

**Министерство сельского хозяйства
Российской Федерации**

Технологический институт-филиал ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

**Т.В.Починова
И.И. Шигапов**

**МИКРОБИОЛОГИЯ
КРАТКИЙ КУРС ЛЕКЦИЙ**



Димитровград - 2021

УДК 579
ББК 28.4

Починова Т.В Микробиология: краткий курс лекций /
Т.В.Починова.,И.И.Шигапов, -Дмитровград: Технологический институт –
филиал УлГАУ, 2021.- 110 с.

Рецензенты: Гафин Мунир Мазгутович, кандидат технических наук, доцент
кафедры "Технологии производства переработки и экспертизы продукции АПК"
Технологического института – филиала ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Микробиология: краткий курс лекций предназначен для подготовки бакалавров
очной и заочной форм обучения по направлению подготовки 35.03.07
«Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции».

Утверждено
на заседании кафедры «Технологии производства
переработки и экспертизы продукции АПК»
Технологического института – филиала
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ,
протокол № 10 от 11 мая 2021г.

Рекомендовано
к изданию методическим советом Технологического
института – филиала
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
Протокол № 10 от 11 мая 2021г.

© Починова Т.В. ,Шигапов И.И. 2021

© Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

№ п/п	Наименование тем	Стр.
1	Цели и задачи освоения дисциплины	4
2	Место дисциплины в структуре ОПОП направления	4
3	Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины	5
4	Содержание и структура дисциплины	6
5	Краткий курс лекций	9
6	Фонд оценочных средств дисциплины	52
7	Учебно-методическое обеспечение дисциплины	70
8	Лабораторный практикум	71
	Глоссарий	105

1 ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

Цель – формирование знаний по основам общей и специальной микробиологии и умений использования полученных знаний для решения практических задач сельского хозяйства и перерабатывающих производств.

Задачи:

- изучить систематику, морфологию, генетику и размножение бактерий; метаболизм микроорганизмов, участие микроорганизмов в превращениях различных соединений;
- изучить почвенные микроорганизмы и освоить методы определения их состава и активности;
- сформировать понятия о роли микроорганизмов в почвообразовательном процессе и воспроизводстве плодородия почв, микробиологических процессах при производстве, хранении и переработке сельскохозяйственной продукции.

2 МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ В СТРУКТУРЕ ОПОП НАПРАВЛЕНИЯ

Курс входит в базовую часть профессионального цикла дисциплин.

Предшествующими курсами, на которых непосредственно базируется дисциплина «Микробиология», являются школьный курс биологии, ботаника, зоология, химия неорганическая, химия органическая и аналитическая.

Курс «Микробиология» является основополагающим для изучения следующих дисциплин: земледелие с основами почвоведения и агрохимии, физиология растений, сертификация и стандартизация с.-х. продукции, технологии хранения и переработки продукции животноводства, технологии хранения и переработки продукции растениеводства.

Требования к результатам освоения дисциплины

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций:

- использование основных законов естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применение методов математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования;
- способность использовать микробиологические технологии в приготовлении органических удобрений, кормов и переработке сельскохозяйственной продукции;
- готовность оценивать качество и безопасность сельскохозяйственного сырья и продуктов его переработки в соответствии с требованиями ГОСТ;

– способность к лабораторному анализу образцов почв, растений, проб животного происхождения и сельскохозяйственной продукции.

В результате изучения дисциплины обучающийся должен:

знать: систематику, морфологию, генетику и размножение микроорганизмов; метаболизм микроорганизмов, трансформацию различных соединений микроорганизмами; почвенные микроорганизмы; микробиологию сельскохозяйственной продукции, микробиологический контроль продуктов переработки;

уметь: управлять микробиологической активностью почвы и с.-х. продукции при хранении и переработке;

владеть: методами приготовления препаратов и микроскопирования, методами культивирования микроорганизмов, получения чистых культур; микробиологическими методами лабораторного анализа образцов почв, растений и продукции растениеводства и животноводства.

3 КОМПЕТЕНЦИИ ОБУЧАЮЩЕГОСЯ, ФОРМИРУЕМЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

3.1 Общекультурные и профессиональные компетенции

Изучение дисциплины «Микробиология» направлено на формирование у обучающихся компетенций: ОПК - 1

общепрофессиональными:

Способен решать типовые задачи профессиональной деятельности на основе знаний основных законов математических, естественнонаучных и общепрофессиональных дисциплин с применением информационно-коммуникационных технологий (ОПК-1)

4 ОБЪЁМ ДИСЦИПЛИНЫ И ВИДЫ УЧЕБНОЙ РАБОТЫ

Вид учебной работы	Очная форма обучения
Семестр	3
Общая трудоемкость дисциплины	108
Контактные занятия, в том числе КСР:	56,2
Лекции	2
Практические занятия	18
Самостоятельная работа	36
Вид итогового контроля	24,8
	Экзамен

4 СОДЕРЖАНИЕ И СТРУКТУРА ДИСЦИПЛИНЫ

4.1 Содержание разделов дисциплины

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Содержание раздела
1	Общая микробиология	Систематика и морфология микроорганизмов.
		Генетика и размножение микроорганизмов.
		Микроорганизмы и окружающая среда.
		Метаболизм микроорганизмов.
		Трансформация различных соединений микроорганизмами.
2	Специальная микробиология	Почвенная микробиология.
		Микробиология сельскохозяйственной продукции и микробиологический контроль продуктов переработки

4.2 Общая микробиология

«Систематика и морфология микроорганизмов». Объекты микробиологии, место микробиологии в системе биологических наук, роль микроорганизмов в природе и жизни человека.

Общие сведения по систематике и номенклатуре прокариот. Принципы нумерической и филогенетической систематики.

Микроорганизмы, не имеющие клеточного строения. Морфологические типы бактерий. Ультраструктура бактериальной клетки. Споры и спорообразование. Морфология и систематика микроскопических грибов.

«Генетика и размножение микроорганизмов». Рост и размножение бактерий. Основы генетики микроорганизмов. Механизмы модификации и мутации у бактерий, механизмы трансформации, трансдукции и конъюгации. Генетическая инженерия в микробиологии.

«Микроорганизмы и окружающая среда». Действие абиотических и биотических факторов окружающей среды на микроорганизмы. Физиологические группы микроорганизмов по отношению к факторам внешней среды. Возможности регулирования жизнедеятельности микроорганизмов при хранении сельскохозяйственного сырья и продуктов переработки.

«Метаболизм микроорганизмов». Питание бактерий. Механизмы транспорта через цитоплазматическую мембрану. Пищевые потребности. Типы питания. Ферменты и обмен веществ.

Получение энергии микроорганизмами. Роль АТФ в аккумуляции и переносе энергии. Типы энергетических процессов. Брожение. Аэробное дыхание. Анаэробное дыхание.

«Трансформация различных соединений микроорганизмами». Круговорот углерода и кислорода в биосфере. Значимость двух космических процессов – фотосинтеза и минерализации микроорганизмами органических веществ.

Спиртовое брожение. Возбудители спиртового брожения и их особенности. Химизм процесса. Эффект Пастера. Роль спиртового брожения в природе и жизни человека.

Молочнокислое брожение. Особенности молочнокислых бактерий. Гомоферментативное, гетероферментативное и бифидоброжение.

Виды брожений, вызываемых клостридиями. Маслянокислое брожение, особенности возбудителей, значение в природе, сельском хозяйстве и промышленности. Разложение пектиновых веществ и его роль в первичной переработке грубоволокнистых растений. Микробная трансформация целлюлозы. Возбудители, химизм, значение.

Окислительные процессы. Окисление жира. Неполное окисление. Окисление этилового спирта в уксусную кислоту.

Участие микроорганизмов в различных этапах круговорота азота. Влияние микробиологических превращений азотсодержащих соединений на доступность азота для питания растений. Минерализация азотсодержащих органических соединений. Нитрификация и денитрификация. Имобилизация азота. Биологическая фиксация азота атмосферы.

4.3 Специальная микробиология

«Почвенная микробиология». Почвенные микроорганизмы. Методы определения их состава и активности. Роль микроорганизмов в почвообразовании и воспроизводстве плодородия почв. Микробные ценозы различных типов почв. Влияние агроприемов на почвенные микроорганизмы.

Микроорганизмы зоны корня и их влияние на растения. Симбиоз микроорганизмов и растений. Биопрепараты, повышающие плодородие почв и улучшающие рост и развитие растений. Использование микроорганизмов и их метаболитов для защиты растений от возбудителей болезней и насекомых вредителей.

«Микробиология сельскохозяйственной продукции и микробиологический контроль продуктов переработки»

Микробиология продуктов животноводства и птицеводства. Первичная микрофлора молока. Изменение состава микроорганизмов молока при

хранении и транспортировке. Пороки молока микробного происхождения. Микробиология молочных продуктов. Микрофлора мяса и мясных продуктов. Эндогенное и экзогенное обсеменение мяса. Пороки мяса. Микробиология яиц сельскохозяйственной птицы. Порча яиц.

Микробиология продукции растениеводства. Микрофлора свежих плодов и овощей. Микрофлора квашеных и соленых плодов и овощей. Микрофлора зерна и семян. Микробиология крупы, муки и хлеба.

Микробиология кормов. Использование молочнокислого брожения в кормопроизводстве. Силосование и сенажирование.

Микроорганизмы, вызывающие порчу сельскохозяйственной продукции и продуктов переработки. Методы контроля микроорганизмов, вызывающих порчу и пороки продуктов. Принципы консервирования. Санитарно-гигиенический контроль перерабатывающих производств.

4.4 Структура дисциплины очной и заочной формы обучения

№ п/п	Разделы, темы дисциплины	Количество часов контактной и самостоятельной работы	
		очная	заочная
1	Модуль 1. Общая микробиология Предмет и задачи дисциплины «Микробиология» Основы общей микробиологии	9,0	11
2	Систематика и морфология микроорганизмов. Генетика и размножение микроорганизмов.	23,5	21,5
3	Микроорганизмы и окружающая среда. Метаболизм микроорганизмов.	19,5	17,65
4	Трансформация различных соединений микроорганизмами.	18	18
5	Модуль 2. Специальная микробиология Почвенная микробиология.	17,5	18
6	Микробиология сельскохозяйственной продукции и микробиологический контроль продуктов переработки	20,3	21,5
	Консультации	0,2	0,35
	Итого	108	108

5 КРАТКИЙ КУРС ЛЕКЦИЙ

Лекция 1

ВВЕДЕНИЕ. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК СТАНОВЛЕНИЯ И РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

Микробиология (от греч. *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – наука) – наука о мельчайших, невидимых невооруженным глазом организмах. Микробиология изучает морфологию, физиологию, генетику, систематику, экологию микроорганизмов и взаимоотношения их с другими существами.

Открытие и изучение мира микробов стало возможным с изобретением микроскопа и дальнейшим совершенствованием оптической техники. Хотя человек всегда находился в окружении микроорганизмов, использовал продукты их жизнедеятельности (хлеб, вино, уксус и др.), страдал от заболеваний (чума, холера, оспы и др.), причиной которых они являлись, однако до XVII века не имел ясного представления о невидимом мире. Так, в древности появление заразных болезней считалось карой богов. Позднее, многолетние наблюдения позволили сделать важные открытия, люди научились избегать болезней путем профилактики и изоляции больных. Великий врач древности *Гиппократ* (IV в. до н.э.) придерживался теории «болезнетворных миазмов» и считал, что во время эпидемий воздух содержит особые болезнетворные испарения – «миазмы». Греческий ученый *Фукидид* (V в. до н.э.) предполагал, что при заболеваниях в организм проникают мельчайшие живые частицы – контагии (от лат. *contagio* – дотрагиваюсь). Итальянский врач *Фракасторо* (1478–1553 гг.), поддерживая учение о «контагии», говорил о том, что контагий представляет собой инфекционный возбудитель, который, попав в организм, активно размножается и быстро распространяется по всему телу.

Первое оптическое устройство было изобретено *Г. Галилеем* (1564–1642). Однако настоящее устройство для изучения микроскопических объектов (с 32-кратным увеличением) сконструировали в конце XVI в. голландские ученые *Ханс и Захариас Янсены*. Ученый иезуит *Афанасий Кирхер* в 1646 г. с помощью микроскопа обнаружил мельчайших «червячков» в гниющем мясе, молоке, уксусе и т.д. А. Кирхер, конечно, не мог видеть в такой микроскоп бактерии, но его открытие укрепляло веру в теорию развития болезней, вызываемых некими существами.

Открытие мира микробов принадлежит голландскому ученому *Антонию Ван Левенгуку*. Будучи преуспевающим торговцем сукном, А. ван Левенгук весь свой досуг посвящал искусству шлифования линз, его оптическая система давала увеличение в 200–270 раз. Ученый наблюдал компоненты крови, структуру тканей растений, животных. В 1676 г. ему впервые удалось увидеть микроорганизмы, рассматривая в микроскоп каплю дождевой воды. В 1683 г. А. ван Левенгук подробно описал и зарисовал основные виды бактерий. Результаты своих исследований ученый сообщил в

Лондонское королевское общество, членом которого впоследствии был избран. Работами А. ван Левенгука интересовался Петр I, который привез из Голландии в Россию первый микроскоп.

После открытий А. ван Левенгука внимание к миру микробов возросло, однако накопление материала о микроорганизмах продолжалось очень долго. Великий систематик *К. Линей* (XVIII в.) первоначально объединил все микроорганизмы в один общий род под названием «Chaos» («Хаос»). Впервые попытку систематизировать микроорганизмы сделал в 1786 г. датский ученый *О. Мюллер*. Он описал микроорганизмы, обитающие в воде и почве, и назвал их «инфузории» (*unfusium* – развивающиеся в настоях). Позднее, в 1839 г. *Х.Г. Эренберг* предложил делить инфузории на 22 семейства, три из которых содержали описание бактерий. В развитии микробиологии в этот период большое значение имели работы русских исследователей *М.М. Тереховского* и *Д.С. Самойловича*. М.М. Тереховский одним из первых использовал экспериментальный метод в микробиологии: он изучал влияние различных физических и химических факторов на микроорганизмы. Опыты показали, что микроскопические существа (анималькулы) не зарождаются внезапно, а появляются в колбах с настоями вместе с некипяченой водой. Д.С. Самойлович внес большой практический вклад в борьбе с чумой и предпринял попытку создания противочумной вакцины.

После усовершенствования микроскопов были предприняты попытки более точной классификации микробов. Большой вклад в систематику микробов внес один из основоположников отечественной микробиологии *Л.С. Ценковский* (1822-1887). Ученый исследовал простейшие, водоросли, грибы, изучал их морфологию, циклы развития и сделал вывод об отсутствии резкой границы между миром растений и животных. Л.С. Ценковский описал 43 вида микроорганизмов, впоследствии независимо от Пастера, получил сибирезвенную вакцину.

В 1857 г. *П. Негели* выделил бактерии в самостоятельную группу *Schizomycetes* (грибы-дробянки). В 1872 г. *Ф. Кон* отделил бактерии от простейших и отнес их к царству растений.

Дальнейшее развитие микробиологии связано с именем великого французского ученого *Л.Пастера* (1822–1895), автором двух докторских диссертаций по химии и физике. В ходе изучения изомеров винной кислоты он столкнулся с деятельностью микроорганизмов. Он наблюдал, как плесневый гриб и дрожжи, развиваясь на соли рацемической винной кислоты, потребляли лишь один из оптических изомеров. Это натолкнуло его на мысль о возможном участии микроорганизмов в процессах брожения. После нескольких лет напряженных исследований Л.Пастер установил, что процессы брожения действительно вызываются микроорганизмами, причем каждый вид брожения – определенным видом. Изучая масляно-кислое брожение, Пастер обнаружил, что некоторые виды микроорганизмов могут жить только в отсутствие кислорода. На основании этих опытов вошли в практику термины «аэробный» и «анаэробный» для обозначения жизни в

присутствии или отсутствии кислорода. В 1860–1864 гг. Пастер безупречными экспериментами доказал, что самостоятельного зарождения жизни в современных условиях не существует. Ученый предложил методы стерилизации (нагревания до 120 °С) и пастеризации (нагревание до 60–70° С). Пастер положил начало и развитию медицинской микробиологии. Он изучал инфекционные болезни животных и человека (болезнь шелковичных червей, сибирскую язву, бешенство и др.), выяснил природу этих заболеваний и нашел способ борьбы с ними. Пастером созданы вакцина против сибирской язвы и антирабическая вакцина (от лат. *anti* – против + *rabies* – бешенство).

Огромное влияние на развитие и становление медицинской микробиологии оказал *Роберт Кох* (1843–1910). Он занимался изучением возбудителей инфекционных заболеваний (сибирская язва, туберкулез, холера и др.). В честь него возбудитель туберкулеза был назван палочкой Коха. Ученый усовершенствовал бактериологическую методику, внес новшества в методику микроскопирования. Он работал над получением твердых питательных сред, используя желатин, затем сыворотку крови и агар. Кох добился получения чистых культур, что позволило четко установить этиологическую роль возбудителя и изучать его свойства. Разработка и внедрение в практику ученым селективных сред (сред, наиболее сходных с условиями пребывания патогенна в тканях хозяина) привели к открытию возбудителей холеры, туберкулеза и других патогенных микроорганизмов. В 1905 г. за исследование туберкулеза ученому была присуждена Нобелевская премия.

Выдающийся русский ученый *И.И.Мечников* (1845–1916) является основоположником микробиологии и иммунологии. Он открыл явление фагоцитоза, создал фагоцитарную теорию иммунитета. Благодаря *И.И.Мечникову* и *П. Эрлиху*, предложившим гуморальную теорию иммунитета, были раскрыты многие механизмы иммунитета, за что ученым в 1908 г. была присуждена Нобелевская премия.

Дальнейшее изучение микроорганизмов способствовало развитию и другого направления в микробиологии – *эколого-физиологического*. Приверженцами этого направления стали *С.Н. Виноградский* (1856–1953), *В.Л. Омелянский* (1867–1928), *М. Бейеринк* (1851–1931). *С.Н. Виноградский* установил роль микроорганизмов в усвоении азота, разработал метод накопительных культур, открыл хемосинтез у микроорганизмов. *В.Л. Омелянский* изучал вопросы нитрификации, азотофиксации, распада целлюлозы; получил широкую известность благодаря своим работам по почвенной микробиологии. После открытия *С.Н. Виноградским* анаэробного азотофиксатора, *М. Бейеринк* обнаружил в почве еще один вид бактерий, способный к азотофиксации в аэробных условиях – *Azotobacter chroococcum*. Ученый исследовал также физиологию клубеньковых бактерий, изучал процессы денитрификации и сульфатредукции, изучал ферменты разных групп микроорганизмов.

В 70–80-х годах XIX века была доказана микробиологическая природа процесса нитрификации (*Т. Шлезенг* и *А. Мюнци*), денитрификации (*П. Дегерен*). *М.С. Воронин* в 1867 г. описал клубеньковые бактерии, а *Г. Гельригель* и *Г. Вильфарт* доказали их способность к азотофиксации. *П.А. Костычев* создал теорию микробиологической природы процессов почвообразования. В 1982 г. *Д.И. Ивановский* (1864–1920) обнаружил вирус табачной мозаики.

К началу XX столетия был накоплен значительный объем данных о микроорганизмах. Усовершенствованные методы исследования позволили открыть новые виды микробов. Важным событием стало открытие *А. Флемингом* в 1929 г. способности грибов рода *Penicillium* вырабатывать антибактериальные вещества.

Новый этап в развитии микробиологии начался во второй половине XX в. и связан с рождением молекулярной биологии и молекулярной генетики. В 1944 г. *О. Эвери*, *К. Маклеод*, *М. Мак-Карти* на бактериях доказали роль ДНК в передаче наследственных признаков. Изучение генетического материала бактерий, вирусов, а затем и плазмид позволило сделать ряд важных открытий, необходимых для правильного понимания фундаментальных процессов, лежащих в основе жизни. Благодаря расшифровке основных принципов кодирования генетической информации в ДНК бактерий, установлены общие молекулярно-генетические закономерности, свойственные высшим организмам.

Лекция 2

СТРОЕНИЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Размеры и формы клеток

По принципу клеточной организации все микроорганизмы могут быть разделены на два типа – прокариоты и эукариоты. К эукариотам (от. греч. *eu* – истинный, *karion* – ядро), к организмам, имеющим четко оформленное ядро с кариомембранной, принадлежат грибы, водоросли и простейшие. К прокариотам (от. греч. *pro* – перед, *karion* – ядро), древнейшим организмам, не обладающих четко оформленным ядром с оболочкой, относят бактерии и археи.

Размеры крупных одноклеточных эукариот лежат в пределах 100 мкм (диатомовые водоросли, высшие протисты). Одноклеточные зеленые водоросли и клетки дрожжей имеют величину от 2 до 10 мкм. Линейные размеры многих прокариот лежат в пределах 0,2–10,0 мкм, однако некоторые представители имеют размеры около 0,05 мкм (*Mycoplasma*), другие достигают 100 мкм (*Achromatium*) и даже 600 мкм (*Epulopiscium fishelsoni*).

Большинство бактерий – одноклеточные организмы, хотя существует ряд форм, состоящих из многих клеток. Выделяют основные формы бактерий – шаровидные, палочковидные, извитые и нитевидные.

Шаровидные, или кокки (от греч. *kokkos* , ягода, зерно) имеют сферическую или овальную форму. После деления кокки могут не

расходиться. Если деление происходит в одной плоскости, образуются пары клеток (диплококки), или цепочки (стрептококки). Деление в нескольких плоскостях, может привести к скоплению клеток, напоминающих гроздь винограда (стафилакокки), образованию тетрад (тетракокки), пакетов (сарцины)

Палочковидные (цилиндрические) бактерии различаются по форме, размерам и длине и в поперечнике, концов клетки. Палочки бывают длинными – более 3 мкм, короткими – 1,5–3 мкм очень короткими – менее 1,0 мкм. Концы палочек могут быть закругленными, заостренными, утолщенными, обрезанными.

Извитые (спиралевидные) бактерии характеризуются разным количеством и характером завитков. Спириллы имеют от одного до нескольких завитков, вибрионы – изогнутые палочки, их завиток не превышает четверти оборота спирали.

Кроме перечисленных выше основных, встречаются и иные формы. Обнаружены бактерии, имеющие форму замкнутого и незамкнутого кольца, червеобразной формы и шестиугольной звезды, бактерии, образующие выросты – простеки и др.

Для многоклеточных бактерий характерна нитевидная форма, хотя могут встречаться и другие.

Ультраструктура бактериальной клетки

Бактериальная клетка, несмотря на кажущуюся простоту организации, представляет собой сложный механизм, в котором скоординированы все процессы жизнедеятельности, обеспечивающие рост, развитие и размножение. В составе бактериальной клетки выделяют условные компартменты – поверхностные структуры, клеточную оболочку и цитоплазму.

Поверхностные структуры

К поверхностным структурам относят капсулы, слизистые слои и чехлы, жгутики, ворсинки.

Клеточная оболочка

Клеточная стенка – один из важных структурных элементов бактериальной клетки. Клеточная стенка определяет форму клеток, защищает от внешних воздействий, участвует в транспорте веществ, регуляции роста и деления, обеспечивает коммуникацию с внешней средой. Компоненты клеточной стенки определяют антигенные свойства клетки, акцепторную специфичность к фагам и бактериоцинам.

Состав и строение клеточной стенки – важный систематический признак. В 1884 г. датским ученым Х. Грамом был предложен способ окраски, позволяющий дифференцировать бактерии. После окраски генцианвиолетовым и обработки раствором йода клетки одних бактерий обесцвечиваются спиртом, других – остаются окрашенными в синий цвет. Бактерии по данному признаку подразделяют на окрашивающиеся по Грамму – грамположительные (Γ^+) и не окрашивающиеся – грамотрицательные (Γ^-).

Клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий различаются по химическому составу и ультраструктуре. У *грамположительных* бактерий толщина клеточной стенки колеблется у разных видов от 20 до 80 нм. Стенка плотно прилегает к ЦПМ, основную ее массу (60–90%) составляет специфический гетерополисахарид – пептидогликан. Пептидогликан построен из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных между собой посредством β -1,4 гликозидных связей (рис. 7). К N-ацетилмурамовой кислоте присоединен короткий пептидный хвост, состоящий из небольшого числа, обычно 4–5 аминокислот (L-аланина, D-аланина, D-глутаминовой кислоты, лизина или диаминопимелиновой кислоты).

Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит много тейхоевых кислот. Тейхоевые кислоты (от греч. *teichos* – стенка) – полимеры, образованные остатками спирта рибита (рибиттейхоевые кислоты) или глицерина (глицеринтейхоевые кислоты), связанные фосфодиэфирными связями (рис. 10). Свободные гидроксильные группы в молекулах спиртов могут быть замещены остатками D-аланина, глюкозы, N-ацетилглюкозамина и некоторых других сахаров. Тейхоевые кислоты ковалентно могут соединяться с N-ацетилмурамовой кислотой.

Клеточная стенка *грамотрицательных бактерий* значительно тоньше (толщина 14–18 нм) и имеет более сложное строение, чем стенка грамположительных бактерий. Пептидогликан образует только внутренний слой, неплотно прилегая к ЦПМ. Снаружи от пептидогликана располагается дополнительный слой клеточной стенки – наружная мембрана, состоящая из фосфолипидов, белков, липопротеина и липополисахарида. Липополисахарид имеет сложное молекулярное строение, локализован во внешнем слое наружной мембраны и занимает около 30–40% ее поверхности. Липополисахарид определяет антигенную специфичность бактерий и является главным фактором их патогенности.

80% всех белков наружной мембраны (основные белки) участвуют в формировании гидрофильных пор, необходимых для транспорта молекул веществ. Функция минорных белков – транспортная и рецепторная.

У некоторых прокариот отмечено наличие необычной клеточной стенки или полное ее отсутствие. Так, некоторые скользящие бактерии (миксобактерии, флексибактерии) имеют гибкую клеточную стенку, вероятно, вследствие низкой сшитости ее пептидогликанового компонента. Метанобразующие археобактерии содержат пептидогликан особого химического строения. Экстремальные галофильные, метанобразующие и кислототермофильные археобактерии имеют клеточную стенку, состоящую только из белка; у других представителей этой группы клеточная стенка состоит исключительно из кислого гетерополисахарида. К прокариотам, не имеющим клеточной стенки, относятся группа микоплазм, сапрофитов, внутриклеточных паразитов растений, животных и человека.

Нарушение синтеза клеточной стенки лежит в основе L-трансформации бактерий. Феномен был обнаружен в институте имени Листера и таким

необычным бактериям дали название L-форм. Трансформация может происходить как *in vitro*, так и *in vivo* (в организме человека и животных). Причинами ее является действие различных факторов (антибиотиков, ферментов, антимикробных антител). Освобождение от клеточной стенки не лишает бактерий жизнеспособности, но позволяет пережить действие неблагоприятных факторов, а по их устранении – возвращаться в исходное состояние. Однако, если генетический контроль синтеза клеточной стенки сильно нарушен, L-трансформация приобретает необратимый характер.

Цитоплазматическая мембрана

Содержимое клетки отделяется от клеточной стенки цитоплазматической мембраной (ЦПМ). На долю ЦПМ приходится 8–15% сухого вещества клеток. Как и многие биологические мембраны ЦПМ бактерий состоит из двух слоев липидов и встроенных в липидную мембрану белков. Набор липидов в ЦПМ чрезвычайно видоспецифичен; особый состав липидов обнаружен в мембране археобактерий.

Цитоплазма

Содержимое клетки, окруженное ЦПМ, называется цитоплазмой. Цитоплазма бактерий представлена разнообразными структурными элементами (внутрицитоплазматические мембраны, генетический аппарат, рибосомы, включения) и цитозолем. Цитозоль – фракция цитоплазмы, имеющая гомогенную консистенцию и содержащая набор растворимых РНК, ферментных белков, продуктов и субстратов метаболических реакций.

Генетический материал бактерий – *нуклеоид* (от лат. *nucleus* – ядро + греч. *eidos* – сходство) занимает определенную область в цитоплазме и не отделен от нее мембраной. Каждая бактерия содержит от нескольких до десятков тысяч центров синтеза белков. Количество рибосом зависит от интенсивности процессов белкового синтеза. Рибосомы имеют константу седиментации 70S, построены из двух неодинаковых субъединиц: 30S и 50S-субъединиц.

У фотосинтезирующих бактерий в цитоплазме присутствуют хлоросомы и фикобилосомы. В этих структурах локализованы пигменты, поглощающие кванты света.

Лекции III

РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Различают рост индивидуальных клеток и рост популяций. Под ростом индивидуальной клетки понимают увеличение ее биомассы, наступающее в результате синтеза клеточного материала. Достигнув определенной величины, клетка прекращает рост и подвергается делению. В результате размножения происходит увеличение числа клеток микроорганизмов в популяции.

Для прокариот характерно в основном равновеликое бинарное поперечное деление, приводящее к образованию двух одинаковых дочерних клеток. У большинства грамположительных бактерий и цианобактерий

деление происходит путем синтеза поперечной перегородки, образующейся из ЦПМ и пептидогликанового слоя. Клетки большинства грамотрицательных бактерий делятся путем перетяжки

Почкование у бактерий представляет собой разновидность деления. При почковании на одном из полюсов материнской клетки образуется маленький вырост (почка), который, достигнув определенных размеров в процессе роста, отделяется от материнской клетки. Между образовавшимися клетками обнаруживаются морфологические и физиологические различия.

У одноклеточных цианобактерий обнаружено множественное деление, приводящее к образованию мелких клеток (баеоцистов), число которых колеблется от 4 до 1000. Освобождение баеоцистов происходит путем разрыва материнской клеточной стенки.

Клеточные циклы бактерий

Период, который проходит клетка от деления к делению, называется клеточным циклом. При отсутствии дифференциации клеточный цикл бактерий представляет собой вегетативный клеточный цикл, который включает процессы, связанные с ростом и делением. У бактерий выделяют три типа вегетативного клеточного цикла: мономорфный, диморфный, полиморфный. Для большинства бактерий характерен *мономорфный* тип, когда при делении образуется только один морфологический тип клеток. Периоду деления предшествует репликация молекулы ДНК.

При *дифоморфном* типе образуются две клетки, отличающиеся формой, размерами и другими признаками. Так, у бактерий *p. Caulobacter* образуются два типа клеток – подвижные со жгутиками и неподвижные со стебельком.

Полиморфный клеточный цикл свойственен бактериям *p. Arthrobacter*, *Nurhomicrobium*, *Rhodomicrobium* и др. У бактерий *p. Arthrobacter* сначала формируются палочковидные неправильной формы клетки, переходящие затем в кокки, последние удлиняются и превращаются в палочки.

Морфологически дифференцированные клетки

Для некоторых бактерий характерно образование специализированных клеток и особый порядок прохождения жизненных циклов. Некоторые морфологически дифференцированные клетки (гормогонии, баеоцисты) служат для размножения. Другие (гетероцисты, бактериоиды) связаны с фиксацией молекулярного азота атмосферы. Некоторые бактерии в неблагоприятных условиях способны образовывать особые защитные формы (покоящиеся формы) – эндоспоры, цисты, акинеты, экзоспоры. Такие клетки характеризуются низким уровнем метаболической активности и устойчивостью к действию разнообразных повреждающих факторов: высоких и низких температур, обезвоживанию, высокой кислотности, радиации, механических воздействий и др. Покоящиеся клетки в течение разного времени могут находиться в жизнеспособном состоянии и прорасти в подходящих условиях.

Бактериальные *эндоспоры* (от греч. *sporos* – семя) формируются эндогенно, т.е. внутри цитоплазмы «материнской» клетки. В каждой

бактериальной клетке формируется, как правило, одна эндоспора. Споры характеризуются высоким коэффициентом светопреломления, обладают специфическими структурами (многослойными белковыми покровами, наружной и внутренней мембранами, кортексом).

В процессе споруляции бактериальная клетка подвергается сложной перестройке. Генетический материал, представляющий собой одну или несколько полностью реплицированных хромосом, конденсируется на одном из полюсов клетки и обособляется от остального клеточного содержимого с помощью перегородки. Перегородка формируется впячиванием ЦПМ внутрь клетки. Затем происходит обрастание отсеченного участка цитоплазматической мембраной вегетативной клетки. В результате образуется проспора, окруженная двумя мембранами. Между наружным и внутренним мембранными слоями начинается формирование кортикального слоя (кортекса), состоящего из молекул пептидогликана. По мере созревания споры обе ее мембраны участвуют в формировании специальных слоев споры, число, толщина и строение которых различны у разных видов спорообразующих бактерий. У многих бактерий поверх покровов формируется еще одна структура – экзоспориум (часто многослойная липопротеиновая оболочка, содержащая немного углеводов).

Образование эндоспор сопровождается накоплением в них дипиколиновой кислоты и ионов кальция, которые образуют комплекс, локализованный в сердцевине споры. В эндоспорах обнаружено повышенное содержание и других катионов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{+}). После завершения спорообразования происходит разрушение (лизис) материнской клетки и спора выходит в среду.

Экзоспоры формируются в результате отпочковывания от одного из полюсов материнской клетки. Образование экзоспор сопровождается уплотнением и утолщением клеточной стенки. У экзоспор отсутствуют дипиколиновая кислота, а также кортекс и экзоспориум.

Цисты представляют собой округлые светопреломляющие образования, окруженные капсулой. Цитоплазма содержит нуклеоид, часто гранулы поли- β -оксимасляной кислоты, окружена ЦПМ и двумя оболочками – внешней (экзиной) и внутренней (интиной).

Акинеты заметно крупнее вегетативных клеток, имеют продолговатую форму или сферическую форму, гранулированное содержимое и толстую оболочку. Оболочка акинет содержит больше липидов и полисахаридов, а цитоплазма меньше воды, чем вегетативные клетки. В цитоплазме акинет находится много гранул запасных веществ (гликогеновых, полифосфатных, цианофициновых), а также карбоскисом.

Фазы роста бактерий

Рост бактерий происходит, когда созданы оптимальные химические и физические условия: благоприятная температура, рН среды, достаточный запас питательных веществ. В условиях определенной несменяемой питательной среды (*периодическая культура*) рост микроорганизмов может быть разделен на несколько периодов (фаз). Вначале, после внесения

бактерий в питательную среду, отмечается период адаптации к новым условиям питания. В этот период перестаривается метаболизм клетки, синтезируются ферменты, необходимые для использования новых субстратов, активируется биосинтез белка. Этот период называется *лаг-фазой*. Продолжительность лаг-фазы будет зависеть от вида бактерий и условий культивирования.

Экспоненциальная (линейная) фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью роста. Происходит быстрое размножение микроорганизмов, в обмен активно вовлекаются питательные вещества, накапливаются метаболиты растений.

Стационарная фаза наступает, когда число клеток перестает увеличиваться. Устанавливается равновесие между клеточным ростом и делением и процессом отмирания клеток. Лимитирующим фактором в этот период становится доступность важнейших питательных веществ.

Фаза отмирания (спада, лизиса) наступает, когда за счет автолиза биомасса клеток уменьшается. Угнетение и распад клеток происходят, вероятно, вследствие накопления продуктов метаболизма и действия собственных ферментов.

У бактерий, способных использовать два различных источника углерода, отмечается *двухфазный рост*. Например, кишечная палочка может расти на среде с глюкозой и сорбитолом. После исчерпания запасов глюкозы, наступает стационарная фаза, в течение которой в культуре иницируются синтез ферментов для утилизации второго углерода (сорбитола). Наступает фаза вторичного экспоненциального роста.

Если в среду добавлять питательные вещества и одновременно удалять продукты обмена, то микроорганизмы могут пребывать в течение определенного времени в экспоненциальной фазе. Такой способ положен в основу проточного культивирования микроорганизмов (*непрерывная культура*) и используется в биотехнологии для получения биомассы или метаболита. Культивирование осуществляется в специальных аппаратах – биореакторах, или ферментерах, где создаются оптимальные условия для жизнедеятельности микроорганизмов.

Лекция IV

ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Геном прокариот

Местом нахождения генетического материала у прокариот является нуклеоид, который включает в себя почти всю ДНК бактерий. Хромосомы бактерий, как правило, имеют кольцевую структуру. Однако, некоторые микроорганизмы могут содержать линейные хромосомы; линейная и кольцевая хромосомы могут сосуществовать одновременно. У некоторых микроорганизмов имеются и нехромосомные структуры – плазмиды.

Размер геномов у различных бактерий колеблется от 580 тыс. н.п. у *Micoplasma genitalium* до 9500 тыс. н.п. у *Mухосoccus xanthus*. Для кишечной

палочки *E.coli* размер генома составляет 4600 тыс.н.п. В бактериальных клетках хромосома сильно компактизирована. Так, кольцевая молекула ДНК *E.coli* длиной ~1,5 мм заключена в клетку, имеющую форму палочки диаметром 1 мкм и длиной 2 мкм.

Структура бактериальной хромосомы

В бактериальной хромосоме все гены расположены в линейной последовательности. Бактерии обычно гаплоидны, т.е. имеют только один набор генов. Полный набор генов, которым обладает клетка микроорганизма, составляет *генотип* данного микроорганизма. Проявление наследуемых морфологических признаков и физиологических процессов у индивидуума называется *фенотипом*.

Количество генов у тех или иных микроорганизмов различно. Так, у бактерии *Mycoplasma genitalium* в настоящее время идентифицировано 324 гена, *Mycobacterium tuberculosis* – 1600, *Escherichia coli* – 2656 (предположительно количество генов у данных микроорганизмов значительно больше). Все бактерии, как правило, содержат обязательный *минимальный набор генов*, необходимый для их существования. Этот набор генов кодирует 256 белков и включает следующие жизненно важные генетические системы микроорганизмов: гены системы регуляции, репарации и рекомбинации, аппарата транскрипции, гены, контролирующие анаэробный метаболизм, гены биосинтеза липидов и др. Все другие гены, которые содержат микроорганизмы, определяют специфические фенотипические характеристики, составляющие уникальность организма.

Для прокариот характерна *оперонная организация геномов*.

Внехромосомные факторы наследственности

У многих обнаружены внехромосомные факторы наследственности: плазмиды, IS-элементы и транспозоны.

Плазмиды – это двуцепочечные кольцевые молекулы ДНК, размером 0,1 до 5% размера хромосомы, несущие гены, необязательные для клетки-хозяина, или гены, необходимые только в определенной среде.

Каждая плазида является самостоятельным репликоном, сама контролирует собственную репликацию. Для этой цели она должна иметь по крайней мере один или несколько репликативных модулей (областей инициации репликации), которые и позволяют ей автономно реплицироваться. Наличие других модулей, не связанных с репликацией, не являются обязательными для каждой плазмиды. *Конъюгативные (самотрансмиссивные)* плазмиды, подобно F-фактору имеют модули, содержащие гены и регуляторные области, необходимые для переноса плазмиды из одной клетки в другую. Трансмиссивные плазмиды кодируют специальные ворсинки, половые пили, которые появляются на поверхности клеток, содержащих плазмиды, и способны специфически связываться с поверхностью безплазмидных клеток. Последующее сокращение пили притягивает клетки друг к другу, и между ними образуется мостик, через который плазмидная ДНК может передаваться в новую клетку. *Неконъюгативные* плазмиды (утратившие модуль конъюгации) не способны

к самотрансмиссивности, но способные к передаче в присутствии трансмиссивных плазмид, используя их аппарат конъюгации.

F-плазмиды обеспечивают устойчивость к антибиотикам. Их модули содержат гены, белковые продукты которых (например, β -лактамаза) инактивируют антибиотики. Col-плазмиды, несут Col-модули, кодирующие один из нескольких белков – колицинов (антибактериальных агентов).

Модульное строение типичной R-плазмиды представлено. Около 50% последовательности из приблизительно 10^5 пар оснований этих плазмид гомологичны одному из участков F-плазмиды как по структуре, так и по функциям. Вторая половина R-плазмиды не родственна F и содержит модули, ответственные за резистентность к стрептомицину, сульфаниламидам, хлорамфениколу и канамицину.

У бактерий идентифицированы дискретные подвижные элементы (мобильные элементы) – *IS-элементы и транспозоны*. Эти элементы способны перемещаться не только между плазмидами, но и между плазмидными и клеточными геномами, в также в пределах самого бактериального генома. Обычно многие модули в плазмидах являются подвижными элементами или фланкированы ими.

Репликация ДНК прокариот

Для сохранения уникальных свойств организма необходимо точное воспроизведение генетической информации в каждом последующем поколении. Во время деления клетки содержание ДНК должно удвоиться (реплицироваться), чтобы каждая дочерняя клетка могла получить полный спектр ДНК. В основе репликации лежит матричный механизм биосинтеза. Во время репликации каждая из цепей ДНК служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи. После репликации одна цепь в каждой из двух дочерних молекулах ДНК является родительской, т.е. консервативной, а другая синтезируется заново. Такой способ удвоения молекул ДНК называется *полуконсервативным*.

Изменение генетического материала

Бактерии значительно больше, чем другие организмы подвержены изменчивости. Для них характерна как наследственная, так и ненаследственная (модификационная) изменчивость. Модификационные изменения происходят на уровне фенотипа и не затрагивают клеточный генотип. Широко известны адаптивные модификации. Так, у ряда бактерий обнаружена универсальная адаптивная реакция в ответ на различные стрессовые воздействия (высокие и низкие температуры, резкий сдвиг pH и др.), проявляющаяся в интенсивном синтезе сходных белков (белков теплового шока). Адаптивные модификации расширяют возможность организма к выживанию и размножению в более широком диапазоне условий внешней среды.

В основе наследственной изменчивости лежат *мутации и генетические рекомбинации*.

Мутации. Почти до XX в. господствовало мнение, что в отличие от других животных бактерии выживают при неблагоприятных внешних

воздействиях не благодаря случайным генетическим изменениям (мутациям), а вследствие запуска физиологических процессов, что и позволяет им выжить. Эта теория была опровергнута исследованиями С.Е. Лурия и М. Дельбрюка, которые доказали, что устойчивость *E.coli* к бактериальным вирусам обусловлена произошедшими в них мутациями. Исследования Лурия – Дельбрюка положили начало современной генетике микроорганизмов.

Рекомбинация генетического материала. В 1946 г. Ледерберг и Татум (J. Lederberg, E.L. Tatum) продемонстрировали, что между членами генетически неоднородной популяции *E.coli* может происходить обмен генетической информацией и что при этом, как и у двуполовых организмов, в результате физического обмена между хромосомами могут возникать новые генетические комбинации (генетическая рекомбинация). В настоящее время известны три способа передачи генетического материала у бактерий: *конъюгация, трансформация и трансдукция.*

Конъюгация – прямой перенос фрагментов ДНК от донорских клеток к реципиентам при непосредственном контакте этих клеток.

Трансформация – генетическое изменение клеток в результате включения в их геном экзогенной ДНК. Погибшие клетки постоянно высвобождают ДНК, которая может быть воспринята бактериями (как правило, любая чужеродная ДНК, попадающая в бактериальную клетку, расщепляется эндонуклеазами, но при некоторых условиях такая ДНК может быть включена в геном бактерии).

Трансдукция – перенос генов от одной бактериальной клетки к другой посредством бактериофага. Трансдуцирующий бактериофаг обычно переносит небольшой фрагмент ДНК хозяина от клетки-донора к клетке-реципиент. Известно три вида трансдукции: *неспецифическая, специфическая и abortивная.*

Лекции V

ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы, как и все другие живые существа, нуждаются в пищи. Питательные вещества могут поступать в микроорганизмы либо непосредственно сразу, усваивая их из окружающей среды, или предварительно преобразуя их в доступную форму.

Известны два способа питания живых существ – голозойный и голофитный. При голозойном способе питания живой организм захватывает или заглатывает плотные частицы пищи и переваривает их. Такой способ питания характерен для животных (от простейших до высших). При голофитном способе живые существа утилизируют питательные вещества в виде относительно простых молекул из водных растворов (присущ растениям, бактериям).

Транспорт питательных веществ

Между клеткой и окружающей средой постоянно происходит обмен различными веществами. Клеточная стенка прокариот не является существенным барьером для небольших молекул и ионов, но задерживает макромолекулы. Барьером, обеспечивающим избирательное поступление веществ в клетку, является ЦПМ.

Перемещение осуществляют различные транспортные системы. Вещества (вода, кислород некоторые ионы) могут поступать в клетку пассивно, без энергетических затрат, по градиенту концентраций (*пассивная диффузия*). Транспорт большинства растворенных веществ осуществляется через мембрану при действии специальных механизмов переноса. Специальные мембранные белки – пермеазы способствуют прохождению различных молекул через ЦПМ. Транспорт веществ, осуществляемый переносчиками, может быть в виде *облегченной диффузии и активного транспорта*.

Движущей силой *облегченной диффузии* служит разница в концентрации какого-либо вещества по обе стороны мембраны (например, глицерина). Молекула вещества соединяется с молекулой-переносчиком у наружной поверхности мембраны, и образовавшийся комплекс диффундирует через мембрану к ее внутренней стороне. Там он диссоциирует, вещество оказывается внутри клетки, а переносчик диффундирует к наружной поверхности и может присоединять новую молекулу.

Многие сахара, белки и другие вещества поступают в клетку путем *активного транспорта*, против градиента их концентраций. Активный транспорт осуществляется с помощью специфических белков-переносчиков (пермеаз, транслоказ и др.) и требует расхода молекул АТФ.

Для переноса веществ бактерии могут использовать энергию *протонного потенциала*. В процессе дыхания в локализованной мембране дыхательной цепи осуществляется вывод протонов. В результате перемещения протонов через мембрану, за счет энергии дыхания, создается градиент электрохимического потенциала (протонный потенциал) между наружной и внутренней мембранами. *Протонный потенциал обуславливает фосфорилирование*, т.е. синтез АТФ, или используется непосредственно транспортными системами. Для поддержания протонного потенциала микроорганизм непрерывно выкачивает за пределы своей клетки протоны и другие ионы. В этих целях используются специфические транспортные белки. Способность белка катализировать одновременный и однонаправленный транспорт одного протона и одной молекулы субстрата (например, сахара) называют симпортом. Унипорт наблюдается, когда белок осуществляет перенос только одного субстрата (без протона), антипорт – когда белок осуществляет перенос двух разных субстратов (обычно ионов) в противоположных направлениях.

Питательные субстраты

Основные соединения, усваиваемые бактериальной клеткой, – углеводы, аминокислоты, органические кислоты, жирные кислоты, минеральные вещества, витамины и др. Бактерии могут также утилизировать вещества, не пригодные для животных клеток (например, карболовую кислоту, нафталин, мыло и др.). Как и другие формы жизни, бактерии нуждаются в одних и тех же макроэлементах – С, Н, О, N, P, S, К, Са, Mg, Fe. Микроэлементы – Mn, Mo, Zn, Cu, Co, Ni, Va, В, Cl, Na, Se, Si, Wo – требуются бактериям для синтеза коферментов, либо поддержания специфического типа метаболизма. Рост и развитие бактерий облигатно зависят от наличия воды, так все химические реакции протекают в водной среде.

Многие микроорганизмы (ауксотрофы – от лат. *auxilium* – помощь + греч. *trophe* – питание) нуждаются в дополнительных веществах – факторах роста (витамины, пурины, пиримидины).

Типы питания

В зависимости от того, в какой форме микроорганизмы получают углерод из окружающей среды, их подразделяют на две группы: *автотрофные* (источник углерода – диоксид углерода) и *гетеротрофные* (источник углерода – органические вещества).

Среди гетеротрофных прокариот много облигатных внутриклеточных (могут жить только внутри других клеток) паразитов (от греч. *parasitos* – нахлебник, от *para* – возле, мимо, вне + *sitos* – хлеб, пища). Факультативные паразиты способны расти при создании подходящих условий вне клетки хозяина. Большинство бактерий относится к сапротрофам. Сапротрофы (от греч. *sapros* – гнилой + греч. *trophe* – пища, питание) непосредственно не зависят от других организмов, но нуждаются в готовых органических соединениях. Они используют продукты жизнедеятельности других организмов или разлагающие растительные и животные ткани.

Олиготрофные (от греч. *oligos* – немногочисленный, незначительный, *trophe* – пища, питание) микроорганизмы способны расти при низких концентрациях в среде органических веществ. Копиотрофы (от греч. *copiosus* – изобилие + *trophe* – пища, питание) предпочитают высокие концентрации питательных веществ.

В зависимости от того, какой источник энергии могут использовать прокариоты, их делят на *фототрофов* (источник энергии – свет) и *хемотрофов* (источник энергии – окислительно-восстановительные реакции). Организмы, у которых источниками (донорами) электронов в энергетическом процессе являются неорганические вещества, называют *литотрофами*, а те, у которых донорами электронов служат органические вещества – *органотрофами*. В зависимости от источника энергии и донора электронов возможны четыре основных типа энергетического метаболизма – хемолитотрофия, хемоорганотрофия, фотолитотрофия, фотоорганотрофия

Лекция VI

СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Систематика – классификация организмов по группам (таксонам) в соответствии с определенными свойствами (признаками). Основной задачей систематики является создание естественной системы, отражающей филогенетические взаимоотношения микроорганизмов. Существующая в настоящее время систематика, базирующаяся на фенотипических признаках микроорганизмов, носит в значительной степени искусственный характер. Успехи молекулярной биологии и генетики в исследовании генома микроорганизмов позволяют надеяться на возможность создания естественной (филогенетической) систематики.

Таксономия и номенклатура микроорганизмов

Номенклатура микроорганизмов подчиняется определенным международным правилам. Имеется «Международный кодекс номенклатуры бактерий», «Международный кодекс ботанической номенклатуры» (грибы), «Международный кодекс зоологической номенклатуры» (простейшие) и решения Международного комитета по таксономии вирусов.

Основной таксономической категорией является вид. Виды объединяются в таксоны более высокого порядка – роды, роды – в семейства, далее следуют порядки, классы, отделы, царства.

Название таксонов, имеющих ранг рода и выше, униполярны (унитарны), т.е. обозначаются одним словом, например, род *Bacillus*. Название видов бинарны, т.е. обозначаются двумя словами: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

В микробиологии также применяют специальные термины – «штамм», «клон». *Штаммом* (от нем. *stamen*, происходит) называют культуру микроорганизмов, выделенную из определенного места обитания (почвы, воды, организма животного и т.д.). *Клон* – популяция генетически родственных клеток, полученная неполовым путем из одной родительской клетки. Разнообразные механизмы изменчивости приводят к нестабильности признаков, поэтому в систематике применяют понятие «вариант», «тип», «форма». Штамм, отличающийся от типового по морфологическим особенностям, называют *морфовар* (морфотип), физиолого-биохимическим особенностям – *биовар* (биотип, физиологический тип). По способности синтезировать определенные химические соединения – *хемовар* (хемоформа, хемотип), условиям культивирования – *культуривар*, по типу ответа на внедрение бактериофага – *фаговар* (фаготип, лизотип), антигенным характеристикам – *серовар* (серотип) и т.д.

Идентификация микроорганизмов

Принципы классификации и идентификации разных групп прокариот и эукариотических микроорганизмов имеют существенные различия. Так, для идентификации и грибов важно знать в первую очередь строение и способы образования половых структур; используется также характеристика бесполовых спороношений, строение и степень развития мицелия, культуральные и физиологические признаки. В основе систематики микроскопических водорослей лежит строение их клеток и состав пигментов;

простейших – морфологические особенности и жизненные циклы. Прокариоты морфологически менее разнообразны, поэтому их идентификация основана на фенотипических и генотипических признаках.

При описании и идентификации бактерий используют:

1. *Культуральные свойства*, т.е. характерные особенности роста бактерий на плотных и жидких питательных средах.

2. *Морфологическую характеристику и организацию клеток бактерий*. Наиболее общими признаками для идентификации являются: форма, размеры клеток, их подвижность, наличие жгутиков и тип жгутикования, способность к спорообразованию. Важным является окрашивание клеток, строение их клеточных стенок.

3. *Физиолого-биохимические свойства* включают установление способа питания, типа энергетического метаболизма (способность к брожению, аэробному и анаэробному дыханию, фотосинтезу), образование характерных продуктов метаболизма, наличие ферментов, отношение к молекулярному кислороду, температуре, рН среды и другим факторам.

4. *Изучение генотипа* основано на анализе нуклеиновых кислот (определяют молярное содержание ГЦ для определения состава ДНК, для установления генетического родства используют методы ДНК-гибридизации, ДНК-зондов, метод анализа нуклеотидных последовательностей в рибосомальных РНК и др.)

Группы прокариотических микроорганизмов

Идентификацию бактерий проводят обычно с помощью «Определителя бактерий Берджи», составленного под руководством американского бактериолога Д.Берджи (D.H. Bergey, 1860–1937). Определитель Берджи систематизирует все известные бактерии по известным распространенным принципам идентификации, основанным на различиях в строении клеточной стенки и отношении к окраске по Грамму.

В определителе выделены четыре основные категории бактерий:

1. *Грамотрицательные эубактерии, имеющие клеточную стенку.*
2. *Грамположительные эубактерии, имеющие клеточную стенку.*
3. *Эубактерии, лишённые клеточной стенки: микоплазмы или молликулы.*
4. *Архебактерии.*

Все бактерии разделены на 35 групп по легко определяемым фенотипическим признакам. Таксономическое положение бактерий внутри групп определяется с помощью таблиц и ключей, находящихся в определителе.

Лекция VII, VIII МЕТАБОЛИЗМ БАКТЕРИЙ

Метаболизм (от греч. *metabole* – изменение, перемена) – совокупность всех химических превращений, происходящих в клетке. Метаболизм складывается из двух потоков реакций: *катаболизма (энергетического*

обмена) и анаболизма (конструктивного обмена). Катаболизм (диссимилиация, энергетический метаболизм) – это поток реакций, сопровождающийся мобилизацией энергии и преобразованием ее в электрохимическую ($\Delta\mu_{H^+}$) или химическую (АТФ) форму, которая затем может использоваться во всех энергозависимых процессах. Анаболизм (ассимиляция, конструктивный метаболизм) – это поток реакций, в результате которых за счет поступающих извне веществ строится вещество клеток, процесс связан с потреблением свободной энергии.

Конструктивные и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. У большинства прокариот они тесно взаимосвязаны между собой.

Энергетический метаболизм

У прокариот известны три способа получения энергии: брожение, дыхание и фотосинтез. Во время брожения образование АТФ идет путем фосфорилирования на уровне субстрата (*субстратное фосфорилирование*). В процессах дыхания и фотосинтеза освобождающаяся энергия запасается первоначально в форме электрохимического трансмембранного градиента ионов водорода, а затем при участии мембран происходит образование АТФ. При дыхании синтез АТФ образуется в процессе электронного переноса при окислении химических соединений (*окислительное фосфорилирование*). При фотосинтезе синтез АТФ связан с фотосинтетическим электронным транспортом (*фотосинтетическое фосфорилирование*).

Брожение

Брожение – анаэробный ферментативный окислительно-восстановительный процесс превращения органических веществ, посредством которого микроорганизмы получают энергию, необходимую для жизнедеятельности. Подвергаться сбраживанию могут различные органические химические соединения: углеводы, спирты, органические кислоты, аминокислоты, пурины, пиримидины и т.д.

Любое брожение проходит в две стадии:

1-я стадия (окисление) включает превращение глюкозы в пировиноградную кислоту.

2-я стадия (восстановление) присоединение атомов водорода для восстановления пировиноградной кислоты. У микроорганизмов выделяют три пути образования триоз из углеводов: гликолитический (фруктозо-1,6 бифосфатный), пентозофосфатный и 2-кето-3-дезоксиглюконоатный (путь Энтнера–Дудорова–Парнаса). В зависимости от сбраживаемого субстрата и путей его метаболизма в результате брожения образуются спирты, органические кислоты, ацетон, углекислый газ и т.д. Согласно образуемым продуктам различают молочнокислое, спиртовое, маслянокислое, пропионовокислое и другие типы брожения.

Гомоферментативное молочнокислое брожение

В основе гомоферментативного молочнокислого брожения лежит гликолитический путь разложения углеводов (глюкозы, мальтозы, лактозы и т.д.). Энергетический выход процесса гликолиза 2 молекулы АТФ на

молекулу глюкозы. Энергетическая эффективность процесса, т.е. эффективность запасаения выделяемой свободной энергии в молекулах АТФ, составляет примерно 40%. Конечным продуктом брожения является молочная кислота, которая составляет не менее 90% всех продуктов брожения.

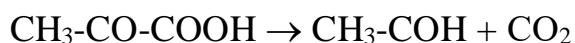
Бактерии, осуществляющие данный тип брожения морфологически разнообразны. Распространены они там, где могут обеспечить свои высокие потребности в питательных веществах. Молочнокислые бактерии используют с давних времен для получения различных кисломолочных продуктов, в процессах соления и квашения овощей, силосования кормов.

Кокковидные формы молочнокислых бактерий представлены семейством *Streptococcaceae*, родами *Streptococcus* и *Pediococcus*. Бактерии рода *Streptococcus* широко распространены в природе – на растениях, в почве, навозе, молоке и других субстратах. *S. cremoris* и *S. lactis* используют при производстве кисломолочных продуктов, кисломолочного масла и сыров. Представители родов *Pediococcus* (*P. damnosus*, *P. acidi – lactici*, *P. dextrinicus*) обитают в квашенных овощах, силосе, а также сыре, молоке, пищеварительном тракте животных и т. д.

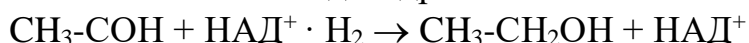
Бактерии рода *Lactobacillus* (сем. *Lactobacillus*) имеют палочковидную форму, обнаружены в молочных, зерновых, мясных продуктах, пиве, вине, соленьях и маринадах, воде, сточных водах, а также в ротовой полости и кишечном тракте человека и животных. *L. bulgaricum*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* используют при производстве кисломолочных продуктов.

Спиртовое брожение

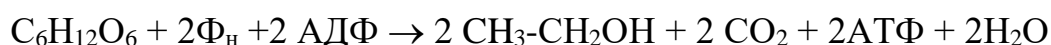
Спиртовое брожение включает превращение пирувата в CO_2 и этанол. Основными возбудителями спиртового брожения являются дрожжи. До последней реакции процесс идет по тому же пути, что и молочнокислое брожение, но последняя реакция заменена двумя другими ферментативными реакциями. Сначала пируват с помощью пируваткарбоксилазы, ключевого фермента спиртового брожения, декарбоксилируется до ацетальдегида и CO_2 (реакция необратима):



Образовавшийся ацетальдегид восстанавливается до этанола с участием НАД^+ – зависимой алкогольдегидрогеназы:



Процесс спиртового брожения суммарно можно выразить следующим уравнением:

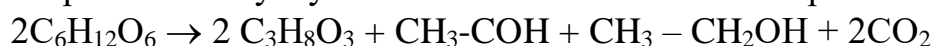


Основными продуцентами этилового спирта являются дрожжи – одноклеточные эукариотические организмы, принадлежащие к разным классам высших грибов. Их используют в виноделии, производстве спирта, пивоварении, хлебопекарном производстве. В бродильных производствах используются представители родов *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. globosus*,

S. vini и др.) и *Schizosaccharomyces* (*S. pompe*, *S. ostoporus*). Дрожжи широко распространены в природе: в почвах, на поверхностях растений и т. д.

При спиртовом брожении образуются и побочные продукты – высшие спирты (сивушные масла). К этим соединениям относятся амиловый, изоамиловый, бутиловый, пропиловый и ароматические спирты (β -фенилэтиловый спирт, *n*-оксифенилэтиловый). Эти вещества образуются из соответствующих кетокислот, синтезированных в процессе метаболизма углеводов, или из аминокислот.

Спиртовое брожение протекает обычно при pH 3–6. Если же процесс проводить в щелочной среде, то происходит накопление в сбраживаемом растворе глицерина. В щелочных условиях ацетальдегид не может акцептировать электроны, поскольку в этих условиях он участвует в реакции дисмутации с образованием уксусной кислоты и этилового спирта:



глюкоза глицерин уксусная кислота этиловый спирт

При доступе кислорода процесс спиртового брожения ингибируется и дрожжи переходят к аэробному дыханию. Это явление было открыто Л.Пастером и получило название «эффекта Пастера».

Способность осуществлять в анаэробных условиях спиртовое брожение по пути, описанному выше, присуща некоторым эубактериям, принадлежащим к разным таксономическим группам, например *Sarcina ventriculi*, *Ervinia amylovora*. Помимо этилового спирта и CO₂ в качестве продуктов брожения у *Sarcina ventriculi* в среде накапливается уксусная кислота и выделяется молекулярный кислород, у *Ervinia amylovora* – молочная кислота.

Пропионовокислое брожение

Сбраживание углеводов пропионовокислыми бактериями происходит до стадии образования пирувата. Пируват карбоксилируется, в результате образуется оксалоацетат (щавелевоуксусная кислота – ЩУК) и пропионил-КоА. Донором CO₂-группы служит метилмалонил-КоА. ЩУК в результате трех ферментативных этапов превращается в янтарную кислоту. Затем с пропионил-КоА на янтарную кислоту переносится КоА-группа, в результате чего образуется сукцинил-КоА и пропионовая кислота. Сукцинил-КоА превращается в метилмалонил-КоА, а пропионовая кислота выводится из процесса и накапливается вне клетки.

Пропионовокислое брожение – сложный процесс, наряду с пропионовой кислотой в качестве продуктов брожения образуются уксусная, янтарная кислоты и CO₂. В культуральной жидкости пропионовокислых бактерий обнаружены молочная, мурабиная, изовалерьяновая кислоты, этиловый и пропиловый спирты, уксусный и пропионовый альдегиды, ацетон, диацетил. Состав конечных продуктов зависит от культуры бактерий, состава среды и условий культивирования.

Пропионовокислое брожение осуществляется бактериями семейства *Propionibacteriaceae* рода *Propionibacterium*. Различают несколько видов

пропионовокислых бактерий, из которых широко известны *Propionibacterium freudenreichii* и *Propionibacterium acidi-propionici*. Пропионовокислые бактерии используют в производстве твердых сычужных сыров. Продукты брожения придают сырам специфический вкус и способствуют образованию дырок.

Маслянокислое брожение

Осуществляют такой тип брожения бактерии рода *Clostridium*, типичными представителями являются *C. butyricum* и *C. pasteurianum*. Они сбраживают сахара с образованием масляной и уксусной кислот, CO_2 . Превращение глюкозы до пирувата идет по гликолитическому пути. Пируват разлагается до ацетил-КоА и CO_2 , при этом восстанавливается ферродоксин. Из ацетил-КоА через ацетилфосфат синтезируется ацетат.

Путь ведущий с синтезу масляной кислоты, начинается с реакции конденсации двух молекул ацетил-КоА. Образовавшийся ацетоацетил-КоА восстанавливается в β -оксибутирил-КоА, источником электронов служат НАД $\cdot\text{H}_2$. От β -оксибутирил-КоА отщепляется молекула воды и образуется кротонил-КоА, который ферментативно восстанавливается в бутирил-КоА. Кофермент А переносится с бутирил-КоА на ацетат и образуется масляная кислота.

Некоторые клостридии (*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. cellobiogram* и др.) при сбраживании сахаров наряду с кислотами накапливают в среде нейтральные продукты (бутиловый, изопропиловый, этиловый спирты, ацетон). Особенно много нейтральных продуктов образуется при брожении, осуществляемом бактериями *C. acetobutylicum*. Поэтому выделяют как вариант маслянокислого брожения – **ацетоно-бутиловое брожение**.

При ацетоно-бутиловом брожении образовании масляной кислоты происходит на первом этапе брожения. По мере подкисления среды (до pH ниже 5) и повышения в ней концентрации жирных кислот индуцируется синтез ферментов, приводящих к синтезу нейтральных продуктов.

Ацетоно-бутиловое брожение используют для получения в промышленном масштабе ацетона и бутанола.

Альтернативные пути сбраживания

Кроме гликолитического известны еще два пути расщепления углеводов – окислительный пентозофосфатный и 2-кето-3-дезоксиглюконолатный, или путь Энтнера-Дудорова.

У гетероферментативных молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* отсутствует ключевой фермент гликолитического пути – фруктозодифосфатаальдолаза, поэтому сбраживание субстратов осуществляется по окислительному пентозофосфатному пути. При **гетероферментативном молочнокислом брожении** образуется смесь различных продуктов.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии имеют огромное практическое значение. Их широко используют при изготовлении кисломолочных продуктов, сыров, кислосливочного масла и т.п.

Бифидобактерии – обитатели кишечника человека, животных, насекомых. Они являются антоганистами гнилостной и болезнетворной кишечной микрофлоры человека, так как способны синтезировать органические антибиотики (низин, диплококцин, лактолин и др.).

Путь Энтнера-Дудорова функционирует у широкого круга эубактерий (у аэробных видов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter* и других; у анаэробных встречается редко, например, *Zygomonas tomitis*).

Дыхание

Дыхание – это окислительно-восстановительный процесс, сопровождающийся синтезом АТФ. Окисляемыми субстратами (донорами водорода/электронов) у бактерий могут быть как органические, так и неорганические соединения. Если в реакциях окисления конечным акцептором электронов служит молекулярный кислород, то такой тип дыхания называется *аэробным*, если терминальными акцепторами являются другие соединения (нитраты, сульфаты, карбонаты и др.) дыхание называют *анаэробным*.

Аэробное дыхание

Аэробное дыхание – наиболее распространенный процесс получения энергии у микроорганизмов. Среди микроорганизмов есть как строгие, так и факультативные аэробы. Последние способны расти как в присутствии так и отсутствии кислорода.

В процессе аэробного дыхания происходит полное окисление субстрата, восстановление переносчиков (НАД · Н₂, НАДФ · Н₂, ФАД · Н₂), которые поступают в дыхательную цепь, функционирование которой приводит к запасанию энергии.

Базовым субстратом, который используют бактерии при дыхании и брожении является глюкоза. Многие реакции катаболизма глюкозы протекают у аэробных и анаэробных бактерий одинаково. Гликолиз доминирует у большинства микроорганизмов. Образовавшийся пируват полностью окисляется в циклическом процессе – цикле трикарбоновых кислот (ЦТК, цикле Кребса).

ЦТК начинается с конденсации ацетил-КоА с молекулой щавелевоуксусной кислоты, катализируемой цитратсинтетазой. Продуктами реакции являются лимонная кислота и свободный кофермент А. Лимонная кислота с помощью фермента аконитазы последовательно превращается в цис-аконитовую и изолимонную кислоты. Последняя превращается в α-кетоглутаровую кислоту в реакции, катализируемой изоцитратдегидрогеназой. На первом этапе реакции имеет место дегидрирование изолимонной кислоты, в результате которого образуется щавелевоянтарная кислота и НАД·Н₂. На втором этапе щавелевоянтарная кислота подвергается декарбоксилированию. Продукты реакции – α-кетоглутаровая кислота и СО₂.

α-Кетоглутаровая кислота подвергается далее окислительному декарбоксилированию, катализируемому α-кетоглутаратдегидрогеназным

комплексом, в результате чего образуется сукцинил-КоА. Из сукцинил-КоА образуется янтарная кислота под действием фермента сукцинилтиокиназы, в результате реакции энергия, освобождающаяся при разрыве тиоэфирной связи, запасается в фосфатной связи ГТФ. ГТФ затем отдает свою фосфатную группу молекуле АТФ, что приводит к образованию АТФ.

Янтарная кислота окисляется в фумаровую с помощью фермента сукцинатдегидрогеназы. Далее фумаровая кислота гидратируется под действием фермента фумаразы, в результате чего возникает яблочная кислота, которая подвергается дегидрированию, приводящему к образованию ЩУК. Реакция катализируется НАД-зависимой малатдегидрогеназой. Этой реакцией завершается ЦТК, так как вновь регенерируется молекула-акцептор (ЩУК), запуская следующий оборот цикла. Однако поскольку из цикла происходит постоянный отток для биосинтезов промежуточных метаболитов, приводящих к понижению уровня ЩУК, возникает необходимость в ее дополнительном синтезе. Это обеспечивается как в реакциях карбоксилирования пирувата или фосфоенолпирувата, так и с помощью последовательности из двух реакций, получивших название глиоксилатного шунта. В первой из них изолимонная кислота под действием изоцитратлиазы расщепляется на янтарную и глиоксилую кислоты. Во второй реакции, катализируемой малатсинтетазой, глиоксилуая кислота конденсируется с ацетил-КоА с образованием яблочной кислоты, превращающейся далее в ЩУК. В результате двух новых реакций происходит синтез C_4 -кислоты из двух остатков C_2 -остатков. Глиоксилатный шунт не работает при выращивании на субстратах, катаболизирование которых приводит к образованию пировиноградной кислоты. Он включается при выращивании организмов на C_2 -соединениях.

Субстратами, перерабатываемыми в ЦТК, могут быть, помимо углеводов, и жирные кислоты (после предварительной деградациии до ацетил-КоА), а также многие аминокислоты (после удаления аминогруппы в реакциях дезаминирования и переаминирования). В результате одного оборота цикла происходят два декарбоксилирования, четыре дегидрирования, одно фосфорилирование. Итогом является образование двух молекул CO_2 , трех молекул $НАД \cdot H_2$, одной молекулы $ФАД \cdot H_2$.

ЦТК имеет важное значение не только для дыхания, но и для биосинтеза. Образующиеся в ЦТК соединения могут трансформироваться в аминокислоты, жиры, углеводы и становиться частью структуры клетки.

Электроны с восстановленных переносчиков $НАД \cdot H_2$, $ФАД \cdot H_2$ поступают в дыхательную цепь, локализованную в цитоплазматической мембране. Дыхательные электротранспортные цепи микроорганизмов состоят, подобно дыхательным цепям митохондрий, из большого числа переносчиков электронов и протонов. У разных групп бактерий дыхательные цепи различаются по составу переносчиков.

Согласно хемиосмотической теории П. Митчелла в дыхательной цепи происходит сопряжение электронного транспорта с фосфорилированием. Электроны, поступив на дыхательную цепь, проходят ряд этапов и

акцептируются конечным акцептором. Мембрана непроницаема для протонов, однако в ней есть три участка, где происходит выделение протонов во внешнюю среду (первый участок расположен в начале дыхательной цепи и связан с функционированием НАД (Ф)·Н₂-егидрогеназы; второй – определяется способностью эйхинина переносить водород; третий локализован в конце дыхательной цепи и связан с активностью цитохромоксидазы). Вывод протонов ведет к созданию между наружной и внутренней сторонами мембраны трансмембранного электрохимического градиента, или протонного потенциала, энергия которого идет на синтез АТФ.

Полное окисление одной молекулы глюкозы приводит к образованию 38 молекул АТФ. Две молекулы АТФ образуются в процессе гликолиза, две – в ЦТК. Перенос каждой пары электронов с НАД · Н₂ приводит к синтезу 30 молекул АТФ (2 молекулы НАД · Н₂ дает процесс гликолиза, 2 молекулы НАД · Н₂ – окислительное декарбоксилирование пирувата, 6 молекул НАД · Н₂ – ЦТК). Перенос каждой пары электронов с ФАД · Н₂ приводит к синтезу 2 молекул АТФ, при двух оборотах – 4 молекулы АТФ.

Анаэробное дыхание

Вместо О₂ некоторые бактерии могут использовать в качестве конечного акцептора электронов ряд окисленных органических и неорганических соединений (табл. 6). Процессы идут в анаэробных условиях, их называют анаэробным дыханием. При анаэробном дыхании выход энергии на 10% ниже, чем при аэробном. Анаэробные дыхательные цепи содержат те же типы переносчиков, что и аэробные, но цитохромоксидазы заменены на соответствующие редуктазы (нитратредуктаз при нитратном дыхании, сульфатредуктазой – при сульфатном дыхании и т.д.). Бактерии, способные осуществлять анаэробное дыхание, относятся к хемолитотрофам и хемоорганотрофам. К хемолитотрофам относятся *тионовые* бактерии (р. *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thiodendron* и др.), использующие серу и соединения серы; *железобактерии* (р. *Leptothrix*, *Sphaerotilus*, *Metallogenium*, *Thiobacillus*), окисляющие и откладывающие окислы железа и/или марганца; *нитрифицирующие* бактерии (р. *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*), окисляющие восстановленные соединения азота; *водородные бактерии* (р. *Hydrogenobacter*, р. *Paracoccus*), окисляющие молекулярный водород; карбонидобактерии (р. *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Comamonas*), использующие окись углерода (СО).

К хемоорганотрофам относятся *метилотрофы* (р. *Methylococcus*, *Methylomonas*), использующие метан, метанол, формальдегид в качестве источника углерода и энергии; *уксуснокислые* бактерии (р. *Gluconobacter*, *Acetobacter*), окисляющие этанол, глюкозу и другие вещества; *аммонифицирующие* бактерии (р. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*); *денитрифицирующие* бактерии (р. *Rhodospseudomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), *бактерии, разрушающие целлюлозу* (р. *Clostridium*, *Cellulomonas*) и др.

Фотосинтез

Фотосинтез (греч. *фотос* – свет; *синтез* – соединение, сочетание, составление) – синтез органических веществ за счет энергии солнечного света. В отличие от растений, только часть бактерий способна к фотосинтезу. У бактерий известны два типа фотосинтеза. Цианобактерии и прохлорофиты осуществляют кислородный фотосинтез (с выделением кислорода), у пурпурных, зеленых и гелиобактерий фотосинтез идет без выделения кислорода – аноксигенный фотосинтез.

Реакции фотосинтеза осуществляются в две фазы. В первой (световой) фазе происходит поглощение кванта света фотосинтетическими пигментами и преобразование электромагнитной энергии в химическую. Во второй фазе (темновой) АТФ и НАДФН₂ используются для восстановления СО₂ в органические вещества.

Пигменты фотосинтезирующих бактерий

У фотосинтезирующих организмов обнаружены пигменты, в основе которых лежит тетрапиррольная группировка – это *флорофиллы* и *фикобилипротеины*, и пигменты, состоящие из длинных полиизопреноидных цепей – *каротиноиды*.

Цианобактерии содержат хлорофилл *a*, прохлорофиты – *a* и *b*. Наличие этих пигментов обеспечивает поглощение света до 750 нм.

Хлорофиллы бактерий, осуществляющие аноксигенный фотосинтез, называются бактериохлорофиллами. Все пурпурные бактерии содержат хлорофилл *a* или *b* (рис. 30; табл.7). Основными хлорофильными пигментами зеленых бактерий являются бактериохлорофиллы *c*, *d*, или *e*, в небольшом количестве *a*. Необычный бактериохлорофилл *g* обнаружен у гелиобактерий.

Фикобилипротеины (красные и синие пигменты) имеются только у цианобактерий. Хромофорная группа пигмента (фикобилин) ковалентно связана с водорастворимым белком типа глобулина и представляет собой структуру, состоящую из четырех не замкнутых пиррольных колец. Фикобилипротеины обеспечивают в клетках цианобактерий поглощение света в области 450–700 нм и с высокой эффективностью передают поглощенный свет на хлорофилл.

Каротиноиды (вспомогательные фотосинтетические пигменты) представляют собой продукт конденсации остатков изопрена (чаще восьми изопреноидных остатков). У некоторых каротиноидов (алифатических) полиизопреноидная цепь открыта и не содержит циклических группировок. У большинства каротиноидов на одном или обоих концах цепи расположены по ароматическому или β-иононовому кольцу. Каротиноиды первого типа относятся к арильным, второго – к алициклическим. Выделяют каротиноиды, не содержащие в молекуле кислорода, и кислородсодержащие каротиноиды – ксантофиллы.

Наиболее разнообразен состав каротиноидных пигментов у пурпурных бактерий. Набор и количество отдельных каротиноидов определяют окраску пурпурных бактерий, суспензии которых имеют пурпурно-фиолетовый, красный, розовый, коричневый, желтые цвета. Основные каротиноиды

зеленых бактерий – арильные, содержащие один или два ароматических кольца, а также алициклический каротиноид – γ -каротин. У цианобактерий и прохлорофит основным каротиноидом является β -каротин (рис. 32).

Каротиноидные пигменты поглощают свет в синем и зеленом участках спектра (в области длин волн 400–550 нм). Каротиноиды поглощают кванты света в коротковолновой области и передают их на хлорофилл. Также как и хлорофиллы, каротиноиды локализованы в мембранах и связаны с мембранными белками без участия ковалентных связей.

Фотосинтетический аппарат

Фотосинтетический аппарат бактерий состоит из трех основных компонентов:

- 1) светособирающих пигментов, поглощающих энергию света и передающих ее в реакционные центры;
- 2) фотохимических реакционных центров, где происходит трансформация электромагнитной энергии в химическую;
- 3) фотосинтетических электронотранспортных систем, обеспечивающих перенос электронов, сопряженный с запасанием энергии в молекулах АТФ.

В фотохимических реакциях участвуют, как правило, хлорофиллы или бактериохлорофиллы *a* в модифицированной форме. Эти виды хлорофиллов выполняют функции антенн (табл. 8).

Реакционные центры и электронотранспортные системы всегда локализованы в мембранах (ЦПМ или производных ЦПМ). Локализация светособирающих пигментов в разных группах фотосинтезирующих бактерий различна. У пурпурных, гелиобактерий и прохлорофит светособирающие пигменты в виде комплексов с белками локализованы в мембране (рис.33, А). В клетках зеленых бактерий светособирающие пигменты находятся в хлоросомах, прикрепленных к поверхности мембраны; у цианобактерий – в фикобилисомах

В хлоросомах зеленых бактерий бактериохлорофиллы организованы в виде палочковидных структур (диаметром 5–10 нм), расположенных параллельно длинной оси хлоросомы. В основании хлоросомы, примыкающей к ЦПМ, расположен слой молекул бактериохлорофилла *a* (рис. 33, Б).

У всех цианобактерий (за исключением *Gloebacter violaceus*) имеется развитая система внутрицитоплазматических мембран – тилакоидов, к наружной поверхности которых прикреплены фикобилисомы. Внутреннее ядро фикобилисомы составляют молекулы аллофикоцианина. К нему примыкают расходящиеся в разные стороны палочковидные образования, построенные из агрегированных молекул фикоцианина и фикоэритрина.

Фотофизические процессы

В темноте молекула хлорофилла находится в стабильном невозбужденном состоянии. Когда квант света падает на молекулу хлорофилла, порция энергии этого кванта поглощается одним из электронов, который переходит на новый, более богатый энергией уровень, а молекула

хлорофилла переходит при этом в возбужденное состояние. Время жизни молекулы хлорофилла в возбужденном состоянии очень коротко (10^{-13} – 10^{-7} с), после чего молекула возвращается в исходное состояние. Энергия, поглощенная электроном, теряется при этом в виде тепла, флуоресценции или фосфоресценции.

В клетке молекулы хлорофилла достаточно жестко сопряжены друг с другом в светособирающих комплексах, поэтому перешедшая в возбужденное состояние молекула пигмента передает энергию поглощенного кванта света соседней молекуле, переводя ее в возбужденное состояние. Энергия возбуждения мигрирует в направлении от пигментов, поглощающих свет более коротких длин волн, к более длинноволновым формам и от последних поступает в реакционные центры.

Фотохимические процессы

Преобразование электромагнитной энергии в электрохимическую происходит в реакционных центрах. Реакционные центры состоят из первичного донора электронов, первичного акцептора и одного или более вторичных акцепторов электронов.

В качестве первичного донора могут выступать бактериохлорофилл *a*, *b* (пурпурные серные и несерные бактерии), бактериохлорофилл *g* (гелиобактерии), хлорофилла *a* (цианобактерии, прохлорофиты).

Первичным акцептором могут быть бактериофеофетин *a*, *b*, *c* (пурпурные серные и несерные бактерии, зеленые бактерии), вторичным акцептором – убихинон, менахинон (пурпурные серные и несерные бактерии, зеленые бактерии), пластохинон (цианобактерии).

Индуцированные светом перемещения электрона приводят его к переносу на вторичный акцептор. Затем электрон поступает на переносчики электронов, локализованные в фотосинтетической мембране.

Рис. 35. Организация фотосинтетического аппарата разных групп эубактерий

Электрон может возвратиться на «свое» место в молекуле хлорофилла (циклический транспорт электронов) и не возвратиться и выйти из «системы» (нециклический путь переноса электронов). Электрон при этом переходит на клеточные метаболиты (НАД(Ф)⁺ и окисленный ферродоксин). У пурпурных и зеленых нитчатых бактерий функционирует только циклический поток электронов, у других как циклический, так и нециклический. У зеленых серобактерий и гелиобактерий оба пути транспорта электронов связаны с функционированием одной фотосистемы, у цианобактерий и прохлорофит циклический перенос электронов зависит от активности фотосистемы I, а для нециклического потока необходимо функционирование обеих фотосистем (рис. 35).

Фотофосфорилирование, сопряженное с циклическим потоком электронов, получило название циклического фотофосфорилирования. Нециклическим фотофосфорилированием называется синтез АТФ, сопряженный с нециклическим электронным транспортом.

При нециклическом потоке электронов электронная «вакансия» («дырка») заполняется электронами, донорами которых являются как органические, так и неорганические вещества (H_2S , сульфит, молекулярная сера и др.) (рис.35, А, Б).

VII. 1.3. 5. Фиксация CO_2 фотосинтезирующими бактериями

Основным путем фиксации CO_2 у всех высших фотосинтезирующих организмов, пурпурных бактерий, цианобактерий, прохлорофит является цикл Кальвина (восстановительный пентозофосфатный путь). Акцептором CO_2 выступает молекула пентозы – рибулозо-дифосфат. Образовавшиеся молекулы 3-ФГА подвергаются серии последовательных реакций, ведущих к образованию молекулы глюкозы (рис. 37).

У зеленых серобактерий фиксация CO_2 идет по механизму, обнаруженного Д. Арноном в реакциях восстановительного ЦТК (цикл Арнона) (рис. 36). В цикле углекислота фиксируется в четырех ферментативных реакциях, конечный продукт цикла – молекула ЩУК.

Конструктивный метаболизм

Конструктивный метаболизм (пластический обмен) – совокупность биосинтетических реакций. Для биосинтеза основных клеточных компонентов микроорганизмы используют соединения-предшественники. Если эти предшественники находятся в окружающей среде, они непосредственно вовлекаются в различные биосинтетические пути, если же их нет, то они синтезируются из доступных исходных продуктов.

Биосинтез аминокислот и белков. Большинство микроорганизмов способны синтезировать все необходимые им аминокислоты. Основными исходными соединениями для синтеза аминокислот являются пируват (образуется в гликолитическом цикле), α -кетоглутарат и фумарат (образуются в ЦТК). Азот вводится в аминокислоты посредством реакций переаминирования, только L-аланин, L-глутамат и аспарат образуются путем прямого аминирования.

Аминокислоты идут на биосинтез белков клетки. Микроорганизмы способны синтезировать несколько тысяч различных белков. Информация об этих белках закодирована в последовательности нуклеотидов ДНК. Синтез белков осуществляется в цитоплазме на рибосомах.

Биосинтез углеводов. Фототрофные организмы образуют гексозы в результате восстановления CO_2 . Гексозы трансформируются в крахмал, целлюлозу и другие полисахариды.

В клетках других организмов углеводы образуются из не углеводных предшественников (аминокислот, глицерина, молочной кислоты) в процессе глюконеогенеза.

Биосинтез липидов. В клетках эубактерий компонентами липидов являются в основном насыщенные жирные кислоты, полиненасыщенные найдены только у цианобактерий. Жирные кислоты синтезируются отдельно, а затем с помощью эфирной связи включаются в липиды.

Биосинтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Большинство микроорганизмов способны к синтезу пуриновых и пиримидиновых

оснований *de novo* из низкомолекулярных соединений. Пуриновые нуклеотиды построены на основе фосфорибозилпирофосфата, а пиримидиновые формируются в серии последовательных превращений, начиная с карбонилфосфата. Синтезированные нуклеотиды идут на синтез нуклеиновых кислот, коферментов, богатых энергией соединений.

Глава IX ВИРУСЫ

Вирусы (от лат. *virus* – яд) – это внеклеточная форма жизни, обладающая собственным геномом и способная к воспроизведению только в клетках живых организмов. Вирусы проникают в растительные, животные ткани, бактерии (вирусы бактерий называют бактериофагами). Вирусы являются внутриклеточными паразитами на генетическом уровне и используют для своего размножения белоксинтезирующий аппарат клетки-хозяина.

Вирусы классифицируют на основе их морфологических, химических, биофизических свойств и особенностей репродукции. Виды объединяют в роды и семейства. Название всех вирусных родов оканчивается словом «*virus*» (*Enterovirus*, *Reovirus*), для названия семейств используется суффикс «*idae*» (*Poxviridae*, *Herpesviridae*), а подсемейств «*inae*» (*Chordopoxvirinae*, *Entomopoxvirinae*).

Строение вирусов

Все вирусы условно делятся на простые и сложные. Простые вирусы («голые») состоят из одной или нескольких молекул ДНК (ДНК-содержащие вирусы) или РНК (РНК-содержащие вирусы), заключенных в белковую оболочку – капсид (от греч. *capsa* – ящик). Сложные вирусы («одетые») имеют вторую оболочку – суперкапсид, который наряду с белками содержит липопротеидную мембрану, углеводы и неструктурные белки – ферменты. Суперкапсидные вирусные белки могут образовывать различные шипы и обладают жизненно важными для вирусов функциями: распознают клеточные рецепторы, связываются с ними, обеспечивают проникновение вирусов и их распространение в организме, обладают антигенными свойствами.

Формы вирусов многообразны: палочковидные, нитевидные, сферические, кубовидные, булавовидные и др. (рис. 38; 39).

ДНК или РНК вирусов могут быть одно- и двуцепочечными, кольцевыми и линейными (рис. 40). Значения масс ДНК вирусов находятся в пределах $1 \cdot 10^6$ – $200 \cdot 10^6$; РНК – $1 \cdot 10^6$ – $15 \cdot 10^6$ дальтона.

Репродукция вирусов

Репликация генетического материала вирусов, а также экспрессия вирусных генов осуществляется при помощи механизмов репликации, транскрипции и трансляции инфицированной клетки-хозяина.

Живая клетка окружена липидной бислоидной мембраной, которая препятствует проникновению вируса. Однако вирусы имеют способы преодоления этих барьеров. Некоторые вирусы используют для

проникновения в клетку рецептор-опосредуемый эндоцитоз. У вирусов, имеющих липидную мембрану, есть второй путь проникновения в клетку. При этом способе происходит слияние двух мембран (вирусной и клеточной), с образованием сквозного отверстия, через которое содержимое вируса входит в клетку. Этот путь использует вирус СПИДа.

Вирусы бактерий (бактериофаги) проникают в клетку иным способом. Так, бактериофаг λ прикрепляется к клеточной стенке нитевидным хвостом и с его помощью вводит ДНК в бактериальную клетку.

Репродуктивный цикл вируса начинается после высвобождения его генома в цитоплазму. Для образования (сборки) дочерних вирусных частиц необходим синтез генетического вируса, экспрессия генетического материала и образование вирусных белков. В зависимости от типа генетического материала (ДНК и РНК), образование дочерних копий геномов протекает по-разному.

РНК-содержащие вирусы делятся на три группы: 1) вирусы, содержащие однополовую геном с положительной полярностью (+РНК-цепь), т.е. с нуклеотидной последовательностью, соответствующей таковой у мРНК; 2) вирусы, содержащие однополовую геном с отрицательной полярностью (-РНК-цепь); 3) вирусы, имеющие двуцепочечные геномы. Если (+) РНК-цепь попадает в клетку, то ее белоксинтезирующий аппарат может немедленно транслировать РНК, производя вирусные белки, в том числе ферменты, необходимые для репродукции вируса. (-) РНК-цепь не может выполнять функции мРНК, поэтому вирус внедряет в клетку не только геном, но и фермент, умеющий снимать с этого генома комплементарные копии. Фермент (РНК-зависимая РНК-полимераза) копирует вирусный геном, образуя (+)РНК, которая выступает в качестве матрицы для синтеза вирусных белков. Двуцепочечные геномы вирусов сегментированы (т.е. состоят из нескольких разных молекул), их размножение происходит по варианту, близкому к предыдущему.

Имеется один класс вирусов, содержащих (+)РНК-цепь – *ретровирусы*. В эту группу входят вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и некоторые возбудители злокачественных новообразований. В вирусном геноме закодирован необычный фермент (обратная транскриптаза, или ревертаза). Этот фермент попадает в заражаемую клетку вместе с вирусной РНК и обеспечивает синтез ее ДНК-копии сначала в одноцепочечной форме, затем в двуцепочечной ДНК, которая встраивается в хромосому клетки-хозяина. Провирусные гены (гены вируса в хромосомах хозяина) транскрибируются в ядре клетки в (+)РНК-транскрипты. Одни из них становятся геномом нового потомства вирусов, а другие используются для трансляции белков, необходимых для сборки вирусных частиц.

Репликация ДНК-содержащих вирусов (двуцепочечных) осуществляется по схеме ДНК \rightarrow РНК \rightarrow белок. Молекулы РНК образуются в результате транскрипции вирусных ДНК в клеточном ядре хозяйским ферментом ДНК – зависимой РНК-полимеразой. Транскрибируется только одна из нитей вирусной ДНК. Синтез ДНК на РНК-матрицы происходит в

результате реакций, катализируемой обратной транскриптазой; сначала синтезируется (-) нить ДНК, а затем на ней строится (+) нить. Если вирусы содержат одноцепочечную ДНК (+ или -) в ходе репликации с использованием фермента клетки-хозяина образуется двуцепочечная ДНК, с которой транскрибируется мРНК.

Лекция X

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Рост и распространение микроорганизмов в природе определяется условиями внешней среды. На жизнедеятельность микроорганизмов оказывают влияние физические и химические факторы.

Физические факторы

Среди физических факторов наибольшее значение имеют температура, влажность, кислотность среды, наличие кислорода, влияние лучистой энергии, давления.

Температура. По отношению к температуре микроорганизмы делятся на три группы: психофилы, мезофиллы и термофилы. *Психофильные виды* (от греч. *psychros* – холод + *phileo* – любить) растут в диапазоне – 10 до + 20⁰С. Среди них есть как облигатные так и факультативные виды. Облигатные психофилы приспособились к устойчивым холодным условиям (глубины морей и океанов, ледяные пещеры, высокогорные районы), облигатные психофилы обитают в неустойчивых холодных условиях.

Мезофильные виды (от греч. *mesos* – тепло + *phileo* – любить) лучше растут в пределах 20 – 40⁰С. В эту группу входят большинство микроорганизмов, среди них много патогенных и условно-патогенных.

Термофильные виды (от греч. *thermo* – тепло + *phileo* – любить) растут при температуре 40⁰С и выше. Среди термофилов выделяют термотолерантные факультативные, облигатные и экстремальные виды. Термотолерантные виды растут в пределах от 10 до 55–60⁰С, оптимум лежит при 35–40⁰С. Факультативные термофилы имеют максимальную температуру роста между 50 и 65⁰С, но способны размножаться и при комнатной температуре. При температуре около 70⁰С растут облигатные термофилы, их рост прекращается при 40⁰С. Температурный оптимум для экстремальных термофилов лежит в пределах 80–105⁰С. К экстремальным термофилам относятся организмы из группы архебактерий. Основное место их обитания – горячие источники. Механизмы, обеспечивающие существование архебактерий при повышенных температурах до конца не известны. Предполагают, что определенную роль в этом играют липидные компоненты клеточных мембран с высоким содержанием длинноцепочечных C₁₇–C₁₉ насыщенных жирных кислот с разветвленными цепями, а также высокая термостабильность белков, ферментов и структурных компонентов клетки.

Высокая температура вызывает коагуляцию структурных белков и ферментов микроорганизмов. Большинство вегетативных форм гибнет при температуре 60⁰С в течение 30 мин, а при 80–100⁰С через мин. Температурные

воздействия применяют для стерилизации – полного удаления микроорганизмов из различных сред и обеззараживания предметов. Существует несколько способов стерилизации. Самыми простыми являются прокаливание и кипячение. Эффективным методом является автоклавирование – обработка горячим паром под высоким давлением. Стерилизация сухим жаром проводится в сухожаровых шкафах при 160°C в течение 2 ч, что позволяет уничтожать не только вегетирующие клетки, но и споры бактерий. В пищевой промышленности используют пастеризацию (нагревание до 60–80°C в течение 10–30 мин).

Кислотность среды. Для большинства микроорганизмов оптимальные значения кислотности среды около рН 7 (нейтрофилы), при крайних значениях рН1 (ацидофилы) и рН 11(алкалофилы) могут существовать лишь немногие из них.

Нейтрофилы развиваются в диапазоне рН 4–9 (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* и др.). Среди нейтрофильных бактерий есть микроорганизмы, обладающие кислото- и щелочеустойчивостью (толерантностью).

Для *алкалофилов* предпочтительна щелочная реакция среды (рН 10 и выше). Некоторые нитрат- и сульфатвосстанавливающие бактерии могут существовать при рН выше 11.

Ацидофилы растут при рН ниже 6. Археобактерии *Sulfolobus acidocaldarius* растут при рН от 1 до 5, 8, оптимальная область рН 2–3.

Наличие кислорода. По отношению к молекулярному кислороду все микроорганизмы делятся на *аэробы* (для их роста необходим кислород) и *анаэробы* (кислород для роста не нужен). Среди как аэробов, так и анаэробов есть облигатные и факультативные виды.

Существуют облигатно аэробные (строгие) прокариоты, которые потребляют кислород, но хорошо растут при содержании его в меньшей концентрации, чем в атмосфере. Такие микроорганизмы называют *микроаэрофильными*. Среди облигатных аэробов существуют различия в устойчивости к высоким уровням O₂ в среде. 100% молекулярный кислород подавляет рост всех облигатных аэробов.

Многие из облигатных анаэробов не выносят присутствия даже незначительных количеств молекулярного кислорода в среде и быстро погибают. К числу строгих анаэробов относятся представители родов *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Butyrivibrio* и др. Есть виды умеренно (*Clostridium tetani*, *C. carnis*, *C. tertium*) или достаточно высоко (*C. perfringens*, *C. acetobutylicum*) *толерантные* к O₂. Молочнокислые бактерии относятся к *аэротолерантным анаэробам*, они обладают метаболизмом анаэробного типа, но могут расти и в присутствии воздуха.

Известны микроорганизмы, которые приспособились, в зависимости от наличия или отсутствия O₂ в среде, переключаться с одного метаболического пути на другой, например, с дыхания на брожение, и наоборот. Такие организмы называют факультативными анаэробами или факультативными аэробами. К ним относятся, например, энтеробактерии.

Излучение. Свет является необходимым фактором для фотосинтезирующих микроорганизмов, но для большинства других бактерий свет губителен. Спектр солнечной активности содержит неионизирующие (УФ- и инфракрасные лучи) и ионизирующее (например, γ -лучи). Наибольший микробицидный эффект оказывают коротковолновые УФ-лучи (250–270 нм), которые действуют на нуклеиновые кислоты. Повреждения ДНК ведут к появлению нежизнеспособных мутантов.

Влажность. Микроорганизмам для роста и размножения необходима влага. Жизнедеятельность большинства бактерий прекращается при относительной влажности среды ниже 30%. Время отмирания бактерий при высушивании различно, например, холерный вибрион погибает за 2 суток, микобактерии – за 90 суток.

Метод искусственного высушивания (лиофилизацию) используют для сохранения иммунобиологических препаратов (вакцин, сывороток), а также для консервирования и длительного сохранения микроорганизмов. Высушивание применяют при консервировании сухих продуктов и изготовлении сухих концентратов пищевых продуктов.

Химические факторы

Химические вещества могут подавлять рост и размножение микроорганизмов. Действие веществ зависит от их концентрации, природы, особенностей микроорганизма, факторов внешней среды.

В медицинской практике широко используют различные виды дезинфектантов и антисептиков. Дезинфектанты используют для обработки помещений и предметов, антисептики – для обработки живых тканей.

Галогены и галогенсодержащие препараты (препараты йода и хлора) используют как дезинфектанты и антисептики. Они взаимодействуют с гидроксильными группами белков, нарушая их структуру. *Альдегиды* (формальдегид, глутаральдегид) алкилируют сульфгидрильные, карбоксильные и аминокгруппы белков и других соединений, вызывая гибель микроорганизмов. *Кислоты* (борная, бензойная, уксусная, салициловая), *щелочи* (раствор аммиака), *металлы* (нитрат серебра, сульфат меди, хромат ртути), красители (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий), окислители (перекись водорода, перманганат калия) применяют как антисептики. *Фенолы* (гексахлоран, хлорофен, тимол) денатурируют белки и нарушают структуру клеточной стенки, широко используются в качестве дезинфектантов.

В отличие от дезинфектантов и антисептиков, имеющих неспецифическое действие, *химиотерапевтические средства* проявляют избирательное противомикробное действие. Антибактериальные, противогрибковые, антипротозойные препараты тормозят рост, либо вызывают гибель микроорганизмов. Антибиотики (от греч. *anti* – против + *bios* – жизнь) – широкий класс антибактериальных препаратов, имеют различный механизм действия. Они способны подавлять процессы синтеза компонентов клеточной стенки, синтеза белка и нуклеиновых кислот и др.

Механизм действия большинства противогрибковых средств связан с нарушением синтеза стеролов, входящих в состав клеточной стенки. Противопротозойные препараты угнетают уникальные ферменты простейших. Противовирусные препараты ингибируют репликацию вирусов.

Глава XI

ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Вездесущность микроорганизмов обусловлена их разнообразием и способностью использовать любые источники питания. В биосфере нет такой среды, в которой не встречались бы микроорганизмы. Образуя сложные ассоциации (микробные сообщества), они играют колоссальную роль в природе, круговороте веществ, поддерживают динамическое равновесие биосферы.

Биогеохимическая деятельность микроорганизмов

Микроорганизмам принадлежит первостепенная роль в круговороте, миграции, распределении и концентрации химических элементов в биосфере. Некоторые этапы круговорота веществ могут осуществляться только прокариотами.

Круговорот углерода

Циклические превращения углерода (и кислорода) реализуются через два разнонаправленных процесса: фотосинтез и дыхание. При фотосинтезе происходит потребление углерода (в виде CO_2) и перевод его в органические соединения. В этом процессе участвуют зеленые растения, водоросли и фотосинтезирующие микроорганизмы. Потребление углерода уравнивается распадом органических веществ. Полное окисление органических веществ до CO_2 в присутствии кислорода осуществляют многие аэробные (псевдомонады, бациллы) и факультативно анаэробные бактерии (актиномицеты), грибы, животные. В анаэробных условиях органические соединения расщепляются путем брожения.

Углерод может извлекаться из круговорота. Так, ионы карбоната, содержащиеся в морской воде, соединяясь с растворенными ионами Ca^{2+} , осаждаются в виде CaCO_3 . Карбонат кальция может образовываться и биологическим путем в известковых структурах простейших, кораллов и моллюсков, откладываясь в качестве известняковых горных пород. В условиях высокой влажности и недостатка кислорода отложение отмерших органических остатков приводит к накоплению гумуса, образованию торфа и каменного угля. В результате жизнедеятельности микроорганизмов образуются также метан, нефть.

Круговорот азота

Цикл азота состоит из нескольких этапов, основную роль в которых играют микроорганизмы, преимущественно бактерии.

Азот составляет 80% земной атмосферы. Как газ азот химически инертен; он не может быть непосредственно использован растениями, животными и большинством микроорганизмов.

Азотофиксация (первый этап) в круговороте азота осуществляется исключительно азотофиксирующими микроорганизмами.

Различают симбиотическую и несимбиотическую (ассоциативную) азотофиксацию. *Симбиотическая азотофиксация* осуществляется бактериями рода *Rhizobium* (вызывают образование клубеньков у бобовых растений), актиномицетами *Frankia* (симбионты тропических растений), цианобактериями *Anabaena azollae*, *Nostoc punctiforme*.

Несимбиотическая азотофиксация осуществляется бактериями рода *Azotobacter*, аноксигенными фототрофными бактериями, цианобактериями, кластридиями, факультативными анаэробами *Bacillus polymixa*, *Klebsiella pneumoniae*, хемолитотрофными бактериями *Alcaligenes latus*, *Xanthobacter autotrophicus*, метилотрофами, метаногенами и сульфатредуцирующими бактериями.

Аммонификация. Аммонификация – это отщепление аминогруппы от аминокислоты с выделением свободного аммиака в процессе дезаминирования.

Наиболее активные аммонификаторы – это представители грамположительных споровых бактерий из рода *Bacillus*. Из не образующих эндоспоры форм к аммонификаторам относятся виды грамположительных бактерий родов *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Micobacterium*, грамотрицательные виды рода *Proteus*, *Pseudomonas*, а также многие микромицеты.

Роль аммонификаторов в природе значительна, поскольку доля белка в тканях умерших растений и животных велика, а аммонифицирующие микроорганизмы осуществляют минерализацию белков, разлагая их в конечном счете до CO_2 , NH_3 и H_2S .

Аммиак, образовавшийся в процессе аммонификации, частично адсорбируется в почве, потребляется как источник азота в процессе метаболизма почвенных микроорганизмов и в аммонийной форме растениями, выделяется в атмосферу, а также окисляется в нитриты и нитраты в процессе нитрификации.

Нитрификация. В процессе нитрификации образуются окисленные формы азотистых соединений. Нитрифицирующие бактерии выделены в определителе Берджи в семейство *Nitrobacteriaceae* и разделены на две группы, в зависимости от процессов которые они осуществляют. Бактерии, окисляющие аммоний до нитритов (I фаза нитрификации), принадлежат к родам *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*. Перевод нитритов в нитраты (II фаза нитрификации) осуществляют бактерии родов *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*.

Денитрификация. Денитрификация – это процесс восстановления нитратов до нитритов и далее до какой-либо из газообразных форм азота (окси азота, закиси азота и молекулярного азота):



Способность к денитрификации обнаружена у многих почвенных и водных прокариот, среди них фото- и хемотрофы. Наиболее часто она встречается у грамположительных бактерий из родов *Bacillus* и *Micrococcus*,

а также у грамположительных бактерий, принадлежащих к роду *Pseudomonas*. Денитрификаторы – факультативные анаэробы, переключаящиеся на денитрификацию только в отсутствие кислорода. В аэробных условиях эти микроорганизмы осуществляют процесс кислородного дыхания.

Круговорот серы

Сера – важный химический элемент, входит в состав аминокислот некоторых белков. Одним из конечных продуктов гниения белков является сероводород, который не усваивается высшими растениями. В почве сера встречается в форме сульфатов – $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, сульфидов – FeS_2 , Na_2S , ZnS и органических соединений.

Органические и неорганические соединения серы под влиянием микроорганизмов подвергаются в почве различным превращениям окислительного и восстановительного порядка

Окисление соединений серы осуществляют группы микроорганизмов, относящихся к родам *Thiobacillus*, *Thiosphaera*, *Thiodendron*, *Sulfolobus*, *Thiobacterium*, *Thiospira*, *Beggiatoa*, *Thioplaca*, фотосинтезирующие пурпурные и зеленые серные бактерии, а также цианобактерии и другие микроорганизмы.

Круговорот фосфора

Фосфор входит в состав нуклеотидов и нуклеозидов, фосфолипидов различных мембран. Фосфор встречается в живых организмах только в пятивалентном состоянии в виде фосфатных ионов (PO_4^{3-}) или в составе органических фосфатных компонентов клетки. Фосфаты играют особую роль в энергетическом обмене, расщеплении углеводов и в мембранном транспорте.

Фосфор содержится в почве, как правило, в виде труднодоступных минеральных и органических соединений, которые становятся доступными для растений только после их минерализации микроорганизмами. Минеральные вещества представлены главным образом ортофосфатами кальция (нейтральные и щелочные почвы), железа и алюминия (кислые почвы). Органические соединения фосфора встречаются в виде ионизитфосфатов, фосфорсодержащих белков, фосфолипидов и др. Около половины органического фосфора почвы содержится в наиболее устойчивых к действию микроорганизмов фосфатах ионизита (фитатах). Микроорганизмы, синтезирующие фосфатазу, способны отщеплять от органических фосфатов фосфорную кислоту, которая, взаимодействуя с катионами, переходит в соли фосфорной кислоты, доступные для растений.

Многие микроорганизмы могут переводить нерастворимые соединения фосфорной кислоты в растворимое состояние. Среди них представители бактерий, актиномицетов, грибов (р. *Pseudomonas*, р. *Bacillus*, р. *Micrococcus*, р. *Micobacterium*, р. *Penicillium*, р. *Aspergillus*).

Круговорот железа

В круговороте железа большую роль играют железобактерии. На основании морфологических характеристик все железобактерии могут быть разделены на две группы: нитчатые и одноклеточные. К первой группе относятся грамотрицательные нитчатые бактерии, окруженные чехлом, в которых накапливаются окислы железа и/или марганца (р. *Leptothrix*, р. *Sphaerotilis*). Окисление железа (и марганца) и отложение их в чехлах бактерий не связано с получением энергии, идет под действием перекиси водорода. С помощью восстановленных форм железа и марганца обеспечивается удаление H_2O_2 – токсического продукта метаболизма:



Вторая группа бактерий делится на две подгруппы и включает одноклеточные организмы из разных таксонов. Первая подгруппа объединяет железобактерии, растущие в нейтральной или слабощелочной среде и характеризуются хемоорганогетеротрофным типом метаболизма. Сюда относятся свободноживущие микоплазмы р. *Metallogenium*, р. *Gallionella*, р. *Siderococcus*. Окисление железа и/или марганца у данных микроорганизмов – результат химических реакций или функционирования перекисного пути и не имеет отношения к получению клетками энергии.

Вторую подгруппу составляют в большинстве аэробные ацидофильные формы (основной представитель – *Thiobacillus ferrooxidans*). Оптимальный рН их роста лежит ниже 4,5 (2–3). Для ацидофильных железобактерий установлена способность получать энергию в результате окисления двухвалентного железа:



Типы взаимоотношений микроорганизмов в биоценозах

Благодаря разнообразию механизмов утилизации источников питания и энергии, а также выраженной адаптации к внешним воздействиям, микроорганизмы обитают там, где другие формы жизни не выживают. В зонах обитания микроорганизмы образуют биоценозы (от греч. *bios* – жизнь + *koinos* – сообщество) – сложные ассоциации со специфическими и часто необычными взаимоотношениями. Каждое микробное сообщество в конкретном биоценозе образует специфические аутохтонные микроорганизмы (от греч. *autos* – свой + *chthon* – страна, местность), т.е. микробы, присущие конкретной области. В состав этих сообществ могут внедряться аллохтонные микробы (от греч. *allos* – свой + *chthon* – страна, местность; буквально – чужестранец), обычно в них не встречающиеся.

В природных биоценозах складываются определенные типы взаимоотношений микробов: симбиоз, паразитизм, антогинизм.

Естественные среды обитания микроорганизмов

Естественные среды обитания микроорганизмов – вода, почва, воздух; число микроорганизмов, обитающих на растениях и в живых организмах животных и человека, значительно меньше.

Микрофлора почвы

Почва является главным резервуаром и естественной средой обитания микроорганизмов. Микроорганизмы принимают участие в процессах формирования почвы, самоочищения, а также в круговороте веществ (азота, углерода, серы, железа и др.). Микроорганизмы обитают в водных и коллоидных пленках, обволакивающих почвенные частицы.

Состав микрофлоры зависит от вида почвы, способов ее обработки, содержания органических веществ, температуры, влажности, климатических условий и других причин.

Микрофлора воды

Вода – естественная среда обитания разнообразных микроорганизмов. Характер микрофлоры водоемов определяется особенностями конкретной водной среды. Большое влияние на состав микрофлоры оказывает происхождение воды как среды обитания: пресные поверхностные (воды рек, ручьев, озер, прудов и водохранилищ), подземные (почвенные, грунтовые, артезианские), атмосферные (дождь, снег) и соленые (морские, озерные) воды. Количественные соотношения микроорганизмов в открытых водоемах зависят от степени их загрязнения, смены метеорологических условий, сезона и т. д.

Микрофлора человека

Организм человека в норме содержит сотни видов микроорганизмов, среди них доминируют бактерии, значительно меньшим числом представлены вирусы и простейшие. Подавляющее большинство таких микроорганизмов – сапрофиты-комменсалы. Видовой состав микробного биоценоза различных отделов организма периодически меняется, но каждый индивидуум имеет более или менее характерные микробные сообщества. Нормальная микрофлора играет важную роль в защите организма от патогенных микробов, например, стимулируя иммунную систему, принимая участие в реакциях метаболизма. В то же время, эта флора способна привести к развитию инфекционных заболеваний.

Лекция XII

ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И ИММУНИТЕТ

Организм контактирует со множеством микроорганизмов, некоторые из которых способны вызывать инфекционные заболевания. Патогенность является видовым, генетически детерминированным признаком микроорганизма. Патогенный потенциал многих возбудителей зависит как от свойств, присущих конкретному микроорганизму, так и от состояния факторов защиты организма-хозяина.

Патогенность микроорганизмов

Патогенность (от греч. *pathos* – болезнь + *genos* – рождение) означает способность микроорганизмов вызывать заболевание. Патогенные микроорганизмы, активно проникая в организм, вызывают инфекционные заболевания у здоровых людей. Существует широкий спектр микроорганизмов, способных вызывать инфекционные поражения при

нарушении сопротивляемости организма и массивности инфицирования. Их относят к условно-патогенным микроорганизмам.

Способность к колонизации – свойство заселять очаги первичного инфицирования. Размножению бактерий в первичном очаге инфицирования предшествует адгезия, т. е. закрепление бактерий на поверхности клеток. Прикрепление обеспечивают различные микробные продукты – молекулы адгезии (белки, липополисахариды, тейхоевые кислоты), которые располагаются непосредственно на поверхности клеток, либо входят в состав микроворсинок и капсул. Некоторые бактерии способны «заранее подготавливать» место для дальнейшего размножения; например, нейроминидаза облегчает проникновение холерного вибриона через слой слизи и контакт с сиалосодержащими рецепторами эпителия кишечника. Для успешной колонизации очага первичного инфицирования бактерии должны выдержать действие многочисленных и разнообразных микробицидных факторов хозяина.

Инвазивность – это способность возбудителей проникать в ткани, лежащие за пределами входных ворот инфекции, и размножаться в них. Основные факторы, обеспечивающие инвазивность – *подвижность* (обеспечивает проникновение как в клетки, так и в межклеточные пространства) и особые клеточные факторы – *инвазины* (от лат. *invasio* – проникать, атаковать), способствующие проникновению в эпителиоциты посредством эндоцитоза (например, поверхностные белки грамотрицательных бактерий).

Токсигенность – способность вырабатывать ядовитые вещества, токсины. Токсины (от греч. *toxikon* – яд) – важнейшие факторы патогенности, вырабатываемые микроорганизмами и реализующие основные механизмы инфекционного процесса. Бактериальные токсины традиционно подразделяются на эндотоксины и экзотоксины. Экзотоксины – секреторные белковые вещества, обычно проявляющие ферментативную активность. Нередко экзотоксины действуют дистанционно (далеко за пределами очага инфицирования) и ответственны за клинические проявления инфекции (например, энтеротоксины вызывают диарею, нейротоксины – параличи и другие неврологические симптомы). Наибольшую токсичность проявляет ботулотоксин – 6 кг токсина могли бы убить все человечество. Высокая токсичность экзотоксинов обусловлена особенностью структуры их фрагментов, имитирующих строение субъединиц гормонов, ферментов или нейромедиаторов хозяина. В результате экзотоксины проявляют свойства антиметаболитов, блокируя функциональную активность естественных аналогов. Экзотоксины проявляют высокую иммуногенность; в ответ на их введение образуются специфические антитела (антитоксины).

Экзотоксины – интегральные компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий, большая их часть высвобождается после гибели клетки. Эндотоксины представлены комплексом протеинов, липидных и полисахаридных остатков. Биологическая активность энтеротоксинов напоминает таковую у некоторых медиаторов воспаления.

Некоторые бактерии могут одновременно синтезировать экзотоксины и выделять при гибели эндотоксины (например, токсигенные *Escherichia coli* и холерные вибрионы).

Способность к длительному персистированию – свойство длительно циркулировать либо сохраняться в определенном очаге, что обусловлено способностью долгое время противодействовать влиянию факторов макроорганизма. В ряде случаев развивающиеся иммунные реакции лишают возбудителя возможности полностью реализовать свои патогенные свойства, но оказываются бессильными удалить его из организма. Таким путем развивается бактерионосительство. Патогенез ряда инфекционных заболеваний в качестве ведущего фактора включает длительную циркуляцию возбудителя (например, возбудителей сифилиса, туберкулеза, бруцеллеза и др.). Длительное выживание в организме хозяина во многом определяет способность патогенов «уходить» от действия защитных факторов (например, за счет изменения антигенной структуры либо путем антигенной мимикрии).

Инфекционный процесс

Проникновение микроба в организм приводит к развитию инфекционного процесса. *Инфекционный процесс, или инфекция* (от лат. *infictio* – вносить что-либо вредное + позднелат. *infectio* – заражение) – совокупность реакций между возбудителем и хозяином. При инфекции развивается комплекс физиологических и патологических реакций, направленных на восстановление гомеостаза.

Инициация инфекционного заболевания во многом зависит от ряда особенностей, связанных с самим возбудителем. К ним относятся: доза возбудителя, способ его проникновения и распространения в организме хозяина, устойчивость микроорганизма к факторам внешней среды. При попадании в организм незначительного числа патогенных микроорганизмов их обычно эффективно элиминируют защитные факторы организма. Для возникновения заболевания необходимо определенное количество микроорганизмов (инфицирующая доза), обеспечивающее возможность адгезии, колонизации и инвазии в ткани.

Антиинфекционный иммунитет

Развитию инфекции препятствуют две формы иммунного реагирования: *неспецифический* (врожденный) иммунитет и *специфический* (адаптационный, приобретенный) иммунитет. *Иммунитет* (от лат. *immunitas* – освобождение, избавление от чего-либо) – способ защиты организма от всех чужеродных веществ как экзогенной, так и эндогенной природы. Биологический смысл данной защиты заключается в обеспечении генетической целостности особей в течение их индивидуальной жизни.

Неспецифический (врожденный) иммунитет

Под неспецифическим (врожденным) иммунитетом подразумевают систему предсуществующих защитных факторов организма, присущих данному виду как наследственно обусловленное свойство. Так, собаки никогда не болеют чумой человека, а куры – сибирской язвой. Иммунитет,

создаваемый анатомическими, физиологическими, клеточными и молекулярными факторами, которые являются естественными составляющими элементами организма, иначе называют *конституционным*. Такие факторы не возникают вновь при встрече с патогеном, т. е. они не индуцибельны, у них нет специфической реакции на антигены микроорганизмов и они не способны сохранять память от первичного контакта с чужеродностью.

Условно факторы неспецифической защиты можно разделить на четыре типа: физические (анатомические); физиологические; клеточные, осуществляющие эндоцитоз или прямой лизис чужеродных клеток; факторы воспаления.

Специфический (адаптационный, приобретенный) иммунитет

Специфичность ответа реализуется через синтез антител и формирование клонов лимфоцитов, способных взаимодействовать только с одной из множества детерминант, чужеродных для данного организма. Упрощенная формула иммунологической специфичности: один антиген – одно антитело. Под *антигеном* понимают структурно чужеродное для данного конкретного организма вещество, способное вызвать иммунный ответ. *Антитела (иммуноглобулины)* – белки сыворотки крови, продуцируемые плазмочитами в ответ на введение антигена; характерная особенность антител – строгая специфичность по отношению к введенному организму антигену.

Особенностью приобретенного иммунитета является его индуцибельность и способность иммунной системы сохранять память о первой встрече с антигеном. Специфические антитела в норме либо отсутствуют, либо их продукция крайне мала. При контакте с антигеном происходит усиление продукции соответствующих антител.

В развитии специфического иммунного ответа принимают участие три типа клеток: *В-лимфоциты*, *Т-лимфоциты*, *антигенпрезентирующие клетки* (макрофаги, дендритные клетки, В-клетки). Основная эффекторная функция *В-лимфоцитов* – участие в формировании гуморального ответа посредством активной продукции специфических иммуноглобулинов. Взаимодействие В-лимфоцита с антигеном приводит к его антигензависимой дифференцировке по двум направлениям – до активно продуцирующего антитела плазмочита и формированию пула В-клеток памяти. Дополнительная функция В-клеток – презентация антигена для Т-хелперов.

Т-лимфоциты – основные участники клеточной формы иммунного реагирования. В отличие от В-лимфоцитов, функция которых реализуется через гуморальные продукты-антитела, Т-лимфоциты разрушают чужеродные клетки (трансплантаты, опухолевые и вируstransформированные клетки) при непосредственном контакте с данными клеточными формами. Предшественник Т-лимфоцитов образуется в костном мозге, затем происходит его миграция в тимус, где осуществляется

дифференцировка и формирование субпопуляций Т-клеток: цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ или Т-киллеры), Т-хелперов и Т-супрессоров. ЦТЛ и Т-хелперы имеют специфические маркеры или корецепторы: CD8-у ЦТЛ/супрессоров и CD4-у Т-хелперов (T_H2) / клеток воспаления (T_H1).

Формирование иммунного ответа складывается из следующих событий: распознавание антигена функционально незрелыми В- и Т-клетками; ответной реакции этих клеток на антиген в виде пролиферации и дифференцировки до зрелых эффекторных клеток; нейтрализации и уничтожении антигена и формирования Т- и В-клеток памяти после первичного контакта с антигеном.

В-клетки способны распознавать свободные, не связанные с какими-либо другими белками антигены; Т-клетки отвечают только за комплекс антигенных эпитопов с молекулами низкомолекулярных белков главного комплекса гистосовместимости.

Подготовка антигена к его распознаванию различными классами лимфоцитов начинается в фагоцитирующих клетках. Большинство бактерий и одноклеточных эукариотических паразитов в результате фагоцитоза оказываются включенными в фаголизосомы. В то же время основным местом внутриклеточной локализации вирусов является неструктурированная часть клетки – цитозоль.

Вирусные антигены в результате протеолиза в цитоплазме и последующего выхода на поверхность фагоцитирующей клетки в комплексе с белками гистосовместимости становятся объектом распознавания цитотоксическими Т-лимфоцитами. Следствием такого распознавания является гибель инфицированной клетки. В случае развития бактериальной инфекции или поражения организма одноклеточными паразитами стратегия иммунитета выглядит иначе. Для внутриклеточных патогенов, таких как микобактерии или возбудители чумы, в процесс уничтожения инфекционного агента вступают хелперные Т-клетки воспаления (T_H1). Эти клетки после распознавания антигенного эпитопа, активируют макрофаги, зараженные бактериями, к внутриклеточному уничтожению возбудителя.

При инфицировании организма возбудителями, размножающимися вне клеток, в иммунный ответ вступают хелперные Т-клетки (T_H2). Функция этих клеток – активация В-клеток к продукции специфических иммуноглобулинов, которые нейтрализуют бактерии или их токсины.

Благодаря работе Т- и В-лимфоцитов формируется специфический иммунный ответ, который не только блокирует первичное заражение, но и является залогом иммунитета в будущем, при реинфицировании. В организме, таким образом, формируется иммунологическая память, благодаря которой иммунная система способна быстро и эффективно реагировать на антиген (патоген), с которым был предварительный контакт организма.

5 ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Организация занятий по дисциплине «Микробиология» проводится по видам учебной работы - лекции, семинарские занятия, текущий контроль.

В соответствии с требованиями ФГОС ВПО по направлению подготовки бакалавра товароведения реализация компетентного подхода предусматривает использование в учебном процессе активных и интерактивных форм проведения занятий в сочетании с внеаудиторной работой с целью формирования и развития профессиональных навыков обучающихся.

Часть лекционных занятий проводится в поточной аудитории с применением мультимедийного проектора в виде учебной презентации. Основные моменты лекционных занятий конспектируются. Отдельные темы предлагаются для самостоятельного изучения с обязательным составлением конспекта (контролируется).

Семинарские занятия проводятся в специальных аудиториях (№ 21, 202), оборудованных необходимыми наглядными материалами.

Самостоятельная работа по дисциплине включает:

- ✓ самоподготовку к учебным занятиям по конспектам, учебной литературе и с помощью электронных ресурсов (контролируются конспекты и др.);
- ✓ оформление и подготовка рефератов, докладов, эссе (изложение мыслей автора на определённую, обычно актуальную тему);
- ✓ подготовка к текущему тестированию по разделам дисциплины (изучение учебных тем).

Удельный вес занятий, проводимых в интерактивных формах, составляют не менее 20% аудиторных занятий, т.е. по данной дисциплине 14 часов. Занятия лекционного типа для соответствующих групп студентов составляют не более 50% аудиторных занятий.

6 ФОНД ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ДИСЦИПЛИНЫ МИКРОБИОЛОГИЯ

ПАСПОРТ

фонда оценочных средств ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ МИКРОБИОЛОГИЯ

1. Модели контролируемых компетенций:

1.1. Компетенции, формируемые в процессе изучения дисциплины (3 семестр):

Индекс	Формулировка компетенции
ОПК-2	Способностью использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применять методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования

1.2 Сведения об иных дисциплинах (преподаваемых, в том числе на других кафедрах) участвующих в формировании данных компетенций;

1.2.1 Компетенция ОПК-2 формируется в процессе изучения дисциплины:

Математика; Физика; Химия неорганическая и аналитическая; Химия органическая; Биологическая и физколлоидная химия; Физико-химические методы анализа; Биохимия растений; Биофизика;

Государственная итоговая аттестация

2.В результате изучения дисциплины Микробиология обучающийся должен:

В результате изучения дисциплины студент должен:

2.1 *знать:* систематику, морфологию, генетику и размножение микроорганизмов; метаболизм микроорганизмов, трансформацию различных соединений микроорганизмами; почвенные микроорганизмы; микробиологию сельскохозяйственной продукции, микробиологический контроль продуктов переработки;

2.2 *уметь:* управлять микробиологической активностью почвы и с.-х. продукции при хранении и переработке;

2.3 *владеть:* методами приготовления препаратов и микроскопирования, методами культивирования микроорганизмов, получения чистых культур; микробиологическими методами лабораторного

анализа образцов почв, растений и продукции растениеводства и животноводства.

3. Уровни обученности (определяются ФГОС ВПО по соответствующему направлению подготовки):

Ступени уровней освоения компетенции	Отличительные признаки
Пороговый	<p><i>Знает</i> Объекты микробиологии, место микробиологии в системе биологических наук, роль микроорганизмов в природе и жизни человека, Рост и размножение бактерий. Основы генетики микроорганизмов;</p> <p><i>умеет</i> управлять микробиологической активностью почвы и с.-х. продукции при хранении и переработке; <i>владеет</i> методами приготовления препаратов и микроскопирования, методами культивирования микроорганизмов.</p>
Продвинутый	<p><i>Знает</i> трансформацию различных соединений микроорганизмами; почвенные микроорганизмы; микробиологию сельскохозяйственной продукции, микробиологический контроль продуктов переработки;</p> <p><i>умеет</i> участие микроорганизмов в различных этапах круговорота азота; <i>владеет</i> : методами приготовления препаратов и микроскопирования, методами культивирования микроорганизмов, получения чистых культур; микробиологическими методами лабораторного анализа образцов почв, растений и продукции растениеводства и животноводства</p>
Высокий	<p><i>Знает</i> инновационные подходы к процессу организации деловой коммуникации;</p> <p><i>умеет</i> управлять микробиологической активностью почвы и с.-х. продукции при хранении и переработке;</p> <p><i>владеет</i> навыками получения чистых культур; микробиологическими методами лабораторного анализа образцов почв, растений и продукции растениеводства и животноводства</p>

4. Программа оценивания контролируемой компетенции:

№	Контролируемые модули, разделы (темы) дисциплины*	Код контролируемой компетенции (или ее части)	Наименование оценочного средства**
Общая микробиология			
1	Систематика и морфология микроорганизмов	ОПК-2	Устно, письменно
2	Генетика и размножение микроорганизмов.	ОПК-2	Устно, письменно
3	Микроорганизмы и окружающая среда.	ОПК-2	Устно, письменно
4	Метаболизм микроорганизмов	ОПК-2	Устно, письменно
5	Трансформация различных соединений микроорганизмами.	ОПК-2	Устно, письменно
Специальная микробиология			
	Почвенная микробиология	ОПК-2	Устно, письменно
	Микробиология сельскохозяйственной продукции и микробиологический контроль продуктов переработки	ОПК-2	Устно, письменно

* Наименование темы (раздела) или тем (разделов) берется из рабочей программы дисциплины.

** В графу наименование оценочного средства в обязательном порядке входит способ осуществления оценки компетенции (части контролируемой компетенции) (устно, письменно, компьютерные технологий и др.).

Форма оформления экзаменационного билета

Министерство сельского хозяйства РФ

Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Кафедра гуманитарные и естественнонаучные дисциплины

	ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЙ БИЛЕТ №1
Технологический институт –	по дисциплине <u>«Микробиология»</u>
филиал ФГБОУ ВО	Направление <u>35.03.07 – Технология производства и переработки</u>
Ульяновская ГСХА	<u>сельскохозяйственной продукции</u>
	Факультет <u>инженерно-технологический</u>
	Курс <u>2</u>
	Кафедра <u>ГЕНД</u>

1. Химический состав бактериальной клетки.
2. Систематика микроорганизмов
3. Метаболизм бактерий.

Доцент _____ Н.Х. Курьянова

Утверждаю

«___» _____ 20__ г.

Зав. кафедрой _____ З.М. Губейдуллина

(подпись)

К комплекту экзаменационных билетов прилагаются разработанные педагогическим работником и утвержденные на заседании кафедры критерии оценки по результатам экзамена.

ОФОРМЛЕНИЕ ТЕМ ДЛЯ КРУГЛОГО СТОЛА

Министерство сельского хозяйства РФ

Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Кафедра гуманитарных и естественнонаучных дисциплин

Перечень дискуссионных тем для круглого стола (дискуссии, полемики, диспута, дебатов)

по дисциплине Микробиология
(наименование дисциплины)

План круглого стола: по теме «Микробиология»

1. Вступительное слово руководителя
2. Заслушивание докладов на темы:
 - ✓ Предмет микробиологии
 - ✓ Общая микробиология
 - ✓ Питание и дыхание микроорганизмов.
3. Обсуждение докладов
4. Избрание счётной комиссии и голосование (выбор лучшего доклада)
5. Подведение итогов круглого стола
6. Подготовка резюме по результатам проведения круглого стола

Критерии оценки:

- оценка «отлично» выставляется студенту, если подготовленный, по подобранной руководителем литературе, правильно по плану раскрыто содержание выступления;
- оценка «хорошо», если выступление хорошее, но не раскрыто все темы круглого стола;
- оценка «удовлетворительно», если студент хорошо владеет информацией, но не подготовлен по подобранной литературе;
- оценка «неудовлетворительно», если студент не подготовлен, доклад отсутствует.

Преподаватель _____ И.О. Фамилия

(подпись)

ОФОРМЛЕНИЕ ТЕМ ДЛЯ ИНТЕРНЕТ-СЕМИНАРА

Министерство сельского хозяйства РФ

Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Кафедра гуманитарных и естественнонаучных дисциплин

Перечень дискуссионных тем для интернет-семинара

по дисциплине Микробиология
(наименование дисциплины)

План круглого стола: по теме «Влияние условий окружающей среды на жизнедеятельность микроорганизмов» с использованием интернет-экскурсии позволяет использовать данный ресурс как источник информации в процессе организации учебно-познавательной деятельности студентов по освоению предметного материала в режиме реального времени. Для этого используется ноутбук с доступом в интернет, видеопроектор, экран и материалы сайтов:

Google <http://www.rospotrebnadzor.ru/> (Влияние физических и химических факторов на жизнедеятельность микроорганизмов);

<http://dietolog.com.ua/diet/racional.php> (Влияние биологических факторов на жизнедеятельность микроорганизмов).

1. Вступительное слово руководителя
2. Заслушивание дискуссии, полемики на темы:
 - ✓ Влияние физических и химических факторов на жизнедеятельность микроорганизмов
 - ✓ Влияние биологических факторов на жизнедеятельность микроорганизмов
3. Обсуждение докладов
4. Избрание счётной комиссии и голосование (выбор лучшего доклада)
5. Подведение итогов **интернет-семинара.**

Преподаватель _____ И.О. Фамилия

(подпись)

ОФОРМЛЕНИЕ ИНТЕРАКТИВНЫЕ ЛЕКЦИИ-ПРЕЗЕНТАЦИИ

Министерство сельского хозяйства РФ

Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Кафедра гуманитарных и естественнонаучных дисциплин

Перечень лекций-презентаций

по дисциплине Микробиология
(наименование дисциплины)

План интерактивных лекций-презентаций по темам «Морфология микроорганизмов»

1. Вступительное слово руководителя
2. Просмотр и доклады лекций-презентаций:
 - ✓ Морфология микроорганизмов
 - ✓ Классификация микроорганизмов по морфологическим свойствам
 - ✓ Классификация извитых форм микроорганизмов
3. Обсуждение презентаций
4. Избрание счѐтной комиссии и голосование (выбор лучшей презентации)
5. Подведение итогов лекций-презентаций
6. Резюме по результатам проведения лекций-презентаций

Преподаватель _____ И.О. Фамилия

(подпись)

ОФОРМЛЕНИЕ ТЕМ ДЛЯ ДИСКУССИИ

Министерство сельского хозяйства РФ
Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА
Кафедра гуманитарных и естественнонаучных дисциплин
Перечень дискуссионных тем для круглого стола

(дискуссии, полемики, диспута, дебатов)

по дисциплине Микробиология

(наименование дисциплины)

План дискуссии: по теме Микробиология сырья и товаров. Биохимические процессы, вызываемые микроорганизмами

Главная задача дискуссии – выявление существующего многообразия точек зрения участников на вопрос и проблему и при необходимости всесторонний анализ каждой из них.

Постановка проблемы дискуссии:

- ✓ Микробиология товаров животного происхождения;
- ✓ Процессы жизнедеятельности микроорганизмов в анаэробных условиях: спиртовое, молочнокислое, пропионово-кислое и маслянокислое брожения;
- ✓ Процессы жизнедеятельности микроорганизмов в аэробных условиях: уксуснокислое, лимоннокислое брожения;
- ✓ Анаэробное и аэробное разложение пектиновых веществ, целлюлозы, жиров, клетчатки.

3. Обсуждение дискуссии: доказательства, обоснования принципов и подходов, предложенных преподавателем

4. Избрание счётной комиссии и голосование (выбор лучшего доклада)

5. Подведение итогов дискуссии

6. Подготовка резюме по результатам проведения дискуссии

Критерии оценки:

- оценка «отлично» выставляется студенту, если есть новизна в проблематике, участвующих в дискуссии, т. е. то решение проблемы, которое не найдено в науке, предстоит найти в учебном процессе в данной аудитории;
- оценка «хорошо», если активно участвует в дискуссии, но нет новизны в решении поставленной проблеме;
- оценка «удовлетворительно», если студент хорошо владеет информацией, но не активно участвует в дискуссии по решению поставленной проблемы;
- оценка «неудовлетворительно», если студент не подготовлен, в дискуссии не участвует.

Преподаватель _____ И.О. Фамилия

**Оформление тем для эссе
(рефератов, докладов, сообщений)**

Министерство сельского хозяйства РФ

Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Кафедра гуманитарных и естественнонаучных дисциплин

Темы эссе (рефератов, докладов, сообщений)

по дисциплине

Микробиология

(наименование дисциплины)

Эссе – вид письменной работы, выражающий индивидуальные впечатления и соображения автора по конкретной теме, проблеме или вопросу.

Структура эссе. Эссе не имеет жестко заданной структуры, т.к. она зависит от специфики конкретной темы и предпочтений автора. Однако в общем виде эссе должно содержать несколько логических частей:

1. Титульный лист.
2. Содержание.
3. Введение. Во Введении кратко излагается суть проблемы, обосновывается ее выбор, актуальность и значимость. Здесь также формулируется цель данной работы, формулируется вопрос, ответ на который автор намерен изложить в ходе написания эссе. Объем Введения обычно составляет 1 страницу.
4. Основная часть. Данный раздел занимает основной объем эссе. Здесь последовательно раскрывается выбранная тема. Основная часть может быть представлена в виде цельного текста или может быть разделена на несколько частей, имеющих свой подзаголовок. Обычно разделы (имеющие собственный подзаголовок) выделяются по принципу «один раздел – один тезис, мысль».
5. Заключение. В Заключении излагаются выводы, вытекающие из рассмотрения основного вопроса, обобщается авторская позиция по исследуемой проблематике. Объем Заключения обычно составляет 1 страницу.
6. Список литературы. Данный элемент структуры является обязательным для эссе и включается в его структуру только в случае, если это определено преподавателем. Здесь приводятся библиографические описания только тех литературных источников, к которым есть отсылка в тексте.

Библиографические описания всех источников, на которые есть ссылка в тексте, должны быть указаны в списке. Учебная литература (учебники, учебные и учебно-методические пособия) при написании эссе должна использоваться в минимальном объеме. При подготовке эссе в качестве литературных источников необходимо использовать преимущественно монографии, журнальные статьи. Список литературы должен быть оформлен в соответствии с требованиями.

по теме 1:

1. Место микроорганизмов среди живых организмов.
2. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе.
3. История развития микробиологии.

по теме 2:

1. Роль спорообразования бактерий в процессах их жизнедеятельности.
2. Особенности организации вирусов и фагов как объектов живой и неживой природы.
3. Положительная и отрицательная роль дрожжей в пищевой промышленности.

по теме 3:

1. Функционирование микробной клетки как системы.
2. Использование ферментов микроорганизмов в пищевой промышленности.
3. Кривая роста как пример природного единства.

по теме 4:

1. Использование физических факторов в практике хранения пищевых продуктов.
2. Использование химических факторов в практике хранения пищевых продуктов.
3. Формы взаимоотношений микроорганизмов.

по теме 5:

1. Оценка сырья и товаров по микробиологическим критериям.
2. Роль процессов жизнедеятельности микроорганизмов в круговороте веществ в природе.
3. Практическое использование спиртового брожения.

по теме 6:

1. Основные инфекционные заболевания, передающиеся через товары.
2. Пищевые токсикоинфекции: возбудители, причины возникновения и меры предотвращения.
3. Токсикозы грибной природы.

по теме 7:

1. Современные направления гигиенической оценки товаров.
2. Почва как естественный резервуар микроорганизмов в природе.

3. Микробиология воды: оценка качества.

Критерии оценки эссе

При оценке эссе преподаватель может руководствоваться следующими критериями:

- соответствие содержания текста выбранной теме;
- наличие четкой и логичной структуры текста;
- наличие авторской позиции по рассматриваемой проблематике;
- обоснованность, аргументированность, доказательность высказываемых положений и выводов автора;
- отсутствие орфографических, пунктуационных, стилистических, а также фактических ошибок;
- соответствие оформления работы предъявляемым требованиям;
- срок сдачи эссе;

Учитывая перечисленные выше основные критерии оценки эссе, преподаватель оценивает данный вид работы по 10-балльной системе. В случае если эссе не было сдано в установленный срок, за него снижается оценка исходя из условий, установленных преподавателем.

Преподаватель _____ И.О. Фамилия
(подпись)

Вопросы для самопроверки:

по теме 1:

1. Дать определение науки «Микробиология» и микроорганизмов.
2. Кто и когда открыл микроорганизмы?
3. Назовите основные открытия Пастера.
4. Какова роль И.И.Мечникова в развитии микробиологии в России?
5. Кто и когда открыл вирусы?
6. Кто написал первый учебник по микробиологии на русском языке?
7. В чем необходимость изучения общей микробиологии товароведом?

по теме 2:

1. Что изучает морфология микроорганизмов?
2. Назовите основные формы бактерий.
3. Строение бактериальной клетки: роль отдельных микроструктур клетки в ее жизнедеятельности.
4. Способы размножения грибов.
5. Строение дрожжевой клетки.
6. Как размножаются дрожжи?
7. Строение и размножение фага.

по теме 3:

1. Из каких основных веществ состоят клетки микроорганизмов?
2. Каким образом поступают питательные вещества в клетки микроорганизмов?
3. Использование ферментов микробного происхождения в пищевой промышленности.
4. Кривая роста микроорганизмов.
5. Углеродное питание микроорганизмов.
6. Азотное питание микроорганизмов.
7. Потребности у микроорганизмов в дополнительных факторах роста.

по теме 4:

1. Какие условия окружающей среды влияют на жизнедеятельность микроорганизмов?
2. Как влияет на жизнедеятельность микроорганизмов низкая температура?
3. Что представляют собой процессы пастеризации и стерилизации?
4. Как различаются микроорганизмы по отношению к кислороду воздуха?
5. Как называются химические вещества, губительно действующие на микроорганизмы и их использование?
6. В чем различия комменсализма и паразитизма?
7. Что такое фитонциды и как они действуют на микроорганизмы?

по теме 5:

1. Что представляет собой первичная контаминация сырья для производства товаров?
2. Назовите этапы формирования вторичной контаминации товаров?
3. В каких условиях происходит образование спирта и что может служить сырьем для его производства?
4. Какие микроорганизмы являются возбудителями молочнокислого брожения?
5. Чем отличается гомоферментативное молочнокислое брожение от гетероферментативного?
6. Назовите места обитания пропионово-кислых бактерий?
7. В каких условиях происходит уксуснокислое брожение?

по теме 6:

1. Санитарно-гигиенические требования к персоналу торгового предприятия.
2. Санитарно-гигиенические требования к условиям хранения, транспортирования и реализации товаров.
3. Какие микроорганизмы называют патогенными?
4. Что такое патогенность, токсинообразование, вирулентность?

5. Дайте сравнительную характеристику пищевых инфекций и отравлений?
6. Что такое иммунитет? Назовите виды иммунитета.
7. Что представляет собой микробиологический контроль качества?

по теме 7:

1. С какой целью проводится гигиеническая оценка товаров?
2. Какие микроорганизмы называются санитарно-показательными?
3. Наличие каких микроорганизмов считаются основным показателем фекального загрязнения окружающей среды?
4. По каким микробиологическим показателям проводят санитарную оценку почвы?
5. Могут ли находиться в жизнеспособном состоянии в воде патогенные микроорганизмы?
6. Насколько равномерно распределены микроорганизмы в воздухе?
7. Какие методы используются для оценки количественного и качественного состава микрофлоры воздуха?

6.3 Вопросы и задания для самостоятельной работы:

По теме 1:

1. Существование микроорганизмов в окружающем пространстве.
2. Наиболее известные микробиологи мира.
3. Использование микроорганизмов человеком.

по теме 2:

1. Органеллы бактериальной клетки и их функциональные особенности.
2. Особенности размножения плесневых грибов.
3. Положительные и отрицательные аспекты жизнедеятельности дрожжей.

по теме 3:

2. Химический состав микробной клетки.
3. Катаболизм и анаболизм у микроорганизмов.
4. Ферменты микроорганизмов и их использование.

по теме 4:

1. Действие различных температур на микроорганизмы и использование температурного фактора в пищевой промышленности.
2. Влияние радиоволн и ультразвука на жизнедеятельность микроорганизмов.
3. Использование антисептиков для борьбы с микроорганизмами.

по теме 5:

1. Основные показатели микробиологической оценки качества сырья и товаров.
2. Использование спиртового брожения в пищевой промышленности.

3. Возбудители гомоферментативного и гетероферментативного брожения и их использование в пищевой промышленности.

по теме 6:

1. Санитарно-гигиенические требования к персоналу, оборудованию и торговым предприятиям.

2. Санитарно-гигиенические требования к условиям хранения, транспортирования и реализации товаров.

3. Порядок проведения микробиологического контроля качества сырья и товаров.

по теме 7:

1. Гигиеническая оценка товаров.

2. Санитарно-микробиологическая оценка объектов окружающей среды.

3. Очистка сточных вод.

Примеры тестов для промежуточного контроля знаний

по теме 1:

1. Микробиология – это наука, изучающая жизнедеятельность:

1. маленьких живых организмов
2. микроскопических организмов животного и растительного происхождения

3. микроскопических растений

4. микроскопических животных

5. микроорганизмов

2. Кто открыл микроорганизмы?

1. К. Линней

2. Р. Кох

3. Л. Пастер

4. А. Левенгук

5. Р. Петри

3. Размер микроорганизмов измеряется в:

1. микрометрах

2. миллиметрах

3. метрах

4. сантиметрах

5. дециметрах

по теме 2:

1. Бациллы – это:

1. спорообразующие кокки

2. спорообразующие палочки

3. не спорообразующие палочки

4. палочковидные бактерии

5. кокки

2. Спорообразование для бактерий – это способ:

1. размножения

2. перенесения неблагоприятных условий
3. питания
4. деления
5. накопления энергии

3. Дрожжи – это:

1. одноклеточные грибы
2. бактерии
3. многоклеточные микроорганизмы
4. вирусы
5. актиномицеты

по теме 3:

1. Ферменты представляют собой:

1. запасные вещества
2. особые белки
3. липиды
4. углеводы
5. витамины

2. Активное поступление питательных веществ в клетку осуществляется с помощью:

1. мезосом
2. пермеаз
3. лизосом
4. рибосом
5. жгутиков

3. При рассмотрении кривой роста культуры микроорганизмов лаг-фаза является фазой:

1. отмирания
2. стационарной
3. задержки роста
4. логарифмического роста
5. всей кривой роста

по теме 4:

1. В процессе пастеризации погибают микроорганизмы:

1. все
2. психрофилы и мезофилы
3. психрофилы и термофилы
4. мезофилы и термофилы
5. только поврежденные

2. При стерилизации погибают микроорганизмы:

1. почти все
2. только вегетативные клетки
3. термофилы и спорообразующие бактерии
4. мезофилы

5. только не спорообразующие.

3. Химические вещества, губительно действующие на микроорганизмы называют:

1. антагонисты
2. ферменты
3. антисептики
4. антиоксиданты
5. токсины

по теме 5:

1. Спиртовое брожение представляет собой процесс:

1. анаэробный, вызываемый дрожжами
2. анаэробный, вызываемый гнилостными бактериями
3. аэробный, вызываемый вирусами
4. аэробный, вызываемый цианобактериями
5. анаэробный, вызываемый актиномицетами

2. Молочнокислое брожение представляет собой превращение:

1. сахара в молочную кислоту
2. молочной кислоты в углекислый газ и воду
3. сахара в молочную кислоту и спирт
4. молочной кислоты в спирт, яблочную кислоту и углекислый газ
5. молочной кислоты в спирт

3. Молочнокислое брожение является основным при производстве:

1. хлебобулочных изделий
2. молочнокислых продуктов
3. пищевого уксуса
4. лимонной кислоты
5. копченых рыбных продуктов

по теме 6:

1. Ядовитые продукты жизнедеятельности микроорганизмов называют:

1. витаминами
2. ферментами
3. токсинами
4. антиоксидантами
5. консервантами

2. Инкубационный период представляет собой период:

1. скрытого развития микроорганизмов
2. выздоровления
3. легкого течения заболевания
4. активного течения заболевания
5. в течение которого макроорганизм является бактерионосителем

3. К пищевым отравлениям относится:

1. брюшной тиф

2. дизентерия
3. холера
4. бруцеллез
5. ботулизм

по теме 7:

1. Допустимое количество микроорганизмов в питьевой воде составляет:

1. 1 000 КОЕ/см³
2. 10 КОЕ/см³
3. 100 КОЕ/см³
4. 10 000 КОЕ/см³
5. 100 000 КОЕ/см³

2. Присутствие БГКП в питьевой воде:

1. не ограничивается
2. не допускается в 100 см³
3. не допускается в 300 см³
4. не допускается в 10 см³
5. не допускается в 1 л

3. Коли - индекс – это

1. количество клеток БГКП в 1 л воды
2. количество клеток БГКП в 100 мл воды
3. количество клеток БГКП в 1 мл воды
4. объем воды, в котором не допускается присутствие БГКП
5. объем воды, в котором допускается присутствие БГКП

Контрольные вопросы для сдачи экзамена

1. Предмет и методы микробиологии. Развитие микробиологии, ее перспективы.

2. Сходство и различие клеток эукариот и прокариот.
3. Морфология бактериальной клетки
4. Анатомия бактериальной клетки.
5. Деление и способы размножения бактерий.
6. Вирусы, их структура.
7. Классификация вирусов, заболевания вызываемые вирусами.
8. Вирусы, взаимоотношение вирусов с клеткой – хозяина
9. Рост и размножение микроорганизмов.
10. Систематика микроорганизмов

11. Генетика микроорганизмов. (Геном прокариот, строение, механизм репликации бактериальной хромосомы. Рекомбинация генетического материала.)

12. Типы питания у бактерий (усваиваемые элементы, пути поступления и выделения веществ из бактериальной клетки. Питательные субстраты.). Фото-, хемотрофия. Авто-, гетеротрофия. Лито-, органотрофия. Прототрофы, ауксотрофы, миксотрофы.

13. Метаболизм бактерий. Способы обеспечения энергией, общая характеристика.
14. Фотофосфорилирование, значение, этапы.
15. Фотосинтез у бактерий, его особенности. (Пигменты фотосинтезирующих бактерий. Строение фотосинтетического аппарата эубактерий.). Группы фотосинтезирующих эубактерий, их характеристика.
16. Получение энергии путем субстратного фосфорилирования. Гомоферментативное молочнокислое брожение.
17. Дыхание бактерий. Общая характеристика типов дыхания.
18. Аэробное дыхание. Характеристика групп бактерий, осуществляющих аэробное дыхание.
19. Анаэробное дыхание бактерий. Общая характеристика групп бактерий, осуществляющий анаэробное дыхание.
20. Спиртовое брожение, его значение. Бактерии, осуществляющие спиртовое брожение.
21. Пропионовокислое брожение. Пропионовокислые бактерии, их значение.
22. Маслянокислое брожение. Бактерии, осуществляющие маслянокислое брожение.
23. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы, значение. Гетероферментативное молочнокислое брожение, его значение.
24. Экология микроорганизмов, типы взаимоотношений микроорганизмов в биоценозах.
25. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы.
26. Роль микроорганизмов в круговороте веществ.
27. Основные микробные биотопы человека.
28. Микрофлора почвы, многообразие микроорганизмов. Роль бактерий в геологических процессах. Микрофлора воды, биологическое загрязнение, самоочищение Микрофлора воздуха. Патогенные микроорганизмы – возбудители бактериальных и вирусных инфекций.
29. Иммуитет, его виды. Значение.
30. Биотехнология. Области использования биотехнологии. Микроорганизмы – продуценты антибиотиков и БАВ.

7 УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

а) основная литература:

1. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: учебник для студентов вузов. – М.: Издательский центр «Академия», 2012. – 384с.
2. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии, Дрофа, 2009 г.
3. Никитина Е.В. Микробиология: Учебник для вузов/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с.
4. Сидоренко О.Д., Борисенко Е.Г., Ванькова А.А., Войно Л.И. Микробиология: Учебник для агротехнологов. - М.: ИНФРА-М, 2010.

б) дополнительная литература:

1. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология, Изд-во МГУ, 2009.
2. Современная микробиология. Прокариоты. /Под ред. Ленгелера И., Дрекса Г., Шлегеля Г. М.: Мир, 20011, т. 1,2.
3. Шлегель Э.Г. История микробиологии. М. УРСС, 2005.
4. Ассонов Н.Р. Микробиология. - М.: Колос, 2007.
5. Жарикова, Галина Григорьевна. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена: Рекомендовано УМО в качестве учебного пособия для вузов по спец. "Товароведение и экспертиза товаров"/ Г.Г. Жарикова. -2-е изд., стер. -М.: Академия, 2007. - 304 с.
6. Матюхина, Зинаида Петровна. Основы физиологии питания, микробиологии, гигиены и санитарии: Допущено МоРФ в качестве учебника для начального проф. образования/ З.П. Матюхина. -М.: Академия, 2007. - 208 с.

8 ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Лабораторно-практическое занятие № 1

Техника безопасности в бактериологической лаборатории. Устройство микроскопа. Особенности микроскопии в микробиологической практике (иммерсионная система). Формы микроорганизмов.

Цель занятия. Усвоить правила работы в бактериологической лаборатории. Ознакомиться с техникой безопасности и личной профилактикой. Освоить работу с микроскопом и особенности иммерсионной системы. Изучить формы бактерий.

Материалы и оборудование. Микроскопы, окрашенные микроскопические препараты с различными формами микроорганизмов, иммерсионное масло, мультимедийная презентация.

Методические указания. После краткого объяснения преподавателя о порядке проведения работы в лаборатории, необходимости соблюдения техники безопасности, студенты знакомятся с устройством светового микроскопа, осваивают технику микроскопии готовых препаратов, изучают морфологию микроорганизмов на препаратах и зарисовывают их в тетради.

Бактериологическая лаборатория - это учреждение для проведения бактериологических исследований при экспертизе пищевых продуктов и кормов, санитарной оценки воды, воздуха и почвы.

Лабораторию размещают в отдельном здании, вдали от проезжих дорог. В ней предусматривают приемное отделение, бактериологический, вирусологический, биохимический, серологический и патологоанатомический отделы; выделяют специальные помещения для стерилизации посуды и питательных сред, для мытья посуды. Для выполнения работы в асептических условиях оборудуют специальные изолированные помещения - боксы. Лабораторных животных размещают в виварии. Кроме того, имеются комнаты для специалистов, обслуживающего персонала, кабинет заведующего, помещения для библиотеки, склада, весовой, раздевалки и др.

Учебная микробиологическая лаборатория предназначена для овладения студентами методами выделения и изучения различных микроорганизмов. В ней проводятся лабораторные занятия, предусмотренные программой, а также научно-исследовательская работа.

Правила работы в лаборатории

1. В помещение входить только в халате и белой шапочке (косынке).
2. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты.
3. В помещении лаборатории категорически запрещается есть.

4. Перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, горелок и др. О замеченных недостатках, неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту.

5. Нельзя зажигать одну горелку от другой.

6. Не касаться металлическими и другими предметами проводов и контактных частей электросети. Не включать без ведома преподавателя или лаборанта любую электроаппаратуру.

7. Материал, используемый для учебных занятий, должен рассматриваться как особо опасный.

8. При распаковке материала, присланного для исследования, необходимо соблюдать осторожность - банки с материалом снаружи обтирают ватой, смоченной дезинфицирующим раствором и ставят только на подносы или кюветы.

9. При исследовании поступившего материала и работе с бактериологическими культурами придерживаются правил исключающих возможность инфицирования работника.

10. Вскрытие трупов лабораторных животных производят в специальной одежде, на соответствующем оборудованном столе с помощью необходимых инструментов, используя для этих целей кювету, залитую воском (или парафином). Инструменты после вскрытия помещают в стакан с дезинфицирующим раствором или обжигают на пламени горелки, на стол класть запрещается.

11. При работе с жидким инфицированным материалом используют резиновые баллоны, соединенные с пипеткой.

12. Жидкости, содержащие патогенных микробов, переливают над сосудом с дезинфицирующим раствором.

13. Если патологический материал попал случайно на стол, его немедленно удаляют тампоном, смоченным дезинфицирующим раствором. При попадании зараженного материала на кожу, конъюнктиву, слизистую ротовой полости принимают экстренные меры к обеззараживанию.

14. По окончании работы использованные культуры микроорганизмов, инструменты и поверхность стола обеззараживают. В конце занятия бактериальные культуры и другой материал студенты сдают преподавателю, а рабочее место приводят в порядок. Перед уходом из лаборатории необходимо, вымыть руки и обработать их спиртом.

Уборка лабораторного помещения

Помещение лаборатории ежедневно до работы убирают влажным способом. Пыль с поверхностей протирают увлажнённой тряпкой смоченной дезинфицирующим раствором. После окончания работы стены, покрытые метлахскими плитками или окрашенные масляной краской, моют горячей водой с мылом или стиральным порошком. Полы моют 3-5% раствором дезинфектанта. Потолки, карнизы, верхняя часть стен, окрашенные клеевой краской, не реже одного раза в неделю очищают от пыли пылесосом.

Подготовка бокса к работе

Ежедневно перед началом работы полы протирают дезинфицирующим веществом (2-5 % раствором хлорамина); воздух обеззараживают бактерицидными лампами, установленными на высоте 2-2,5 м от поверхности пола, из расчета одна лампа БУВ-30 (1,5-2,5 Вт) на 1м³ помещения. При указанных условиях бокс облучают 2 ч. Перед началом работы лампы выключают. Для того чтобы предотвратить заражение бокса, образцы материалов, подлежащие исследованию, вносят в бокс после предварительного тщательного протирания их 3 % раствором формалина. Работа в боксе проводится в стерильных халатах, защитных масках и тапочках, специально предназначенных для бокса. Воздух в боксе следует регулярно, не менее 2 раз в неделю, проверять на бактериальную контаминацию. Чашки с мясопептонным агаром и средой Сабуро оставляют открытыми на 15 мин. Посев на мясопептонном агаре выдерживают в термостате 48 ч при 37° С, чашки со средой Сабуро - 96 ч при 22° С. Допустимым ростом считается 5 колоний на чашках. Количество колоний больше 5 при 15-минутной экспозиции является показателем высокой контаминации воздуха бокса. В этих случаях помещение бокса нуждается в дополнительной, более тщательной обработке. Не менее одного раза в неделю помещение бокса моют горячей водой с мылом, дезинфицирующими средствами и протирают досуха. По окончании работы берут пинцетом кусок ваты, смачивают его в 5 % растворе хлорамина или формалина и протирают им поверхность стола на рабочем месте.

Устройство биологического микроскопа

Микроскоп - сложный оптический прибор, используемый для изучения морфологии и тинкториальных свойств микроорганизмов. Принципиально все микроскопы устроены одинаково и состоят из механической части и оптической системы.

Механическую часть составляют:

- основание микроскопа,
- тубу со держатель,
- тубус,
- система винтов для передвижения,
- предметный столик,
- револьвер.

Оптическую часть (рис. 1) составляют:

- окуляр,
- объективы,
- осветительный аппарат.

Работа с иммерсионной системой

Объективы малого увеличения ($\times 3,5$, $\times 8$, $\times 9$) применяют главным образом для предварительного осмотра препарата.

Объективы среднего увеличения ($\times 20$, $\times 40$) применяют для изучения крупных клеток микроорганизмов (например грибов). Эти объективы называются сухими, поскольку при микроскопии между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. При этом благодаря различию показателей преломления воздуха ($n=1$) и стекла ($n=1,52$) часть лучей, освещающих препарат, рассеивается и не попадает в объектив.

Объективы больших увеличений ($\times 85$, $\times 90$) носят название иммерсионных. При работе с ними необходима максимальная освещенность препарата; устранение рассеивания, неизбежного при работе с сухими объективами, в данном случае достигается путем использования иммерсионных жидкостей, у которых показатель преломления близок к показателю преломления стекла (рис.2).

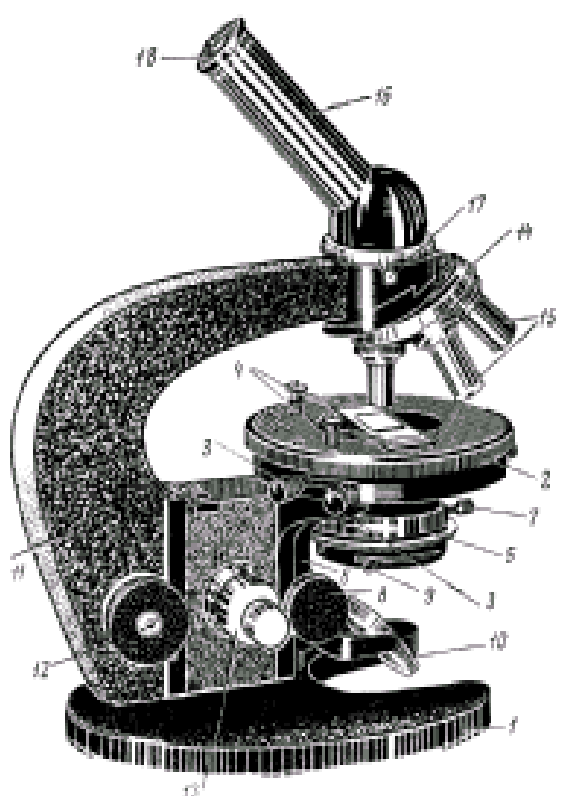


Рис.1. Устройство микроскопа МБР-1. 1-основание; 2-предметный столик; 3-винты для перемещения предметного столика; 4-клеммы; 5-конденсор; 6-кронштейн конденсора; 7-винт, укрепляющий конденсор; 8-рукоятка перемещения конденсора; 9-рукоятка ирисовой диафрагмы конденсора; 10-зеркало; 11-тубусодержатель; 12-рукоятка макрометрического винта; 13-рукоятка микрометрического винта; 14-револьвер; 15-объектив; 16-наклонный тубус; 17-винт для крепления тубуса; 18-окуляр.

Вначале под малым увеличением микроскопа наводят свет и определяют на препарате участок микроскопирования. Затем на выбранное место наносят

каплю иммерсии и осторожно (под контролем глаз с боку) погружают в нее фронтальную линзу иммерсионного объектива ($\times 90$). Иммерсионные объективы имеют короткое фокусное расстояние (до 2,3 мм) поэтому наводить на резкость следует путем поднимания объектива, а не опускания его, так как при небольшом рабочем расстоянии можно раздавить препарат и повредить фронтальную линзу. После грубой наводки, которую проводят с помощью макрометрического винта, руки переводят на микрометрический винт и осуществляют точную фокусировку. По окончании работы объектив поднимают, убирают препарат, а с фронтальной линзы кусочком фильтровальной бумаги убирают иммерсию.

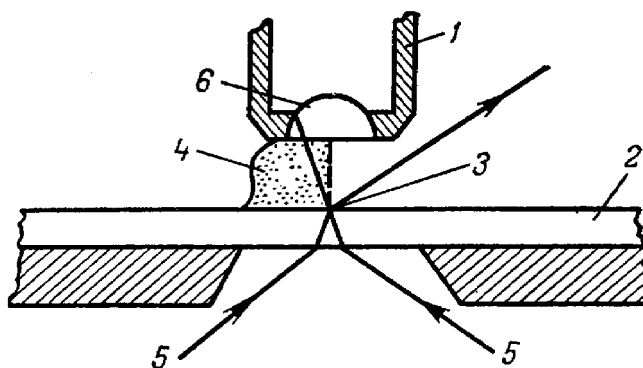


Рис. 2. Схема лучей в иммерсионной системе. 1 - объектив микроскопа; 2 - предметное стекло; 3 - объект исследования; 4 - иммерсионное масло; 5 - лучи света; 6 - фронтальная линза объектива.

Морфология бактерий

По форме бактерий подразделяют на три основные группы: шаровидные (кокки), цилиндрические (палочки) и извитые (рис. 3).

Для различных видов **кокков** характерно своеобразное расположение клеток, обусловленное способом деления.

Микрококки - беспорядочно расположенные кокки, в диаметре не превышают 0,5 мкм.

Диплококки - кокки, располагающиеся попарно, делятся в одной плоскости.

Стрептококки - деление их происходит в одной плоскости и образующиеся клетки не разъединяются, располагаясь цепочками, различной длины.

Тетракокки - сочетание шаровидных микробов по четыре, деление у которых происходит в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

Стафилококки - делятся в различных плоскостях без особой закономерности, образуя беспорядочное скопление клеток, иногда напоминающее грозди винограда.

Сарцины по форме напоминают пакеты или тюки. Образуются в результате деления в трёх взаимно перпендикулярных плоскостях.

Палочковидные микроорганизмы подразделяются на бактерии, бациллы и клостридии.

Бактерии - цилиндрической формы, не образуют спор.

Бациллы - спорообразующие палочки по типу дыхания аэробы, т.е. для своего развития нуждаются в свободном молекулярном кислороде воздуха.

Клостридии - спорообразующие палочки, по типу дыхания анаэробы (не использующие кислород воздуха), диаметр их споры превышает ширину микробной клетки.

Извитые бактерии разделяются на вибрионы, спираиллы и спирохеты.

Вибрионы имеют форму запятой, летящей чайки, поворот вокруг оси не превышает четверти оборота.

Спириллы - характеризуются небольшим числом крупных завитков (не более пяти). Передвигаются с помощью жгутиков.

Спирохеты - имеют штопорообразную форму с большим количеством завитков. На конце тела пучком расположены жгутики.

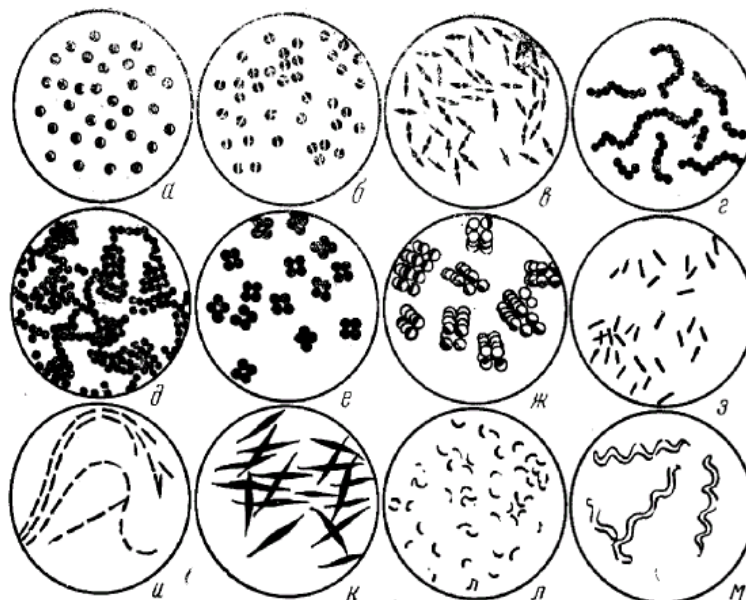


Рис. 3. Основные формы бактерий:

а – микрококки; *б, в* – диплококки; *г* – стрептококки;
д - стафилококки; *е* – тетракокки; *ж* – сарцины;
з, и, к - палочки; *л* – вибрионы; *м* – спириллы.

Задание для выполнения на занятии

1. Записать в тетради правила работы в лаборатории.
2. Законспектировать раздел «Устройство биологического микроскопа» и схематично зарисовать в рабочей тетради биологический микроскоп.
3. Законспектировать раздел «Работа с иммерсионной системой».
4. Зарисовать в рабочей тетради основные формы бактерий.
5. Зарисовать в рабочей тетради основные виды посуды для микробиологических исследований: чашки Петри, плоские бутылки-матрацы,

пробирки и колбы с поплавками, колбы конические Эрленмейера, колбы кругло- и плоскодонные, пипетки Мора, пастеровские пипетки, пробирки биологические (без ранта).

Контрольные вопросы

1. Каковы правила работы в бактериологической лаборатории?
2. Опишите методику подготовки к работе микробиологического бокса.
3. Каково устройство светового микроскопа?
4. Опишите работу с иммерсионной системой.
5. Какова морфология бактерий?

Домашнее задание

1. Изучить назначение следующих аппаратов и приборов: термостата, автоклава, сушильного шкафа, центрифуги, лабораторного рН-метра.
2. Подробно изучить и записать в тетради назначение основных составляющих механической и оптической частей биологического микроскопа.
3. Изучить состав и назначение микробиологических питательных сред, порядок приготовления и стерилизации питательных сред. Составить конспект в рабочей тетради.

Лабораторно-практическое занятие № 2 **Методы работы с микроорганизмами**

Цель занятия. Овладеть методикой приготовления мазка-препарата для микроскопии из микробной взвеси. Ознакомиться с методами приготовления красящих растворов. Отработать методику простого и сложного методов окраски приготовленных препаратов.

Материалы и оборудование. Набор красок, спирт ректификат 96,6%, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, предметные стекла, бактериологические петли, пинцеты, пробирки с микробными взвесями, микроскопы. Взвеси бактерий с вакцинным штаммом сибирской язвы, клостридиями, готовые препараты с капсулообразующими бактериями, подвижные бульонные культуры эшерихий 18 часового роста, предметные и покровные стекла, плакаты, 2% раствор сафранина, водный раствор малахитовой зелени, карболовый фуксин Циля.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Техника приготовления мазков

Исследуемый материал распределяют тонким слоем по поверхности предметного хорошо обезжиренного стекла.

Мазки готовят из культур микробов, патологического материала (мокрота, гной, моча, кровь и др.) и из органов трупов.

Приготовление препарата для микроскопии складывается из следующих этапов:

1. Приготовление мазка на обезжиренном предметном стекле.
2. Высушивание препарата.
3. Фиксация мазка.
4. Окраска мазка.

В правильно приготовленном препарате микробные клетки должны быть расположены в один слой.

Техника приготовления мазков определяется характером исследуемого материала.

Приготовление мазков из микробных культур с жидкой питательной среды и из жидкого патологического материала (моча и др.)

Маленькую каплю исследуемой жидкости наносят бактериальной петлей на предметное стекло и круговыми движениями петли распределяют равномерным слоем в виде кружка диаметром в копеечную монету.

Приготовление мазков из крови

На предметное стекло, ближе к одному из его концов, наносят каплю крови. Второе, шлифованное, стекло, которое должно быть уже предметного, ставят на первое под углом 45° , затем подводят к капле крови до соприкосновения с ней. После того как кровь растечется по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по всей поверхности стекла. Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет светло-розовую окраску и одинаковую толщину на всем протяжении.

Приготовление толстой капли

На середину предметного стекла пастеровской пипеткой наносят каплю крови или прикладывают стекло непосредственно к капле крови, выступающей из пальца. Нанесенную на стекло кровь размазывают бактериальной петлей так, чтобы диаметр образующегося мазка соответствовал величине копеечной монеты. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Кровь в “толстой капле” распределяется не равномерно, образуя неровный край.

Приготовление мазка из вязкого материала

Материал, нанесенный на предметное стекло ближе к узкому краю, накрывают другим предметным стеклом. Стекла слегка придавливают друг другу. После этого свободные концы стекол захватывают 1 и 2 пальцами обеих рук и разводят в противоположные стороны так, чтобы при движении оба стекла плотно прилегали друг к другу. Получаются мазки с равномерно распределённым материалом, занимающим большую часть.

Приготовление мазка из культур с плотных питательных сред

На середину чистого, хорошо обезжиренного стекла наносят каплю водопроводной воды, в нее вносят бактериальную петлю с небольшим количеством исследуемой микробной культуры так, чтобы капля жидкости стала слегка мутноватой. После этого излишек микробного материала на петле сжигают в пламени горелки и приступают к приготовлению мазка по описанному выше способу.

Приготовление мазков из органов и тканей

Поверхность органа с целью обеззараживания прижигают накаленными браншами пинцета, делают по этому месту надрез и из глубины остроконечными ножницами вырезают небольшой кусочек ткани, который помещают между двумя предметными стеклами. Далее поступают так же, как при приготовлении мазка из гноя и мокроты. Если ткань органа плотная, то из глубины разреза делают скальпелем соскоб. Полученный при соскабливании материал распределяют тонким слоем по поверхности стекла скальпелем или бактериальной петлей. Для изучения взаимного расположения элементов ткани и находящихся в ней микроорганизмов делают мазки-отпечатки. Для этого вырезанный из середины органа небольшой кусочек ткани захватывают пинцетом и прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу несколько раз последовательно, получая, таким образом, ряд мазков-отпечатков.

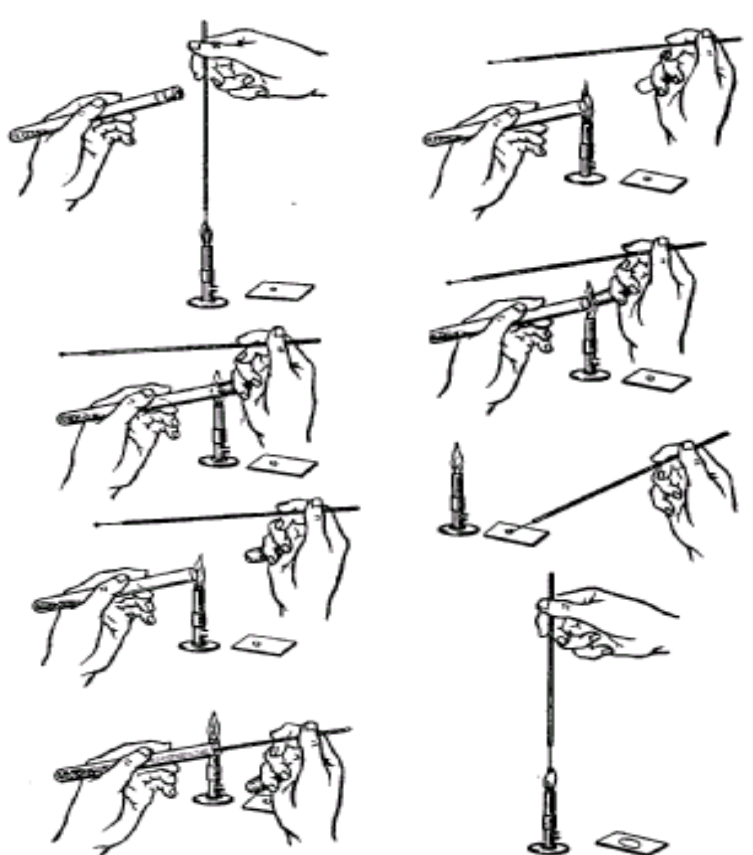


Рис. 4 Схема приготовления препарата-мазка

Высушивание и фиксирование мазков

Приготовленный на предметном стекле мазок высушивают и после высыхания фиксируют. При фиксировании мазок закрепляется на поверхности предметного стекла, и поэтому при последующей окраске препарата микробные клетки не смываются. Кроме того, убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые. Различают физический способ фиксации, в основу которого положено воздействие высокой температуры на микробную клетку, и химические способы, предусматривающие применение средств, вызывающих коагуляцию белков

Физический способ фиксации. Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за ребра мазком кверху и плавным движением проводят 2-3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с. Надежность фиксации проверяют следующим простым приемом: свободную от мазка поверхность предметного стекла прикладывают к тыльной поверхности левой кисти. При правильном фиксировании мазка стекло должно быть горячим, но не вызывать ощущения ожога.

Химический способ фиксации. Для фиксации мазков применяют химические вещества такие как безводный метиловый спирт, этиловый (винный) спирт 96%, жидкость Никифорова (смесь спирта и наркозного эфира в соотношении 1:1), жидкость Карнуа (спирта 96% 60 мл, хлороформа 30 мл, уксусной кислоты ледяной 10 мл)

Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом и затем высушивают на воздухе.

Краски, применяемые в микробиологической практике

Для окрашивания микробов используют анилиновые красители (основные, кислые и нейтральные). Микроорганизмы лучше окрашиваются основными красками. Для окраски препаратов готовят спиртовые, водно-спиртовые и водные растворы. В некоторых случаях добавляют в качестве протравы карболовую кислоту, щелочь и др. Наиболее часто употребляемыми красителями являются следующие:

синие - метиловый синий, водный синий, опаловый синий;

красные - фуксин основной, конго красный, сафранин, нейтральный красный, фуксин кислый;

фиолетовые - метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, генцианвиолет;

зеленые - малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый, светло-зеленый;

желто-коричневые - хризоилин, везувин.

Техника окраски простым методом

1. При простом методе окраски на фиксированный мазок наливают несколько капель какого-либо спиртоводного или водного раствора красок на 1...2 минуты; чаще всего для этой цели применяется фуксин 1: 10 или леффлеровская метиленовая синька.

2. Затем краску смывают дистиллированной водой и мазок обсушивают между двумя полосками фильтровальной бумаги. Обычно Фуксином 1: 10 красят 10...30 секунд, а метиленовой синькой – 2-10 мин. Фуксин окрашивает мазки более интенсивно. А при окраске метиленовой синькой получаются нежные, более изящные препараты. Мазок после обсушивания фильтровальной бумагой должен быть совершенно сухим, в противном случае при соприкосновении оставшейся влаги с кедровым маслом образуется эмульсия и при микроскопии получится неясное изображение. Вообще же продолжительность окраски зависит от вида и качества красящего раствора, степени восприимчивости микроба к окраске и толщины мазка.

При простой окраске микробные тела воспринимают цвет применяемой краски так же интенсивно, как и ядра клеток; в то же время цитоплазма и весь фон мазка (если это не мазок из чистой культуры) окрашиваются в тот же цвет, но несколько бледнее. Фуксин и генцианвиолет относятся к более интенсивно окрашивающим краскам; метиленовая синька окрашивает значительно бледнее. Восприятие окраски зависит не только от свойств красок, но и от свойств подвергаемых окраске микробов. Большинство микробов легко и быстро окрашивается водными или спиртоводными растворами красок.

Для повышения красящей способности воздействуют на краску высокой температурой (нагреванием) до появления паров (вплоть до кипения). Варьируя степень нагревания, можно получать различные степени силы окраски. Удлинение срока воздействия красящего раствора на объект также может в известной мере усилить степень окраски.

Техника окраски сложным методом

Сложные методы окраски основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Сущность этих методов заключается в воздействии на мазок двух красящих веществ, из которых одно является основной, главной краской, а другое дополнительной - контраст. После воздействия первой краской мазок обесцвечивают и только после этого подвергают дополнительной окраске. В качестве обесцвечивающих веществ может быть применен целый ряд химических реагентов (кислоты, щелочи, спирт, ацетон и др.). Обмывание мазка простой водой также является в какой-то степени чисто механическим процессом обесцвечивания, но для этого необходимо продолжительное время; кроме того, обесцвечивание получается неполное. По отношению к обесцвечивающим веществам можно разбить микробов на группы легко и трудно обесцвечиваемых, Не все виды микробов одинаково относятся к обесцвечивающим реагентам; некоторые являются кислото - и спиртоустойчивыми, другие только кислотоустойчивы. Наконец,

некоторые, как, например, споры, энергично противостоящие воздействию всех обесцвечивающих веществ, относятся к группе краскоустойчивых.

Сложные методы окраски имеют важное дифференциально-диагностическое значение для характеристики изучаемого микроба.

Окраска по Грамму

1. На фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги пропитанной 1%-ым спиртовым раствором генцианвиолета. Наносят на бумажку 2-3 капли воды. Окрашивают 2-3 минуты.

2. Бумажку снимают и, не промывая препарата водой, наносят раствор Люголя на 2 минуты.

3. Сливают раствор Люголя и препарат обрабатывают 96%-ным этиловым спиртом в течение 20-30 секунд.

4. Тщательно промывают мазок водой.

5. Окрашивают мазок фуксином Пфейффера в течение 2-3 минут.

6. Препарат промывают водой.

7. Высушивают и микроскопируют.

Грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в розовый.

Этот метод позволяет все микроорганизмы дифференцировать на две группы: грамположительные (гр+) и грамотрицательные (гр-).

Сущность окраски по Граму состоит в том, что отношение к краскам зависит от химического состава клетки и структурных особенностей клеточной стенки (наличие муреина и частично липида). В составе клеточной стенки грамположительных микроорганизмов большое количество муреина, воздействие этиловым спиртом вызывает разбухание муреина, что приводит к уменьшению диаметра пор и снижению проницаемости клеточной стенки. Поэтому не происходит вымывания красителя и обесцвечивания микробной клетки. В клеточной стенке грамотрицательных микроорганизмов муреиновый слой меньших размеров, диаметр пор больше и спирт легко проходит через клеточную стенку, вымывая краситель. Микробная клетка принимает цвет дополнительного красителя (красный). Кроме того, в поверхностном слое грамположительных микроорганизмов находится магниевая соль рибонуклеиновой кислоты, которая в присутствии йода в кислой среде образует прочное соединение с основными красителями. Это так же препятствует обесцвечиванию их спиртом.

Пример: *Escherichia coli* (кишечная палочка) и *Salmonella cholerae suis* (возбудитель сальмонеллеза свиней) - грамотрицательные и окрашиваются в розово-красный цвет. *Listeria monocitogenes* (возбудитель листериоза), *Streptococcus equi* (возбудитель мыта) - грамположительные и окрашиваются генцианвиолетом в фиолетовый цвет.

Окраска кислотоустойчивых микроорганизмов

В природе существует группа микроорганизмов, устойчивых к действию кислот, щелочей и спиртов. Они относятся к роду *Mycobacterium* (возбудители

туберкулеза, паратуберкулеза крупного рогатого скота, проказы человека). Химическая структура цитоплазмы и клеточной оболочки микроорганизмов данной группы отличается содержанием значительного количества жировосковых веществ, в частности стеариновых кислот (в том числе фтионовой кислоты до 40%), поэтому проникновение красителя в клетку затруднено. Для их окраски используют протравливание (нагревание мазка с красителем над пламенем). Окрасившись, они прочно удерживают краску и не обесцвечиваются кратковременным действием кислоты.

Окраска по Циль-Нильсену

1. Фиксированный на пламени мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги, наливают на нее карболовый раствор фуксина и подогревают; при появлении паров прекращают нагревание и оставляют краску на препарате еще на несколько минут (2-3 минуты). Дав препарату остыть, удаляют пинцетом бумажку и обмывают мазок водой.

2. Обесцвечивают препарат 5-10 % водным раствором серной кислоты в течение 3-5 секунд (до желтоватого оттенка мазка). Вместо серной кислоты можно применить 5 % раствор азотной или 3 % раствор соляной кислоты.

3. Мазок тщательно промывают водой.

4. Споласкивают 96° спиртом.

5. Снова промывают водой.

6. Докрашивают в течение 3-5 минут леффлеровской метиленовой синькой или водным раствором 1: 1000 малахитовой зелени или метиловой зелени.

7. Краску смывают водой и препарат высушивают.

Микроскопическая картина: туберкулезные палочки - рубиново красные, остальные, за исключением возбудителя паратуберкулеза, кислото - и спиртоустойчивых сапрофитов, - синие.

Для обесцвечивания мазков при окраске по Циль-Нильсену вместо растворов кислот и спирта особо рекомендуется применение солянокислого алкоголя (соляной кислоты - 3 мл+96° спирта - 97 мл) до слабо заметного розоватого оттенка препарата. После этого мазок ополаскивают водой и докрашивают метиленовой синькой и т. д. по основной прописи. Указанным методом достигается одновременное испытание бацилл на кислото - и спиртоустойчивость. Среди видов кислотоустойчивых сапрофитов встречаются спиртоподатливые разновидности, палочки же туберкулеза и паратуберкулеза всегда кислото - и спиртоустойчивы.

Окраска спор

При неблагоприятных условиях для микробов (отсутствие питательной среды, высушивание, неблагоприятная температура и др.) в цитоплазме некоторых микроорганизмов образуются споры. Формируются они внутри вегетативной клетки, являясь эндоспорами. Палочковидные грамположительные микроорганизмы, образующие округлые споры, диаметр которых не превышает ширину микробной клетки, относятся к роду *Bacillus* и называются бациллами. Микроорганизмы рода *Clostridium* имеют споры

диаметр которых превышает ширину микробной клетки и называются клостридиями. По форме они бывают овальные и круглые (рис. 5).

Споры устойчивы к воздействию высоких температур, химических веществ, к высыханию, длительно сохраняются в почве, что объясняется их особым строением и химическим составом, в особенности ее оболочки. Поэтому споры стойки к действию красителей.

Все методы окраски спор основаны на обеспечении проникновения красителя через трудноокрашиваемую оболочку споры. Поэтому применяют протраву. После охлаждения оболочка вновь становится плотной и не пропускает дополнительный краситель.

Техника окраски спор методом Трүхильо

1. На фиксированный мазок накладывают небольшой кусочек фильтровальной бумаги и на нее наносят водный раствор малахитовой зелени.

2. Подогревают препарат на пламени горелки до появления паров и выдерживают в течение 3 минут

3. Промывают дистиллированной водой.

4. Докрашивают 0,25%-ным водным раствором основного фуксина 1 минуту.

5. Промывают водой и высушивают.

Микрокартина: споры зеленые, а вегетативные клетки красные.

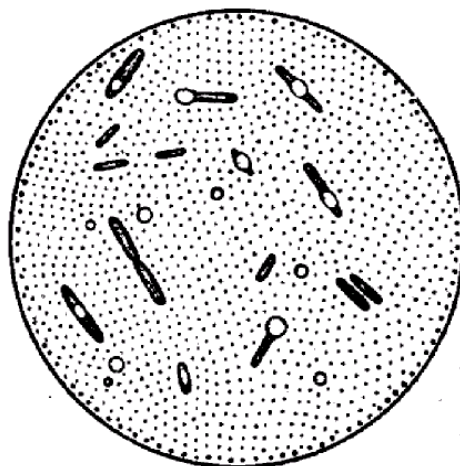


Рис. 4. Споры микроорганизмов различных типов

Окраска капсул

Тело микробной клетки покрыто рыхлым слизистым слоем. У некоторых видов микроорганизмов этот слой развивается очень сильно и тогда он называется капсулой. *Капсула* - муциноподобное вещество, высокомолекулярный полисахарид, является производным наружного слоя оболочки. Наличие капсулы является важным диагностическим признаком при идентификации и дифференциации возбудителей некоторых инфекций (сибирской язвы, пневмококковой пневмонии и др.) (рис. 5). Патогенные

микроорганизмы образуют капсулу в инфицированном организме. Она является фактором вирулентности и защищает бактериальную клетку от фагоцитоза и бактерицидного действия сыворотки крови. Капсульное вещество плохо окрашивается. Поэтому при приготовлении препарата для обнаружения капсулы выполняют следующие правила:

а) мазок готовят из свежего материала, так как капсула быстро лизируется;

б) фиксируют мазок химическим способом, для окраски применяют метохроматические краски, то есть при использовании которых цитоплазма окрашивается в один цвет, а капсула - в другой;

в) промывать мазок водой следует слабо и кратковременно.

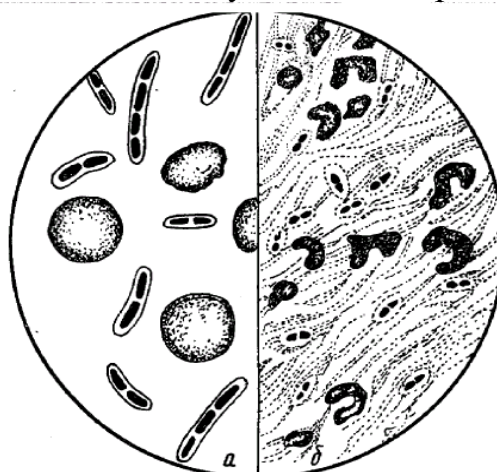


Рис.5.Капсула у бактерий: а - *бацилла сибирской язвы*; б – *диплококк*

Техника окраска капсул по методу Ольта

1. Свежий горячий 2%-ный раствор сафранина наносят на фиксированный мазок, окрашивают 5-7 минут.
2. Быстро промывают водой и высушивают.

Тело клетки окрашивается в красно-кирпичный цвет, капсула в - желто-оранжевый.

Определение подвижности бактерий

Подвижности бактерий важный видовой признак и производится при диагностических исследованиях: результат учитывают при идентификации микроорганизмов. У подвижных видов способность самостоятельного поступательного (и вращательного) движения обусловлена наличием *жгутиков* - *специальных тонких нитевидных образований*. Жгутики бывают различной длины. Их диаметр настолько мал, что они невидимы в световом микроскопе (менее 0,2 мкм). У разных групп бактерий количество и расположение жгутиков неодинаково. Жгутики плохо воспринимают красители. Методы сложной окраски искажают подлинный вид жгутиков, поэтому в лабораториях окраску жгутиков не осуществляют, а исследуют бактерии в живом состоянии.

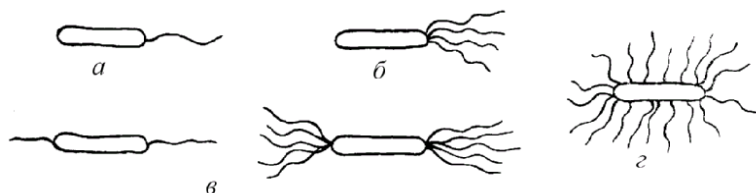


Рис. 6. Типы расположения жгутиков у бактерий

В зависимости от расположения и количества жгутиков микробы подразделяют(рис. 7):

а) *монотрихи* - микроорганизмы имеющие на одном из полюсов один жгутик, движения активные, поступательные (псевдомонас);

б) *лофотрихи* - микробы имеющие на одном из полюсов пучок жгутиков (листерии);

в) *амфитрихи* - микробы, имеющие жгутики на обоих полюсах микробной клетки;

г) *перитрихи* - микробы, у которых жгутики расположены по всей поверхности клетки(*E.coli*).

Есть виды микроорганизмов, обладающие подвижностью, но жгутиков не имеют (спирохеты, лептоспиры). Их движение обусловлено импульсивными сокращениями двигательного фибриллярного аппарата микробной клетки.

Для определения подвижности у бактерий необходимо использовать культуру не старше суточного возраста, так как старые культуры утрачивают способность передвигаться.

Определение подвижности микроорганизмов

Определение подвижности бактерий методом «висячая капля»

Каплю молодой (18-20 часовой) бульонной культуры бактерий бактериологической петлей наносят на покровное стекло. Специальным предметным стеклом с углублением (луночкой) накрывают каплю культуры так, чтобы покровное стекло с каплей находилось в центре луночки и прилипло к предметному стеклу (края луночки предварительно слегка смазывают вазелином). Препарат перевертывают стеклом вверх, и капля «повисает» над луночкой (рис. 8). Препарат микроскопируют при затемненном поле зрения, сначала при малом, затем при среднем или большом увеличении. На светлом фоне микробы темно-серые.

Определение подвижности бактерий методом Жукевича

Для этого каплю микробной взвеси наносят в конденсат скошенной плотной питательной среды в пробирке. Подвижные микроорганизмы, передвигаясь из конденсата, растут на поверхности среды; неподвижные виды размножаются только в конденсате среды («не заходя» на поверхность агара).

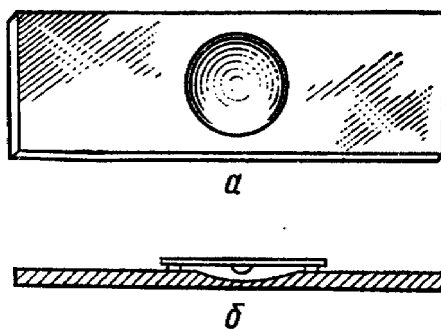


Рис. 7. Исследование микробов на подвижность *а* - стекло с луночкой; *б* - «висячая капля».

Определение подвижности бактерий методом «раздавленная капля»

Каплю бактериальной взвеси наносят на обычное предметное стекло, осторожно накрывают покровным стеклом и слегка придавливают пальцем. Микроскопию проводят так же как и в методе «висячая капля».

Определение подвижности бактерий методом посева уколом в полужидкий агар

Для этого бактериологической петлей производят посев исследуемой культуры уколом до дна пробирки с полужидкой питательной средой. Подвижная культура растет по всей питательной среде, образуя равномерное помутнение, а неподвижная - только по уколу в виде стержня, сохраняя прозрачность незасеянного участка среды.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать раздел «Техника приготовления мазков» в рабочей тетради.
2. Законспектировать раздел «Высушивание и фиксирование мазков» в рабочей тетради.
3. Законспектировать раздел «Техника окраски простым методом» в рабочей тетради. Приготовить из предложенных культур микроорганизмов мазок и окрасить простым методом окраски микроорганизмов Увиденную в поле микроскопа картину зарисовать в рабочей тетради, используя цветные карандаши.
4. Законспектировать раздел «Техника окраски сложными методами» в рабочей тетради. Приготовить мазки из предложенных культур и окрасить и окрасить их по Граму, по Цилю-Нильсену, по Трухильо и по Ольту. Увиденную в поле микроскопа картину зарисовать в рабочей тетради, используя цветные карандаши.
5. Законспектировать раздел «Определение подвижности бактерий» в рабочей тетради. Зарисовать в рабочей тетради типы расположения жгутиков у бактерий. Освоить методики определения подвижности микроорганизмов.

Контрольные вопросы

1. Какова техника приготовления мазков из различного исследуемого материала?
2. Опишите методику «Техника окраски простым методом».
3. Каковы методики окраски микроорганизмов сложными методами окраски?
4. В чем сущность окраски по Граму?
5. Как определяют подвижность микроорганизмов?

Домашнее задание

1. Изучить порядок проведения посева и пересева микроорганизмов. Сделать конспект в рабочей тетради.
2. Подробно изучить и записать в тетради методы получения накопительных культур. Зарисовать в тетради рис.9.
3. Внимательно изучить и записать в тетради методы выделения чистых культур.

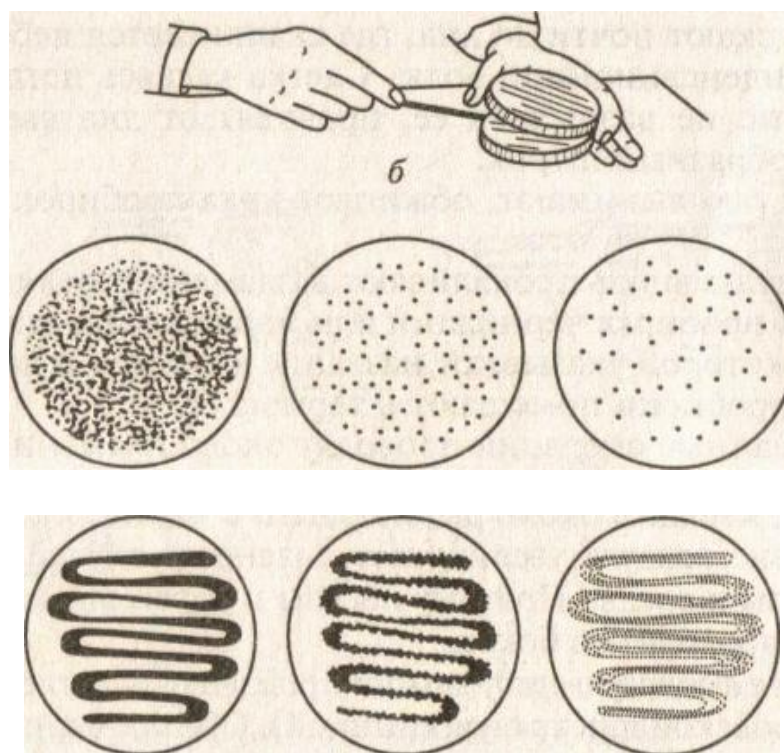


Рис. 9. Посев микроорганизмов на поверхность плотной среды в чашках Петри: *а* - шпатель Дригальского; *б* - положение чашки и рук при посеве шпателем; *в* - рост микроорганизмов после рассева шпателем; *г* - рост микроорганизмов после рассева петлей.

Лабораторно-практическое занятие №3 Изучение морфологии бактерий

Цель занятия. Изучить и описать колонии бактерий, выросших на агаризованной среде, величину, край профиль колоний; приготовить препараты бактерий, определить форму клеток, подвижность, наличие спор; пересеять изучаемые культуры на скошенный агар в пробирку.

Материалы и оборудование. Микроскопы биологические, спиртовки, предметные стекла, бактериальные петли, фуксин Циля, капельница с водой. Чашки Петри с колониями бактерий, пробирки с МПА по 10 мл (скошенный агар).

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Термин «бактерии» происходит от лат. *bacterion* — палка, палочка. Бактерии относятся к прокариотным организмам. Это одноклеточные организмы. Размножение клеток осуществляется путем их роста и деления (обычно пополам, иногда на неравные части).

Клетки после деления могут оставаться соединенными, в результате чего возникают характерные группировки. Многие виды обладают жгутиками бактериального типа и в жидкой среде способны активно плавать; другим свойственно скользящее, сократительное, «щелкающее» или кувыркающееся движение на поверхности твердых сред. У одних видов образуются эндоспоры.

Клетки находятся внутри жесткой или полужесткой клеточной стенки, обеспечивающей постоянство формы.

Генофор бактерий состоит из нуклеоплазмы, которая не отделена от цитоплазмы ядерной мембраной.

В настоящее время принята классификация бактерий, утвержденная юридической комиссией Международного союза микробиологических обществ, представленная в Кратком определителе бактерий Берги. Царство *Procaryotae*, к которому относятся бактерии, состоит из двух отделов: первый - фототрофные прокариоты («фотобактерии»), которые здесь не рассматриваются, и второй - прокариоты, индифферентные к свету («скотобактерии»).

Методика выполнения лабораторной работы

1. Изучить и описать колонии бактерий, выращенных на плотной питательной среде в чашках Петри; результаты представить в табл. 1

- размер (диаметр) измеряют линейкой в миллиметрах: мельчайшие, точечные, крупноточечные - менее 1 мм;

- цвет колоний и субстрата под колониями (от белого до черного);

- форма - бывает круглая, овальная и т.д.

- край - при необходимости устанавливают с помощью лупы (рис. 10);

- поверхность - бывает гладкая, зернистая, морщинистая, концентрически или радиально исчерченная, бугристая, мучнистая, матовая, блестящая, влажная, сухая и др.;
- прозрачность - бывает прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная;
- структура колонии - бывает однородная, мелкозернистая, волокнистая и др.;
- профиль - бывает изогнутый, каплевидный, плоский, выпуклый, вогнутый;
- консистенция (определяют при касании поверхности колонии бактериальной петлей) - бывает плотная, мягкая, тягучая, тестообразная и др.

На рис. 11 представлены фотографии различных бактериальных колоний

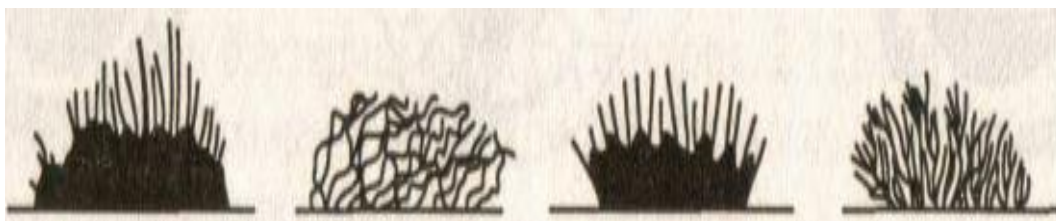


Рис 10. Края колоний

Колонии, различающиеся хотя бы одним из внешних признаков, следует рассматривать как разные типы. Каждый вид бактерий имеет вполне определенный тип колонии, поэтому по числу типов колоний в чашках Петри можно ориентировочно судить о I разнообразии видового состава бактериальной флоры исследуемого пищевого продукта.

2. Определить форму бактерий пяти колоний и спорообразование клеток. Приготовить препараты бактерий, провести простую окраску и их микроскопическое исследование. Результаты записать в табл. 2 и схематично зарисовать.

На рис. 12 представлены фотографии цикла развития бактерий от споры до споры.

3. Определить подвижность бактерий. Приготовить препарат «висячая капля».

Движение бактериальных клеток лучше наблюдать в препарате «висячая капля», используя молодые бульонные или агаровые культуры в возрасте 6-12 ч, но не старше суточных. При наблюдении под микроскопом в поле зрения хорошо видно активное перемещение клеток в разных направлениях с разной скоростью. В отличие от самостоятельного движения клеток броуновское движение взвешенных частиц и неподвижных клеток характеризуется беспорядочными колебаниями на одном месте. Результаты записать в табл. 2.

4. Посеять культуры бактерий на скошенный агар. Сделать пересев культур бактерий со среды на чашках Петри в пробирки со скошенным агаром. Посевы поставить в термостат при температуре 30 °С на 24 ч.

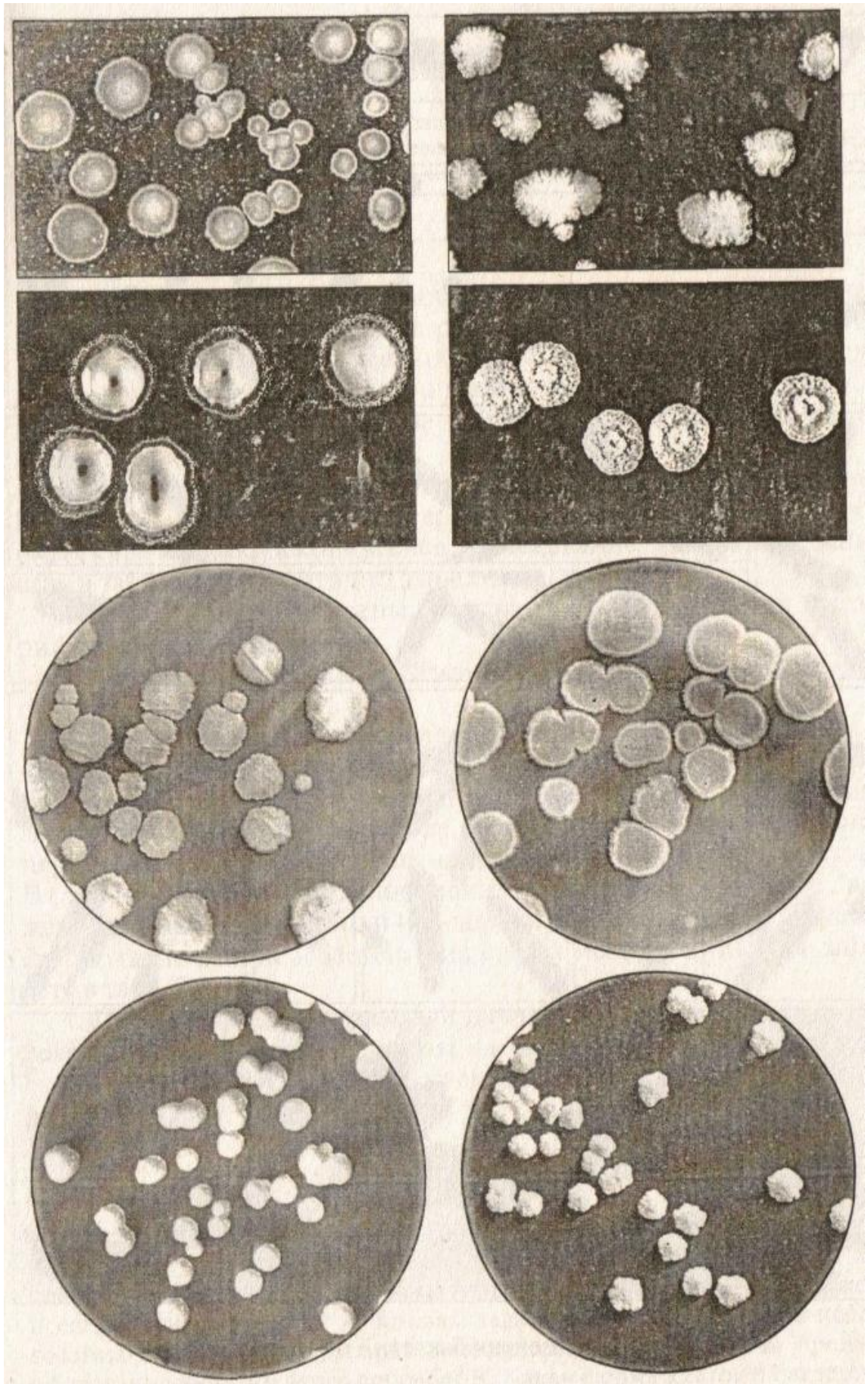


Рис 11. Колонии бактерий (фотографии).

Таблица 1

Культуральные признаки колоний бактерий

Описываемые признаки колоний	Номер колонии				
	1	2	3	4	5
Цвет					
Форма					
Край					
Поверхность					
Прозрачность					
Структура					
Профиль					
Консистенция					
Размер					

Таблица 2

Форма клеток, образование спор и подвижность

Номер колонии	Форма клеток	Взаимное расположение клеток	Спорообразование	Подвижность

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Какие существуют методы исследования морфологии бактерий?
2. Какие существуют способы фиксации бактериальных препаратов?
3. Каковы преимущества и недостатки прижизненного микроскопического исследования микробов?
4. Каковы задачи микроскопического исследования окрашенных препаратов микроорганизмов? Каковы преимущества и недостатки этого способа?
5. Какая форма клеток у бактерий?
6. Какие группировки клеток бывают у шаровидных бактерий и как они называются?
7. Какие бактерии образуют споры?
8. Каково значение спор у бактерий?
9. Какими свойствами обладают споры?
10. За счет чего бактерии активно двигаются?
11. Как называются бактерии с разным числом жгутиков?

Домашнее задание

1. Самостоятельно изучить культуральные и морфологически признаки дрожжей. Законспектировать материал в рабочей тетради и сделать рисунок «Морфология дрожжей».

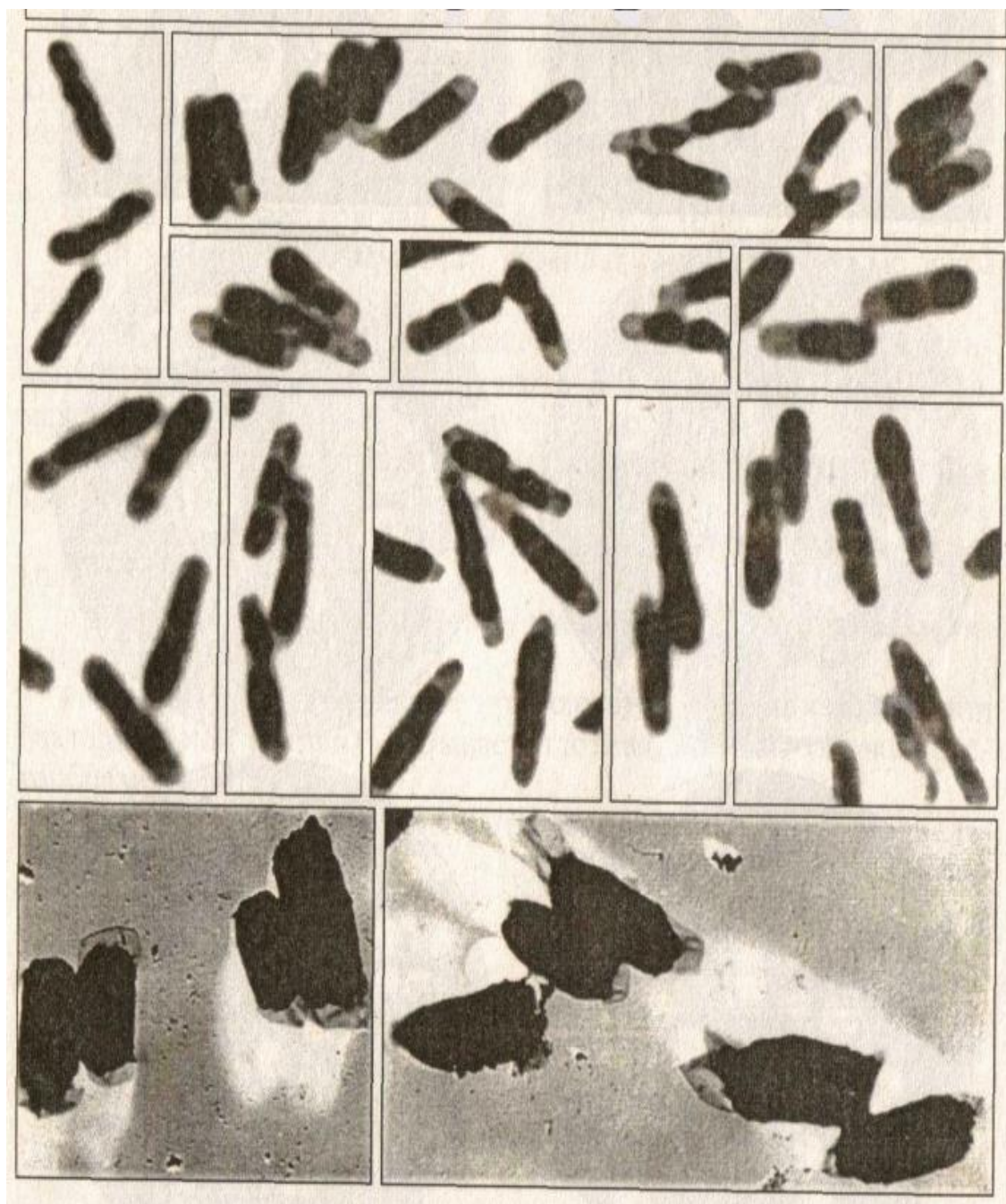


Рис 12. Цикл развития бактерий от споры до споры

Лабораторно-практическое занятие № 4
Изучение морфологии плесневых грибов.
Идентификация грибов до рода

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

Оборудование инструменты: чашки Петри с колониями плесневых грибов, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, спирт с глицерином (1:1), красители, лупы, биологический микроскоп.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Грибы - обширная группа эукариотных организмов, включает в себя около 100 тыс. видов, разделенных на шесть классов: хитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты, базидиомицеты, дейтеромицеты.

Грибы - это самостоятельное царство эукариотных организмов, характеризующееся следующими признаками: образование хорошо выраженной клеточной стенки, абсорбтивное питание, размножение спорами, неподвижность в вегетативном состоянии и неограниченный рост, первично гетеротрофный способ питания, накопление в качестве запасного продукта гликогена.

Вегетативное тело грибов представляет собой мицелий, состоящий из ветвящихся гиф с верхушечным ростом и боковым ветвлением. Мицелий пронизывает субстрат и всей поверхностью поглощает из него питательные вещества — субстратный мицелий. Мицелий также располагается на поверхности субстрата и образует поверхностный и воздушный мицелий.

На воздушном мицелии обычно образуются органы размножения. Мицелий грибов бывает одноклеточный (не септированный) и многоклеточный (септированный).

Одноклеточный, или не септированный, лишенный поперечных перегородок мицелий, представляет собой одну гигантскую клетку с большим числом ядер (рис. 13, а).

Многоклеточный, или септированный мицелий, разделенный перегородками - септами на отдельные клетки, содержащие от одного до нескольких ядер (рис. 13,б).

Представители грибов классов хитридиомицетов, оомицетов, зигомицетов имеют неклеточный мицелий.

Представители грибов классов аскомицетов, базидиомицетов и дейтеромицетов состоят из клеточного мицелия с настоящими септами.

Грибы прекрасно развиваются на пищевых продуктах, промышленных материалах и изделиях, бумаге, произведениях искусства в музеях, вызывая их

порчу и разрушение Многие грибы образуют микотоксины и вызывают пищевые отравления.

Грибы поражают культурные растения, нанося большой вред сельскому хозяйству. Есть патогенные грибы.

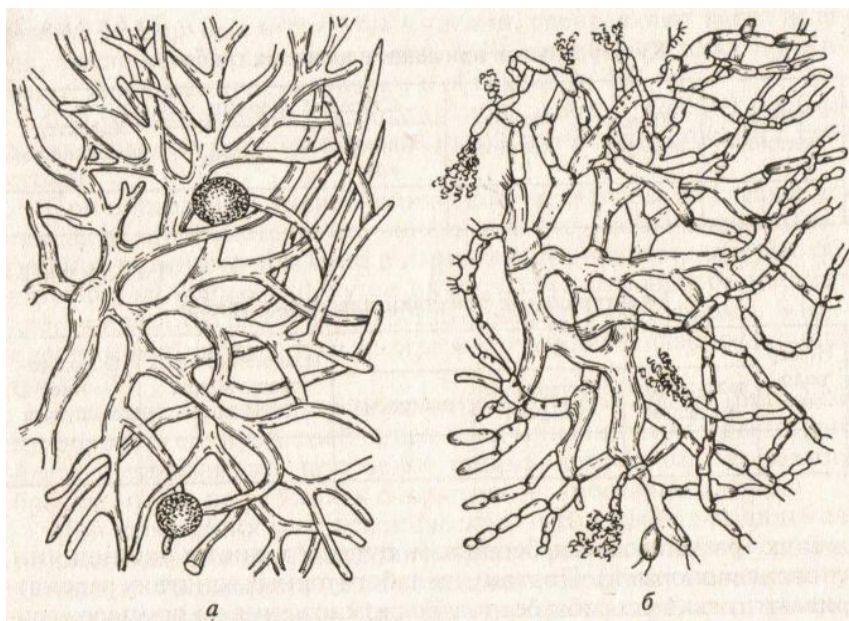


Рис. 13. Гифы грибов: а- несептированные, б - септированные

Методика выполнения лабораторной работы

1. Изучить культуральные признаки плесневых грибов. Большинство плесневых грибов, развиваясь на предметах окружающей среды пищевых продуктах, размножаются бесполом путем (оидиями, конидиями, спорангиоспорами). Поэтому на лабораторных занятиях рассматривают только способы бесполого размножения на примерах грибов — возбудителей порчи пищевых продуктов. Культуры этих грибов выращивают в чашках Петри на плотной питательной среде. Культуры в чашках не следует без надобности держать открытыми, так как споры грибов легко осыпаются и рассеиваются, что может привести к нежелательному заражению плесневыми грибами лаборатории, изучаемых культур и людей.

При изучении отмечают: размер колоний, их форму, плотность, строение наружного края и центра, характер поверхности, цвет колоний, окраску субстрата и обратной стороны колоний, выделение капель жидкости (экссудата). На плотных средах мицелиальные грибы образуют округлые или широко распространенные по поверхности, не врастающие в субстрат, пушистые, нитевидные, паутинообразные, ватоподобные или мучнистоподобные колонии. Вегетативный мицелий большинства видов не окрашен. Пигментирован только плодоносящий мицелий. Поэтому молодые колонии имеют белый или сероватый цвет. По мере развития органов плодоношения колонии приобретают желтый, розовый, бежевый, красный, зеленый, черный или другой цвет.

Результаты записывают в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Культуральные признаки плесневых грибов

Номер	Размер	Форма	Строение колонии		Характер
			Наружный край	Центр	

Таблица 4

Культуральные признаки плесневых грибов

Номер колонии	Цвет			Изменение цвета среды вокруг колонии	Образование экссудата
	воздушного мицелия	субстратного мицелия	реверзума		

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

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

При проведении микроскопического исследования следует установить многоклеточность мицелия и отсутствие специальных органов размножения. Гриб размножается оидиями, которые образуются на концах гиф путем их расчленения в виде бесцветных клеток прямоугольной или округло-прямоугольной формы. В препарате могут наблюдаться иногда цепочки нераспавшихся оидий (рис. 14).

Для приготовления препарата гриба мукор (*Mucor*) (рис. 15) нужно взять его пушистый воздушный мицелий черновато-серого цвета и накладывать покровное стекло осторожно, без резкого броска, чтобы не раздавить спорангии — вместилища спор.

При проведении микроскопического исследования выявить одноклеточное строение мицелия и органы размножения — спорангиеносцы. Рассмотреть их по всей длине, передвигая соответствующим образом препарат. Спорангиеносцы мукора, как правило, простые, неветвящиеся, отрастают от грибницы одиночно. Спорангии, сидящие на их верхушках (колонках), крупные, шарообразные, с

массой спор, которые видны через тонкую прозрачную оболочку спорангия. Спорангиоспоры - одноклеточные, округлые или эллипсоидальные, гладкие, бесцветные или сероватого цвета. В препарате всегда есть много свободно лежащих спор, высыпающихся из некоторых лопнувших спорангиев

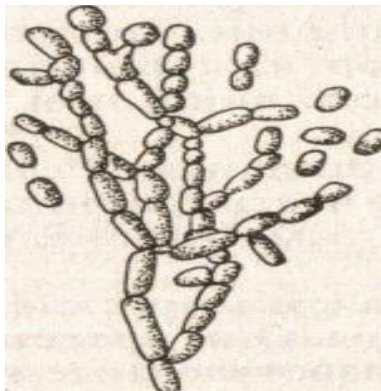


Рис. 14. *Oidium* с оидиоспорами

К муковым грибам относятся ризопус (*Rhizopus*) (рис. 16), который отличается от мукора образованием так называемых ризоидов и столонов, которые служат для захвата новой площади.

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

При микроскопическом исследовании найти многоклеточные гифы и органы размножения — конидиеносцы. Конидиеносец по внешнему виду простой, одноклеточный, неветвящийся. На его конце имеется булавовидное вздутие, на котором расположены в один ярус бутылочковидные клетки стеригмы, а на них одноклеточные споры в виде цепочек - конидии. Верхушка конидиеносца с массой неосыпавшихся спор кажется плотной, плохо просвечивается, ее можно рассмотреть лишь при осыпании спор (рис. 17).

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

При микроскопическом исследовании найти многоклеточные гифы и органы размножения - конидиеносцы. Они представляют собой многоклеточные гифы, кистевидно разветвленные на концах. На концах ветвей расположены стеригмы (по 2 - 4), а на стеригмах - цепочки одноклеточных конидий, имеющих голубовато-зеленую окраску с различными оттенками (рис. 18) Для приготовления препарата гриба ботритис (*Botritis*) следует взять небольшой кусочек воздушной пушистой грибницы. На кладывать покровное стекло надо очень осторожно, чтобы не разрушить конидиеносцы, с которых легко осыпаются конидии. При микроскопическом исследовании выявить древовидно разветвленный конидиеносец, на концах ветвей которого кучками располагаются конидии - одноклеточные, сероватого цвета, овальной формы (рис. 19).

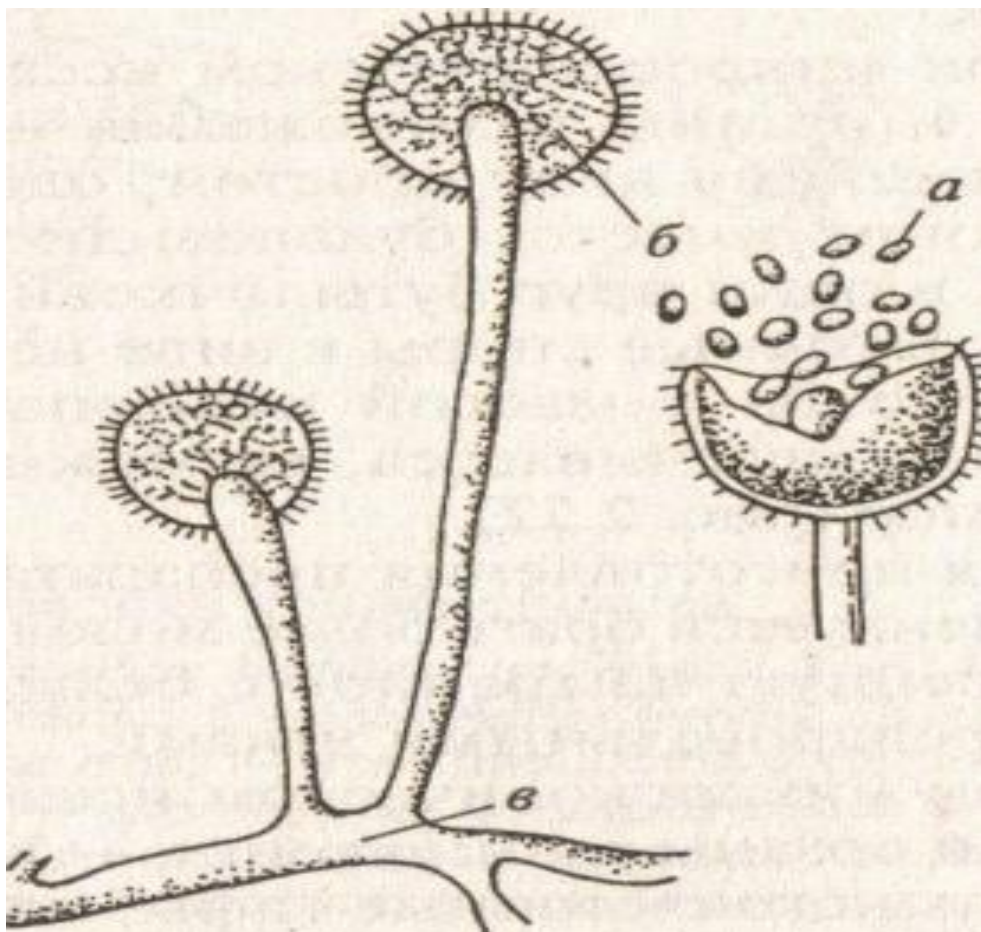


Рис. 15. *Mucor*:

а - спорангиоспоры; б – спорангий; в - гифа

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

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

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

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

Род гриба определяется по ключу Никитинского-Алеева.

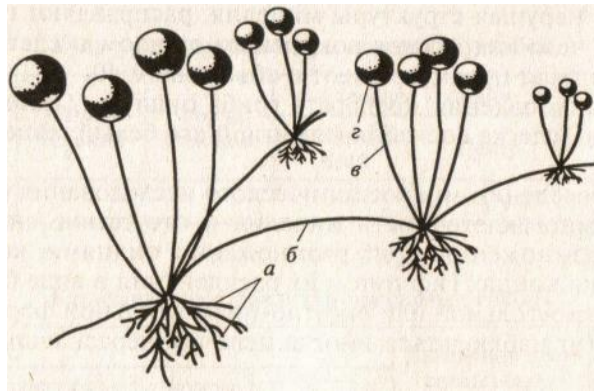


Рис. 16. *Rhizopus*:

a – ризоиды; *б* – стolon; *в* – спорангиеносец; *г* – спорангий

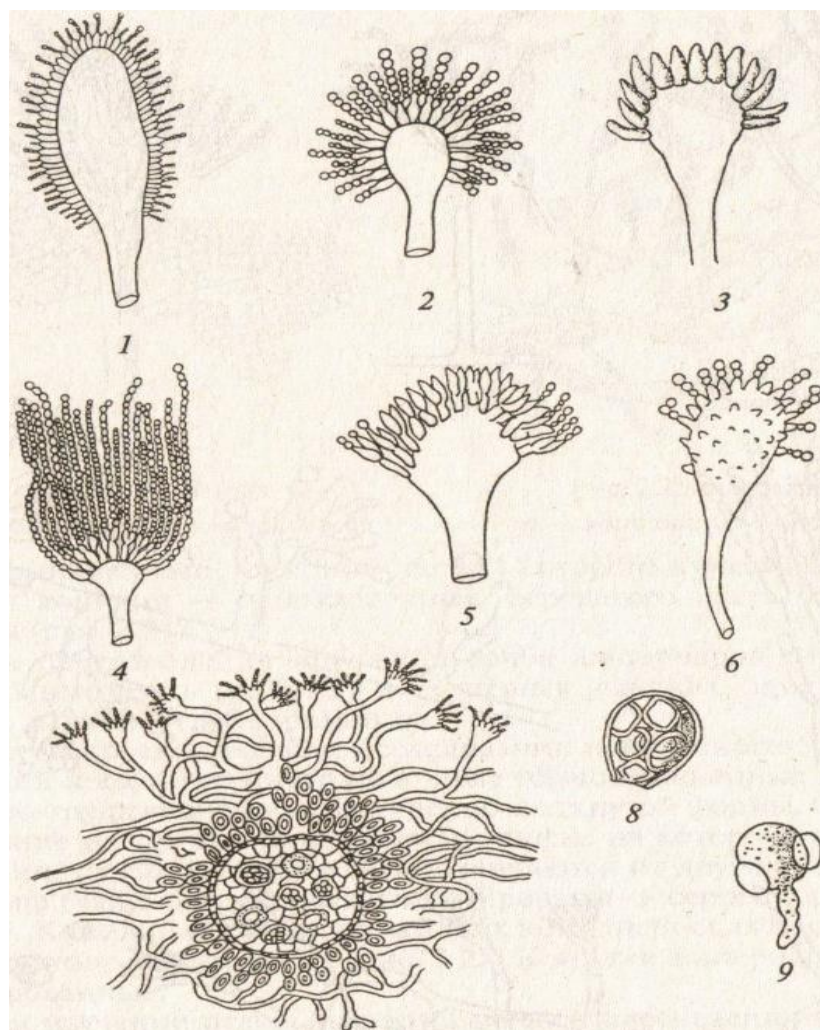


Рис. 17. *Aspergillus*. Головки конидиеносцев: 1-6; 7 – дерновинка конидиеносцев и под ней кистекарпий, окруженный оберткой из толстостенных клеток; 8 – сумка со спорами; 9 – прорастание аскоспоры

Ключ для определения рода плесневого гриба

1. Грибы размножаются спорангиоспорами, находящимися внутри спорангиев.

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

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

3. Спорангиеносцы одиночные, простые, иногда ветвящиеся. Спорангии мелкие или крупные, всегда однородные, бесцветные или окрашенные. Споры круглые или эллипсоидальные, гладкие, бесцветные или серого цвета (мукор (*Mucor*)) (см. рис. 15).

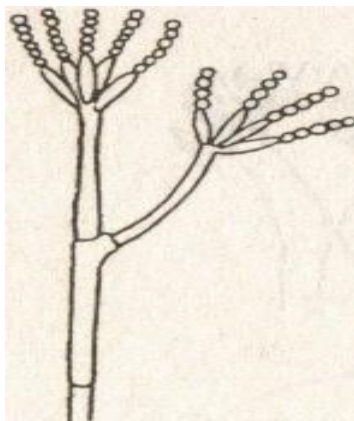


Рис. 18. *Penicillium*. Одномутовчатое строение кониеносцев

Спорангиеносцы расположены кустиками, вырастающими на столонах из одного центра, с большими черными головками. Споры серого цвета, округло-яйцевидные, морщинистые. Ризопус (*Rhizopus*) (см. рис. 16).

4. Кустовидные ветви расположены мутовчато на главной оси спорангиеносца в один или несколько ярусов. Места ответвления не раздуты. Споры цилиндрические и эллипсоидальные, бесцветные (тамнидиум (*Thamnidium*)) (рис. 20).

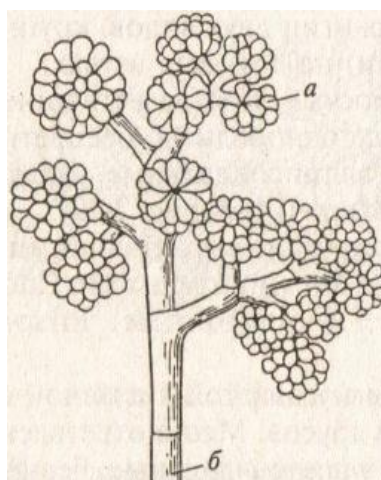


Рис. 19. *Botritis*: а – конидии; б - конидиеносцев

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

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

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

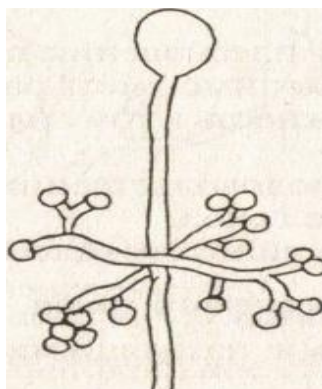


Рис. 20. *Thamnidium*

7. Ветвление древовидное. Ветвление кистевидное или многократно вильчатое, конидии располагаются цепочками, гладкие, бесцветные или окрашенные, округлые (пенициллиум (*Penicillium*)) (см. рис. 18).

8. Конидиеносцы древовидно разветвленные, большие. Ветви располагаются беспорядочно, конидии на концах ветвей развиваются кустиками, бесцветные, яйцевидные, гладкие (ботритис (*Botritis*)) (см. рис.19).

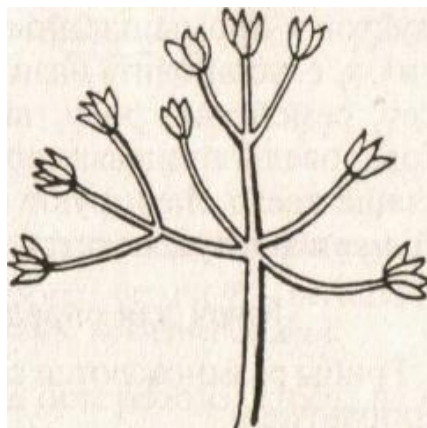


Рис. 21. *Verticillium*

Конидиеносцы древовидно разветвленные. Ветви располагаются мутовчато. Конидии образуются пучками или поодиночке, эллипсоидальные или вытянуто-яйцевидные, бесцветные или слабоокрашенные (вертициллиум (*Verticillium*)) (рис. 21).

9. Конидиеносцы неветвящиеся, длинные, с кустиками больших грушевидных конидий на конце. Конидии двухклеточные, бесцветные или розового цвета. Колонии гриба желто-розового цвета (трихотециум (*Trichotecium*)) (рис. 22).

Конидиеносцы и конидии иной формы.

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

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

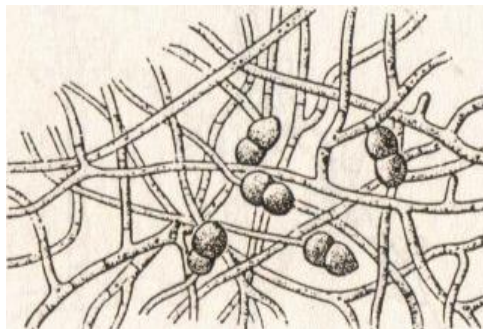


Рис. 22. *Trichotecium*

Конидии бесцветные, длинные, серповидные, многоклеточные (с поперечными перегородками), иногда расположены цепочкой одна за другой или появляются прямо на мицелии. Колонии гриба часто окрашены в розовый цвет (особенно нижняя сторона) (фузариум (*Fusarium*)) (рис. 23).

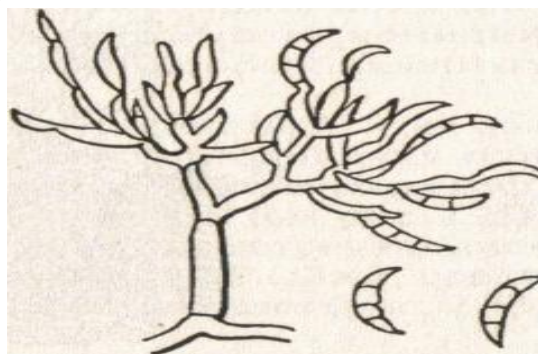


Рис. 23. *Fusarium*

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

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

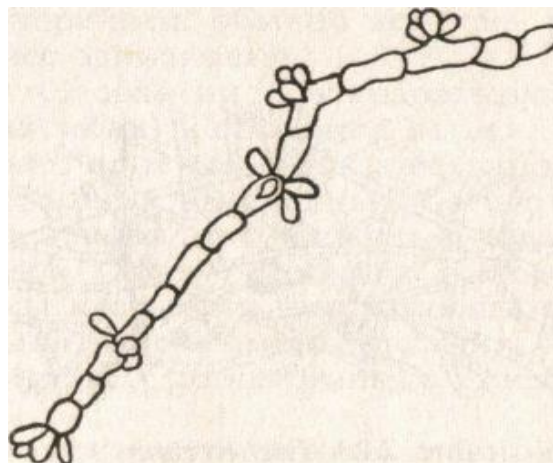
13. Стеригмы, покрывающие булавовидные вздутия, простые, неветвящиеся, несут цепочки конидий. Конидии округлые, гладкие или шиповатые, окрашенные или бесцветные (аспергиллус (*Aspergillus*)) (см. рис. 17).

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

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

16. Одноклеточные конидии, бесцветные, веретеновидные или округло-удлиненные. Колонии слизистые, черные (дематийум (*Dematium*)) (рис. 2.4).

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



25).

Рис. 24. *Dematium*

17. Конидии получают простым делением мицелия и легко отпадают, бесцветные, прямоугольные, иногда соединены в короткие цепочки (оидиум (*Oidium*)) (см. рис. 14).

Конидиеносцы длинные, многоклеточные. Конидии неправильной формы (длинные, округлые или лимонообразные), окрашены в светлый оливково-зеленый цвет (кладоспориум (*Cladosporium*)) (рис. 26).

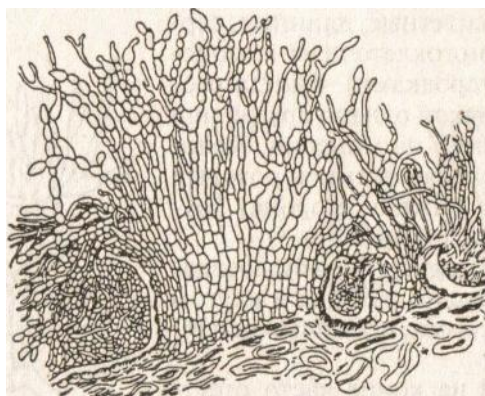


Рис. 25. *Monilia*

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

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

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

Студент должен идентифицировать грибы до рода, заполнить табл. 5 и схематично зарисовать органы спороношения.

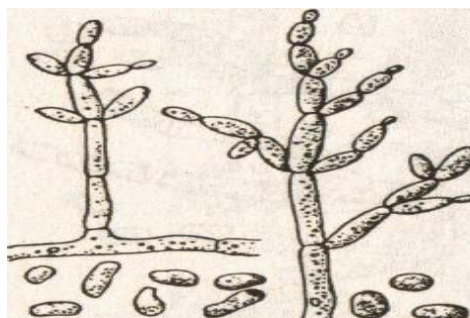


Рис. 26. *Cladosporium*

Таблица 5

Род плесневого гриба

Номер	Органы спороношения (рисунок)	Род гриба

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

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

Домашнее задание

1. Зарисовать грибы, не вошедшие в определитель, но встречающиеся на пищевых продуктах.

ГЛОССАРИЙ

Азотофиксация. Первый этап в круговороте азота осуществляется исключительно азотофиксирующими микроорганизмами.

Аммонификация. Отщепление аминокруппы от аминокислоты с выделением свободного аммиака в процессе дезаминирования.

Брожение. Анаэробный ферментативный окислительно-восстановительный процесс превращения органических веществ, посредством которого микроорганизмы получают энергию, необходимую для жизнедеятельности. Подвергаться сбразиванию могут различные органические химические соединения: углеводы, спирты, органические кислоты, аминокислоты, пурины, пиримидины и т.д.

Вирусы (от лат. *virus* – яд) – это внеклеточная форма жизни, обладающая собственным геномом и способная к воспроизведению только в клетках живых организмов. Вирусы проникают в растительные, животные ткани, бактерии (вирусы бактерий называют бактериофагами). Вирусы являются внутриклеточными паразитами на генетическом уровне и используют для своего размножения белоксинтезирующий аппарат клетки-хозяина.

Вискозитаксис. Реакция бактерий на изменение вязкости раствора, при этом они способны плыть в направлении ее увеличения или снижения.

Денитрификация. Процесс восстановления нитратов до нитритов и далее до какой-либо из газообразных форм азота (оксида азота, закиси азота и молекулярного азота).

Иммунитет (от лат. *immunitas* – освобождение, избавление от чего-либо) – способ защиты организма от всех чужеродных веществ как экзогенной, так и эндогенной природы. Биологический смысл данной защиты заключается в обеспечении генетической целостности особей в течение их индивидуальной жизни.

Капсула. Слизистое образование, обволакивающее клетку, сохраняющее связь с клеточной стенкой и имеющее аморфное строение.

Клон. Популяция генетически родственных клеток, полученная неполовым путем из одной родительской клетки.

Конъюгация. Прямой перенос фрагментов ДНК от донорских клеток к реципиентам при непосредственном контакте этих клеток.

Магнитотаксис. Способность перемещаться по силовым линиям магнитного поля Земли или магнита. В клетках этих бактерий имеются непрозрачные частицы геометрической формы – магнитосомы, заполненные железом в форме магнетита (Fe_3O_4) и выполняющие функцию магнитной

стрелки. В северном полушарии такие бактерии плывут в направлении Северного полюса, а в южном – в направлении Южного. *Аэротаксис* связан с разницей в среде кислорода, а *термотаксис* – с разницей температур.

Метаболизм (от греч. *metabole* – изменение, перемена) – совокупность всех химических превращений, происходящих в клетке. Метаболизм складывается из двух потоков реакций: *катаболизма (энергетического обмена)* и *анаболизма (конструктивного обмена)*. *Катаболизм (диссимилиация, энергетический метаболизм)* – это поток реакций, сопровождающийся мобилизацией энергии и преобразованием ее в электрохимическую ($\Delta\mu_{H^+}$) или химическую (АТФ) форму, которая затем может использоваться во всех энергозависимых процессах. *Анаболизм (ассимиляция, конструктивный метаболизм)* – это поток реакций, в результате которых за счет поступающих извне веществ строится вещество клеток, процесс связан с потреблением свободной энергии.

Микробиология (от греч. *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – наука) – наука о мельчайших, невидимых невооруженным глазом организмах. Микробиология изучает морфологию, физиологию, генетику, систематику, экологию микроорганизмов и взаимоотношения их с другими существами.

Нитрификация. В процессе нитрификации образуются окисленные формы азотистых соединений.

Патогенность (от греч. *pathos* – болезнь + *genos* – рождение) означает способность микроорганизмов вызывать заболевание.

Плазмиды. Двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, размером 0,1 до 5% размера хромосомы, несущие гены, необязательные для клетки-хозяина, или гены, необходимые только в определенной среде. IS-элементы (от англ. *insertion sequences* – последовательности-вставки) – это сегменты ДНК, способные перемещаться как целое из одного участка локализации в другой. IS-элементы содержат лишь те гены, которые необходимы для их собственного перемещения – транспозиции

Прокариоты (от греч. *pro* – перед, *karion* – ядро), древнейшие организмы, не обладающие четко оформленным ядром с оболочкой, к ним относят бактерии и археи.

Трансдукция. Перенос генов от одной бактериальной клетки к другой посредством бактериофага. Трансдуцирующий бактериофаг обычно переносит небольшой фрагмент ДНК хозяина от клетки-донора к клетке-реципиенту.

Транспозонами (Тп-элементы) называют сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но содержащие также гены, не имеющие непосредственного отношения к транспозиции (гены устойчивости к

антибиотикам, гены токсинов или гены дополнительных ферментов клеточного метаболизма).

Трансформация. Генетическое изменение клеток в результате включения в их геном экзогенной ДНК. Погибшие клетки постоянно высвобождают ДНК, которая может быть воспринята бактериями (как правило, любая чужеродная ДНК, попадающая в бактериальную клетку, расщепляется эндонуклеазами, но при некоторых условиях такая ДНК может быть включена в геном бактерии).

Фимбрии (от лат. *fimbria* – бахрома) – ворсинки общего типа, обеспечивающие прикрепление бактерий к субстратам, участвующие в транспорте метаболитов. F-пили (от англ. *fertility* – плодовитость + лат. *pilus* – волосок) – половые пили, представляют собой белковые цилиндры, внутри которых имеется канал, через который передается генетический материал от одной клетки к другой при конъюгации бактерий.

Фототаксис Движение к свету или от него, характерен прежде всего для фототрофных бактерий.

Фотосинтез (греч. *фотос* – свет; *синтез* – соединение, сочетание, составление) – синтез органических веществ за счет энергии солнечного света. В отличие от растений, только часть бактерий способна к фотосинтезу. У бактерий известны два типа фотосинтеза. Цианобактерии и прохлорофиты осуществляют кислородный фотосинтез (с выделением кислорода), у пурпурных, зеленых и гелиобактерий фотосинтез идет без выделения кислорода – аноксигенный фотосинтез.

Хемотаксис. Движение бактерий в определенном направлении относительно источника химического вещества. Среди химических соединений есть инертные, которые не влияют на движение бактерий и существуют вещества-эффекторы, определяющие таксисы бактерий. Среди них выделяют аттрактанты (сахара, аминокислоты, витамины), которые привлекают бактерии и репелленты (спирты, фенолы) – отпугивающие вещества.

Штаммом (от нем. *stamen*, происходить) называют культуру микроорганизмов, выделенную из определенного места обитания (почвы, воды, организма животного и т.д.).

Эукариоты (от. греч. *eu* – истинный, *karion* – ядро), организмы, имеющие четко оформленное ядро с кариомембраной, к ним принадлежат грибы, водоросли и простейшие

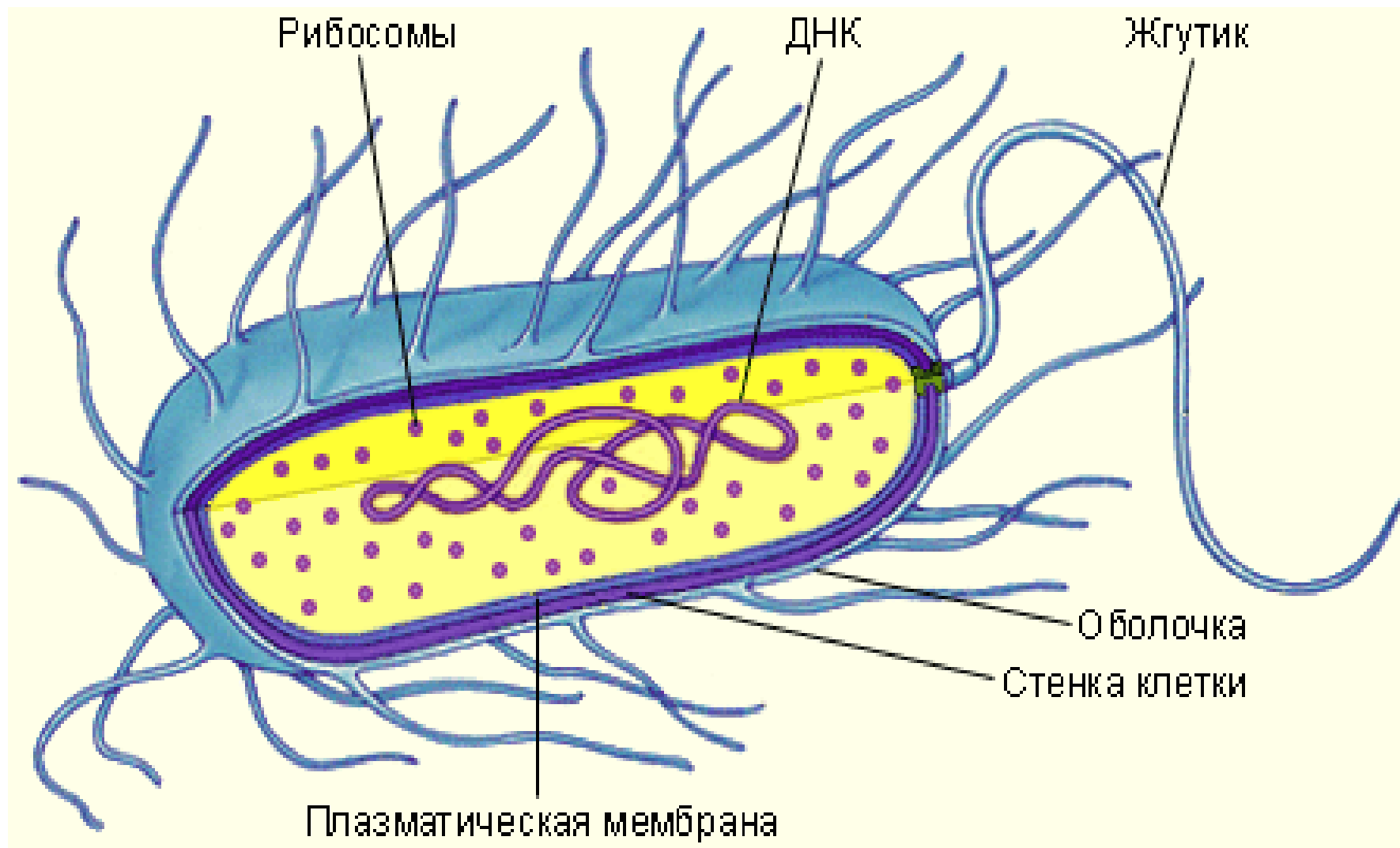


Рисунок -1 ПРОКАРИОТНАЯ КЛЕТКА

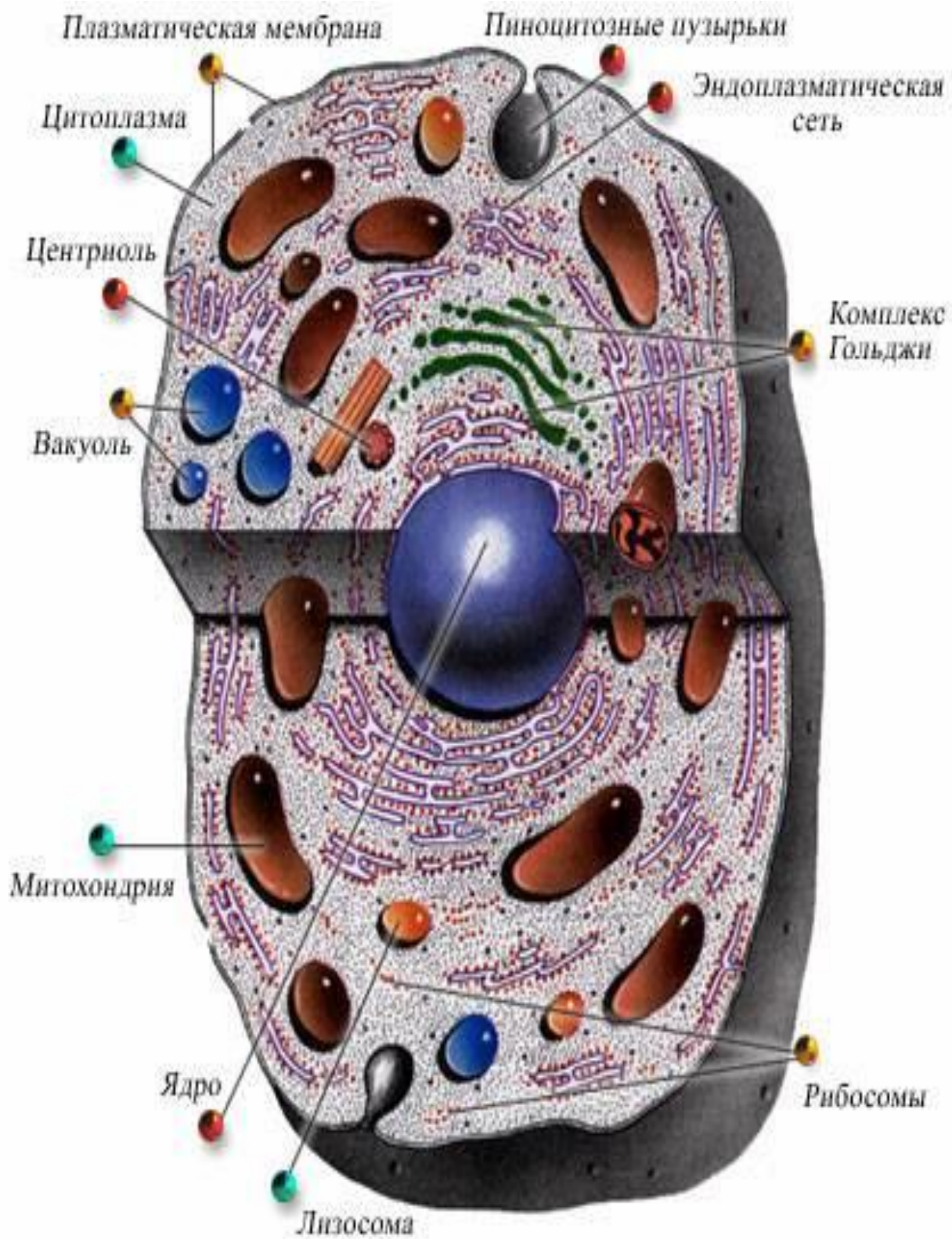


Рисунок 2 – ЭУКОРИОТНАЯ КЛЕТКА

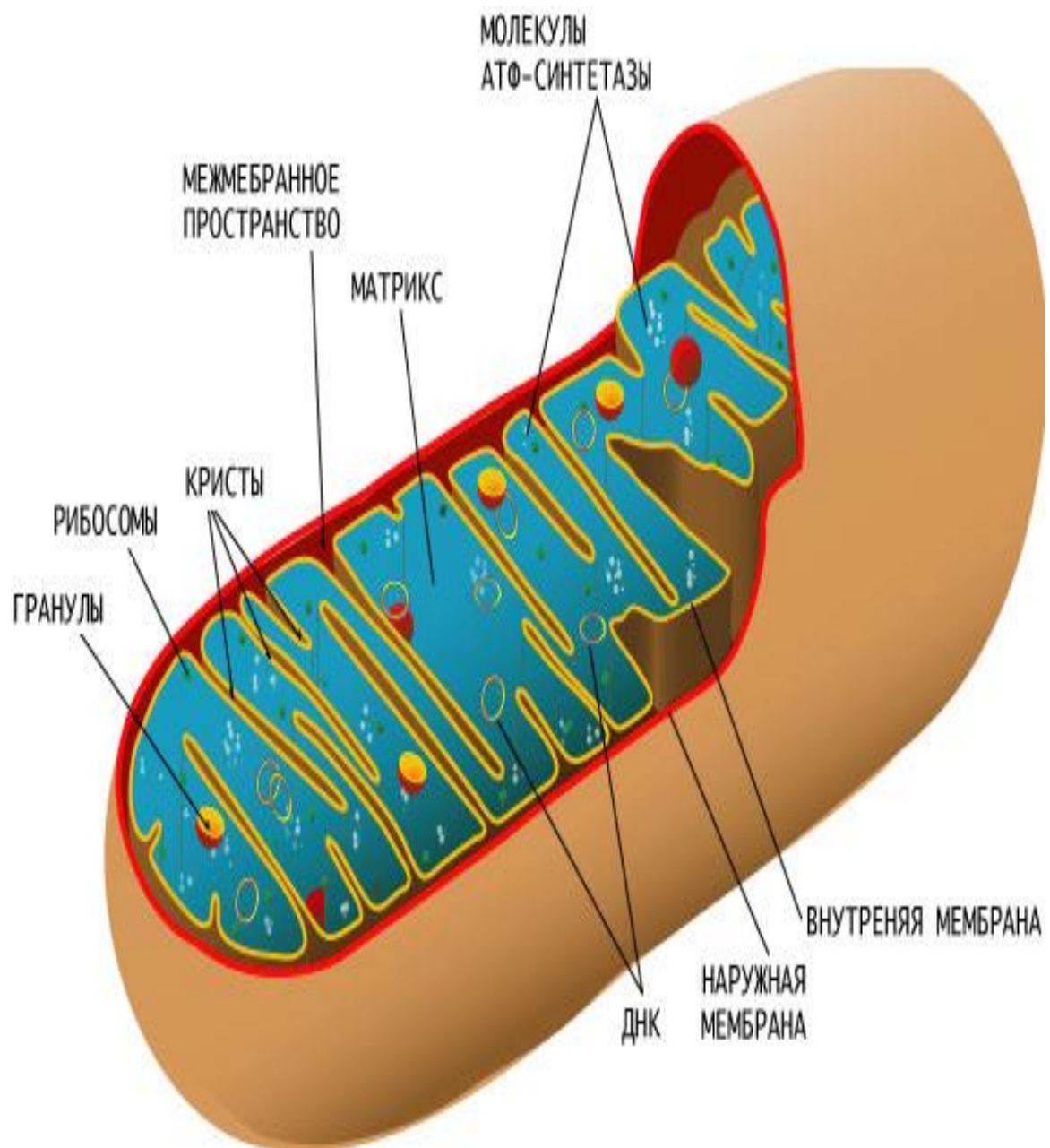


Рисунок 3 - Схема строения митохондрии

Починова Татьяна Владимировна
Шигапов Ильяс Исхакович

МИКРОБИОЛОГИЯ:

краткий курс лекций

для подготовки бакалавров очной и заочной форм обучения по направлению подготовки 35.03.07 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции». - Димитровград: Технологический институт – филиал УлГАУ, 2021.- 110с.