не вызывает биологического эффекта. Инфракрасные лучи (700 – 1100 нм и более) оказывают тепловое воздействие на микроорганизмы и используются зелеными и пурпурными бактериями в процессе фотосинтеза. Видимая часть спектра (300 – 700 нм) используется цианобактериями и другими фототрофными бактериями в процессе фотосинтеза. УФ-лучи (10 – 300 нм) могут оказывать на микроорганизмы как микробоцидное, так и мутагенное действие, что определяется видом микроорганизмов и дозой облучения. Наибольший летальный эффект УФ-лучей наблюдается при длине волны 260 нм, при которой отмечается максимум поглощения УФ-лучей молекулами ДНК. Летальное действие УФ-лучей объясняется в первую очередь изменениями структуры ДНК: разрывом водородных связей, расщеплением связей между дезоксирибозой и фосфатом, а также образованием сшивок между тиминовыми азотистыми основаниями (образование димеров тимина), которые обусловливают нарушение процессов репликации и транскрипции. Кроме нуклеиновых кислот, УФ-лучи поглощают

белки и другие макромолекулы, что приводит к нарушению их структуры и функций.

УФ-облучение не всегда приводит клетку микроорганизмов к гибели. Многие микроорганизмы обладают механизмами, призванными исправлять (репарировать) повреждения ДНК, вызванные УФ-облучением. Гибель клеток от УФ-лучей наступает тогда, когда повреждение происходит быстрее, чем репарация ДНК.

К воздействию УФ-излучения более устойчивы те виды микроорганизмов, в клетках которых содержатся каротиноиды. У гетеротрофных организмов каротиноиды служат защитной системой, снижающей повреждения нуклеиновых кислот, а у фототрофных прокариот они предохраняют бактериохлорофиллы от фотоокисления.

УФ-облучение в лабораторной практике используют для индукции мутаций у микрорганизмов, а также в качестве стерилизующего агента.

Ионизирующая радиация, под которой обычно подразумевают рентгеновское и гамма-излучение (с длиной волны менее 10 нм), вызывает летальный для клетки эффект. В отличие от УФ-лучей, она действует на биополимеры не прямо, а опосредованно, вызывая образование свободных радикалов и органических перекисей, которые реагируют с нуклеиновыми кислотами и белками, вызывая одно- и двунитевые разрывы цепей ДНК, изменения азотистых оснований, окисление сульфгидрильных групп белков в дисульфидные и т. д. Чувствительность микроорганизмов различных групп к ионизирующей радиации проявляется в разной степени. Абсолютным «чемпионом» по устойчивости к ионизирующей радиации являются бактерии *Deinococcus radiodurans*, которые обитают в водах атомных реакторов, встречаются в залежах урановых руд. Эти бактерии устойчивы к дозе ионизирующего излучения в 1,5 Мрад, что объясняется наличием в их клетках мощных репарационных систем, призванных исправлять повреждения в молекулах ДНК. Ионизирующее излучение используется в качестве стерилизующего фактора, в том числе для продления срока хранения некоторых продуктов (фруктов, овощей, морепродуктов и др.).

Высокие значения **гидростатического давления** приводят к разрушению клеточных структур, происходит денатурация белков, прекращается деление и клетки приобретают нитевидную форму. Однако существуют микроорганизмы, которые живут на глубине 7000 м и более, где давление достигает более 1000 атмосфер. Из осадков на дне океанов выделяют прокариоты двух групп: баротолерантные и пьезофильные (барофильные). **Баротолерантные микроорганизмы** размножаются как при обычном, так и при давлении в несколько сот атмосфер. **Пьезофильные** (менее многочисленная группа) при давлении в сотни атмосфер дают больший урожай биомассы, чем при атмосферном давлении. Пьезофильные микроорганизмы (например, бактерии вида *Bacillus submarinus*) – это обитатели глубоководных впадин морей и океанов.

Высокочастотные (более 16 кГц) механические колебания упругой среды, или **ультразвук**, не воспринимаются нашими органами слуха. При воздействии

на микроорганизмы ультразвук создает большую разницу в давлении на отдельные части клеток и повреждает их: разжижается и вспенивается цитоплазма, разрушаются поверхностные структуры, содержимое клетки смешивается с окружающей средой. Чувствительность микроорганизмов к ультразвуку пропорциональная частоте колебаний и длительности воздействия, зависит также от их индивидуальных особенностей и физиологического состояния. Чем крупнее клетки, тем более чувствительны они к воздействию ультразвука; палочки и извитые формы чувствительнее кокков. При длительном воздействии наблюдается полная гибель микроорганизмов, что используется в целях стерилизации. Ультразвук применяют и для разрушения клеток, чтобы извлечь из них некоторые биологически активные вещества.

Концентрация веществ, растворенных в окружающей среде, т. е. **осмотическое давление**, также оказывает большое влияние на жизнеспособность микроорганизмов: чем концентрированнее раствор, тем труднее клетке поглощать из него воду. В гипертонических растворах, т. е. таких, в которых осмотическое давление больше, чем в клетке, происходит обезвоживание клеток (плазмолиз) и полное прекращение роста. Это явление называется физиологической сухостью. Однако некоторые микроорганизмы способны нормально развиваться в достаточно концентрированных растворах. Такие микроорганизмы называют **осмофильными**. Осмофильные микроорганизмы, для которых требуется высокое содержание NaCl, получили название **галофильных**. К экстремальным галофилам относятся археи из родов *Halobacterium* и *Halococcus*, живущие в растворах NaCl при концентрациях, близких к насыщающим. У таких архей концентрация солей в цитоплазме равна концентрации внешнего раствора, однако в клетках преобладает не натрий, а калий. Белки галофильных архей отличаются по строению от таковых негалофильных: содержание кислотных групп в них преобладает над основными. Эти кислотные группировки нейтрализуются катионами. Высокие концентрации солей необходимы галофилам для поддержания каталитической активности ферментов, стабилизации мембран и рибосом. Галофильные археи обнаружены в соленых озерах, в солончаковых почвах. Они обычно вызывают порчу соленой рыбы и мяса.

Кроме охарактеризованных физических факторов, на развитие микроорганизмов оказывает воздействие изменение напряжения магнитных полей. Этот фактор в настоящее время рассматривается как экологический, определяющий протекание многих биологических процессов. Особенно чувствительны к изменению напряжения магнитного поля магниточувствительные микроорганизмы, содержащие в клетках магнитосомы.

Небезразличны микроорганизмы и к действию земного притяжения, сотрясений, а также электрического тока.

1.6. Питание микроорганизмов. Закономерности микробного роста

1.6.1. Питание микроорганизмов

Питание микроорганизмов – включение в метаболические реакции любого характера тех или иных соединений внешней среды. Питательным веществом

следует считать любое химическое вещество, которое способно удовлетворять энергетические потребности клетки либо анаболические функции, либо те и другие. Потребности в питательных веществах у микроорганизмов весьма разнообразны, но тем не менее можно говорить о каких-то общих принципах питания.

Прежде всего, все химические элементы, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов, подразделяют на макро- и микроэлементы. К основным макроэлементам, из которых состоят биополимеры микроорганизмов, относятся С, О, Н, N, Р, S. Кроме того, для построения клеток необходимы важные в качестве электролитов щелочные металлы (К, Na), щелочноземельные металлы (Mg, Ca), выполняющие функции кофакторов ферментов. К микроэлементам относятся металлы переходной группы (V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Wo) и неметаллы (Se, B, Cl и др.). Набор требуемых микроэлементов зависит от вида микроорганизмов. В природе микроэлементы обычно присутствуют в виде свободных катионов или анионов, поглощаемых микробными клетками с помощью относительно специфических транспортных систем. В клетках микроорганизмов они подвергаются ферментативному восстановлению, приобретая валентность, необходимую для ассимиляции.

Некоторые виды микроорганизмов не способны сами синтезировать отдельные органические вещества: аминокислоты, азотистые основания, витамины, вследствие чего не могут расти при их отсутствии в питательной среде. Такие соединения являются для них **факторами роста**. Микроорганизмы, нуждающиеся в определенном факторе роста, называются **ауксотрофными** в отличие от **прототрофных**, которые способны синтезировать все необходимые для них соединения. Примером природных ауксотрофных микроорганизмов являются молочнокислые бактерии, которые зависят от наличия в среде многих аминокислот и витаминов.

По способу поступления питательных веществ в клетки микроорганизмов различают два типа питания: **осмотрофное** и **фаготрофное**. Подавляющее большинство микроорганизмов питается по осмотрофному типу: поглощают растворенные в воде вещества. Фаготрофное питание у большинства микроорганизмов невозможно, так как их клетки имеют ригидные клеточные стенки, и поэтому они не способны захватывать твердые частицы.

В зависимости от использования источников углерода все микроорганизмы разделяются на автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы (от греч. *autos* – сам, *trophe* – пища, питание) – это микроорганизмы, способные усваивать или фиксировать углекислый газ воздуха в качестве единственного источника углерода и синтезировать из него органические вещества своих клеток.

Гетеротрофы – микроорганизмы, нуждающиеся в готовых органических веществах.

Как автотрофы, так и гетеротрофы подразделяют на две группы в зависимости от того, какой источник энергии они используют: **фототрофы** используют энергию света и трансформируют ее в химическую, **хемотрофы** используют

энергию, освобождаемую в реакциях окисления органических или неорганических веществ.

В зависимости от того, какие питательные вещества – органические или неорганические – являются донорами электронов, все микроорганизмы также подразделяют на две группы. *Органотрофными* являются микроорганизмы, использующие в качестве доноров электронов органические соединения, к *литотрофным* относятся микроорганизмы, способные использовать в качестве доноров электронов неорганические вещества (H_2 , NH_3 , H_2S , CO , Fe^{2+} и т. д.).

В соответствии с тремя вышеуказанными критериями (источник энергии, источник углерода, донор электронов) все микроорганизмы могут быть разделены на восемь физиологических групп.

Клетки микроорганизмов не могут существовать без кислорода. Основным источником кислорода является вода. Кроме того, он содержится в CO_2 и многих органических соединениях. Многим микроорганизмам помимо этого необходим молекулярный кислород. Главная функция O_2 состоит в том, что он служит конечным акцептором электронов при аэробном дыхании; при этом он восстанавливается до воды.

По отношению к молекулярному кислороду все бактерии можно разделить на несколько физиологических групп:

1) *облигатные аэробы* – бактерии, способные получать энергию только путем аэробного дыхания и поэтому нуждающиеся в O_2 . Среди них следует выделить *микроаэрофилы* – бактерии, которые нуждаются в O_2 для получения энергии, но растут только при низком его содержании в среде (2 – 5 %), т. е. более низком, чем содержание кислорода в атмосфере (21 %);

2) *факультативные анаэробы* – бактерии, способные расти как в присутствии, так и в отсутствии O_2 . Они могут переключать свой энергетический метаболизм с аэробного дыхания (в присутствии O_2) на брожение или анаэробное дыхание (в отсутствии O_2). Среди факультативных анаэробов следует выделить *аэромонитные* бактерии, которые могут расти в присутствии атмосферного кислорода, но не способны его использовать в качестве акцепторов электронов, получая энергию исключительно с помощью брожения;

3) *облигатные анаэробы* – могут расти только в среде, лишенной молекулярного кислорода, поскольку он токсичен для них.

Токсичность молекулярного кислорода для анаэробных бактерий связана с отсутствием в их клетках механизмов, обеспечивающих детоксикацию сильных окислителей, которые образуются в его присутствии в процессе развития.

Установлено, что окисление флавопротеинов или других доноров электронов, а также радиация приводят к восстановлению O_2 , сопровождаемому образованием супероксид-радикалов и пероксид-анионов, которые легко связывают протоны и переходят в пероксид водорода (H_2O_2). В ходе последующих перестроек формируются также очень токсичные гидроксил-радикалы. Все эти формы являются сильными окислителями, способными окислять сульфгидрильные группы ферментов, приводя к их инактивации, а также вызывать повреждения в молекулах ДНК.

Многие клетки синтезируют ферменты каталазу и пероксидазу, защищающие их содержимое от токсичного действия радикалов кислорода.

1.7. Значение микроорганизмов в природе и жизнедеятельности человека

Повсеместное распространение, быстрое размножение и особенности метаболизма микроорганизмов накладывают отпечаток на жизнь всей планеты.

Значение микроорганизмов в природе

Процессы, в которых принимают участие микроорганизмы, прежде всего являются определяющими и необходимыми звенями круговорота таких элементов, как углерод, азот, сера, фосфор, а также других биогенных элементов. Без микроорганизмов приостановился бы круговорот веществ в природе и жизнь на Земле стала бы невозможной.

Микроорганизмы первыми поселяются на материнской горной породе и обусловливают почвообразовательные процессы. Образуя в результате жизнедеятельности минеральные и органические кислоты, микроорганизмы ускоряют растворение и выветривание горных пород, вовлечение освобожденных минералов в биологический круговорот.

Микроорганизмы участвуют и в образовании гумуса, определяющего основное свойство почвы – плодородие. Кроме того, жизнедеятельность микроорганизмов обеспечивает доступность гумуса для растений.

Особую роль в формировании и поддержании плодородия почвы играют бактерии, участвующие в круговороте азота в природе. Это азотфикссирующие бактерии, которые превращают недоступный для растений молекулярный азот атмосферного воздуха в связанный, обогащая тем самым почву соединениями азота. Немаловажным этапом круговорота азота в природе является возвращение минерального азота в атмосферу, которое осуществляют денитрифицирующие бактерии в процессе нитратного (анаэробного) дыхания. Если бы этот цикл не был замкнут, то окисленные формы азота вымывались бы из почвы в моря и океаны, оставаясь в них недоступными для растений. Кроме того, образующиеся в процессе денитрификации оксиды азота участвуют в поддержании озонового слоя планеты.

Многие микроорганизмы образуют в процессе метаболизма и выделяют во внешнюю среду различные органические и неорганические кислоты, под действием которых водонерастворимые соли переходят в растворимую форму, в результате чего улучшается питание растений.

Микроорганизмы-редуценты – «санитары» природы. Они осуществляют разложение растительных и животных остатков и превращают их в минеральные вещества. Минерализация органических веществ имеет большое значение, так как при этом необходимые зеленым растениям элементы переходят из недоступной для них формы в доступную. Кроме того, микроорганизмы способны осуществлять деградацию отдельных искусственно синтезированных человеком органических веществ (ксенобиотиков) – пестицидов, гербицидов, поверхностно-

активных веществ, составляющих упаковочных материалов, нафталина, толуолов и др. Если бы это не происходило, ксенобиотики бесконтрольно накапливались бы в окружающей среде, загрязняя ее.

Микроорганизмы принимают активное участие в биологическом самоочищении водоемов, выполняя функцию по обезвреживанию и окислительной переработке поступающих в водоем загрязняющих веществ.

Широко используются микроорганизмы и в системах биологической очистки сточных вод. Биологическая очистка сточных вод производится на полях орошения и полях фильтрации, куда поступают подлежащие очистке воды. Просачиваясь через слои почвы, они подвергаются окислительному воздействию целого комплекса почвенных микроорганизмов, в результате чего содержащиеся органические вещества полностью минерализуются. В настоящее время в связи с высоким уровнем развития промышленности и огромным количеством образующихся сточных вод создаются специальные сооружения аэробной биологической очистки – биотенки, биофильеры и аэротенки.

Микроорганизмы принимают участие в формировании месторождений меди, марганца, серы, железа, фосфатов, нефти.

Использования микроорганизмов в биотехнологии, промышленности и сельском хозяйстве

Человек с древних времен интуитивно использовал уникальные особенности микроорганизмов, даже не подозревая об этом. С давних пор процессы брожения применялись при приготовлении теста для хлеба, пива, вина, уксуса, кисломолочных продуктов, росяной мочке льна. Только в настоящее время стало известно, что все эти процессы происходят при участии определенных микроорганизмов, которые присутствуют на используемых для брожения субстратах.

Изучение биосинтетической деятельности микроорганизмов позволило установить их способность к синтезу самых разнообразных соединений, имеющих большое народнохозяйственное значение. В настоящее время с помощью микроорганизмов в промышленных масштабах получают микробный белок, аминокислоты (глутаминовую, треонин, лизин, пролин, глутамин), витамины (В₁₂, рибофлавин), ферменты (амилазы, пектиназы, протеазы, целлюлазы, липазы, изомеразы, трипсины, стрептокиназы, диастазы), интерферон, инсулин, гормон роста человека, органические кислоты (лимонную, молочную, маслянную, уксусную, глюконовую), этанол, глицерин, ацетон, бутанол, пропанол, бутандиол, полисахариды (декстрыны, ксантаны, пуллулан, альгинаты), средства защиты растений, антибиотики, стероиды, каротиноиды, рибонуклеотиды, кортизон, преднизолон, гидрокортизон и другие ценные продукты.

Достижения микробиологии находят практическое применение в металлургии для извлечения различных металлов из руд. Например, уже реализован способ микробиологического выщелачивания меди из сульфидной руды халькопирита. В перспективе возможно использование микроорганизмов для получения цветных и редких металлов – золота, свинца, германия, лития и др.

Особо следует отметить, что микробиология внедрилась в такие традиционно небиологические производства, как получение энергетического сырья (биогаз метан), добыча нефти, что вносит существенный вклад в решение топливно-энергетической проблемы. Микроорганизмы способны повышать прочность бетона. Установлено, что при добавлении на тонну бетона нескольких килограммов биомассы микроорганизмов повышается прочность и пластичность строительного материала.

Микроорганизмы используются для приготовления кисломолочных продуктов, в приготовлении сыров. Также широкое применение нашли микроорганизмы для приготовления мясных и рыбных продуктов, для приготовления квашеных овощей и фруктов. Широко используются микроорганизмы также в хлебопечении, в приготовлении спирта и алкогольных напитков, уксуса. Используют микроорганизмы в приготовлении сироса и сенажа.

Микроорганизмы могут служить источниками пищи для человека и животных с высоким содержанием белка.

На основе микробиологического синтеза получают биологически активные и хозяйствственно ценные продукты метаболизма. Микроорганизмы широко используются в производстве индивидуальных веществ и препаратов (аминокислот, органических кислот, антибиотиков, пигментов, спиртов, ферментов, гормонов, вакцин, биогаза и др.).

Широкое применение получили микробные препараты, улучшающие питание растений и способствующие повышению продуктивности растениеводства. Создание микробно-растительных ассоциаций для фиторемедиации деградированных сельскохозяйственных угодий является важной темой исследования для ученых микробиологов. Биологический метод защиты растений от болезней бактериальной и грибной этиологии получает все большее распространение в сельском хозяйстве. Использование микроорганизмов-антагонистов фитопатогенов, создание и повышение эффективности микробных препаратов для сельского хозяйства является ключевыми направлениями микробиологических исследований.

Микробная деградация ксенобиотиков в техногеннонарушенных природных и производственных средах может способствовать очистке природных ресурсов от наиболее распространенных ксенобиотиков.

Исследование микробиоты Антарктики и практическое применение антарктических микроорганизмов может иметь важное значение в микробиологии.

Микроскопические грибы являются продуцентами большого количества разнообразных биологически активных веществ. Промышленное использование грибов.

Термофильные бактерии имеют большое практическое значение. Обладая очень интенсивным метаболизмом, они являются активными продуцентами витаминов, ферментов, органических кислот, кормового белка и других ценных веществ. Эти их свойства широко используются в микробиологической промышленности, так как применение мезофильных микроорганизмов в ней ограничено из-за того, что в результате культивирования часть энергии выделяется в виде

тепла и происходит разогрев субстрата (питательной среды), что приводит к гибели мезофильных микроорганизмов.

Термофильные бактерии играют также большую роль в биологической очистке бытовых отходов и образовании метана.

Таким образом, микробиология вносит существенный вклад в решение многих практических задач, проблем здравоохранения и сельского хозяйства, способствует развитию определенных отраслей промышленности.

Использование микроорганизмов в научных исследованиях

Классические генетические эксперименты с использованием бактерий и микроскопических грибов. Применение прокариот для создания моделей основных процессов, осуществляющихся на клеточном и молекулярном уровне. Исследования генома микроорганизмов. Основные достижения генной инженерии.

Следует отметить, что еще имеются большие возможности, основанные на применении микроорганизмов, для расширения и совершенствования биотехнологических процессов. Решение таких актуальных проблем, как обеспечение человечества продуктами питания и лекарственными средствами, возобновление энергетических ресурсов, охрана окружающей среды, так или иначе будет связано с использованием микроорганизмов.

Отрицательная роль микроорганизмов

Порча микроорганизмами продуктов питания.

Микробное повреждение промышленных и бытовых объектов и материалов.

Болезнетворные микроорганизмы – возбудители заболеваний человека, животных и растений. Следует также отметить, что успехи в области микробиологии открыли новые возможности в профилактике и лечении многих инфекционных заболеваний, в борьбе с которыми ранее медицина была бессильна. За сравнительно небольшой период времени почти полностью ликвидированы такие заболевания, как чума, оспа, холера, являющиеся в прошлом бичом человечества. В настоящее время внимание микробиологов сосредоточено на проблеме злокачественных опухолей, синдроме приобретенного иммунодефицита и многих вирусных инфекций. Изучение свойств патогенных микроорганизмов позволило получать в промышленных масштабах вакцины, сыворотки и другие лечебные препараты.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

2.1. Программа лабораторных занятий

Занятие № 1. Оснащение микробиологической лаборатории и правила работы в ней. Лабораторное оборудование. Лабораторная посуда (2 часа).

Занятие № 2. Питательные среды и их классификация. Принципы приготовления питательных сред (2 часа).

Занятие № 3. Методы стерилизации, используемые в микробиологической практике (2 часа).

Занятие № 4. Микроскопические методы исследования в микробиологии. Изучение морфологии, сочетания клеток и размеров разных групп прокариот (2 часа).

Занятие № 5. Изучение морфологии, размеров клеток разных представителей эукариотических микроорганизмов (2 часа).

Занятие № 6. Изучение принадлежности бактерий к грамположительным и грамотрицательным. Морфология бактерий. Метод окраски по Граму, метод Грегерсена. Окраска эндоспор (2 часа).

Занятие № 7. Способы культивирования микроорганизмов (2 часа).

Занятие № 8. Принципы культивирования (выращивания) микроорганизмов. Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов (2 часа).

Занятие № 9. Выделение чистых культур микроорганизмов. Накопительные культуры микроорганизмов; методы их получения. Чистые культуры микроорганизмов, методы их получения (2 часа).

Занятие № 10. Проверка чистоты выделенных культур микроорганизмов (2 часа).

2.2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов

Известно значительное количество питательных сред, используемых для культивирования и поддержания (сохранения) микроорганизмов. **Питательной средой** в микробиологии называют среду, содержащую различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях. Еще в 1930 г. М. Левин и Г. Шенлейн описали 2543 питательные среды и классифицировали не менее 2000 их наименований, однако число ингредиентов, являющихся неотъемлемыми компонентами сред, относительно невелико, а их композиции создаются на основе определенных общих принципов.

Для размножения разных бактерий необходимо обеспечить подходящее биофизическое окружение и наличие биохимических питательных компонентов. Любая питательная среда для культивирования определенного вида микроорганизмов должна соответствовать следующим требованиям:

- содержать все необходимые для роста питательные вещества в легко усвояемой форме;

- иметь оптимальную влажность, чтобы вещества в ее составе находились в растворенном состоянии;
- характеризоваться определенной вязкостью, кислотностью, быть изотоничной, сбалансированной по содержанию отдельных химических элементов, с высокой буферной емкостью (по возможности прозрачной);
- быть стерильной.

Для роста автотрофных бактерий потребности в питательных веществах достаточно просты: вода, диоксид углерода и соответствующие неорганические соли. Например, хемолитотрофные бактерии рода *Nitrobacter* ассимилируют CO₂ и получают энергию путем окисления нитритов в нитраты.

Используют в двух целях: 1) в качестве источника энергии; при этом органическое вещество окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов типа CO₂, органических кислот и др.; 2) в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно для образования клеточных компонентов или для их синтеза в реакциях, требующих затрат энергии. Так, бактерии *Escherichia coli* способны к росту на минимальной среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Молочнокислые же бактерии растут на сложных средах, содержащих в качестве добавок ряд органических соединений (витамины, аминокислоты и др.), которые клетки не в состоянии синтезировать самостоятельно. Такие соединения называются **факторами роста**. Организмы, которые нуждаются в их добавлении в ростовую среду, называются **ауксотрофными** по соответствующим соединениям. Этим термином особенно широко пользуются в литературе по генетике бактерий.

Организмы, способные к росту на простых средах, содержащих источник углерода и энергии, а также набор основных биогенных элементов (углерод, кислород, водород, азот, сера, фосфор), получили название **прототрофных**. Следует учитывать и то, что в природе встречаются бактерии, которые способны размножаться в местах с низким пищевым потоком углерода – до 0,1 мг/л в сутки. Они получили название **олиготрофных**; противоположную группу для них составляют **копиотрофные** бактерии, которые способны к росту на богатых пищевых субстратах.

Выбор питательной среды зависит не только от потребностей клеток, но и в значительной степени от целей эксперимента, а существующая классификация питательных сред учитывает характеристику их основных особенностей.

Для культивирования микроорганизмов используются различные по составу питательные среды, в которых должны содержаться все вещества, необходимые для роста. В связи с тем что конструктивные и энергетические процессы у микроорганизмов крайне разнообразны, универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех без исключения микроорганизмов, не существует.

Основными компонентами любой питательной среды для культивирования микроорганизмов являются источники углерода и азота. Их количественное отношение определяет специфичность подавляющего большинства сред.

Для культивирования автотрофных микроорганизмов необходимо обеспечить клетки углекислым газом, так как его концентрация в воздухе не превышает

0,03 % и поступление в среду за счет диффузии недостаточно для интенсивного роста микроорганизмов. В среды для культивирования автотрофов вносят чаще всего карбонат кальция (CaCO_3), можно также вносить гидрокарбонат натрия (NaHCO_3) или другие карбонаты. В некоторых случаях через среду продувают воздух, искусственно обогащенный 1–5 % углекислого газа.

Потребности гетеротрофов в углероде не могут быть удовлетворены при использовании CO_2 . Для их развития среда должна содержать источник углерода в виде органических соединений. В зависимости от индивидуальных особенностей микроорганизмы-гетеротрофы способны использовать различные соединения – органические кислоты, спирты, углеводы, углеводороды, ароматические соединения и др. Но в лабораторной практике в качестве источника углерода чаще всего применяют глюкозу, так как это наиболее легко утилизируемое микроорганизмами соединение углерода.

Вторым по значимости компонентом питательной среды является азот. Азот входит в состав органических веществ клетки главным образом в восстановленной форме – в виде амино ($-\text{NH}_2$)- или имино ($-\text{NH}-$)-групп. Потребности микроорганизмов в источнике азота могут быть удовлетворены различными азотсодержащими соединениями, в которых азот имеет разную степень восстановленности. Для очень многих микроорганизмов это могут быть и соли аммония, которые вносят в среду в виде хлоридов или сульфатов. Однако следует помнить, что аммонийные соли – физиологически кислые вещества, по мере использования иона аммония в среде накапливается анион соответствующей кислоты, что приводит к заметному возрастанию кислотности среды и может отрицательно повлиять на развитие микроорганизмов.

Потребности значительного числа микроорганизмов в азоте могут быть удовлетворены нитратами. Питательные среды для культивирования таких микроорганизмов содержат нитраты в виде солей калия или натрия. В отличие от солей аммония, нитраты физиологически щелочные соединения, так как при использовании аниона в среде накапливаются катионы K^+ или Na^+ . Нитриты для многих микроорганизмов токсичны, поэтому в качестве источника азота практически не используются нитраты.

Наиболее требовательные к азоту микроорганизмы культивируют на питательных средах, содержащих белки или продукты их неполного гидролиза – пептоны. Пептоны представляют собой смесь поли- и олигопептидов, аминокислот, органических азотистых оснований, солей и микроэлементов. Их получают в результате воздействия протеолитическими ферментами на белки животного (мышечный белок, казеин) или растительного (соевая мука) происхождения. Необходимо иметь в виду, что микроорганизмы могут использовать пептон не только как источник азота, но и как источник углерода и энергии.

Кроме источников углерода и азота, микроорганизмам для построения веществ клетки необходимы также соединения серы, фосфора, калия, магния, кальция и других макроэлементов. Все они должны содержаться в питательной среде в доступной для микроорганизмов форме. Потребности в этих элементах удовлетворяются обычно за счет минеральных солей. Так, потребности подавляющего

большинства микроорганизмов в сере удовлетворяются сульфатами, хотя в клетке сера находится в основном в восстановленной форме, в виде сульфогидрильных групп. Соли фосфорной кислоты удовлетворяют потребности микроорганизмов в фосфоре. Все необходимые металлы (калий, натрий, кальций, марганец) и другие элементы микроорганизмы получают в форме катионов или анионов неорганических солей. Например, источником магния служит, как правило, $MgSO_4$, натрия – $NaCl$, кальция – $CaCO_3$ или $CaCl_2$.

Помимо макроэлементов, многие микроорганизмы требуют наличия в среде так называемых факторов роста. Факторы роста могут быть двух типов: неорганические и органические. К неорганическим факторам роста относятся микроэлементы – Co, Zn, Mo, Mn, Fe, Cu и др. Они входят в состав активных групп многих ферментов. В качестве органических факторов роста можно выделить витамины, пуриновые, пириимидиновые основания, аминокислоты. Факторы роста добавляют в питательную среду в значительно меньших количествах, чем макроэлементы. Следует помнить, что микроорганизмы усваивают аминокислоты в L-, а не в D-форме.

Потребности микроорганизмов сразу в нескольких аминокислотах часто удовлетворяют, добавляя к среде гидролизат белка. Для получения гидролизатов используют белки животного (мясо, рыбу, желатину, казеин) или растительного (семена сои, подсолнечника, кукурузы) происхождения, а также клетки микроорганизмов (дрожжи, водоросли, бактерии). Гидролиз проводят с использованием протеолитических ферментов, кипячением минеральных кислот или крепких щелочей.

Некоторые натуральные вещества, к числу которых относятся дрожжевой или кукурузный экстракт, содержат сразу несколько различных факторов роста (витамины, минеральные соли, аминокислоты).

Все питательные среды по составу делятся на натуральные и синтетические. **Натуральными** называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения. К средам такого типа относятся овощные или фруктовые соки, ткани животных, молоко, отвары мяса, вытяжки почвы, различные части растений, клетки микроорганизмов. На натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, поскольку такие среды содержат все компоненты, необходимые для их роста и развития. Однако эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав и мало пригодны для изучения обмена веществ микроорганизмов, так как в них трудно учесть потребление ряда компонентов и образование продуктов метаболизма. Натуральные среды используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления биомассы и для диагностических целей.

К **натуральным средам** относят те, которые имеют неопределенный химический состав. Примерами являются среды, представляющие собой смесь продуктов распада белков (казеина, тканей животных), образующихся при их гидролизе, солодовое и пивное сусло, картофельный отвар, отвары злаков, настои сена, соломы и др. Кислотный (HCl) или щелочной ($NaOH$) гидролиз белков используется для приготовления их полных гидролизатов. Действие ферментов типа

трипсина, панкреатина, папаина приводит лишь к частичному (неполному) гидролизу белков, в результате чего образуются *пептоны*. Они представляют собой смесь поли- и олигопептидов, органических азотных соединений, аминокислот, микроэлементов. Как правило, на пептонных питательных средах наиболее требовательные микроорганизмы растут лучше, чем на питательных средах, приготовленных из полных гидролизатов или смесей аминокислот. Отдельные компоненты таких сред могут использоваться не только как источники азота, но и как источники углерода. При ферментативном гидролизе белка, вероятно, сохраняются лабильные факторы роста. Кроме того, многие микроорганизмы лучше размножаются на средах, содержащих небольшие пептиды, потому что могут усваивать их непосредственно, а отдельные аминокислоты в чистом виде – нет. Обычно в составе такой среды ферментативный гидролизат белка обеспечивает потребность в источниках азота, аминокислотах, используется как источник углерода и энергии; дополнительно внесенные соли удовлетворяют потребности бактерий в неорганических ионах, а дрожжевой экстракт обеспечивает клетки витаминами.

Такие среды используются для наращивания биомассы, хранения микроорганизмов и т. п.

Синтетические среды – это среды определенного состава, представленные чистыми химическими соединениями, взятыми в точно указанных концентрациях и соотношениях отдельных элементов. Они широко используются при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов. Их обязательными составляющими являются неорганические соединения (соли), углерод- и азотсодержащие вещества (типичными примерами являются глюкоза и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Часто к таким средам добавляют буферные растворы и хелатирующие соединения. Ауксотрофные организмы растут на таких средах только при добавлении соответствующих факторов роста. Основное назначение этих питательных сред – изучение особенностей физиологии и метаболизма микроорганизмов, выделение генетически измененных форм, на основании чего их можно отнести к *средам селективным*.

Наряду с натуральными и синтетическими выделяют **полусинтетические среды**. Главными компонентами полусинтетических сред являются соединения известного химического состава – углеводы, соли аммония или нитраты, фосфаты и др. Однако в них всегда включаются вещества неопределенного состава, такие как дрожжевой, почвенный, кукурузный экстракт или гидролизат казеина. Эти среды находят широкое применение в промышленной микробиологии для получения аминокислот, витаминов, антибиотиков и других важных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Такие среды часто используются в случае промышленного культивирования биологических объектов для получения продуктов их метаболизма.

По назначению среды подразделяют на элективные и дифференциально-диагностические. **Элективные среды** предназначены для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания. Они обеспечивают преимущественное развитие определенной физиологической группы микроорганизмов.

Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одной или нескольких физиологических групп микроорганизмов и менее пригодны для развития других. Например, для преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавление в питательную среду трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т. д.). Для выделения стафилококков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %, при которой рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т. е. при получении накопительной культуры.

Дифференциально-диагностические среды дают возможность быстро отличить одни виды микроорганизмов от других и выявить некоторые их особенности. Эти среды особенно широко применяются в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации микроорганизмов.

Принцип разработки состава таких сред основан на том, что отдельные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в питательную среду. В дифференциально-диагностические среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма.

Примером таких сред являются среды Гисса, которые используются для изучения сахаролитических свойств микроорганизмов, т. е. способности ферментировать те или иные углеводы и спирты. В состав среды Гисса входит основной фон (пептон и K_2HPO_4), индикатор (бротимоловый синий, бромкрезоловый пурпурный, Андреде и др.) и один из изучаемых углеводов или спиртов. Различают малый и большой пестрый ряд Гисса. В малый ряд Гисса входят следующие углеводы и спирты: глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза и маннит. В большой пестрый ряд Гисса входят, кроме тех, что образуют малый ряд, другие углеводы и спирты, например арабиноза, рамноза, сорбит, дульцит и т. д. Среды Гисса можно использовать в жидким или полужидким состоянии. В последнем случае к жидкой среде добавляют 0,5 % агара. Рост микроорганизмов на средах Гисса может приводить к накоплению органических кислот, нейтральных продуктов и газов. Выделение этих продуктов регистрируется по изменению pH среды. Например, если среда Гисса содержит индикатор бромтимоловый синий, то цвет ее будет изменяться в зависимости от pH следующим образом: pH = 7,0 – зеленый; pH > 7,0 – синий; pH < 7,0 – желтый.

Так, среда Эндо позволяет отличить клоны клеток, сбраживающие лактозу до ацетальдегида, от клонов, не обладающих этим свойством. Основными компонентами данной среды являются питательный (пептонный) агар, лактоза и индикатор – основной фуксин, обесцвеченный сульфитом натрия (реактив Шиффа). Исходная питательная среда окрашена в розовый цвет. Микроорганизмы, не сбраживающие лактозу, образуют на ней бесцветные колонии. При

сбраживании лактозы до ацетальдегида последний реагирует с сульфитом, в результате чего формируются колонии, окрашенные в интенсивный розовый или красный цвет, иногда с металлическим блеском. Другим примером является среда *Левина*, в которой в качестве индикаторов содержатся эозин и метиленовый синий, исходно окрашенная в черно-синий цвет. Клетки, осуществляющие сбраживание лактозы, образуют колонии, окрашенные в синий с металлическим блеском цвет, а колонии, не обладающие этим свойством, бесцветны. Подобные изменения окраски происходят потому, что красители присутствуют в среде не в виде самостоятельных соединений, а в виде комплексов с ее питательными веществами. При низких значениях pH эти комплексы выпадают в осадок, исходные же красители в этих условиях растворимы; при высоких значениях pH комплексы красителей бесцветны, тогда как метиленовый синий приобретает синюю окраску. Данная среда позволяет дифференцировать бактерии рода *Escherichia* от бактерий рода *Proteus*.

Существуют среды, сочетающие свойства селективных и дифференциально-диагностических: например, среда *Плоскирева* содержит углевод (лактоза) и индикатор нейтральный красный (как в дифференциально-диагностических средах), а также бриллиантовый зеленый, угнетающий рост грамположительной микрофлоры.

По физическому состоянию различают жидкие, сыпучие, плотные, или твердые, среды. **Жидкие среды** применяют для накопления биомассы или продуктов обмена, для исследования физиологии и биохимии микроорганизмов.

Жидкие питательные среды получаются при растворении в воде определенного необходимого набора питательных веществ, макро- и микроэлементов. По составу они могут быть как натуральными, так и синтетическими. Рост микроорганизмов в жидкой среде может происходить в *периодической* (закрытой) системе; в этом случае после инокуляции среды не происходит ни добавления, ни удаления каких-либо компонентов, кроме газовой фазы.

При *проточном* (непрерывном) культивировании постоянная подача свежих питательных компонентов со скоростью, равной скорости удаления среды (открытая система). Такие среды используются для выявления физиологического-биохимических особенностей, накопления биомассы или продуктов метаболизма.

Полужидкие среды содержат гелеобразующее вещество в низкой (0,3-0,7 %) концентрации и имеют мягкую желеподобную консистенцию. Такие среды пригодны для изучения подвижности и хемотаксиса клеток, культивирования микроаэрофилов.

Плотные среды используют для выделения чистых культур, определения количества жизнеспособных микроорганизмов, хранения культур в коллекциях, для накопления биомассы и др.

Среды в твердом состоянии в форме плотных гелей используются в бактериологии со времен Р. Коха. Наиболее важное их преимущество в том, что на них можно выращивать микроорганизмы в виде колоний, образующихся из отдельных клеток популяции. Твердые среды необходимы для получения чистых

культур, количественного учета и хранения культур микроорганизмов, а также для диагностических целей.

В целях уплотнения сред применяют агар, желатину или силикагель (кремнекислый гель).

Для уплотнения чаще всего используют агар. Он представляет собой сложный полисахарид, в состав которого входят агароза и агаропектин. Агар получают из красных морских водорослей.

Агар – полисахарид, состоящий из агарозы (70 %) и агаропектина. Он обладает рядом полезных свойств, в частности: 1) способен образовывать в воде гели; 2) плавится при температуре 100 °C и затвердевает при 45 °C; 3) не расщепляется под влиянием ферментов большинства видов микроорганизмов; 4) термолабильные вещества и живые микроорганизмы не разрушаются при добавлении к нагретому до 45 °C расплавленному агару, если смесь сразу же охладить; 5) агаровые гели имеют высокую степень прозрачности; 6) используемые концентрации 1,5–2,0 % являются относительно невысокими, что весьма экономично.

Желатин – это экстракт, получаемый из субстратов, богатых коллагеном – белком костей, хрящей, сухожилий, чешуек. Образуемый желатиной гель плавится при температуре 25 °C, которая ниже обычной температуры инкубации многих микроорганизмов (30 – 37 °C). Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами, которые многие микроорганизмы выделяют в среду. Уплотняющая концентрация желатина 17 – 20 %. Эти свойства желатины ограничивают его применение в качестве уплотняющего средства.

Силикагель используют как твердую основу для синтетических сред строго определенного состава. Силикагелем называют соли двуокиси кремния (SiO_2). Его стерильный золь готовят из раствора силиката натрия и перед использованием, для того чтобы вызвать образование геля, к нему добавляют питательную среду, содержащую электролиты. Среды на основе силикагеля (1,5–2,0 %) используют для получения культур автотрофных бактерий, так как при этом в них отсутствуют органические вещества. При добавлении в такие минеральные среды различных органических веществ можно исследовать способность гетеротрофных бактерий использовать их в качестве единственных источников углерода. С помощью силикагелиевых сред можно также определять потребности бактерий в витаминах.

Каррагинан («растительный желатин») добывается путем экстракции из определенных видов красных морских водорослей. Калиевые соли некоторых типов каррагинанов способны образовывать плотные (2 %) прозрачные гели, которые могут быть заменителями агара. Каррагинан значительно дешевле агара, не разрушается большинством видов бактерий. Однако разливать приготовленные среды следует при высокой температуре – 55 – 60 °C.

Для жизнедеятельности микроорганизмов существенное значение имеют не только состав питательной среды, но и такие факторы, как плотность среды, аэрация, температура, свет и влажность. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных диапазонах значения каждого фактора, причем для различных групп микроорганизмов они часто неодинаковы.

Так как pH среды имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов, то в приготовленных средах всегда следует определять значение pH, которое может изменяться в процессе стерилизации. Поэтому после стерилизации pH следует повторно проверить и, если это требуется, установить нужное значение, стерильными растворами низкой концентрации кислоты или щелочи. В процессе культивирования микроорганизмов pH среды часто меняется и для того, чтобы не допустить чрезмерного изменения и удержать его на необходимом уровне, используют различные приемы. Иногда в среды добавляют буферные растворы или избыточное количество мела, который нейтрализует образующуюся кислоты. Лучше всего контролировать pH среды в ферmentерах, применяемых для проточного культивирования.

Сыпучие среды применяют главным образом в промышленной микробиологии для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений. К таким средам относятся, например, разваренное пшено, отруби и др. Сыпучие (сухие) среды представляют собой массу в той или иной степени измельченного и увлажненного органического сырья (чаще всего растительного происхождения). Основное их назначение – использование в пищевой промышленности (получение соевого соуса или других ферментированных продуктов), сельском хозяйстве (силосование кормов), утилизации твердых и полужидких бытовых отходов. В бактериологической практике чаще всего используются сухие питательные среды, которые получают в промышленных масштабах – триптические гидролизаты дешевых непищевых продуктов (рыбные отходы, мясокостная мука, технический казеин), и среды, в которых присутствуют продукты природного происхождения (мясной перевар, кровяной агар и т. д.). Многие среды для клинической микробиологии выпускаются в сухом виде, их можно хранить длительное время. Кроме того, сыпучие среды стандартны по составу, удобны в хранении и транспортировке, хорошо растворимы в воде.

Выбор состава питательной среды для культивирования предполагает, что будут учтены не только особенности химического состава среды, но и такие биофизические факторы, как кислотность, температурные режимы культивирования, способ подачи и удаления молекулярного кислорода, освещенность, влажность, являющиеся определяющими для роста любой бактериальной культуры. При этом для различных групп микроорганизмов следует учитывать, что их значения неодинаковы. Температура, аэрация и давление определяются условиями культивирования, окислительно-восстановительный потенциал зависит как от состава ростовой среды, так и от условий культивирования. Контроль окислительно-восстановительного потенциала особенно важен при культивировании облигатно-анаэробных бактерий.

2.3. Стерилизация в микробиологии

Цель и назначение процесса стерилизации состоят в полном удалении или уничтожении всех живых микроорганизмов, спор и других покоящихся форм

внутри или на поверхности объектов окружающей среды. Стерилизации подвергаются питательные среды, лабораторная посуда, инструменты, растворы и т. д. Термин «стерильность» имеет абсолютное значение: можно говорить только о стерильности либо нестерильности – состояния «частичной или неполной стерильности» не существует. Возможность и целесообразность использования того или иного способа стерилизации определяются несколькими факторами, в первую очередь физико-химическими свойствами материала, а также целью проведения исследования. Можно выделить термическую и холодную стерилизацию.

К методам термической стерилизации относятся: прокаливание и обжигание в пламени спиртовки (фламбирование); кипячение; дробная стерилизация (тиндализация); пастеризация; сухожаровая (горячим паром) стерилизация; стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование). Использование двух последних способов предполагает гибель только вегетативных клеток микроорганизмов.

Прокаливание и обжигание в пламени спиртовки (фламбирование) – наиболее быстрый и доступный метод стерилизации. Однако его использование ограничивается только термоустойчивыми материалами. Таким методом стерилизуют бактериологические петли, иглы, шпатели, пинцеты, фарфоровые ступки и другие инструменты. *Кипячение* – простейший способ стерилизации. Кипячением в дистиллированной воде стерилизуют мембранные фильтры. Режим стерилизации для мембранных фильтров – 30–60 мин с момента энергичного закипания воды. Металлические инструменты, мелкие стеклянные детали лучше всего кипятить в специальных закрытых приборах – стерилизаторах. В микробиологической практике таким способом стерилизации пользуются редко в связи с тем, что продолжительное кипячение может повредить обрабатываемый материал, а сокращение времени кипячения может не обеспечить стерильности. Чаще всего кипячение используют для стерилизации растворов термолабильных веществ (сахара, аминокислоты и т. п.).

Дробная стерилизация (тиндализация, или стерилизация текущим паром) используется для стерилизации питательных сред и растворов, которые содержат эндоспоры, но портятся при использовании температур выше 100 °С. Метод разработан в 1877 г. Дж. Тиндалем. Согласно методу, жидкость нагревают до 100 °С и продолжают выдерживать при данной температуре 10 мин. За это время все вегетативные клетки погибают, жизнеспособность сохраняют только споры. Затем жидкость охлаждают до температуры, оптимальной для прорастания спор (30 °С), и через несколько часов снова нагревают до температуры кипения. Трех-четырех подобных циклов бывает достаточно для уничтожения всех имеющихся спор. Эффективность метода особенно велика потому, что нагревание обычно приводит к активации спор. Тиндализацию можно проводить с помощью пара, подаваемого от внешнего источника, либо в специальных аппаратах. Резервуар с кипящей водой располагают в нижней части аппарата, а над ним помещают сетку с устанавливаемыми стерилизуемыми растворами.

Пастеризация заключается в однократном прогреве материала при температурах ниже 100 °С и направлена на уничтожение вегетативных клеток. Этот метод широко используется в пищевой промышленности для обработки продуктов, которые теряют вкусовую и пищевую ценность при кипячении: молока, ягодных и фруктовых сиропов, соков, вин, пива и т. д. В микробиологической практике пастеризацией пользуются для получения накопительных культур спорообразующих бактерий. В лабораторных условиях пастеризацию проводят либо на водяной бане, либо в ультратермостате при следующих режимах: 60 – 70 °С в течение 15 – 30 мин; 80 °С в течение 10 – 15 мин.

Сухожаровая стерилизация, или **стерилизация сухим горячим воздухом**, проводится в сухожаровых шкафах. Режим стерилизации 160 – 170 °С на протяжении 2 ч. При этом предполагается, что погибают как клетки, так и споры. Таким способом стерилизуют стеклянную посуду, инструменты и др.

Стерилизация насыщенным паром под давлением, или **автоклавирование**, – один из наиболее эффективных методов стерилизации, так как стерилизуемый объект подвергается одновременному воздействию высокой температуры и повышенного давления пара. При этом погибают как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов. Процесс проводится в специальных приборах – автоклавах (рис. 1), закрывающихся герметично. Основные используемые режимы стерилизации: 15 – 30 мин при избыточном давлении 0,5 атм (температура достигает 110 – 112 °С); 15 – 45 мин при избыточном давлении 1,0 атм (температура достигает 121 °С); 10 – 30 мин при избыточном давлении 1,5 атм (температура достигает 126 °С). Таким способом стерилизуют питательные среды, растворы, посуду, инструменты, фильтры и т. д.

При **холодной стерилизации** применяют химические вещества или проводят воздействие на объект факторами физической природы. Химические методы подавления жизнедеятельности микроорганизмов предполагают использование дезинфектантов и антисептиков, имеющих неспецифический эффект, либо антибиотиков и синтетических antimикробных препаратов с избирательным противомикробным действием.

Дезинфицирующие вещества классифицируются по группам: кислоты или щелочи, галогены, тяжелые металлы, четвертичные аммониевые соли, фенольные соединения, альдегиды, кетоны, спирты, амины и перекиси. Устойчивость микроорганизмов к их действию может существенно меняться в зависимости от таких факторов, как концентрация активного компонента, длительность контакта, pH, температура, влажность и присутствие органических веществ. Химическими средствами неспецифического действия обрабатывают помещения, оборудование, различные предметы. Например, спирты используются в концентрации 60 – 70 % и эффективны в отношении вегетативных клеток. Фенолы и их производные применяются для дезинфекции помещений и дезинсекции. Среди летучих стерилизующих веществ можно отметить окись этилена, окись пропилена, озон, метилбромид, формальдегид, глутаровый альдегид. Указанные вещества используют для стерилизации пластмассовых центрифужных пробирок, пластмассовых чашек Петри, оптических инструментов, сывороток крови и др.

Стерилизация фильтрованием применяется к веществам, которые не выдерживают термической обработки (растворы белков, углеводов, витаминов, антибиотиков; углеводороды; сыворотки). Способ заключается в пропускании жидкостей и газов через специальные мелкопористые фильтры, диаметр пор которых меньше размеров самых мелких клеток или вирусов. Фильтры задерживают микроорганизмы благодаря поровой структуре их матрикса. Для пропускания раствора через фильтр требуется вакуум или давление.

Существуют два основных типа фильтров – *глубинные* и *мембранные*. Глубинные состоят из волокнистых или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в матриксе фильтра. Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру, и захват ими частиц определяется размером пор. Фильтры изготавливают из различных природных (коалин, асбест, целлюлоза) или синтетических (производные целлюлозы) материалов.

Различают фильтры: мембранные, получаемые на основе нитроцеллюлозы; асbestовые, или фильтры Зейтца, получаемые на основе смеси асбеста и целлюлозы; фарфоровые, или свечи Шамберлана, получаемые из смеси кварцевого песка и коалина, сплавленных между собой; стеклянные, получаемые из стекла «Пирекс».

Стерилизация с использованием облучения пригодна для термолабильных материалов. Ультрафиолетовые лучи (250 – 270 нм) используются для стерилизации центрифужных пробирок, наконечников для пипеток, материалов из термолабильной пластмассы, воздуха в помещениях. Доза облучения определяется мощностью лампы, временем воздействия, степенью и видовым составом микроорганизмов загрязненного материала. Вегетативные формы более чувствительны к облучению, чем споры, которые устойчивее в 3-10 раз. От УФ-облучения микроорганизмы могут быть защищены органическими веществами, пылью или другими материалами. Ограничением при использовании данного метода стерилизации является низкая проникающая способность УФ-лучей и высокая поглощающая способность воды и стекла.

Рентгеновское и γ -облучение также эффективны для стерилизации пластмасс, пищевых продуктов, но требуют строгого соблюдения правил безопасности. К γ -облучению наиболее чувствительны вегетативные клетки бактерий, затем идут плесневые грибы, дрожжи, бактериальные споры и вирусы. В большинстве случаев для надежного уничтожения микроорганизмов достаточно дозы облучения 2,5 Мрад.

Гамма-облучение используется для стерилизации больничных принадлежностей, антибиотиков, витаминов, гормонов, стероидов, разового пластмассового оборудования, шовного и перевязочного материала и др.

На практике проводят контроль стерилизации, при котором о работе стерилизующих агентов и аппаратов судят: 1) по эффективности гибели спор в процессе стерилизации; 2) с помощью прямого измерения температуры и 3) с помощью химических индикаторов.

Следует отметить, однако, что в настоящее время все большее распространение получают посуда и инструменты одноразового использования.

2.4. Микроскопия в микробиологии

Основные задачи микроскопии:

- выявление микроорганизмов в различных материалах;
- количественное определение содержания микроорганизмов в исследуемом материале;
- ориентировочная идентификация микроорганизмов в исследуемом образце;
- изучение некоторых морфологических признаков и наличия структур в клетках микроорганизмов (например, капсул, жгутиков и т. д.);
- изучение окрашенных мазков из колоний и чистых культур.

В настоящее время используется световая микроскопия, обеспечивающая увеличение объектов в сотни раз, и электронная микроскопия – в десятки тысяч раз. Световая микроскопия включает обычную просвечивающую (светло- и темнопольную), фазово-контрастную и люминисцентную формы. В последнее время разработаны типы микроскопии и соответственно микроскопы других видов: инверсионная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Строение светового микроскопа представлено на рисунке 20.



Рисунок 20 – Устройство светового микроскопа.

Светлопольная микроскопия позволяет исследовать объекты в проходящем свете в светлом поле. Данный вид микроскопии предназначен для исследования морфологии, размеров клеток, их взаимного расположения, структурной

организации и других особенностей. Максимальная разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,2 мкм (минимальное расстояние, при котором различимы два объекта). Общее увеличение складывается из произведения увеличений объектива и окуляра. Разрешение микроскопа можно увеличить за счет увеличения коэффициента преломления (иммерсии). В микроскопии применяют несколько иммерсионных систем: масляную, глицериновую, водную. При работе со световым микроскопом производят следующие действия:

1. В центральной части столика микроскопа устанавливают препарат.
2. Если дальнейшие исследования проводят с суховоздушным объективом ($\times 40$), то следует прикрыть диафрагму конденсора, перевести револьвер микроскопа на данное увеличение и опустить вниз тубус микроскопа с помощью микровинта до появления в поле зрения исследуемых объектов.
3. Если исследования проводятся с помощью иммерсионной системы (увеличение $\times 90$), то в центр препарата следует поместить каплю иммерсионного масла, очень осторожно опустить тубус микроскопа вниз таким образом, чтобы дотронуться до предметного стекла, затем, глядя в окуляр, поднять объектив вверх с помощью макровинта до появления в поле зрения микроорганизмов в плоскости препарата. С помощью микровинта добиваются максимальной четкости изображения. На объективе, предназначенном для использования иммерсионной системы, нанесены обозначения МИ (масляная иммерсия), ВИ (водная иммерсия) или цветное кольцо.
4. После просмотра всех препаратов следует снять масло с иммерсионного объектива сухой хлопчатобумажной салфеткой, перевести микроскоп на малое увеличение, снять осветитель, опустить конденсор и тубус микроскопа вниз до упора. Хранить микроскоп следует в условиях, предотвращающих попадание пыли на линзы.

Фазово-контрастная микроскопия ценна тем, что с ее помощью можно наблюдать живые объекты, которые имеют коэффициенты преломления, близкие к коэффициентам преломления среды, не прибегая к их фиксации и окрашиванию. С точки зрения увеличения никакого выигрыша нет, однако прозрачные объекты видны более четко, чем в проходящем свете обычного светлопольного микроскопа. При отсутствии соответствующего микроскопа обычный световой может быть оснащен специальным фазово-контрастным устройством, которое переводит фазовые изменения световых волн, проходящих через объект, в амплитудные, в результате чего живые прозрачные объекты становятся контрастными и видимыми в поле зрения.

С помощью фазово-контрастной микроскопии изучают форму, размеры, взаимное расположение клеток, их подвижность, размножение, прорастание спор микроорганизмов и т. д.

Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта косыми лучами света. При таком освещении лучи не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Если в исследуемом препарате содержатся клетки микроорганизмов, то косые лучи отражаются от их поверхности, отклоняются от

своего первоначального направления и попадают в объектив. На интенсивно черном фоне видны сияющие объекты. Такое освещение препарата достигается использованием специального темнопольного конденсора, которым заменяют обычный конденсор светлопольного микроскопа. При микроскопировании в темном поле можно увидеть объекты, величина которых измеряется сотыми долями микрометра, что находится за пределами разрешающей способности обычного светлопольного микроскопа. Однако наблюдение за объектами в темном поле позволяет исследовать только контуры клеток и не дает возможности рассмотреть их внутреннюю структуру.

Люминесцентная микроскопия основана на способности ряда веществ биологического происхождения или некоторых красителей светиться под действием падающего на них света. Микроорганизмы, содержащие хлорофилл, витамин В₁₂, алкалоиды, некоторые антибиотики, обладают первичной люминесценцией. Клетки микроорганизмов, в которых люминесценция слабо выражена или отсутствует, обрабатывают специальными красителями – флуорохромами (акридиновый оранжевый, примуллин, родамин и др.) в виде сильно разбавленных водных растворов: 1:500 – 1:100 000. Это называется наведенной или вторичной люминесценцией.

Такие растворы слабо токсичны, что дает возможность изучать неповрежденную клетку. В зависимости от химического состава клеточные структуры в разной степени адсорбируют красители и различным образом люминесцируют. Кроме того, флуорохромы неодинаково адсорбируются живыми и мертвыми клетками. Это позволяет применять данный вид микроскопии для цитологических и иммунологических исследований, определения жизнеспособности клеток, изучения микроорганизмов в почве, воде и т. д. Проведение люминесцентной микроскопии предполагает использование специальных микроскопов. Разработанные на основе люминесцентной микроскопии **иммунофлуоресцентные методы** применяются для визуализации иммунохимических реакций, основанных на специфическом взаимодействии антигена изучаемого объекта и меченых флуоресцентными красителями антител.

Электронная микроскопия позволяет обнаружить объекты, которые не визуализируются при использовании световых или ультрафиолетовых лучей. Короткая длина волн электронов, уменьшающаяся в прямой зависимости от подаваемого ускоряющего напряжения, позволяет различить объекты размером 0,5 – 1,0 нм (или больше чем 0,0002 мкм). В современных электронных микроскопах достигается увеличение на экране или пленке 5000 – 15 000. Благодаря столь высокому разрешению становится возможным выявление деталей бактериальных структур. Например, с помощью напыления солей тяжелых металлов, окружающих клетки бактерий и проникающих в поверхностные неровности, получают контрастирование за счет дифференциальной задержки электронов. Этот эффект называется **негативным контрастированием**.

Детали внутреннего строения выявляют на срезах бактерий, залитых в полимерный материал. Предварительно бактерии фиксируют и обрабатывают со-

лями тяжелых металлов для получения необходимого контраста. Часть электронов проходит через образец, а другие рассеиваются компонентами структуры, в результате чего формируется изображение на экране или пленке. Электронный микроскоп, в котором изображение формируется благодаря прохождению (просвечиванию) электронов через образец, называют ***просвечающим*** (или ***трансмиссионным***).

В ***сканирующем (растровом) микроскопе***, как следует из названия, пучок электронов быстро сканирует поверхность образца, вызывая излучение, которое формирует изображение на светящемся экране. Этот микроскоп дает картину поверхностей и позволяет получать сразу трехмерное изображение.

При ***методе сколов (замораживание – оттаивание)*** проводят изучение внутреннего строения клеточных мембран. Клетки замораживают при температуре жидкого азота -196°C в присутствии криопротектора и используют для получения сколов. Плоскости скола проходят через гидрофобную середину двойного слоя липидов. Обнаженную внутреннюю поверхность мембран оттеняют платиной. Полученные реплики изучают в сканирующем электронном микроскопе. Помимо вышеуказанных разработаны и другие методы визуализации:

- ***компьютерная интерференционная микроскопия*** позволяет получить высококонтрастное изображение при наблюдении субклеточных структур;
- ***лазерная конфокальная микроскопия*** дает возможность получить отчетливое изображение и наблюдать объекты в фокусе по всему полю. При сочетании с компьютерной техникой возможна пространственная реконструкция изучаемого объекта;
- ***рентгеновская микроскопия и позитронная эмиссионная томография*** позволяют наблюдать объекты не в вакууме, а в обычных условиях.

2.5. Микроскопические методы исследования в микробиологии

Выбор методов или способов окраски определяется конкретной целью исследования. Однако для приготовления препаратов существует ряд принципиальных методических приемов, которые лежат в основе использования большинства из них. Прежде всего это подготовка предметных стекол для приготовления препаратов. Толщина стекол должна составлять 1,2 – 1,4 мм. Более толстые стекла резко снижают четкость изображения, и их применение недопустимо при работе с иммерсионным объективом. Поверхность стекла должна быть хорошо обезжирена и очищена, что в повседневной работе достигается тщательным натиранием сухим мылом с последующим его удалением чистой хлопчатобумажной тканью или ватой. Хороший эффект может давать протирание вымытых стекол эфиром или обжигание их поверхности в пламени спиртовки. Хранят стекла, приготовленные для микроскопирования, в сухом состоянии или в этаноле. Покровные стекла также должны быть хорошо вымыты и высушены. Их толщина составляет 0,15 – 0,17 мм.

В микробиологической практике для изучения морфологии бактериальных клеток можно использовать неокрашенные (нативные, прижизненные) или окрашенные (фиксированные) препараты (мазки), приготовленные из естественных образцов либо из колоний выросших микроорганизмов. При этом следует помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию клеток.

Нативные препараты готовят для исследования живых неокрашенных бактерий. Наиболее распространены методы «раздавленной капли», «висячей капли», микрокамеры с плотными средами, препарат «отпечаток». При помощи таких технологий можно исследовать форму и взаимное расположение клеток, их подвижность, рост, спороношение и т. д. Препараты живых клеток часто рассматривают с «сухими системами» (т. е. без иммерсии) микроскопа. Для прижизненного изучения бактерий используют светлопольную, фазово-контрастную, темнопольную и люминесцентную микроскопию.

Препарат «раздавленная капля» готовят на предметном стекле, куда наносят каплю воды. В нее стерильной бактериологической петлей вносят небольшое количество исследуемой культуры, эмульгируют и накрывают покровным стеклом. Избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Если исследуют бульонную культуру, то на предметное стекло наносят непосредственно ее каплю. Препарат микроскопируют с использованием суховоздушной или иммерсионной системы (увеличение $\times 40$ или $\times 90$).

Препарат «висячая капля» используют при продолжительном наблюдении за ростом и развитием микроорганизмов. Небольшую каплю бульонной культуры микроорганизмов помещают с помощью бактериологической петли на стерильное покровное стекло. Стекло переворачивают каплей вниз и накладывают на лунку специального предметного стекла. Капля должна свободно висеть в лунке, не затрагивая ее краев и дна. Для создания влажной камеры и предохранения от высушивания края лунки смазывают вазелином. Микроскопируют также, как и препарат «раздавленная капля».

Микрокамеры с плотными средами готовят на стерильных предметных стеклах, на которые тонким слоем наносят расплавленную агаризованную питательную среду. После ее застывания в центр с помощью пастеровской пипетки или бактериологической петли помещают суспензию бактерий. Вокруг выбранной области лишнюю среду удаляют, сверху помещают покровное стекло. Для предотвращения высыхания такие препараты либо инкубируют в закрытой камере, либо герметизируют щели между стеклами путем заливки парафином или воском. Этот способ микроскопирования позволяет вести наблюдение за процессами роста и размножения, исследовать циклы развития, влияние на эти процессы каких-либо агентов. На таких препаратах не нарушается естественное расположение растущих клеток.

Препарат «отпечаток» готовят из агаризованной среды, на которой микроорганизмы растут сплошным газоном. К выросшей культуре сверху прикладывают чистое покровное стекло, слегка прижимают пинцетом и снимают. По-

лученный препарат помещают отпечатком вниз в раствор воды или метиленового синего на предметном стекле. Препараты типа «отпечаток» можно фиксировать и окрашивать, они хранятся длительное время. Часто приготовленные таким образом препараты используют при изучении спороношения у актиномицетов.

Окрашенные (фиксированные) препараты бактерий готовят в следующей последовательности.

1. *Приготовление мазка*: на чистое и обезжиренное предметное стекло наносят культуру исследуемого микроорганизма либо в капле воды, либо в виде суспензии, тщательно размешивают и распределяют по поверхности стекла максимально тонким слоем для того, чтобы мазок быстрее высыхал.

2. *Высушивание мазка* проводят при комнатной температуре.

3. *Фиксация мазка* чаще всего осуществляется термически (фламбированием). Хотя данный метод является достаточно грубым, он позволяет сохранить интактную морфологию и отношение бактерий к красителям. Препарат проносят 2–4 раза над пламенем спиртовки мазком вверх (стекло должно нагреться до такой степени, чтобы при прикосновении к тыльной стороне ладони оно вызывало легкое жжение).

Фиксация мазка преследует определенные цели: а) инактивацию микроорганизмов; б) закрепление их на поверхности стекла и предотвращение смывания при последующем окрашивании; в) повышение восприимчивости клеток к красителям, так как мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые.

Для более детального изучения структуры клеток используют *фиксирующие растворы*, предотвращающие ферментативный автолиз бактерий и стабилизирующие макромолекулы путем их химического сшивания. Наиболее часто применяют формалин, спирты, жидкость Карнуга, ацетон и др. Мазки фиксируют, помещая в раствор фиксаторов или нанося их на мазок.

Техника приготовления препаратов для окрашивания заключается в следующем. Фиксированный мазок помещают на параллельные стеклянные рейки, которые расположены над кюветой. На мазок наносят один или последовательно несколько красителей (например, 1 % водный раствор фуксина или метиленового синего на 1 – 2 мин). Следят за тем, чтобы во время окрашивания раствор красителя не подсыхал. После завершения окрашивания препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают, аккуратно промокая его фильтровальной бумагой, наносят на окрашенный сухой мазок каплю иммерсионного масла и микроскопируют с иммерсионной системой.

В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое.

Окрашивание препаратов проводится с помощью красителей, которые можно разделить:

- на позитивные (метиленовый синий, фуксин) и негативные (нигрозин). Позитивными называются красители, окрашающие клетки микроорганизмов

и другие находящиеся на стекле фиксированные объекты; негативными – красители, заполняющие пространство, окружающее микроорганизмы, в результате чего последние становятся видимыми в форме силуэтов на фоне красителя;

• на кислые (эозин, конго красный) и щелочные (гематоксилин, толуидиновый синий, азур). Кислые красители связываются с веществами, имеющими щелочную реакцию (например, цитоплазматическими белками), щелочные – с базофильными (кислыми) компонентами клеток (нуклеиновыми кислотами, рибосомами). Основные красители наиболее часто используются в микробиологических исследованиях.

Цвета окрашивания могут быть следующими: красный (основной фуксин, кислый фуксин, сафранин, конго красный); фиолетовый (генциановый фиолетовый, метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый); синий (метиленовый синий, толуидиновый синий, водный синий); зеленый (малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый).

Способность клеток воспринимать различные красители отражает их *тинкториальные свойства*, что определяется структурой и составом клеточной стенки. Выделяют простые и сложные (дифференцирующие) методы окраски.

Окрашивание препаратов каким-либо одним красителем относится к *простым методам*. Чаще всего при этом применяют фуксин, генциановый фиолетовый, метиленовый синий. В случае использования негативных красителей среда, в которой находятся микроорганизмы, становится полупрозрачной, поэтому клетки, в которые краситель не проникает, выглядят как светлые частицы на равномерно окрашенном фоне. Окрашивание проводят в течение 1 – 3 мин. В результате некоторые микроорганизмы, например, спирохеты, плохо выявляемые с помощью позитивных красителей, легко обнаруживаются при окрашивании негативными красителями. Споры при окрашивании негативными красителями имеют вид преломляющих свет включенияй в вегетативной клетке.

При *сложных методах* окрашивания на один препарат воздействуют несколькими красящими веществами, одно из которых – *основное*, а другие – *дополнительные*. Кроме красителей используются различные обесцвечивающие вещества: спирты, кислоты, ацетон и др. С помощью сложных методов окрашивания выявляют цитологические особенности клеток микроорганизмов (клеточные структуры, запасные вещества, включения и т. д.).

Окраска по методу Грама – один из наиболее универсальных и часто используемых сложных методов окраски. Окраска положена в основу дифференциации бактерий, является важнейшим таксономическим признаком и отражает способность клеток воспринимать и удерживать внутри красящий комплекс генцианового фиолетового и йода либо терять его после обработки спиртом. Соответственно по результатам окраски выделяют грамположительные (*Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Sarcina* и др.) и грамотрицательные (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Neisseria*, *Rickettsia* и др.) роды и виды бактерий.

Техника окраски:

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги и на него наносят карболовый раствор генцианового фиолетового. Окрашивание проводят на протяжении 1 – 2 мин.

2. Бумажку снимают, краситель сливают и, не промывая препарат водой, обрабатывают его на протяжении 1 – 2 мин раствором Люголя до почернения.

3. Сливают раствор Люголя, окрашенный мазок обесцвечивают 96 % этиловым спиртом (препарат несколько раз помещают в стакан со спиртом до прекращения отхождения фиолетовых струек). Обесцвечивание проводят не более 30 с.

4. Препарат промывают водой.

5. Мазок дополнительно окрашивают на протяжении 1 – 2 мин водным раствором фуксина.

6. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый.

Определить грампринадлежность бактерий можно и без окрашивания клеток с использованием теста Грегерсена. Для этого можно воспользоваться качественной реакцией с 3 % раствором KOH. На предметное стекло наносят каплю реактива, в которую стерильной бактериологической петлей вносят исследуемую чистую культуру бактерий. Тщательно перемешивают в течение 30 с и определяют вязкость полученной суспензии. При образовании вязких слизистых тянувшихся нитей исследуемые клетки относят к грамотрицательным. Если вязкость суспензии не изменилась, то клетки являются грамположительными.

Выявление эндоспор бактерий

Бактериальные споры могут быть выявлены как простыми, так и сложными методами окраски. Например, при использовании 7 % водного раствора нигрозина (простой метод) клетки становятся зелеными, споры – бесцветными, а фон – черным. Наиболее часто применяемым сложным методом окрашивания эндоспор является *метод Шефера – Фултона*.

Техника окраски:

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги, на который наносят 0,5 %-ный водный раствор малахитового зеленого и 2 – 3 раза нагревают в пламени спиртовки до появления паров.

2. Фильтровальную бумагу снимают, препарат промывают водой и в течение 30 с докрашивают 0,5 %-ным раствором сафранина (или фуксина).

3. Препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки – в красный.

2.6. Принципы культивирования (выращивания) микроорганизмов. Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов

Культивирование (выращивание) микроорганизмов определяется не только составом питательной среды, но и физико-химическими факторами (температура, кислотность, аэрация, свет и т. д.). При этом количественные показатели параметров неодинаковы и зависят от особенностей метаболизма каждой группы микроорганизмов, целевой направленности и аппаратурного оснащения. Можно выделить методы культивирования на твердых, полужидких и жидкких питательных средах, а также в аэробных, анаэробных или микроаэрофильных условиях. Характеристики этих процессов устанавливают путем измерения таких показателей, как число клеток или их биомасса.

Техника посева микроорганизмов в жидкие питательные среды

Посев микроорганизмов осуществляется бактериологической петлей. Отбор клеток микроорганизмов производят следующим образом. В правую руку берут петлю и стерилизуют ее нагреванием в пламени спиртовки. Пробирку с культурой берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с выросшими колониями микроорганизмов была хорошо видна. Не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки, прижимая пробку к ладони, вынимают ее из пробирки и держат так во время всех дальнейших манипуляций. Края открытой пробирки обжигают в пламени спиртовки и вводят в пробирку стерильную петлю. Петлю охлаждают прикосновением к внутренней поверхности стекла пробирки или на свободной от микроорганизмов части среды и после этого захватывают небольшое количество микробной биомассы. Осторожно вынимают петлю из пробирки, горлышко пробирки вновь обжигают, пробку проводят над пламенем спиртовки и закрывают ею пробирку. Пробирку с культурой помещают в штатив, а извлеченную культуру переносят в жидкую питательную среду, находящуюся в другой пробирке или колбе. Оставшиеся на петле после пересева клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки. При культивировании микроорганизмов в жидкой питательной среде с последующим описанием характера их роста отмечают степень помутнения (слабая, умеренная или сильная), особенности образующейся пленки (тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая), формирующийся осадок (плотный, рыхлый, слизистый, хлопьевидный). Можно упомянуть появление пигментации или выделение газообразных продуктов.

Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду

1. *Посев на скошенный агар* в пробирках проводят следующим образом. Клетки микроорганизмов отбирают бактериологической петлей (как описано выше) и вводят ее в пробирку со скошенной агаризованной средой почти до дна.

Слегка прикасаясь петлей к поверхности среды, проводят от дна вверх зигзагообразную или прямую черту-штрих.

При описании роста по штриху отмечают следующие особенности: однородный, скучный, умеренный или обильный, сплошной, диффузный, перистый, ризоидный и т. д. Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность, консистенцию.

2. *Посев на поверхность агаризованной среды в чашках Петри* можно производить с помощью бактериологической петли, микробиологического шпателя или методом реплик. При посеве петлей отбирают клетки микроорганизмов с агаризованной или жидкой среды, приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхности среды проводят штрихи, после чего чашку закрывают и помещают в термостат крышкой вниз.

При посеве микроорганизмов из жидкой среды с использованием микробиологического шпателя поступают следующим образом. На поверхность среды в чашке с помощью стерильной пипетки наносят заданный объем жидкой культуры. Одновременно, вращая чашку и делая круговые движения стерильным шпателем, сусpenзию распределяют по всей поверхности среды.

При пересеве микроорганизмов методом реплик используют стерильные кусочки бархата с коротким, жестким и густым ворсом. Бархат помещают на специальный столик для реплик, диаметр которого меньше диаметра чашки Петри, и закрепляют металлическим кольцом. Чашки Петри с питательной средой и сформировавшимися колониями микроорганизмов накладывают поверхностью среды на бархат и слегка прижимают. На чашке делают отметку, соответствующую той, которая находится на столике для реплик. Чашку осторожно снимают, а бархат с отпечатками колоний после этого может служить исходным штампом для засева других чашек со средой. Возможно снятие отпечатков на серию чашек, содержащих различные среды. В качестве контроля в последнюю очередь производится отпечаток на чашку со средой, на которой находились исходные микроорганизмы.

3. При глубинном посеве микроорганизмов в агаризованную питательную среду ее предварительно расплавляют, разливают по 15 – 20 мл в пробирки и стерилизуют. После охлаждения расплавленной среды до 48 – 50 °C в каждую пробирку стерильной пипеткой вносят по 0,1 – 1,0 мл жидкой культуры микроорганизмов. При необходимости готовят серию разведений культуры микроорганизмов с таким расчетом, чтобы при высеве получить изолированные колонии. Содержимое пробирки перемешивают путем ее вращения между ладонями и быстро выливают в чашку Петри. После застывания среды чашки помещают в термостат.

4. В особых случаях используют *выращивание бактерий в полужидких средах*, которые содержат уплотняющее вещество в низкой концентрации. Такие среды пригодны для культивирования микроаэрофильных бактерий, изучения подвижности клеток и хемотаксиса. При использовании 0,1 – 0,4 % агара гелеобразующие вещества расслаивают среду таким образом, что конвекционные по-

токи не способны смешивать богатые кислородом верхние слои среды с нижними. Единственным путем для проникновения кислорода в более глубокие слои в данном случае является диффузия, что создает градиент концентрации кислорода. При инокуляции среды в пробирке уколом петлей микроаэрофилы начинают расти несколько ниже поверхности, где концентрация кислорода для них наиболее благоприятна. Анаэробы растут в нижней части полужидкой среды.

Техника культивирования анаэробных микроорганизмов

Граница между **аэробными и анаэробными микроорганизмами** относительно условна; при этом строго облигатными анаэробами обычно считают бактерии, рост которых невозможен в присутствии растворенного кислорода. На практике к анаэробным относят те бактерии, которые не растут на поверхности твердой или полужидкой среды на воздухе при атмосферном давлении.

Аэротолерантные бактерии хорошо растут на поверхности агара в чашках Петри при низком парциальном давлении кислорода. Степень анаэробиоза изменяется по окислительно-восстановительному (редокс, Eh) потенциальну среды. При увеличении Eh выше 100 мВ, обусловленном присутствием растворенного кислорода, подавляется рост всех анаэробных бактерий. Для удаления кислорода и создания соответствующих условий среды можно воспользоваться следующими методами.

1. *Культивирование в микроанаэростате* – аппарате для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью. Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав: азот 90 %, CO₂ и H₂ по 5 %.

2. *Использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород*. В качестве поглотителей молекулярного кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия (Na₂S₂O₄), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реагенты. Поглотители помещают на дно химического эксикатора с притертой крышкой; туда же вносят анаэробные бактерии, засеянные в колбу, пробирку или чашку Петри. При таком способе создания анаэробных условий необходимо учитывать поглощающую способность химических веществ и объем замкнутого пространства, в котором выращиваются бактерии.

3. *Использование восстанавливающих агентов*, которые добавляют в большинство сред для снижения их окислительно-восстановительного потенциала: тиогликолата натрия, цистеина, дитиотреитола, аскорбиновой кислоты. Удаления кислорода из среды можно добиться также в результате быстрого нагревания и кипячения среды с последующим быстрым охлаждением. Если в такую среду засеять анаэробные микроорганизмы и наслить смесь масла и парафина (1:1), то будет наблюдаться рост нестрогих анаэробов. Возможно использование полужидких (0,05 – 0,1 % агара) сред для уменьшения конвенционных потоков.

4. *Выращивание совместно с аэробными или факультативно-анаэробными бактериями*. В жидкой среде с восстанавливающими агентами перед инокуляцией анаэроба проводят культивирование, например *E.coli*, что приводит к удалению из среды остаточного кислорода. Перед инокуляцией анаэробов

клетки *E.coli* убивают нагреванием. Существует и другая модификация метода. На одной половине чашки Петри засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой – анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется только после полного использования кислорода аэробом. Содержание кислорода можно контролировать с помощью некоторых химических веществ, например, раствора резазурина, щелочного раствора глюкозы с метиленовым синим.

2.7. Выделение чистых культур микроорганизмов. Накопительные культуры микроорганизмов; методы их получения. Чистые культуры микроорганизмов, методы их получения

В условиях естественного обитания чистые культуры микроорганизмов встречаются довольно редко. Тем не менее основная часть современных представлений о свойствах бактерий, а также их взаимоотношениях получена при изучении чистых культур. Поэтому необходимой задачей является выделение чистых культур различных видов бактерий, существующих в естественных условиях, и разработка адекватных методических приемов для этого. Для выделения чистых культур большинства бактерий обычно затрачивается не более 2 – 3 суток, однако для некоторых (например, бактерий туберкулеза) этот процесс может затягиваться до 4 – 6 недель.

Чистой (аксенической) культурой называют популяцию бактерий одного вида, представляющую потомство одной клетки. Выделение чистой культуры предполагает проведение трех этапов: 1) получение накопительной культуры; 2) собственно выделение чистой культуры; 3) определение чистоты выделенной культуры.

Получение накопительной культуры

Выделение культур микроорганизмов будет успешным, если обеспечить содержание их клеток в популяции в высокой концентрации. Накопление представляет собой основной этап процесса выделения, который позволяет получить чистые культуры. Методы накопления имеют цель добиться увеличения относительного количества клеток определенной физиологической группы или данного вида микроорганизмов за счет создания благоприятных условий для их роста и выживания по сравнению с другими. Получение накопительной культуры предполагает создание элективных условий, что обеспечивается подбором соответствующих сред или использованием влияния различных факторов окружающей среды.

О развитии накопительной культуры судят по появлению характерных признаков роста культуры: помутнению среды, образованию пленки, осадка, выделению газов, развитию пигментации. Помимо этого можно провести микроскопирование культуры и выявить наличие желаемых форм.

Накопление дает возможность оценить воздействие различных факторов окружающей среды на смешанную популяцию микроорганизмов, благодаря

чему может происходить отбор клеток, способных утилизировать необычные субстраты или хорошо расти в необычных условиях.

К **физическими методам**, которые могут быть использованы при получении накопительной культуры, следует отнести регуляцию роста температурой, тепловую и ультразвуковую обработку, ультрафиолетовое облучение и др. Можно использовать также другие особенности клеток микроорганизма, например размеры, подвижность, что позволяет выделить данный микроорганизм среди других членов популяции. В качестве примеров использования характерных признаков бактерий приведем следующие.

Получение накопительной культуры бактерий, обладающих скользящим типом движения. Пробы предварительно разведенного исследуемого биологического материала засевают петлей в конденсационную жидкость скошенной агаризованной питательной среды в пробирках. Посевы инкубируют при оптимальной температуре. Клетки, характеризующиеся скользящим типом движения, распределяются по поверхности среды и разрастаются далеко за зону нанесения посевного материала.

Использование освещения для получения культур цианобактерий, которые легко выделяются из пресной воды и морских осадков. Для получения накопительных культур образцы инкубируют при 25 °С и постоянном освещении от 500 до 3000 лк. Через 4 – 7 суток наблюдается увеличение мутности культуры, имеющей часто розовую, коричневую, желтую окраску.

Инкубирование при низкой температуре для получения культур психрофильных бактерий. На первом этапе проводят инкубирование образцов природного материала при низких температурах (0 – 5 °С), поскольку в этих условиях задерживается рост многих бактерий. Инкубирование при температуре ниже –5 °С осуществляют в течение 14 – 24 суток.

При использовании **химических методов** применяют химические вещества, которые убивают или подавляют рост части популяции, не влияя на выделяемый микроорганизм. Кроме того, можно использовать вещества, которые служат источниками питания преимущественно для отдельных микроорганизмов в смешанной популяции. Примерами применения таких методических подходов для выделения микроорганизмов являются следующие.

Инкубирование в кислой среде для выделения культур лактобацилл. Для выделения бактерий из сыров высев производится на среду, которая за счет ацетатной буферной системы имеет pH 5,3. В этом случае *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* способны образовывать колонии, а другие молочнокислые бактерии – нет.

Ингибирование роста пенициллином для получения культур микоплазм. Поскольку микоплазмы лишены клеточной стенки, то они устойчивы к высоким концентрациям пенициллина, который подавляет рост многих бактерий, имеющих клеточную стенку. Антибиотик, добавленный к питательной среде в концентрации 100 – 200 Е/мл, позволяет избавиться от посторонней чувствительной к нему микробиоты. *Разбавленная среда для получения культур Sphaerotilus.* Бактерии данного рода, образующие чехлы, встречаются в загрязненных сточных

водах, открытых водоемах, где формируют слизистые «пряди», прикрепленные к погруженным в воду предметам. Процедура получения накопительных культур основана на их способности к росту при низком содержании питательных веществ. В питательную среду, содержащую источник углерода в концентрации до 100 мг/л, добавляют пробы воды. В течение 2 – 5 суток инкубирования проводят микроскопический контроль за образованием нитей. Для получения чистой культуры проводят рассев пленки на твердую среду.

Использование целлюлозы как субстрата для цитофаг. Для получения накопительных культур цитофаг, разлагающих целлюлозу, на поверхность основного минерального агара помещают кусочки фильтровальной бумаги. На бумагу кладут частицы почвы или растительного материала и инкубируют чашки при комнатной температуре. Следят за образованием вокруг частиц желтой, оранжевой или розовой окраски, а также за процессом лизиса бумаги.

Бактериальные клетки как субстрат для роста миксобактерий. Некоторые виды миксобактерий способны с помощью литических ферментов лизировать клетки других бактерий и использовать высвобождающиеся при этом вещества для своего роста. Бактериальные клетки, используемые в качестве субстрата (например, представители семейства *Enterobacteriaceae*), в виде густой суспензии наносят мазком на поверхность водно-агаровой среды. На один конец мазка помещают две-три частицы почвы или кусочки растительного материала. Через 2 – 5 суток исследуют чашки и анализируют растворение бактериального мазка вокруг добавленных частиц. При обнаружении по его краям желтых, оранжевых или розовых плодовых тел их переносят на питательную среду.

Биологические методы включают использование специфических хозяев выделяемого микроорганизма, а также преимуществ некоторых свойств патогенных микроорганизмов. В качестве примеров можно рассмотреть следующие.

Получение накопительной культуры патогенных для животных микроорганизмов. Патогенные для животных бактерии можно выделить, заражая восприимчивое животное-хозяина смешанной культурой исследуемого материала, в котором предполагается их присутствие. В инфицированном организме патогенные формы часто преобладают и обнаруживаются в крови и тканях в виде чистой культуры. При этом в результате действия защитных механизмов животного рост непатогенных сопутствующих микроорганизмов ингибируется и они гибнут. Например, чистую культуру пневмококков можно получить через 4 – 6 ч после внутрибрюшинного введения мышам смеси эмульгированной мокроты, содержащей *Streptococcus pneumoniae* и другие бактерии. Пробы перitoneальной жидкости отбирают из брюшинной полости животного с помощью стерильной пипетки или шприца.

Бактериальный паразитизм бделловибрионов. Способность бделловибрионов прикрепляться к различным грамотрицательным бактериям, проникать через их клеточную стенку и размножаться в перiplазматическом пространстве с последующим лизисом клеток используется следующим образом. Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования растворенной в воде почвы,

пропускают через мембранные фильтры с диаметром пор до 0,45 мкм. Полученный фильтрат смешивают с суспензией клеток-хозяев (представители семейств *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*). В составе полужидкой питательной среды смесь насыпают на поверхность агаризованной среды в чашках Петри. После инкубирования в течение 18 – 24 ч проверяют появление зон лизиса. Области лизиса, образованные бделловибriosами (в отличие от бактериофагов), появляются через 2 – 3 суток. Образующиеся зоны лизиса вырезают из агара и повторно насыпают на газон чувствительной культуры.

Симбиоз растений с бактериями рода Rhizobium. Клубеньки, появляющиеся на корнях бобовых растений, представляют собой природную накопительную культуру симбиотических азотфикссирующих бактерий.

Корни бобовых растений, содержащие клубеньки, промывают и отделяют часть корня с клубеньками. После поверхностной стерилизации (с использованием суплемы, этанола) корень помещают в стерильную воду и стерильным пинцетом раздавливают в чашке Петри, одну-две петли такой суспензии переносят в следующую чашку и т. д. К каждому разведению добавляют расплавленный и остуженный агар с маннитом. После его застывания чашки инкубируют при оптимальной температуре.

Во многих случаях для получения накопительной культуры определенных бактерий используют сочетание физических, химических и биологических методов.

Собственно выделение чистой культуры

Для выделения бактерий в виде чистых культур известно сравнительно мало методов. Чаще всего цель достигается путем изолирования отдельных клеток на твердой питательной среде с использованием метода посева штрихом или разлива по чашкам небольшого количества жидкой культуры в расплавленной и охлажденной питательной среде (метод предельных разведений). Однако получение отдельной колонии не всегда гарантирует чистоту культуры, поскольку колонии могут вырасти не только из отдельных клеток, но и из их скоплений. Если микроорганизмы образуют слизь, то часто к ней прикрепляются посторонние формы. Для очистки предпочтительно использовать неселективную среду, поскольку на ней лучше растут контаминирующие микроорганизмы и их легче обнаружить.

Получение изолированных колоний на твердой питательной среде достигается либо путем рассева взвеси микроорганизмов шпателем (метод Коха), либо с помощью бактериологической петли (метод истощающего штриха). В результате механического разобщения клеток микроорганизмов каждая из них может дать начало изолированной колонии одного вида.

Рассев шпателем (метод Коха) производят в следующей последовательности:

- на поверхность питательной среды в чашке № 1 наносят стерильной пипеткой каплю накопительной культуры и распределяют ее стерильным шпателем;

- чашку быстро закрывают и переносят шпатель в чашку № 2, не стерилизуя его. Имитируют распределение культуры по всей поверхности среды, прикасаясь к ее поверхности той же стороной шпателя, которой ранее распределяли пробу;
- точно те же действия проводят и в чашке № 3, после чего шпатель стерилизуют;
- засеянные чашки помещают в термостат крышками вниз, чтобы образующаяся конденсационная жидкость не мешала формированию изолированных колоний, и инкубируют при оптимальной температуре.

Через определенное время (от 1 до 7 суток) чашки достают из термостата и изучают рост микроорганизмов. Обычно в чашке № 1 наблюдается сплошной рост бактерий, в последующих чашках формируются изолированные колонии. Такие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенного агара или в жидкую среду для последующего анализа.

Рассев петлей (метод истощающего штриха) предполагает высев бактериологической петлей из жидкой накопительной культуры на поверхность агаризованной среды в чашках Петри (рисунок 21).

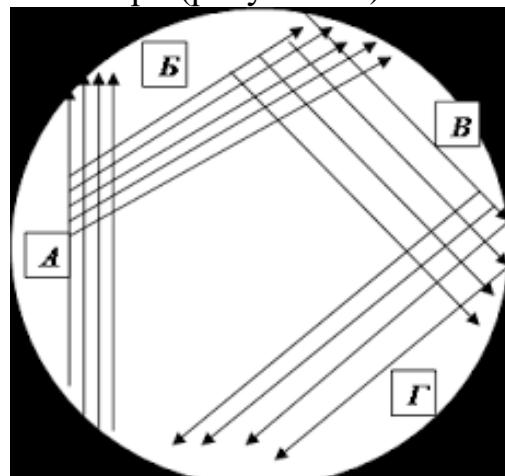


Рисунок 21. – Схема рассева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

На первом этапе петлей с культурой наносят ряд параллельных штрихов на агаризованную среду (рисунок 23, А). Петлю стерилизуют, остужают о незасеянную часть агаризованной среды и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым штрихам (рисунок 23, Б). Затем петлю вновь стерилизуют, остужают и штрихи наносят в направлении в (рисунок 23, В), а после очередной стерилизации – в направлении Г (рисунок 23, Г).

Чашки помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах А и Б вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах В и Г формируются изолированные колонии.

Последовательные разведения в твердой среде – один из простых способов посева, который заключается в том, что после инокуляции пробы в пробирку со

стерильным расплавленным и охлажденным до 45 °С агаром среду перемешивают, выливают в чашку Петри и дают смеси застыть.

Для получения изолированных колоний готовят ряд последовательных десятикратных разведений накопительной культуры и из каждого разведения по 0,5 – 1,0 мл проб вносят сразу в чашку, добавляют 15 – 20 мл расплавленной агаризованной среды и перемешивают, покачивая ее. Иногда отдельные колонии оказываются погруженными в агар и извлечь их можно только механически. Следует учитывать и то, что бактерии некоторое время находятся в среде при температуре расплавленного агара.

Использование данного метода целесообразно для изолирования аэробных, микроаэрофильных или факультативно-анаэробных видов. Для получения чистой культуры бактерий иногда бывает достаточно одного посева на плотную среду, однако чаще эту процедуру проводят 2 – 3 раза, а в качестве посевного материала используют культуру, полученную из отдельной колонии.

Определение чистоты выделенной культуры

Выросшие изолированные колонии отсевают бактериологической петлей на поверхность скошенной агаризованной среды в пробирке.

Поскольку изолированные колонии иногда могут формироваться не только из отдельных клеток, обязательным этапом выделения чистой культуры должна быть проверка их однородности. Это осуществляется несколькими способами: визуальным и микроскопическим контролем, а также высеивом на соответствующие питательные среды. При **визуальном контроле** исследуют рост культуры по штриху на поверхности скошенной среды; в том случае, если рост неоднороден, считают, что культура загрязнена и требуется ее дополнительная расчистка.

Чистоту выделенных культур микроорганизмов обязательно нужно подвергать **микроскопическому контролю**. Для этого готовят препарат фиксированных окрашенных клеток, который микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки чистых культур микроорганизмов, как правило, однородны по размеру и окраске по Граму. Однако следует помнить, что в чистых культурах многих бактерий могут появляться различающиеся по морфологии клетки, цисты, споры. Наконец, многие микроорганизмы проявляют свойство грамвариабельности, т. е. после прекращения активного роста могут терять способность окрашиваться по Граму.

Чистоту культуры клеток проверяют также путем повторного **высева на соответствующие питательные среды**. Критерием чистоты в этом случае является однородность формирующихся колоний. Дополнительно в чистоте культуры можно убедиться и при *рассеве клеток на селективные среды*, обеспечивающие избирательный рост тех или иных микроорганизмов.

Скопление клеток одного вида, выросшее из одной клетки, называют **колонией**. На некоторые особенности и характеристики колоний могут влиять состав среды выращивания, возраст культуры, условия культивирования. При описании колоний, которые образуются на поверхности плотной питательной среды (рисунки 22 – 25), учитывают следующие их признаки:

- диаметр (размер) в миллиметрах;
- цвет или пигментацию, выделение пигмента в субстрат;
- форму (точечная, округлая, неправильная, ризоидная и т. д.);
- высоту, профиль (плоский, высокий, выпуклый, кратерообразный и т. д.);
- вид края (ровный, волнистый, лопастной, зубчатый, бахромчатый) и т. д. Для рассмотрения краев используют микроскоп с малым увеличением;
- поверхность (гладкая, шероховатая, неровная, гранулированная, исчерченная и т. д.);
- блеск и прозрачность колонии (прозрачная, блестящая, полупрозрачная, матовая, тусклая, непрозрачная и т. д.);
- консистенцию (определяют при прикосновении петлей: она может быть мукоидной (слизистой), маслянистой, вязкой, тянущейся, сухой и т. д.);
- структуру (крупно- или мелкозернистая, однородная, волокнистая и т. д.).

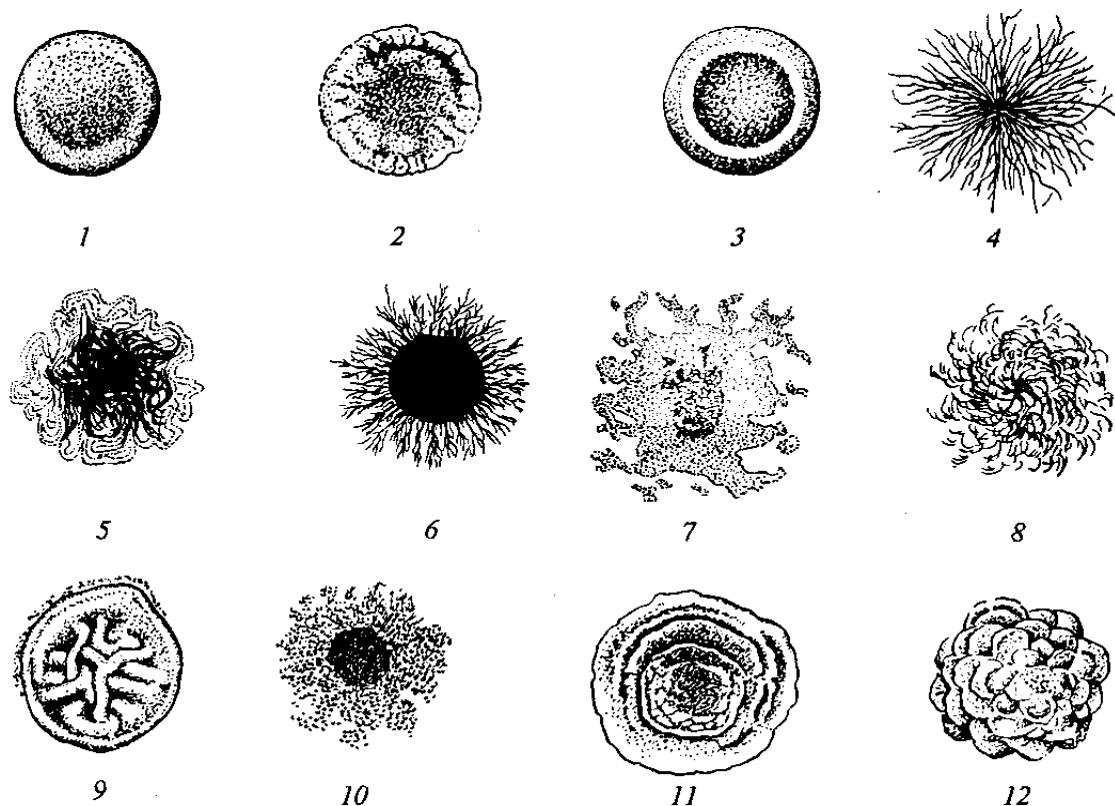


Рисунок 22. – Формы бактериальных колоний: 1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амебовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная

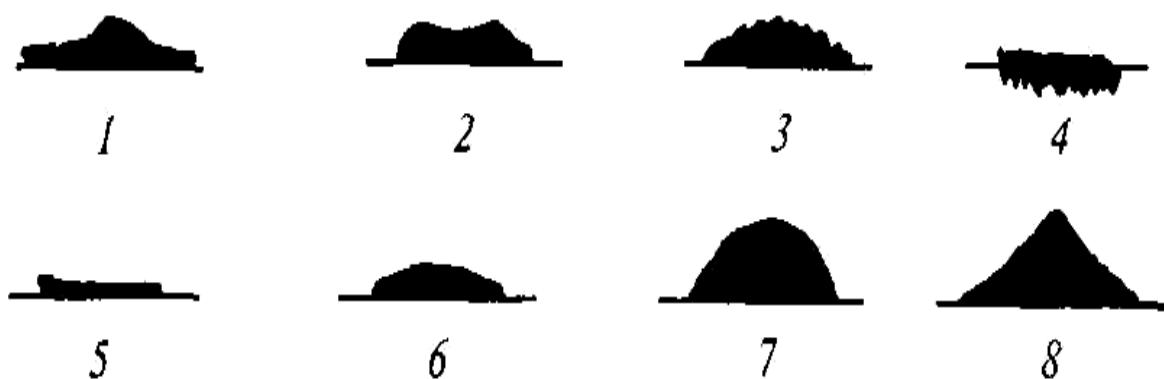


Рисунок 23. – Профиль бактериальных колоний: 1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастаящий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный

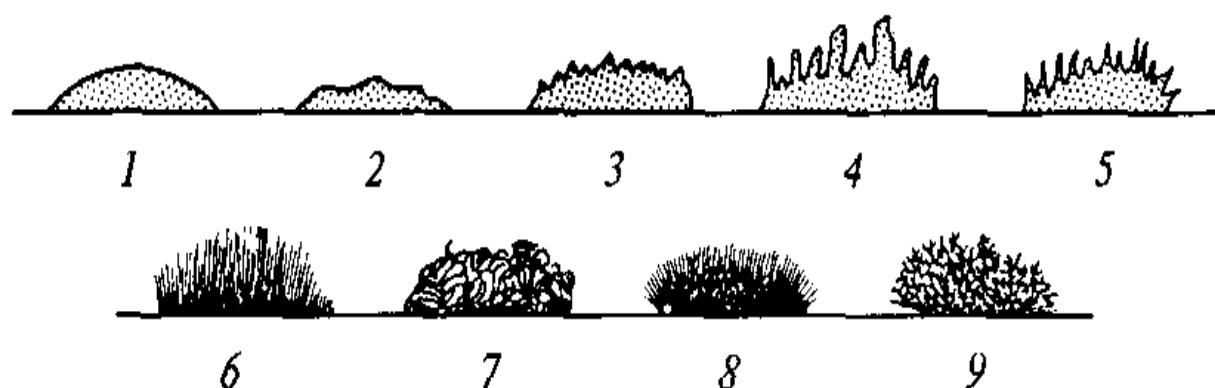


Рисунок 24. – Характер края бактериальных колоний: 1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной; 5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

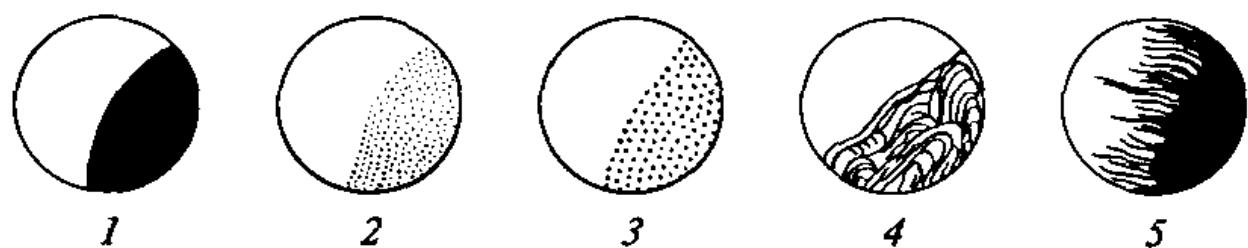


Рисунок 25. – Структура бактериальных колоний: 1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая; 5 – волокнистая

Выделяют также колонии *глубинные*, формирующиеся в толще агаризованной среды, и *донные*, образование которых наблюдается на дне чашек Петри под слоем агаризованной среды в виде тонких стелющихся пленок.

3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

3.1. Перечень рекомендуемых средств диагностики

Рекомендуемые средства диагностики раскрывают основные критерии оценивания деятельности студентов и относятся с формами контроля знаний, зафиксированными в учебно-методической карте.

Объектом диагностики компетенций студентов являются знания, умения, полученные ими в результате изучения учебной дисциплины. Выявление учебных достижений студентов осуществляется с помощью мероприятий текущего контроля и промежуточной аттестации.

Для диагностики компетенций используются следующие средства текущего контроля:

проект – выполнение проверочного задания в форме проекта по заданной теме;

тест – выполнение заданий в тестовой форме;

реферат – защита подготовленного студентом реферата;

контрольная работа – написание контрольной работы;

устный опрос – устный опрос на лабораторных занятиях.

Формой промежуточной аттестации по дисциплине «Введение в специальность» учебным планом предусмотрен **зачет**.

3.2. Примерный перечень заданий для управляемой самостоятельной работы студентов

Тема 1. Структурная организация клеток микроорганизмов. Принципы культивирования микроорганизмов

Задание: изучить структурную организацию клеток микроорганизмов. Принципы культивирования микроорганизмов. Классификация и приготовление питательных сред. Способы стерилизации.

Форма контроля - компьютерное тестирование (2 ч).

Примерный перечень вопросов:

1. Общая характеристика микроорганизмов. Характеристика про- и эукариотических микроорганизмов.
2. Структурная организация бактериальной клетки.
3. Морфология прокариот.
4. Действие факторов внешней среды.
5. Оборудование, используемое при работе с микроорганизмами.
6. Питательные среды в микробиологии (классификация, принцип приготовления).
7. Методы стерилизации, используемые в микробиологической практике.
8. Микроскопические методы исследования в микробиологии.
9. Устройство светового микроскопа.

10. Типы микроскопии.
11. Приготовление препаратов для микроскопирования.
12. Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях.
13. Культивирование аэробных микроорганизмов.
14. Культивирование анаэробных микроорганизмов.
15. Выделение чистых культур микроорганизмов.
16. Накопительные культуры микроорганизмов; методы их получения.
17. Чистые культуры микроорганизмов, методы их получения.
18. Проверка чистоты выделенных культур микроорганизмов.

Тема 2. Значение микроорганизмов в природе и жизнедеятельности человека

Задание, изучить и проанализировать разнообразие направлений микробиологических исследований в Республике Беларусь.

Форма контроля – защита проекта по предложенной теме. (2 ч).

Примерный перечень вопросов:

1. Основные направления микробиологических исследований в Республике Беларусь.
2. Достижения белорусских микробиологов.
3. Основные направления научных исследований микробиоты Антарктики.
4. Практическое применение микробиоты Антарктики.
5. Биоразнообразие микроорганизмов.
6. Использование микроорганизмов в пищевых производствах.
7. Использование микроорганизмов в производстве органических веществ и препаратов.
8. Использование микроорганизмов в непищевых производствах.
9. Положение грибов в системе живого мира.
10. Значение грибов в природе и жизни человека.
11. Промышленное использование грибов.
12. Грибы - продуценты биологически активных веществ.
13. Значение микробной ремедиации экосистем.
14. Основные факторы, влияющие на эффективность биоремедиации.
15. Этапы биоремедиации загрязненных природных и производственных сред.
16. Биопрепараты, используемые для очистки природных и производственных сред.
17. Современные фиторемедиационные технологии.
18. Молекулярно-биотехнологические аспекты использования микроорганизмов.
19. Значение коллекционных штаммов микроорганизмов как объектов биотехнологии.
20. Роль коллекции микроорганизмов в изучении и сохранении микробного биоразнообразия.

21. Создание микробных препаратов.
22. Современное состояние проблемы микробной деградации ксенобиотиков.
23. Микробная трансформация веществ в почве.
24. Этапы создания и форма выпуска микробных удобрений.
25. Бактерии как антагонисты возбудителей болезней растений и животных и объекты биотехнологии.
26. Критерии отбора штаммов-антагонистов.
27. Распространение и роль микроорганизмов в природе.
28. Отрицательная роль микроорганизмов.

3.3. Примерная тематика реферативных работ

1. Основные этапы становления микробиологии как науки.
2. Важнейшие ученые, внесшие существенный вклад в развитие микробиологии.
3. Вклад Л. Пастера и Р. Коха в развитие микробиологии.
4. Вклад русских ученых в развитие микробиологии.
5. Современная микробиология: основные направления и достижения.
6. Достижения белорусских микробиологов.
7. Характеристика основных групп микроорганизмов с указанием их систематического положения и особенностей процессов жизнедеятельности.
8. Характеристика основных групп фототрофных микроорганизмов: система, особенности процессов жизнедеятельности, распространение и практическое значение.
9. Характеристика основных групп гетеротрофных микроорганизмов: система, особенности процессов жизнедеятельности, распространение и практическое значение.
10. Характеристика основных групп грибоподобных микроорганизмов: система, особенности процессов жизнедеятельности, распространение и практическое значение.
11. Характеристика основных групп грибов: система, особенности процессов жизнедеятельности, распространение и практическое значение.
12. Классические генетические эксперименты с использованием бактерий и микроскопических грибов.
13. Исследования генома микроорганизмов. Основные достижения генной инженерии.
14. Биосинтетические возможности микроорганизмов и их практическое использование.
15. Микробно-растительные ассоциации для фиторемедиации деградированных сельскохозяйственных угодий.
16. Биологический метод защиты растений от болезней бактериальной и грибной этиологии.

17. Микробная деградация ксенобиотиков в техногенно нарушенных природных и производственных средах.
18. Создание микробных биопрепаратов для сельского хозяйства.
19. Использование микроорганизмов для очистки окружающей среды от загрязнений различного происхождения.
20. Основные направления микробиологических исследований.
21. Принципы культивирования микроорганизмов.
22. Питательные среды. Приготовление. Классификация.
23. Способы стерилизации питательных сред.
24. Исследование микробиоты Антарктики.
25. Практическое применение микробиоты Антарктики.
26. Значение грибов в природе и жизни человека.
27. Промышленное использование грибов.
28. Бактерии как антагонисты возбудителей болезней растений и животных.

3.4. Примерный перечень вопросов к зачету

1. Микробиология как наука. Основные разделы современной микробиологии.
2. Основные этапы развития микробиологии.
3. Ученые, внесшие существенный вклад в становление и развитие микробиологии как науки.
4. Вклад Л. Пастера и Р. Коха в развитие микробиологии.
5. Основные направления микробиологических исследований в Республике Беларусь.
6. Основные направления научных исследований микробиоты Антарктики.
7. Практическое применение микробиоты Антарктики.
8. Биоразнообразие микроорганизмов.
9. Общая характеристика микроорганизмов. Характеристика про- и эукариотических микроорганизмов.
10. Структурная организация бактериальной клетки.
11. Морфология прокариот.
12. Методы стерилизации, используемые в микробиологической практике.
13. Оборудование, используемое при работе с микроорганизмами.
14. Питательные среды в микробиологии (классификация, принцип приготовления).
15. Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях.
16. Культивирование аэробных микроорганизмов.
17. Культивирование анаэробных микроорганизмов.
18. Распространение и роль микроорганизмов в природе.
19. Использование микроорганизмов в пищевых производствах.
20. Использование микроорганизмов в производстве органических веществ и препаратов.
21. Использование микроорганизмов в непищевых производствах.

22. Отрицательная роль микроорганизмов.
23. Положение грибов в системе живого мира.
24. Значение грибов в природе и жизни человека.
25. Промышленное использование грибов.
26. Грибы - продуценты биологически активных веществ.
27. Значение микробной ремедиации экосистем.
28. Основные факторы, влияющие на эффективность биоремедиации.
29. Этапы биоремедиации загрязненных природных и производственных сред. Биопрепараты, используемые для очистки природных и производственных сред.
30. Современные фиторемедиационные технологии.
31. Молекулярно-биотехнологические аспекты использования микроорганизмов.
32. Значение коллекционных штаммов микроорганизмов как объектов биотехнологии.
33. Создание микробных препаратов.
34. Современное состояние проблемы микробной деградации ксенобиотиков.
35. Микробная трансформация веществ в почве.
36. Этапы создания и форма выпуска микробных удобрений.
37. Роль коллекции микроорганизмов в изучении и сохранении микробного биоразнообразия.
38. Бактерии как антагонисты возбудителей болезней растений и животных и объекты биотехнологии.
39. Критерии отбора штаммов-антагонистов.
40. Роль коллекции микроорганизмов в изучении и сохранении микробного биоразнообразия. деятельности.

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

4.1. Рекомендуемая литература

1. Ильяшенко, Н.Г. Микробиология / Н.Г. Ильяшенко, Л.Н. Шабурова, М.В. Гернет. – Москва: ИНФРА-М, 2022.
2. Лысак, В.В. Микробиология: учебник / В.В. Лысак. – Минск: Адкуация и выхаванне, 2025.
3. Лысак, В.В. Микробиология: практикум / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2015.
4. Нетрусов, А.И. Микробиология: теория и практика. В 2 ч. / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Издательство Юрайт, 2023.

Перечень дополнительной литературы

1. Белясова, Н.А. Микробиология / Н.А. Белясова. – Минск: Выш. шк., 2012.
2. Брюханов, А.Л. Молекулярная микробиология / А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак, А.И. Нетрусов. – М.: Издательство Московского университета, 2012.
3. Емцев, В.Т. Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005.
4. Лысак, В.В. Микробиология / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2008.
5. Лысак, В.В. Физиология микроорганизмов / В.В. Лысак. – Минск: Изд. центр БГУ, 2014.
6. Лысак, В.В. Систематика микроорганизмов / В.В. Лысак, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2014.
7. Нетрусов, А.И. Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Издательский центр «Академия», 2012.
8. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.
9. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. Т. 1 – 2.
10. Современная микробиология / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. Т. 1 – 2.
11. Шлегель Г. История микробиологии / Г. Шлегель. – М.: Едиториал УРСС, 2002.
12. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – New York, Heidelberg, Berlin: Springer - Verlag, V.1 - 2001, V.2 - 2005, V.3 - 2009, V.4 - 2010, V.5 - 2011.

4.2. Электронные ресурсы

1. Учебная программа учреждения высшего образования по учебной дисциплине «Введение в специальность» для специальности: 6-05-0511-03 «Микробиология» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/309840> – Дата доступа: 09.12.2025.

2. *Лысак, В.В.* Микробиология: электронный учебно-методический комплекс для специальностей: 6-05-0511-06 «Биотехнология», 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика» / В. В. Лысак, В. Е. Мямин, С. Л. Василенко – Минск: БГУ, 2024. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/308813> – Дата доступа: 09.12.2025.

3. *Лысак, В.В.* Систематика микроорганизмов / В.В. Лысак, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2014. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/98207> – Дата доступа: 09.12.2025.

4. *Лысак, В.В.* Микробиология: практикум / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2015. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/141935> – Дата доступа: 09.12.2025.