Учреждение образования
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Н. А. Белясова, Т. И. Ахрамович

МИКРОБИОЛОГИЯ

**Электронный курс лекций
для студентов специальности 1-48 02 02 «Технология лекарственных препаратов» специализации 1-48 02 02 01 «Промышленная технология лекарственных препаратов»**

Минск 2019

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73
Б44

Рассмотрен и рекомендован к изданию редакционно-издательским советом Белорусского государственного технологического университета.

Р е ц е н з е н т ы :
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник лаборатории
взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений
ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» *З. М. Алещенкова*;

кандидат биологических наук,
доцент кафедры микробиологии Белорусского государственного
университета *А. Г. Песнякевич*

Белясова, Н. А.

Б44 Микробиология : электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 02 «Технология лекарственных препаратов» специализации 1-48 02 02 01 «Промышленная технология лекарственных препаратов» / Н. А. Белясова, Т. И. Ахрамович. – Минск : БГТУ, 2019. – 290 с.

Рассмотрены вопросы классической микробиологии, включающие морфологию, систематику, физиологию и биохимию прокариот, дрожжей и мицелиальных грибов, водорослей, протистов, вирусов, а также фармацевтической микробиологии, касающиеся требований к микробиологической чистоте лекарственных средств и условиям их производства.

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73

© УО «Белорусский государственный
технологический университет», 2019
© Белясова Н. А., Ахрамович Т. И., 2019

ВВЕДЕНИЕ

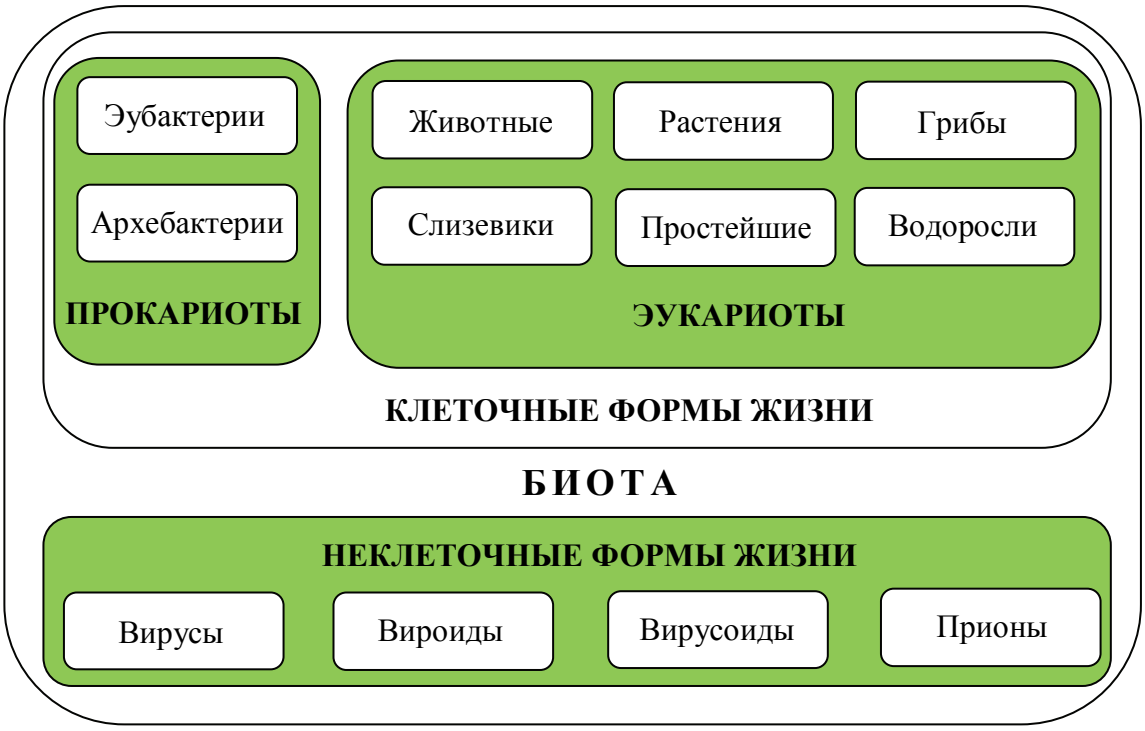
Предмет и задачи микробиологии

Мир скрытых от невооруженного глаза маленьких живых существ гораздо более разнообразен и удивителен, чем макромир. В нем властвуют свои законы и порядки, он хранит свои тайны, разгадать которые призвана наука «Микробиология». Этот увлекательный раздел биологии изучает морфологию, физиологию, систематику, биохимию, генетику и экологию микроорганизмов, т. е. микроскопических существ. Кого же называют микроорганизмами?

К микроорганизмам относятся: все прокариоты (эубактерии и архебактерии), отдельные эукариоты (грибы, слизевики, простейшие, животные, растения, микроводоросли), а также организмы с неклеточной организацией (вирусы, вироиды, вирусоиды, прионы). В **таксономическом плане** это весьма неоднородная группа, представители которой различаются по своей организации, морфологии, физиологическим особенностям, способам запасания энергии, типам питания. Однако всех их объединяет малая величина особей – мы не способны видеть большинство этих организмов невооруженным глазом. На рисунке представлена современная система классификации живых существ, населяющих нашу планету, и определено положение основных групп микроорганизмов в ней.

Кроме малой величины, микроорганизмы характеризуются рядом других признаков, отличающих их от макромира. Это, в первую очередь, простота организации, которая в наибольшей мере присуща неклеточным формам и прокариотам. Благодаря этой особенности микроорганизмы чрезвычайно легко приспосабливаются к меняющимся условиям окружающей среды. Легкость к адаптации объясняется и другим отличительным признаком микроорганизмов – их способностью

обитать в природных экосистемах в виде многочисленных популяций, концентрация которых может достигать 10^8–10^9 клеток в 1 мл, а для вирусных частиц – на два-три порядка больше. С возрастанием численности популяции увеличивается вероятность закрепления в ней «полезных» мутаций и, следовательно, повышается скорость естественного отбора. Кроме того, микроорганизмы отличаются гораздо более высокими соотношениями площади поверхности их клеток к объему, что способствует облегчению и ускорению процессов обмена с окружающей средой. Известно, что интенсивность метаболизма микробных клеток на несколько порядков выше, чем тканей растений и животных.



Система классификации живых существ

Для микроорганизмов характерны бóльшее разнообразие ферментных систем и более мобильные способы регуляции обмена веществ, чем для макроорганизмов. Все сказанное выше обусловливает наиболее высокую степень интенсивности и пластичности метаболизма, присущую микробным клеткам, обеспечивает им возможность выживать в самых неблагоприятных условиях окружающей среды, а также заселять экстремальные экологические ниши.

Важным свойством микроорганизмов является их способность к быстрому размножению. В идеальных условиях бактерии способны

делиться каждые 20 мин, есть сведения, что некоторые почвенные бактерии удваиваются за 6–10 мин! Наконец, к числу отличительных свойств микроорганизмов следует отнести отсутствие у них тканей, что делает их непохожими на растения и животных.

Наиболее важные отличительные особенности представителей основных групп микроорганизмов приведены в таблице.

Особенности организации микроорганизмов различных групп

Основные группы микроорганизмов	Особенности организации	Величина особей
Вирусы, вироиды, вирусоиды, прионы	Неклеточные формы жизни, ультрапаразиты клеток, не обладают собственным метаболизмом	15–300 нм
Эубактерии, архебактерии	Прокариоты (греч. pro – до, karion – ядро) не содержат в клетках истинного ядра. Одноклеточные	0,1–10,0 мкм
Дрожжи, мицелиальные грибы, протисты	Эукариоты (греч. eu – истинный, karion – ядро) имеют в клетках настоящее ядро. Одноклеточные (дрожжи, многие протисты) и многоклеточные (мицелиальные грибы, некоторые протисты)	10–100 мкм

Роль микроорганизмов в природе. Жизнь макромира неразрывно связана с деятельностью микроорганизмов, более того, можно утверждать, что без биогеохимической активности микроорганизмов все формы жизни на Земле, включая человека, не могли бы существовать. Такое большое значение микроорганизмов для окружающей среды объясняется следующим.

Прежде всего, микроорганизмы осуществляют круговорот биогенных элементов, среди которых наибольшее значение для живых систем имеют углерод и азот. По некоторым оценкам, суммарное число клеток микроорганизмов на Земле составляет $\sim 5 \cdot 10^{30}$, в них содержится столько же углерода, сколько во всех растениях, а азота и фосфора – в 10 раз больше, чем в общей растительной биомассе.

Микроорганизмы-редуценты, разлагая органику, осуществляют возврат в атмосферу углерода в форме CO_2, который непрерывно потребляется в ходе темновых реакций фотосинтеза растениями. Кроме того, только микроорганизмы способны утилизировать отдельные, искусственно синтезированные человеком, органические вещества – отходы промышленных производств, пестициды, составляющие упаковочных материалов и т. п. Если бы не микробная деградация этих

ксенобиотиков, они бы бесконечно накапливались в окружающей среде, загрязняя ее, а вместе с ними из биогеохимического оборота постоянно изымался бы углерод.

Содержание азота в почве, как известно, является лимитирующим фактором развития растений. При этом фиксация атмосферного азота (перевод его в доступную для растений форму) может осуществляться только представителями микроорганизмов – некоторыми прокариотами. Следует отметить и другой немаловажный этап круговорота азота – возвращение N_2 в атмосферу. Эту деятельность осуществляют бактерии-денитрификаторы в ходе анаэробного восстановления нитратов. Без их участия окисленные формы азота постоянно вымывались бы из почвы в моря и океаны, оставаясь там недоступными для растений. В процессе денитрификации образуются также окислы азота, которые участвуют в поддержании озонового экрана планеты.

Микроорганизмы переводят в минеральную форму соединения фосфора и серы, способствуя также растворению их в воде, что делает данные элементы доступными для потребления растениями. Выделяя в ходе жизнедеятельности кислоты, многие почвенные микроорганизмы обусловливают растворение и других минералов. Совокупность перечисленных свойств дает основание относить микроорганизмы к факторам плодородия почвы.

Способность микроорганизмов быстро утилизировать органику в составе сточных вод, а также токсичные соединения (метан, окись углерода, сероводород, аммиак, метанол, метилированные амины, многие ксенобиотики и др.) позволяет использовать их в системах биологической очистки. А в естественных экосистемах такие микроорганизмы выполняют функции «санитаров» планеты. Велика роль микроорганизмов в геохимических процессах: доказано их участие в формировании месторождений меди, марганца, серы, железа, нефти, фосфоритов.

Микроорганизмы на службе человека. Древние люди прежде осознали вред, который им могут причинять микроорганизмы, вызывая различные заболевания, а также порчу продуктов, поэтому развитие микробиологии стимулировалось вначале поиском способов борьбы с «вредными» микроорганизмами. Однако гораздо раньше человек интуитивно научился использовать деятельность микроорганизмов, даже не подозревая об этом. Так, уже в VI в. до н. э. в Вавилоне готовили пиво. С давних пор люди занимались хлебопечением, виноделием, получением кисломолочных продуктов и уксуса, росяной мочкой

льна. Теперь известно, что все эти процессы обусловливают определенные микроорганизмы, всегда присутствующие на используемых субстратах.

Пожалуй, впервые роль микроорганизмов в хозяйственных процессах, в частности в спиртовом брожении, стала понятной благодаря работам Л. Пастера (XIX в.). С тех пор научились с помощью микроорганизмов получать в промышленных масштабах этанол, глицерин, метан, органические кислоты (молочную, лимонную, уксусную, глюконовую, итаконовую), органические растворители (ацетон, бутанол, пропанол, бутандиол), аминокислоты (лизин, глутаминовую кислоту, треонин, глутамин, пролин), ферменты (протеиназы, амилазы, реннины, трипсины, целлюлазы, изомеразы, липазы), антибиотики и стероиды, полисахариды (ксантаны, декстраны, альгинат, курдлан, пуллулан), поли-β-гидроксибутират, гормоны (инсулин, соматостатин, интерферон, гормон роста человека), витамины (рибофлавин, B_{12}), средства защиты растений, стимуляторы роста растений, белок одноклеточных и множество иных продуктов. Производство всех перечисленных веществ относится к сфере биотехнологии. Кроме того, к числу процессов, в которых активно используются микроорганизмы, можно причислить: переработку отходов, биодеградацию ксенобиотиков, выщелачивание металлов из руд, многие отрасли пищевой промышленности, производство микроудобрений, ликвидацию последствий разливов нефтепродуктов на почве и в водоемах и многое другое.

Этот перечень народнохозяйственных отраслей, в которых задействованы микроорганизмы, позволяет оценить важность знаний в области микробиологии, поскольку ни один технологический процесс с участием микробных клеток не может быть осуществлен без понимания закономерностей роста, размножения, питания, метаболизма микроорганизмов, их отношения к факторам окружающей среды, типов взаимоотношений друг с другом и с макроорганизмами. Кроме того, рентабельность биотехнологических процессов напрямую зависит от активности штаммов-продуцентов, которые в последнее время чаще всего получают в процессе генноинженерных манипуляций. Таким образом, грамотные биотехнологи обязаны знать основы генетики микроорганизмов. А для того чтобы можно было выделять из окружающей среды новые штаммы – объекты биотехнологических производств, следует разбираться в экологических аспектах микробиологии.

Неоценима роль микроорганизмов в расшифровке закономерностей хранения и передачи наследственной информации, синтеза РНК

и белка, регуляции метаболизма, структуры генетического кода, механизмов рекомбинации и репарации ДНК, в понимании основ мутагенеза и деятельности мобильных элементов, в создании методологии генетической и белковой инженерии. Можно утверждать, что разработка технологии рекомбинантных ДНК обязана, в первую очередь, открытиям, сделанным на микроорганизмах.

История развития науки

Первое опубликованное изображение микроорганизмов принадлежит английскому математику **Роберту Хуку** (Robert Hooke, 1635–1703), который в совершенстве овладел техникой микроскопирования и в 1665 г. издал знаменитую книгу «Микрография» с рисунками увиденных им микроорганизмов, в основном мицелиальных грибов.

Первооткрывателем бактерий считается **Антони ван Левенгук** (Antony van Leeuwenhoek, 1632–1723). Этот преуспевающий голландский бизнесмен не получил университетского образования. Он осваивал азы своей профессии, будучи учеником в мануфактурной лавке. Возможно, именно там он научился пользоваться увеличительными стеклами, определяя качество выделки тканей. Чтобы добиться бóльшего увеличения, Левенгук конструировал микроскопы, которые увеличивали объекты в 50–300 раз. С помощью этих микроскопов он рассматривал капли воды, биологические жидкости, налет с зубов и другие объекты, обнаруживая в них бесчисленное множество живых существ, невидимых никем доселе. Воодушевленный своим открытием, Левенгук стал описывать различные микроорганизмы, составляя научные отчеты, которые он отправлял в Королевское общество в Лондоне. Таким образом результаты исследований Левенгука получили известность. Этот естествоиспытатель открыл и описал представителей всех основных групп клеточных микроорганизмов: бактерий, дрожжей, микроводорослей, простейших, причем сделал это с высокой точностью. Его работы положили начало описательному периоду в истории микробиологии.

Существенно обогатили методологию микроскопирования бактерий исследования **Пауля Эрлиха** (Paul Ehrlich, 1854–1915), который предложил в 1881 г. метод прижизненной окраски бактерий метиленовым синим, а также работы **Ганса Христиана Грама** (Hans Christian Gram, 1853–1938), разработавшего метод обнаружения различий между двумя основными типами клеточных стенок бактерий. Окраска

по Граму и в настоящее время служит одним из основных этапов идентификации бактерий.

Описательный период в истории микробиологии длился слишком долго – не менее 150 лет. Новый период, который можно назвать физиологическим, начался с работ **Луи Пастера** (Louis Pasteur, 1822–1895). Согласно общепринятому мнению, его исследования по физиологии и экологии микроорганизмов, описание возбудителей различных заболеваний человека и животных положили начало микробиологии как истинной научной дисциплины.

Луи Пастер родился и жил во Франции, начав свою научную деятельность как химик. Однако вскоре он сделал выдающиеся открытия в области микробиологии: на примере развития микроорганизмов доказал невозможность самозарождения жизни; открыл анаэробиоз – жизнь микроорганизмов в отсутствие молекулярного кислорода; пытаясь выявить причину скисания вина, доказал роль микроорганизмов в процессах брожения, изучил химизм спиртового, уксуснокислого, молочнокислого и маслянокислого брожения; нашел способ борьбы с контаминацией пищевых продуктов, в первую очередь пива и вина, – их кратковременный прогрев до температуры 50–60°С (**пастер**изация); совместно с коллегами изобрел автоклав.

Неоценимый вклад внес Пастер в медицинскую микробиологию. Во многом благодаря своей научной интуиции, не зная основ наследственности (генетика еще не зародилась как наука), он научился получать ослабленные культуры патогенных микроорганизмов, которые использовал для вакцинации животных. Пастеру удалось получить эффективные вакцины против холеры кур, а позднее – против свирепствовавшей в то время в Европе сибирской язвы.

Эксперименты Пастера с кратковременным прогревом жидкостей не всегда оказывались успешными – в некоторых случаях и после нагревания до 100°С в них развивались бактерии. Причину такого явления установил сторонник Пастера, английский физик **Джон Тиндаль** (John Tyndall, 1820–1893). Он первым предположил, а потом доказал существование у некоторых бактерий термоустойчивых форм (эндоспор) и предложил оригинальный способ стерилизации жидкостей, содержащих спорообразующие бактерии, – дробную стерилизацию (**тиндал**изация). Принцип метода состоит в кратковременных прогревах жидкости, чередующихся с благоприятными для прорастания эндоспор периодами, в результате чего погибают чувствительные к температуре вегетативные клетки, которые образуются из эндоспор.

Еще одна знаменитая школа микробиологов возникла во второй половине XIX в. в Германии. Ее возглавил немецкий ученый **Роберт Кох** (Robert Koch, 1843–1910). Этот исследователь и его ученики обогатили микробиологию следующими достижениями:

– ввели в практику плотные питательные среды, благодаря чему появилась возможность получать чистые культуры микроорганизмов в виде изолированных колоний на поверхности среды. **Фанни Хессе** (Fannie Hesse, 1850–1934) – супруга одного из сотрудников Р. Коха – предложила использовать в качестве уплотнителя для сред агар-агар. Ассистент Р. Коха – **Юлиус Петри** (Julius Richard Petri, 1852–1921) – разработал стеклянные емкости для культивирования микроорганизмов на плотных средах, которые используются по сей день и называются чашками Петри;

– разработали методологию окраски бактерий анилиновыми красителями, что позволило обнаружить бактерии с гидрофобными клеточными стенками, которые не прокрашивались водными красителями;

– применили для улучшения разрешающей способности микроскопа иммерсионную систему, что дало возможность выявлять плохо различимые бактериальные формы;

– использовали микрофотографию;

– внедрили в микробиологическую практику способ химической стерилизации – дезинфекцию.

Все эти нововведения не были случайными, их упорно разрабатывал Р. Кох, стремившийся обнаружить возбудителя туберкулеза – «невидимку», которого никак не могли найти микробиологи. В то время от туберкулеза умирал каждый седьмой житель Европы, и Р. Кох был уверен в том, что данное заболевание вызывается микроорганизмами. Он сформулировал ряд подходов, необходимых для идентификации возбудителя заболевания, которые вошли в историю медицинской микробиологии как постулаты Коха. Такая непоколебимость мнений и плодотворная деятельность привели исследователя к успеху: в 1882 г. он доложил Берлинскому товариществу физиологов об открытии возбудителя туберкулеза, который с тех пор носит название палочки Коха. Через два года в результате изучения эпидемии холеры в Египте и Индии Р. Коху удалось открыть возбудителя холеры. А в 1905 г. ученому присудили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

У истоков микробиологии в России стоял **Л. С. Ценковский** (1822–1887) – ботаник и микробиолог, занимавшийся систематикой

микроорганизмов. Ему принадлежит первая научно обоснованная классификация микроорганизмов, в которой он указал на близость бактерий и сине-зеленых водорослей. Ценковский описал много новых родов и видов микроорганизмов, внес вклад в разработку методов получения и сохранения вакцины против сибирской язвы.

В области медицинской микробиологии обрел знаменитость другой русский ученый – **И. И. Мечников** (1845–1916). Он был первым, кто описал явление фагоцитоза (1884 г.), наблюдая под микроскопом, как подвижные клетки крови, которые он назвал фагоцитами, движутся к микробным клеткам, поглощают и переваривают их. Эти исследования доказали роль клеток крови в разрушении болезнетворных микроорганизмов и послужили основой для развития иммунологии. В экспериментах на себе Мечников установил роль холерного вибриона как возбудителя азиатской холеры. Им начаты исследования антагонистических отношений между микроорганизмами в инфекционном процессе, в частности, он обнаружил антагонизм между молочнокислыми и гнилостными бактериями в желудочно-кишечном тракте человека и животных. В результате Мечников сформировал философское учение о продолжительности жизни и причинах старения, указав на особую роль рационального питания с содержанием в рационе большого количества кисломолочных продуктов. И. И. Мечников стал вторым русским ученым, удостоенным в 1908 г. Нобелевской премии за работы в области иммунологии.

Учеником, а впоследствии соратником Мечникова был советский микробиолог и эпидемиолог **Н. Ф. Гамалея** (1859–1949), который организовал в России первую бактериологическую станцию и впервые в стране осуществил вакцинацию людей против бешенства. Он создал противохолерную и оспенную вакцины. Впервые описал явление бактериофагии – разрушение бактериальных клеток под действием бактериофагов. Имя Н. Ф. Гамалеи присвоено Институту эпидемиологии и микробиологии в Москве.

Первооткрывателем вирусов считается русский физиолог растений и микробиолог **Д. И. Ивановский** (1864–1920). Изучая болезни растений табака, он доказал заразность мозаичной болезни и обнаружил, что ее возбудитель способен проходить через поры фильтров, задерживающих самые мелкие бактериальные клетки, а также диффундировать в агаровых гелях. Так был открыт новый тип инфекционных микроорганизмов, названных впоследствии вирусами.

Важнейшим событием XX в. считается открытие в 1928 г. **Александром Флемингом** (Alexander Fleming, 1881–1955) первого

антибиотика – пенициллина. В 1908 г. Флеминг стал лучшим студентом-медиком Лондонского университета и планировал стать хирургом, однако жизнь распорядилась иначе, и он стал бактериологом, сделав два замечательных открытия, практически, случайно. В 1921 г. Флеминг заболел и обнаружил, что носовая жидкость «растворяет» бактерии на плотной среде. Так он открыл фермент лизоцим.

В 1928 г., вернувшись из отпуска, Флеминг заметил на старых посевах стафилококков зоны лизиса вокруг колонии мицелиального гриба *Penicillium notatum*. Он изучил физико-химические и терапевтические свойства пенициллина и предложил его использовать в качестве антисептика для обработки ран. Применение пенициллина для лечения ран и послеоперационных осложнений в годы Второй мировой войны было столь успешным, что, согласно мнению историков, в роли бактериолога Флеминг внес более весомый вклад в медицину, чем если бы он стал самым высококлассным хирургом.

Последняя четверть XIX в. в истории развития микробиологии ознаменована открытиями в области экологии микроорганизмов, осознанием важной роли микроорганизмов в происходящих в окружающей среде процессах, влияющих на поддержание жизни на Земле. Это, в первую очередь, независимые исследования русского микробиолога **С. Н. Виноградского** (1856–1953) и голландского ботаника и микробиолога М. Бейеринка.

Виноградский открыл процесс хемосинтеза у микроорганизмов, выделив из почвы и изучив группу нитрификаторов – бактерий, способных извлекать энергию при окислении восстановленных неорганических соединений. Для этого ему пришлось разработать широко используемый сегодня метод элективных культур. Он показал особую роль этих бактерий в почве, состоящую в обеднении ее связанными формами азота, поскольку окисленные соединения азота легко вымываются из почвы с талыми водами и атмосферными осадками. Виноградский описал микробиологическое окисление соединений серы и железа, а также впервые выделил из почвы и охарактеризовал анаэробные азотфиксирующие бактерии. Этот ученый заложил основу современных представлений о роли микроорганизмов в круговороте веществ в природе.

Мартин Бейеринк (Martinus Beijerinck, 1851–1931) выделил из почвы чистые культуры симбиотических и свободноживущих азотфиксирующих бактерий, в том числе анаэробных, и описал явление фиксации атмосферного азота. Решая данную задачу, он независимо от Виноградского разработал метод элективных культур. Кроме того,

Бейеринк выделил чистые культуры сульфатредуцирующих бактерий, которые составляют важное звено в круговороте серы. Через 5 лет после Ивановского сформулировал вывод о небактериальном происхождении возбудителя табачной мозаики.

В 1941 г. американские исследователи **Джордж Уэлс Бидл** (George Wells Beadle, 1903–1989) и **Эдуард Тейтум** (Edward Lawrie Tatum, 1909–1975), изучая проявление индуцированных мутаций у грибов *Neurospora*, сумели приблизиться к пониманию функций генов и сформулировали свой знаменитый постулат «один ген – один фермент», который означал, что каждый ген направляет синтез одного фермента. В настоящее время эта гипотеза претерпела лишь одно изменение, связанное с тем, что структура некоторых белков, включающих более чем одну полипептидную цепь, кодируется несколькими генами. При этом последовательность аминокислот в каждой полипептидной цепи кодируется отдельным геном, цепи синтезируются отдельно и лишь затем соединяются в готовый продукт. Таким образом, современная трактовка постулата Бидла и Тейтума звучит так: «один ген – одна полипептидная цепь». Это достижение совпало во времени с серией открытий в области генетики микроорганизмов, и его можно считать началом генетического периода в истории развития микробиологии.

В начале XX в. биологи активно искали ответ на вопрос – какое вещество в клетке является носителем наследственной информации? Эксперименты по выяснению структуры этого вещества проводились на микроорганизмах как наименее сложно организованных и быстро воспроизводящихся биологических объектах. В 1944 г. американцы **Освальд Эвери** (Oswald Avery, 1877–1955), **Колин Маклауд** (Colin MacLeod) и **Маклин Маккарти** (Maclyn McCarty) опубликовали научное сообщение с доказательством роли ДНК в хранении и передаче наследственной информации, выполнив эксперименты по генетической трансформации бактерий.

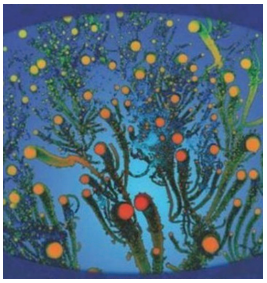
С 1946 по 1952 г. **Джошуа Ледерберг** (Joshua Lederberg, 1925–2008) с сотрудниками обнаружили половые различия у бактерий, которые связаны с наследованием плазмид. Им удалось выявить и изучить два способа обмена генетической информацией у бактерий – конъюгацию и трансдукцию, а также закономерности рекомбинации генетического материала у этих микроорганизмов.

Наиболее значимым событием данного периода стала расшифровка структуры и функций ДНК. В 1953 г. **Джеймс Уотсон** (James Watson, 1928–) и **Фрэнсис Крик** (Francis Crick, 1916–2004) предложили

модель молекулы ДНК в виде двойной спирали, положив начало изучению механизмов передачи наследственной информации. Эти ученые – лауреаты Нобелевской премии (1962 г.) – изучили структуру и функции бактериальных рибосом, на примере бактерий определили роль РНК в процессе белкового синтеза, а также раскрыли механизм репликации ДНК. Вместе с коллегами в экспериментах на бактериофагах впервые установили основные принципы организации генетического кода.

Этот далеко не полный перечень открытий и достижений генетического периода в микробиологии демонстрирует важность микроорганизмов как объектов, с помощью которых оформились такие новые научные направления, как молекулярная биология, генетическая инженерия, молекулярная биотехнология, белковая инженерия и др. Иными словами, микроорганизмы и их отдельные структуры стали инструментами, посредством которых человек не только приблизился к пониманию тайн наследственности, но и научился перестраивать геномы, формировать новые организмы, лечить наследственные заболевания, т. е. управлять наследственностью.

Часть I



МОРФОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Глава 1

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК

Большинство населяющих нашу планету организмов имеет клеточное строение (см. рисунок на с. 4, таблицу на с. 5). Для всех клеток характерна общность организации:

1) это элементарные единицы живого, неделимые далее в функциональном отношении;

2) клетки могут существовать как обособленные самостоятельные организмы или являться структурными частями многоклеточных организмов;

3) через клетку производится поглощение веществ и выведение продуктов метаболизма;

4) в клетке осуществляется превращение, запасание и использование вещества и энергии;

5) в клетке хранится, воспроизводится и реализуется наследственная информация;

6) клетки способны к самовоспроизведению и росту.

Любая клетка имеет в основе **протопласт** – содержимое клетки, окруженное **плазматической мембраной**. Плазматическая мембрана,

ограничивающая цитоплазму и формирующая протопласт, служит полупроницаемым барьером, не позволяющим содержимому клетки смешиваться с окружающей средой. В основе структуры плазматической мембраны лежит двойной слой полярных липидов (бислой), которые формируют с помощью своих жирнокислотных остатков гидрофобную внутреннюю область, не проницаемую для большинства веществ. В липидный бислой вкраплены молекулы белков, которые участвуют в селективном транспорте веществ через мембрану, а также выполняют каталитическую и рецепторную (восприятие сигналов из окружающей среды) функции. Плазматическая мембрана – это эластичное образование, не способное служить механической защитой для протопласта.

Содержимое клетки называют цитоплазмой, и она состоит из бесформенного геля – **цитозоля**, в который погружены разнообразные **органеллы** и **включения**. Цитозоль – это концентрированный водный раствор аминокислот, сахаров, белков, липидов, низкомолекулярных органических соединений, ионов металлов, различных анионов и других веществ, имеющий вязкую консистенцию. Реакция среды цитозоля обычно нейтральная или слабощелочная (7,0–7,2). Многие клетки снаружи плазматической мембраны имеют клеточную стенку. Чаще всего клеточные стенки микроорганизмов состоят из полисахаридов и являются довольно прочными. Их основная функция – защитная. Они, в частности, предохраняют клетки от физических повреждений.

В соответствии со структурой наследственного аппарата и некоторыми другими признаками клетки делят на два типа: эукариотические (имеют истинное ядро) и прокариотические (не содержат истинного ядра). Эти типы клеток существенно различаются по организации и будут рассмотрены отдельно.

§ 1.1. Структура эукариотической клетки

Типичной особенностью эукариотических клеток является **компартментализация**: многочисленные органеллы, расположенные в цитозоле, создают в клетке отдельные отсеки – **компартменты** (рис. 1.1), в каждом из которых осуществляются специфические процессы. Кроме того, в цитозоле, а иногда и в отдельных органеллах, могут содержаться включения, которые представляют собой запасные вещества. В эукариотической клетке насчитывается не менее восьми типов

различных клеточных органелл, каждая из которых характеризуется специфической структурой и выполняет определенную функцию (рис. 1.1). Согласованное функционирование органелл и составляет основу жизнедеятельности клетки.

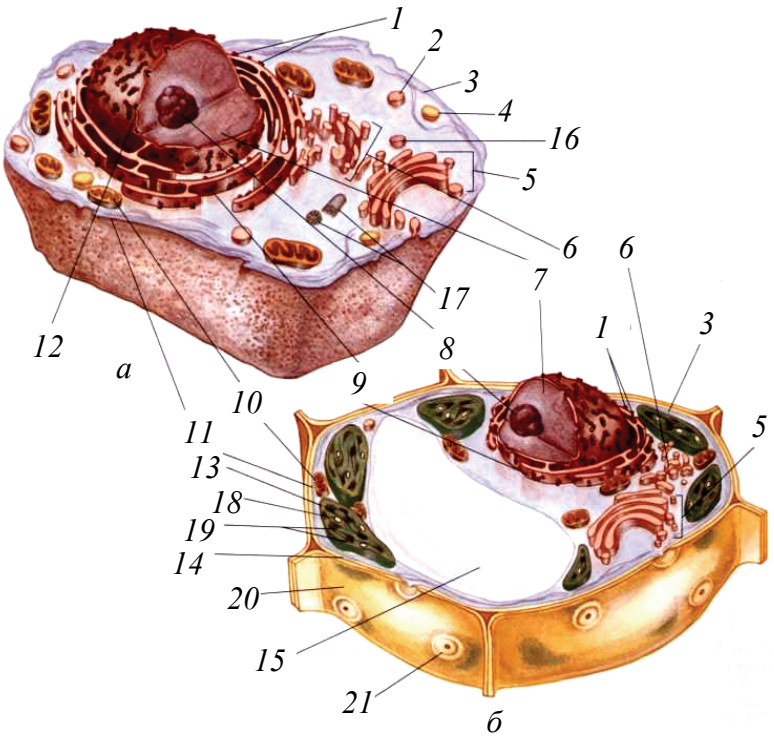


Рис. 1.1. Строение эукариотических клеток:
а – животной; *б* – растительной:
1 – рибосомы; *2* – пероксисома; *3* – цитоскелет; *4* – лизосома;
5 – аппарат Гольджи; *6* – гладкий эндоплазматический ретикулум;
7 – ядро; *8* – ядрышко; *9* – шероховатый эндоплазматический ретикулум;
10 – митохондрии; *11* – плазматическая мембрана; *12* – ядерная мембрана;
13 – хлоропласт; *14* – клеточная стенка; *15* – вакуоль; *16* – транспортная везикула;
17 – центриоли; *18* – гранулы крахмала; *19* – тилакоиды; *20* – соседняя клеточная стенка; *21* – плазмодесма

Ядро (рис. 1.2) является самой крупной органеллой эукариотической клетки и достигает в диаметре 3–10 мкм. Содержимое ядра отделено от цитоплазмы ядерной оболочкой, которая, в свою очередь, состоит из двух слоев мембран, структура которых подобна структуре плазматической мембраны. В оболочке ядра имеются крупные поры, необходимые для транспорта молекул РНК в цитоплазму. Гелеобразное содержимое ядра носит название **нуклеоплазма**, в нее погружены **хромосомы** – структурно оформленные с помощью **белков-гистонов** линейные молекулы ДНК. Для каждого вида организмов характерен

свой уникальный набор, в котором хромосомы различаются по структуре, форме, числу. В ядре, а именно в составе ядерной ДНК, хранится основная наследственная информация клетки. Ядра эукариотических клеток делятся с помощью митоза или мейоза.

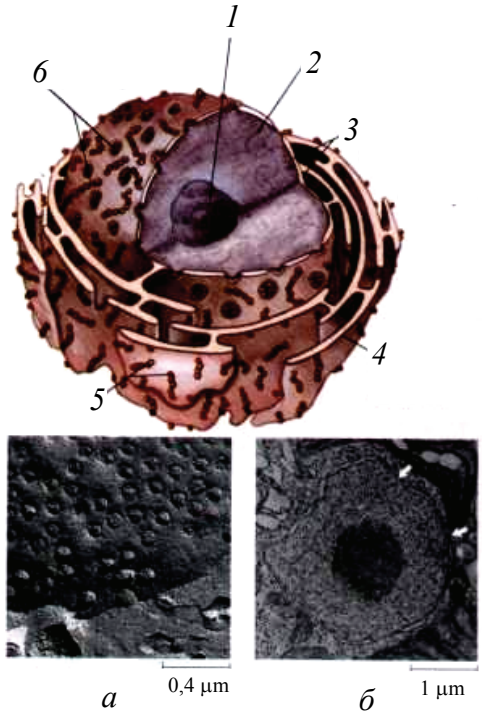


Рис. 1.2. Ядро эукариотической клетки:
а, *б* – электронные микрофотографии ядерной мембраны с порами при разном увеличении:
1 – ядрышко; *2* – хроматин (комплекс ДНК с белками-гистонами);
3 – двухслойная ядерная мембрана;
4 – шероховатый эндоплазматический ретикулум; *5* – рибосомы; *6* – поры в ядерной мембране

При микроскопировании в ядре различают более уплотненный материал – **ядрышко**. Здесь содержатся молекулы ДНК, определяющие структуру рибосомальных РНК (рРНК), а также осуществляется синтез рРНК.

Ядра эукариот служат важнейшими, но не единственными носителями наследственной информации клетки. Аналогичную функцию выполняют элементы так называемой внеядерной наследственности. У эукариот **внеядерная наследственность** может быть представлена **плазмидами** (автономно реплицирующимися молекулами ДНК, чьи

свойства более подробно описаны в § 1.3), ДНК митохондрий и ДНК хлоропластов.

Особенностью эукариотических клеток является наличие в них сложнейшей сети **цитомембран**, которые имеют сходное с плазматической мембраной строение, связаны с ней и соединяют друг с другом различные клеточные органеллы (рис. 1.3). В результате создается разветвленная внутренняя мембранная система, участвующая, с одной стороны, в разграничении клеточных функций, а с другой – в координации действий связанных мембранами органелл.

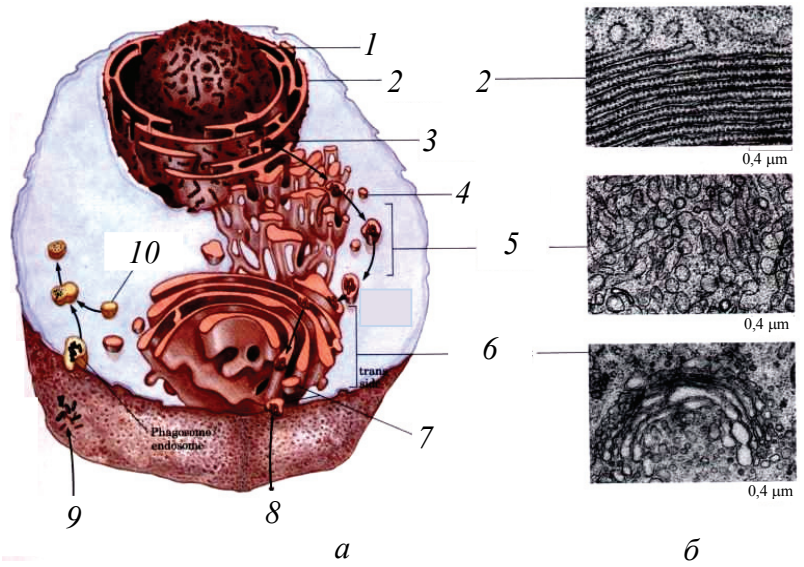


Рис. 1.3. Органеллы, относящиеся к сети цитомембран:
а – схематическое представление;
б – электронные микрофотографии:
1 – ядро; *2* – шероховатый эндоплазматический ретикулум;
3 – синтезируемые на рибосомах секреторные белки;
4 – транспортные везикулы; *5* – гладкий эндоплазматический ретикулум; *6* – аппарат Гольджи; *7* – секреторные везикулы;
8 – экзоцитоз; *9* – эндоцитоз; *10* – лизосома

К числу органелл с выраженной цитомембранной структурой относятся, в первую очередь, эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи.

Эндоплазматический ретикулум (ЭР). Представляет собой обширную мембранную сеть, состоящую из уплощенных мешочков и цистерн. Часть мембран ЭР участвует в формировании наружной мембраны ядерной оболочки (рис. 1.3), другая часть связана со впячиваниями плазматической мембраны. Различают два морфологических типа ЭР, которые выявляются при электронной микроскопии, – гладкий

и шероховатый. У этих типов ЭР разные функции. В гладком ЭР локализуются многие ферменты, участвующие в обезвреживании токсичных веществ, на его поверхности осуществляется синтез липидов, а также расщепление гликогена. Мембраны шероховатого ЭР усеяны рибосомами, на которых протекает синтез белка (это в основном те белки, которые подлежат секреции из клетки или включению в плазматическую мембрану), здесь же формируется тот мембранный материал, который необходим клетке для увеличения числа органелл в процессе деления. Мембраны ЭР непосредственно связаны с наружной ядерной мембраной и аппаратом Гольджи.

Аппарат Гольджи (комплекс Гольджи). Это разветвленная сеть мембранных структур, по форме напоминающих стопки дисковидных мембран и связанных с ними многочисленных пузырьков (**везикул**). Расположен аппарат Гольджи в клетке обычно между ЭР и плазматической мембраной (см. рис. 1.3 на с. 19), что не случайно: продукты из ЭР направляются в аппарат Гольджи, где сортируются на секреторные (например, гормоны, литические ферменты) и те, которые будут функционировать в клетке. Здесь также происходит модификация белков, которые с помощью секреторных везикул аппарата Гольджи транспортируются к плазматической мембране и в ходе экзоцитоза выводятся на ее поверхность. Созревание белков в аппарате Гольджи представляет собой их связывание с липидами или полисахаридами, в результате чего формируются соответственно липопротеины и гликопротеины. Эти вещества обычно включаются в состав клеточных стенок эукариот. С помощью везикул аппарата Гольджи эукариотические клетки осуществляют также секрецию внеклеточных ферментов.

Лизосомы. Представляют собой специализированные мембранные пузырьки (рис. 1.3), сформированные липидами и белками, происходящими из мембран комплекса Гольджи и плазматической мембраны. Лизосомы содержат разнообразные пищеварительные ферменты. В этих органеллах у эукариот осуществляются некоторые процессы расщепления сложных молекул или частиц. Одной из функций лизосом является расщепление прокариотических клеток, которые захватываются в ходе фагоцитоза. Низкомолекулярные продукты расщепления поступают в цитозоль и используются клеткой в качестве питательных веществ. Мембраны лизосом непроницаемы для литических ферментов и устойчивы к их воздействию. Такая компартментализация процессов пищеварения позволяет защитить другие клеточные структуры от активности литических ферментов.

Микротельца. Это меньшие по размерам, чем лизосомы, но сходные с ними по функциям мембранные везикулы эукариот. В этих органеллах изолированно от содержимого клетки протекают метаболические реакции, в которых участвует перекись водорода. Микротельца содержат **каталазу** – фермент, расщепляющий перекись водорода на кислород и воду. Одним из типов подобных органелл являются **пероксисомы** (см. рис. 1.1 на с. 17). В них осуществляется окисление отдельных аминокислот с образованием перекиси водорода, которая здесь же нейтрализуется. Если бы этого не происходило и перекиси попадали в цитоплазму, они вызывали бы губительные для клетки необратимые реакции окисления важных клеточных метаболитов.

Вакуоли. Это еще один тип эукариотических мембранных органелл, которые представляют собой относительно крупные резервуары изменчивой формы (рис. 1.1), выполняющие разнообразные функции. Одни типы вакуолей могут использоваться для хранения запасных веществ. Например, дрожжи запасают в вакуолях полифосфаты, аминокислоты, мочевую кислоту, у некоторых микроорганизмов в вакуолях могут накапливаться источники углерода, азота, фосфора. Другие типы вакуолей часто служат клеткам для вывода ненужных продуктов, в этом случае вакуоли могут связываться с плазматической мембраной в ходе цитозов. Иногда вакуоли используются как пищеварительные органеллы: в них осуществляется расщепление питательных веществ, а также ненужных собственных органелл.

Перечисленные выше мембранные органеллы и структуры (плазматическая мембрана, наружная ядерная мембрана, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы и микротельца, вакуоли) представляют собой систему взаимосвязанных клеточных мембран. Кроме них в эукариотической клетке функционируют обособленные органеллы с двойными мембранными оболочками (митохондрии и хлоропласты), а также структуры с немембранной организацией (рибосомы, цитоскелет).

Митохондрии. Представляют собой крупные органеллы, окруженные двойной мембраной, по форме и размерам часто напоминающие палочковидные бактерии (рис. 1.4). Между внутренней и внешней митохондриальными мембранами есть **межмембранное пространство**, заполненное жидкостью. Внутренняя мембрана митохондрий имеет большое число разветвленных впячиваний, называемых **кристами**. В кристах расположены компоненты дыхательной цепи, по которым совершают путь электроны, отщепленные от окисленного субстрата. Между кристами находится гелеобразный раствор

многочисленных ферментов, низкомолекулярных веществ, ионов – **матрикс**. Здесь осуществляется окисление субстратов. Таким образом, функциями митохондрий является окисление веществ при участии молекулярного кислорода, сопровождающееся запасанием энергии в составе АТР (дыхание).

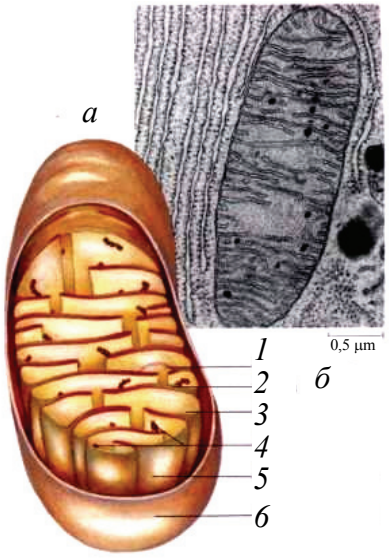


Рис. 1.4. Схематическое изображение (*а*)
и электронная микрофотография (*б*)
митохондрий:
1 – ДНК; *2* – криста; *3* – матрикс;
4 – рибосомы; *5* – внутренняя мембрана;
6 – наружная мембрана

В митохондриях имеется собственная ДНК, организованная в виде нуклеоида (как у прокариот), а также собственный аппарат синтеза белка, содержащий рибосомы, подобные тем, что присутствуют в прокариотических клетках (70S).

Недавно стало известно, что в клетках некоторых эукариот, ведущих анаэробный образ жизни (осуществляют брожение), митохондрии отсутствуют, а вместо них имеются похожие по размеру **гидрогеносомы** (рис. 1.5) – сферические органеллы, окруженные мембраной, но не содержащие кристы, электрон-транспортную цепь и ферменты цикла трикарбоновых кислот. Основным процессом в гидрогеносомах является окисление пирувата до H_2, CO_2 и ацетата, сопровождающееся запасанием энергии. Гидрогеносомы обнаружены в клетках паразитических простейших рода *Trichomonas*, а также у инфузорий, обитающих в желудках жвачных животных, в бескислородном иле и осадках.

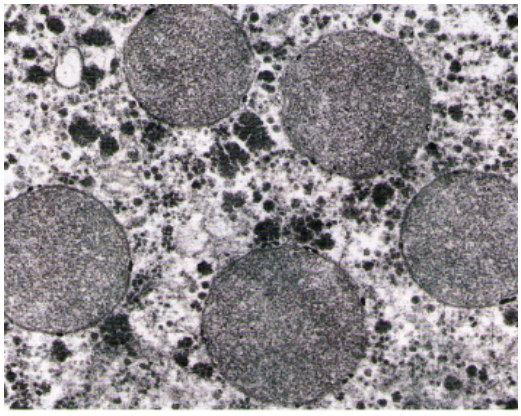


Рис. 1.5. Электронная микрофотография среза клетки *Trichomonas vaginalis* с гидрогеносомами

Хлоропласты. Это органеллы, присутствующие только в фотосинтезирующих клетках (среди микроорганизмов – в клетках микроводорослей). Диаметр этих органелл составляет 5–10 мкм, по форме они напоминают двояковыпуклую линзу (рис. 1.6). Ограничивает хлоропласт, как и митохондрию, двойная мембрана.

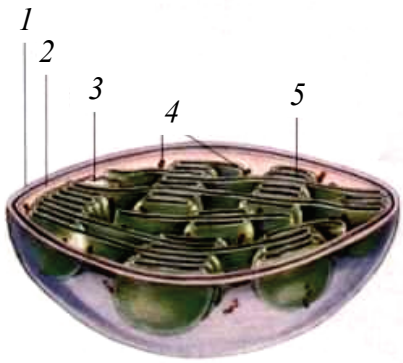


Рис. 1.6. Строение хлоропласта:
1 – наружная мембрана;
2 – внутренняя мембрана; *3* – ДНК;
4 – рибосомы; *5* – тилакоиды

В гелеобразное внутреннее содержимое хлоропласта – **строму** – погружены многочисленные мембранные диски (**тилакоиды**). Стопки тилакоидов в строме носят название **граны**. В мембранах тилакоидов расположены компоненты фотосинтетических систем, при участии которых происходит трансформация световой энергии в энергию химических связей АТР (световые реакции фотосинтеза). А в строме продукты световых реакций принимают участие в фиксации CO_2 (темновые реакции фотосинтеза).

Цитоскелет. Это обязательный компонент эукариотической клетки. Представляет собой сложную сеть микротрубочек и микрофиламентов, состоящих из белка и пронизывающих клетку в различных направлениях (рис. 1.7). При этом мембранные органеллы и структуры связываются с помощью микротрубочек и микрофиламентов между собой, что обеспечивает определенную степень жесткости протопласта, а также правильное расположение клеточных компонентов относительно друг друга. Цитоскелет облегчает движение клеток, перемещение хромосом при делении клеток, а также принимает участие в перестройке мембранных органелл, принимающих участие в цитозах.

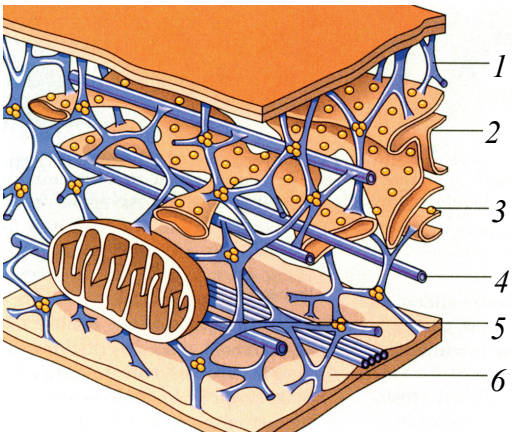


Рис. 1.7. Срез протопласта эукариотической клетки, демонстрирующий разветвленную сеть микрофиламентов и микротрубочек цитоскелета:
1 – микрофиламент; *2* – эндоплазматический ретикулум; *3* – рибосома; *4* – микротрубочка; *5* – митохондрия; *6* – плазматическая мембрана

Рибосомы. Это самые маленькие и многочисленные компоненты клеток (см. рис. 1.2 на с. 18), на которых осуществляется синтез белка. В одной эукариотической клетке насчитываются десятки тысяч рибосом. Величину рибосом, а также их субъединиц принято выражать в **единицах Сведберга** (S), которые служат мерой скорости осаждения частиц и молекул при ультрацентрифугировании. Размер эукариотических рибосом составляет 80S. Они состоят из двух субъединиц, каждая из которых сформирована белком и рРНК.

Включения. Данные структурно не оформленные компоненты эукариотических клеток (запасные вещества) могут иметь коллоидное состояние либо формировать гранулы, скопления определенной формы и размеров. Запасные вещества эукариот откладываются в цитоплазме

или в вакуолях. Для микроорганизмов разных видов характерны специфические по составу запасные вещества, и это различие используется при систематике. Чаще всего роль запасных веществ играют полисахариды, липиды, полифосфаты.

Капсулы и слизистые слои. На поверхности клеток (снаружи от клеточной стенки) некоторые эукариотические микроорганизмы, в частности дрожжи, формируют капсулы или слизистые слои. В большинстве случаев они состоят из полисахаридов, причем их химический состав имеет таксономическое значение. Считают, что эти структуры способствуют поглощению питательных веществ, когда их концентрация в окружающей среде очень мала. У многих дрожжей в формировании капсул принимают участие радиально отходящие от клеточной стенки фибриллы, из-за чего некоторые исследователи считают капсулы интегральными частями дрожжевых клеточных стенок.

Внеклеточные полисахариды дрожжей имеют народнохозяйственное значение. Так, дрожжи *Aureobasidium pullulans* образуют пуллулан (поли-α-1,6-мальтотриоза) и аубазидан (разветвленный глюкан). Пуллулан применяется в качестве кровезаменителя, а аубазидан обеспечивает стабильность лекарственных препаратов и служит носителем для иммобилизации ферментов. Другие дрожжевые внеклеточные полисахариды могут использоваться при лечении атеросклероза, при извлечении металлов из руд.

Двигательные органеллы. Клетки большинства эукариотических микроорганизмов (за исключением грибов) способны к движению, которое чаще всего осуществляется с помощью двигательных органелл. У эукариот распространены два типа органов движения: **жгутики** и **реснички**. Жгутиками называют длинные нити, прикрепленные к полюсу клетки. Реснички обычно короче жгутиков и покрывают всю поверхность клетки. Тип двигательных органелл имеет большое значение для классификации микроорганизмов, в первую очередь простейших и микроводорослей. Жгутики и реснички совершают колебательные движения, продвигая клетки в жидких субстратах.

Строение эукариотических двигательных органелл описывают формулой (9 + 2), желая подчеркнуть, что в центральной части органеллы расположены 2 одиночные микротрубочки, а по периферии – 9 двойных. Эти микротрубочки связаны друг с другом посредством белковых микрофиламентов. Данные структурные части состоят из белка тубулина и окружены общей мембраной (рис. 1.8).

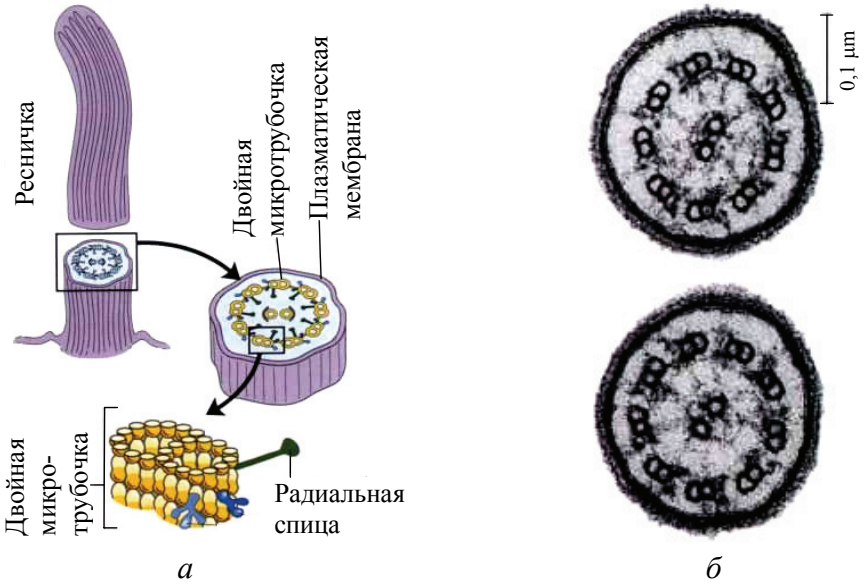


Рис. 1.8. Структура эукариотических жгутиков и ресничек:
а – схематическое представление;
б – электронная микрофотография среза

У некоторых эукариот, как, например, у амебы, движение осуществляется за счет движения микротрубочек цитоскелета. При этом цитоплазматическая мембрана формирует «ложноножки» – выросты изменчивой формы, способствующие передвижению клетки за счет перетекания цитоплазмы.

§ 1.2. Различия в организации клеток прокариот и эукариот

Клетки прокариот отличаются от клеток эукариот не только строением наследственного аппарата, но и другими структурными, морфологическими, физиологическими и биохимическими признаками, систематизированными в таблице.

Приведенные различия позволяют убедиться, что прокариотические клетки организованы гораздо проще, чем эукариотические. Это, с одной стороны, выражается в отсутствии у прокариот таких важных органелл, как ядро, митохондрии, хлоропласты, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, лизосомы и пероксисомы. В прокариотических клетках функции перечисленных органелл осуществляются с участием структурно не оформленных впячиваний (**инвагинаций**) плазматической мембраны, и эти процессы, таким образом, не разграничены в пространстве.

Отличительные признаки эукариотических и прокариотических микроорганизмов

Признак	Эукариоты	Прокариоты
Ядерный аппарат	Присутствует истинное ядро, есть ядрышко	Нет истинного ядра и ядрышка
Белки-гистоны	Обеспечивают суперспирализацию ДНК	Встречаются только у некоторых архебактерий
Хромосомы	Линейные	Кольцевые
Органеллы	Много разнообразных органелл со специфическими функциями	Отсутствуют органеллы, ограниченные мембранами
Компартментализация	Четко выражена	У подавляющего большинства отсутствует
Тип рибосом	80S	70S
Муреин	Не встречается	У большинства присутствует в составе клеточных стенок
Поли-β-гидроксибутират	Не встречается	Встречается как запасное вещество
Двигательные органеллы	Сложно организованы (9 + 2), диаметр ~0,2 мкм	Состоят из одной фибриллы, диаметр 0,01–0,02 мкм
Тейхоевые кислоты	Отсутствуют	Могут содержаться в клеточных стенках
Размер клеток	10–100 мкм	0,2–10,0 мкм
Митоз, мейоз	Характерны	Не характерны
Цитозы	Характерны	Не характерны
Фиксация N_2	Не осуществляется	Может осуществляться
Хемосинтез	Не осуществляется	Может осуществляться
Метаногенез	Не осуществляется	Может осуществляться
Термостойкие эндоспоры	Не формируются	Могут формироваться
Аноксигенный фотосинтез	Не характерен	Встречается у отдельных представителей

С другой стороны, сопоставление физиологических и метаболических возможностей микроорганизмов приводит к заключению, что они более разнообразны у прокариот. Их представители способны фиксировать молекулярный азот, использовать энергию окисления неорганических субстратов, формировать термоустойчивые эндоспоры и выживать при температурах, превышающих 100°С, осуществлять метаногенез, использовать в качестве доноров электронов при фотосинтезе вместо воды иные вещества.

Следует отметить, что структурные отличия между прокариотами и клетками животных и растений имеют большое практическое значение.

В частности, это делает прокариот уязвимыми к препаратам, применяемым для лечения бактериальных инфекций. Например, наличие муреина только в составе клеточных стенок прокариот позволяет использовать пенициллин и подобные ему антибиотики, нарушающие процесс синтеза данного пептидогликана, в терапевтических целях. Подобным образом становится возможным применение стрептомицина, нарушающего процесс синтеза белка на прокариотических 70S (но не на эукариотических 80S) рибосомах. Гораздо сложнее лечить заболевания, вызванные эукариотическими микроорганизмами, поскольку препараты, активные против них, активны также против клеточных структур животных и человека.

§ 1.3. Структура прокариотической клетки

Основой прокариотической клетки, как и эукариотической, является протопласт. Принципиальная структура протопласта одинакова для представителей обеих групп (цитозоль с органеллами и включениями, ограниченный плазматической мембраной). Однако организация как протопластов, так и клеток прокариот имеет свои особенности (рис. 1.9).

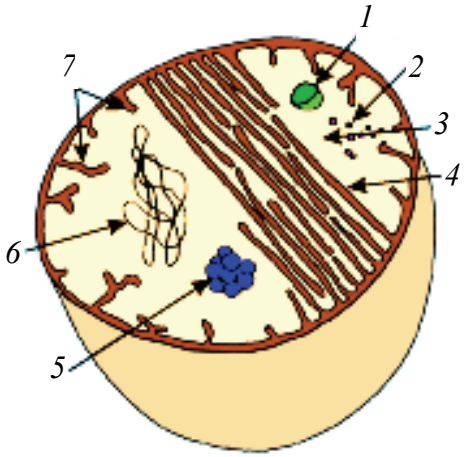


Рис. 1.9. Структура протопласта прокариотической клетки на примере нитрифицирующих бактерий, формирующих ламеллы: *1* – карбоксисома; *2* – рибосомы; *3* – цитозоль; *4* – ламеллы; *5* – включения волютина; *6* – нуклеоид; *7* – впячивания плазматической мембраны

Наследственный аппарат. Обычно представлен у прокариот единственной **бактериальной хромосомой** (**нуклеоидом**) – молекулой ДНК, которая, как правило, содержит всю необходимую для жизнедеятельности клетки генетическую информацию. У подавляющего большинства прокариот в клетках находится только одна кольцевая бактериальная хромосома, однако имеются исключения. Например, бактерии *Rhodobacter sphaeroides* и *Vibrio cholerae* содержат по две кольцевых хромосомальных ДНК, бактерии *Agrobacterium tumefaciens* имеют кольцевую и линейную хромосомальную ДНК, а *Streptomyces* spp. – только линейную.

Бактериальные хромосомы занимают в клетках определенную область (**зона нуклеоида**), которая выявляется при дифференциальном окрашивании, однако эта зона не отделена от содержимого клетки какими-либо оболочками, и бактериальную ДНК называют «голой» ДНК.

Бактериальная ДНК находится в клетке в суперспирализованном состоянии, занимая небольшое пространство. Суперспирализацию ДНК в клетках эубактерий обеспечивают белки-гиразы, а в клетках архебактерий часто эту функцию дополняют белки-гистоны, которые, впрочем, обнаружены не у всех видов архей. Отдельные последовательности нуклеоида связаны с плазматической мембраной, что необходимо для его репликации.

Кроме хромосомальной ДНК, прокариотические клетки могут содержать одну или несколько небольших кольцевых молекул ДНК, называемых плазмидами и представляющих у прокариот внеядерную наследственность.

Плазмиды. Эти внехромосомные генетические элементы наиболее широко распространены и впервые обнаружены у прокариот. К тому же они имеют особое значение для биотехнологии – как для ее научной базы, так и для производственной сферы, поэтому рассмотрим их более обстоятельно.

Типичные плазмиды представляют собой двухнитевые кольцевые молекулы ДНК, обычно не превышающие 5% величины нуклеоида. Они не являются обязательными компонентами клеток, однако в определенных условиях становятся факторами, обеспечивающими выживание бактерий. Например, плазмиды лекарственной устойчивости позволяют наследующим их клеткам развиваться в присутствии соответствующего антибиотика.

Плазмиды характеризуются рядом общих и специфических свойств. К числу наиболее важных общих свойств плазмид следует отнести:

– способность к автономной **репликации** (удвоению). Все плазмиды являются самореплицирующимися молекулами ДНК и представляют собой **репликоны** (единицы репликации, в пределах которых она начинается и заканчивается). Каждая плазмида содержит **сайт** начала вегетативной репликации (*ori* V), без которого репликация невозможна. Репликацию плазмид обеспечивают белки – продукты как плазмидных, так и хромосомальных генов, поэтому репликация плазмид может осуществиться только в клетке. Некоторые плазмиды способны объединяться с бактериальной хромосомой, интегрировать с ней. В таком случае они реплицируются совместно с хромосомой, составляя с ней единое целое, репликон. Генетические элементы с подобными свойствами называют **эписомами**, к ним, в частности, относятся F-фактор, некоторые R-факторы, профаг λ;

– способность транспортироваться из клетки в клетку при конъюгации. Таким свойством обладают **конъюгативные** (трансмиссибельные) **плазмиды**, и оно не характерно для неконъюгативных плазмид. Конъюгативность опосредуется *tra*-генами (**tra**nsfer), расположенными только на плазмидах. Клетки, содержащие трансмиссибельные плазмиды, приобретают **донорские свойства**: способность синтезировать половые ворсинки (**F-пили**), через которые генетический материал передается в **реципиентные клетки** при конъюгации;

– стабильность наследования. Это свойство зависит как от типа плазмиды, так и от особенностей клеток-хозяев. Существуют стабильные плазмиды, репликация которых осуществляется синхронно с репликацией хромосомальной ДНК, так что образующиеся при делении клетки наследуют оба репликона. Нестабильность наследования заключается в утрате частью клеток популяции плазмидных ДНК (**элиминация** плазмид). Известно, что некоторые плазмиды содержат **«суицидные» гены**, которые с помощью особого механизма обеспечивают гибель клеток, утративших такие плазмиды.

В соответствии со специфическими свойствами плазмид различают несколько их типов:

1) F-плазмиды (***f****ertility*), или факторы фертильности, половые факторы. Они придают клеткам донорские свойства – способность опосредовать конъюгативный транспорт генетического материала – и не характеризуются иными фенотипически различимыми свойствами;

2) Col-факторы (***col****icins*), или факторы колициногенности, детерминируют способность наследующих их энтеробактерий продуцировать особый класс веществ – **колицинов**. Эти небольшие белки (частный случай **бактериоцинов**) проявляют токсичные свойства только

по отношению к близкородственным бактериям (тормозят рост и приводят к гибели клеток). Их можно рассматривать как антагонистичекие факторы, позволяющие бактериям, содержащим Col-плазмиды, выигрывать конкуренцию. Бактериоцины характеризуются более узким спектром активности, чем антибиотики. Бактериоцины, синтезируемые *E. coli*, называются **колицинами**, *Pseudomonas aeruginosa* – **пиоцинами**, *Bacillus megaterium* – **мегацинами**, молочнокислые бактерии синтезируют **низин**, **лактококцин**, **диплококцин**, **лактолин** и др. Эти вещества находят применение в народном хозяйстве, например, низин используется в качестве консерванта в пищевой промышленности;

3) R-факторы (***r**esistance*), или факторы резистентности, содержат гены, обусловливающие устойчивость клеток к лекарственным препаратам. Некоторые R-плазмиды являются конъюгативными и способны передаваться в реципиентные клетки при конъюгации. Этим, в частности, объясняется широкое распространение генов лекарственной устойчивости среди бактерий. Показано, например, что R-факторы могут передаваться от *E. coli* (обычные обитатели кишечного тракта животных и человека) патогенным бактериям. Особое значение отмеченное обстоятельство имеет для клинических патогенных штаммов, которые в результате горизонтального переноса генов приобретают множественную лекарственную устойчивость, что в значительной мере осложняет способы лечения заболеваний;

4) факторы вирулентности патогенных бактерий содержат гены, чьи продукты задействованы в процессах инфицирования хозяев. Например, у патогенных штаммов кишечной палочки фактор колонизации эпителия тонкого кишечника человека представляет собой белок, структура которого определяется плазмидным геном. Кроме того, факторы вирулентности бактерий *E. coli* кодируют структуру двух токсинов, участвующих в развитии диареи;

5) плазмиды биодеградации (D-плазмиды) обусловливают способность содержащих их клеток деградировать (разлагать) ряд органических соединений, таких как алифатические углеводороды (октан, декан), ароматические углеводороды (толуол, нафталин, салицилат, бензоат), терпены (камфора), алкалоиды (никотин, никотинат), хлорорганические соединения, в частности многие пестициды и др. Эти свойства широко используются в биотехнологии при очистке загрязнений почвы и водоемов от трудноразлагаемых токсических веществ. Плазмиды биодеградации содержатся в клетках многих видов, но особенно широко это свойство распространено среди почвенных и водных

грамотрицательных бактерий, в первую очередь представителей рода *Pseudomonas*. Важными особенностями D-плазмид являются конъюгативность и **космополитизм** (способность к поддержанию в широком круге бактерий-хозяев).

Кроме перечисленных групп, существует большое количество плазмид, детерминирующих более специфические свойства бактерий, такие как индукция опухолей у растений, утилизация углеводов и аминокислот, устойчивость к бактериофагам, катионам тяжелых металлов, мутагенным факторам (акридиновым красителям, бромистому этидию, ультрафиолету), бактериоцинам, синтез антибиотиков, инсектицидов, пигментов, токсинов, рестрикция и модификация ДНК, продукция ароматообразующих веществ, различных ферментов и др. Для самих бактерий наличие плазмид с перечисленными свойствами – важный фактор адаптации и конкуренции, обеспечивающий выживание в неблагоприятных условиях. Кроме того, это мощный фактор эволюции бактерий.

Для исследователей существование плазмид предоставляет дополнительные возможности селекции активных штаммов-продуцентов: объединение в одной клетке плазмид с разными свойствами позволяет расширить круг метаболических возможностей организмов. А способность плазмид опосредовать конъюгацию дает удобный способ обмена генетической информацией. Знание биологии плазмид неоценимо для специалистов в области биотехнологии, поскольку у многих используемых в этой отрасли микроорганизмов важные хозяйственные признаки кодируются генами, локализованными на плазмидах. Примером могут служить бактерии рода *Lactococcus*, у которых в клетках обычно присутствует по 4–7 плазмид. Плазмидные гены лактококков ответственны за такие свойства, как утилизация лактозы, галактозы и других углеводов, синтез бактериоцинов, ароматообразование (продукция диацетила и ацетоина), устойчивость к ультрафиолету, антибиотикам, тяжелым металлам, бактериоцинам, продукция протеолитических ферментов.

Неоценима роль плазмид в генетической инженерии: эти репликоны чаще других используются в качестве основы для конструирования клонирующих векторов, с помощью которых изолируют отдельные гены разных организмов, переносят их в клетки других организмов, на них создают библиотеки геномов. Эти манипуляции ныне являются неотъемлемым этапом конструирования высокопродуктивных штаммов микроорганизмов для биотехнологической промышленности.

Внутренние мембраны прокариот. Мембранные органеллы в прокариотических клетках отсутствуют, а их функции выполняют

впячивания плазматической мембраны, которые у некоторых групп прокариот очень развиты и называются внутренними мембранами. Эти структуры обнаруживают в клетках нитрифицирующих и фотосинтезирующих бактерий. У нитрификаторов внутренние мембраны чаще представляют собой инвагинации плазматической мембраны, формирующие стопки плоских пузырьков (ламелл), пронизывающие клетку (см. рис. 1.9 на с. 28). В этих мембранах расположены компоненты дыхательной цепи, обеспечивающие процесс запасания энергии, сопряженный с окислением восстановленных соединений азота.

У фотосинтезирующих бактерий внутренние мембраны имеют на срезах цилиндрическую или округлую форму (рис. 1.10), располагаются в виде многочисленных слоев параллельно плазматической мембране и связываются с ней. В составе этих мембран находятся компоненты фотосистем, обеспечивающие трансформацию энергии света в энергию химических связей органических соединений (фотосинтез).

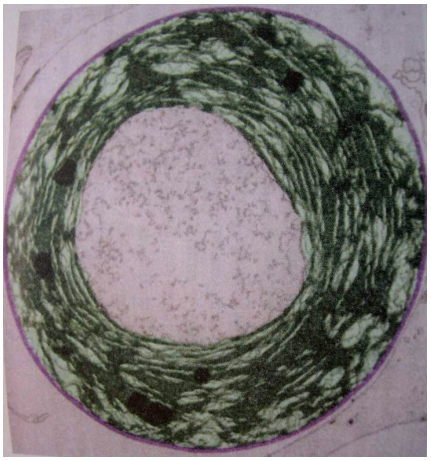


Рис. 1.10. Электронная микрофотография фотосинтезирующей бактерии *Prochloron* sp. с ламеллами цилиндрической формы

Рибосомы. Прокариотические рибосомы находятся в цитоплазме клеток в свободном состоянии, имеют сходную с эукариотическими рибосомами принципиальную структуру, но отличаются от них меньшей величиной (70S). В прокариотической клетке насчитывается 10 000 и более рибосом, и они обеспечивают синтез пептидов.

Включения. У большинства прокариот в определенных условиях обитания в клетках формируются включения, выполняющие в основном резервную функцию. Различают включения, не имеющие оболочки, а также те, которые ограничены белковой оболочкой.

К числу включений без оболочки относятся разнообразные запасные вещества, которые откладываются клетками в благоприятные периоды существования и расходуются при дефиците каких-либо компонентов. Часто бактерии запасают полифосфаты, называемые иначе **волютин**, или **метахроматические гранулы**. Эти вещества служат депо неорганического фосфата, необходимого для синтеза АТР, а также нуклеиновых кислот и фосфолипидов.

Роль резервного источника углерода у прокариот чаще выполняет **поли-β-гидроксибутират** – полиэфир с неполярной гидрофобной природой. Скопления поли-β-гидроксибутирата часто заполняют всю цитоплазму, составляя более 85% массы клетки. При расщеплении этого вещества клетки извлекают энергию. Поли-β-гидроксибутират накапливают представители родов *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* и др. Этот термопластичный полимер используется для изготовления разнообразных изделий и наделен очевидным преимуществом перед традиционными пластмассами – он легко подвергается биодеградации в окружающей среде.

Другим резервным источником углерода и энергии у бактерий служат полисахариды, в частности крахмал, гликоген, гранулеза (крахмалоподобное вещество). Такую же роль могут выполнять жиры, которые накапливаются в клетках в виде капелек или гранул. Часто бактерии запасают в клетках элементарную серу, которая может использоваться в качестве донора электронов при дыхании (*Thiothrix*, *Achromatium*, *Beggiatoa*), а также при фотосинтезе (*Chromatium*). В обоих случаях окисление серы сопряжено с транспортом электронов по системе переносчиков и обеспечивает клетке запасание энергии. Предпочтительность скопления резервных веществ в клетках в виде гранул, а не в растворенном состоянии, объясняется тем, что в данном случае существенно снижается опасность осмотического шока, которая имеет место при высокой концентрации растворенных в цитозоле веществ.

В некоторых случаях запасные вещества грамотрицательных бактерий накапливаются в периплазматическом пространстве.

Бактериальные включения, окруженные белковой оболочкой, чаще всего представлены **аэросомами** – заполненными газом пузырьками (**везикулами**), которые используются водными прокариотами для регуляции глубины погружения клеток в толщу воды. Оболочка аэросом непроницаема для воды и растворов, поскольку состоит из белков с гидрофобными свойствами, но пропускает газы. Изменяя количество аэросом, клетка изменяет свою плотность, погружаясь или, наоборот,

всплывая в водоеме, находя, таким образом, нужную глубину, которая соответствует основным потребностям вида (определенная концентрация O_2, степень освещенности, количество органики, температура и др.). С помощью аэросом бактерии могут оставаться в определенном слое воды с оптимальными условиями существования, не прибегая к активному движению с помощью жгутиков. Интересно отметить, что газовые везикулы имеются только у прокариот.

Кроме аэросом к включениям с белковой оболочкой относятся **хлоросомы** (содержат хлорофиллы, необходимые зеленым бактериям для фотосинтеза), **карбоксисомы** (есть у фототрофных и хемосинтезирующих бактерий, содержат ферменты, необходимые для фиксации CO_2), **магнитосомы** (включения биогенного магнетита Fe_3O_4, помогающие бактериям ориентироваться в пространстве для движения в Северном полушарии на север, а в Южном – на юг, что связано с погружением в глубинные части водоемов и оправдано тем, что большинство магнитотаксических бактерий – **анаэробы** или **микроаэрофилы**) и некоторые более специализированные включения.

Клеточная стенка. Из-за большой концентрации растворенных веществ в клетках создается высокое осмотическое давление: например, в клетках *E. coli* оно может достигать 0,2 МПа. Чтобы защитить протопласт от **осмотического шока** (лизис в гипотонических средах, обусловленный явлениями осмоса), большинство прокариот имеет на поверхности плазматической мембраны ригидную (прочную, упругую, но сохраняющую определенную степень эластичности) клеточную стенку (рис. 1.11). Клеточные стенки служат дополнительным барьером для проникновения крупных молекул внутрь клетки, однако мелкие молекулы легко преодолевают клеточную стенку благодаря наличию в ней пор.

Особенности структуры клеточных стенок прокариот положены в основу классификации этих организмов и будут рассмотрены подробно. Известны три принципиально различающихся типа клеточных стенок (КС): КС грамположительных бактерий, КС грамотрицательных бактерий и КС, не содержащие муреин. Отличие между грамположительными и грамотрицательными бактериями выявляется методом сложной окраски клеток, которую в 1884 г. предложил датский ученый Ганс Христиан Грам. С тех пор этот метод называется окраской по Граму. Различия в структуре клеточных стенок коррелируют с рядом других различий в организации, физиологии и метаболизме их обладателей, которые будут рассмотрены в главе 4.

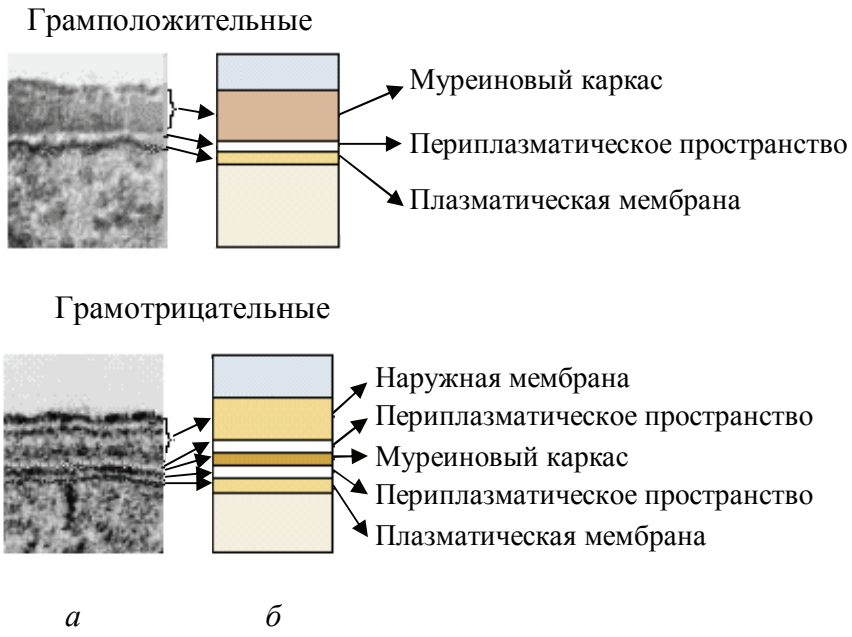


Рис. 1.11. Строение клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий:
а – электронные микрофотографии срезов клеток;
б – схематичное представление о структуре клеточных стенок

Основу КС грамположительных бактерий (рис. 1.11) составляет пептидогликан **муреин** (в переводе с греческого означает «стена»), придающий КС жесткость. Это сложный гетерополимер, в нем линейные полисахаридные цепи связаны пептидными мостиками, в результате чего формируется разветвленный каркас, или «мешок». Толщина муреинового слоя у грамположительных бактерий достигает 40 нм, на него приходится до 70% (иногда больше) массы КС. С муреиновым каркасом прочно связаны **тейхоевые кислоты** (полимеры, состоящие из многоатомных спиртов, остатков фосфорной кислоты и моносахаридов).

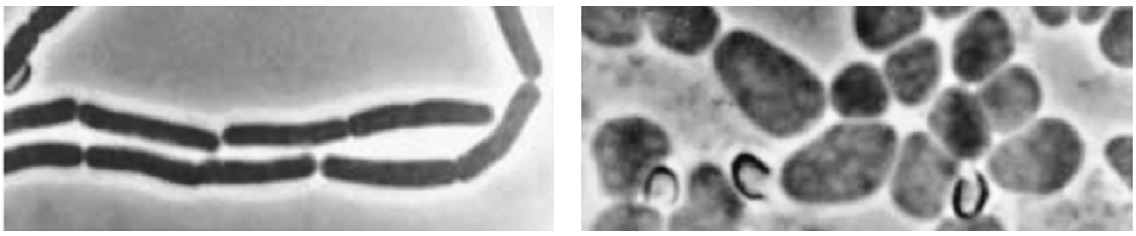
КС грамотрицательных бактерий (рис. 1.11) организованы гораздо сложнее грамположительных. Они содержат только один слой муреина толщиной порядка 2 нм, составляющий не более 10% массы КС. В них не содержатся тейхоевые кислоты. Зато присутствует **наружная мембрана** – слой, напоминающий по структуре плазматическую мембрану, однако более проницаемый для большинства малых молекул. В основе наружной мембраны лежит липидный бислой, содержащий фосфолипиды, белки и липополисахариды. Липополисахариды в составе наружной мембраны формируют самый внешний, обращенный наружу, слой. В его составе находятся рецепторы для фагов, он, кроме того,

определяет антигенные свойства бактерий, которые инфицируют организмы животных и человека. Липополисахариды называют также **эндотоксинами**, поскольку, попав в организм, они вызывают лихорадку и обусловливают симптомы заболевания.

Наружная мембрана прикрепляется к муреиновому слою с помощью липопротеинов. Между плазматической и наружной мембранами грамотрицательных бактерий находится пространство, заполненное гелем, которое называется периплазматическим. Слой муреина в периплазматическом пространстве относительно пористый, так что молекулы белков способны мигрировать в этой гелеобразной субстанции. В периплазматическом пространстве присутствуют связанные с мембранами транспортные и рецепторные белки, а также ферменты. Считается, что основной функцией наружной мембраны является как раз создание перипласта, где могут накапливаться белки, которые в таком случае располагаются в непосредственной близости от плазматической мембраны.

Присутствие муреина в клеточных стенках грамположительных и грамотрицательных бактерий делает их чувствительными к лизоциму – одному из распространенных в животном мире ферментов. **Лизоцим** расщепляет ковалентные связи в линейных цепях муреина и, таким образом, способствует разрушению клеточных стенок. Если клеточная стенка разрушена частично и на поверхности плазматической мембраны остаются ее обрывки (островки), такая структура называется **сферопластом**, при полном разрушении КС формируются **протопласты** (рис. 1.12).

Эти структуры имеют сферическую форму, поскольку их ограничивает эластичная плазматическая мембрана, и являются осмочувствительными: сохраняют целостность только в изотонических или гипертонических средах. В гипотонических растворах плазматическая мембрана не выдерживает осмотического давления поступающей в клетку воды и лопается (осмотический шок).



а *б*

Рис. 1.12. Интактные клетки (*а*) и протопласты (*б*) бактерий рода *Bacillus megaterium*

Протопласты и сферопласты широко используются в методологии конструирования штаммов-продуцентов: при их слиянии можно обобществлять геномы далеко отстоящих в родстве организмов и получать гибридные формы. Кроме того, трансформация протопластов молекулами ДНК – один из основных приемов генетической инженерии, позволяющий вводить сконструированные *in vitro* гибридные ДНК в клетки.

Другим агентом, оказывающим влияние на КС, содержащие муреин, является антибиотик пенициллин. Он способен блокировать функции одного из ферментов, принимающих участие в биосинтезе муреина. В результате клетки, растущие в присутствии пенициллина, имеют дефектную клеточную стенку, не защищающую их от осмотического шока. На агаризованных гипертонических средах такие клетки образуют сильно увеличенные в объеме формы, названные **L-формами**, а в жидких гипертонических средах выглядят как сферопласты. Эти структуры тоже характеризуются осмотической хрупкостью, что используется на практике в процедуре обогащения популяций бактерий **ауксотрофными мутантами**. На синтетических средах такие мутанты не растут, поэтому оказываются устойчивыми к пенициллину, а **прототрофные бактерии** в синтетических средах способны к росту и подвергаются в гипотонических растворах осмотическому шоку под действием пенициллина. Такая дифференциация объясняется тем, что пенициллин воздействует только на растущие клетки, формирующие КС.

В подходящих условиях, в отсутствие перечисленных агентов, протопласты и сферопласты могут достраивать клеточную стенку, превращаясь в обычные клетки.

Для архебактерий характерны клеточные стенки, не содержащие муреин и в большинстве случаев наружную мембрану. Они могут состоять из псевдомуреина (не имеет основных отличительных особенностей муреиновых молекул), из белков или из полисахаридов. Иногда в состав КС архебактерий входят другие вещества. Можно сказать, что КС архебактерий не характеризуются какой-либо унифицированной структурой. Тем не менее их защитная функция ярко выражена: они предохраняют клетки от высоких температур, кислот, повышенных концентраций солей.

Белки цитоскелета. Недавно у прокариот были обнаружены специфические белки, определяющие форму клеток. Эти белки гомологичны белкам цитоскелета эукариот как по строению, так и по функциям, что позволяет постулировать существование динамичного многофункционального скелета у прокариот. Наиболее изученным является белок MreB, который под плазматической мембраной фор-

мирует способную вращаться спиралевидную структуру (рис. 1.13). Считается, что этот белок управляет функциями других белков, которые в совокупности определяют форму клетки. У растущих палочковидных клеток белок MreB контактирует с мембраной и пептидогликаном в определенных сайтах и, вращаясь, направляет синтез новой клеточной стенки таким образом, что клетки удлиняются только вдоль длинной оси. У сферических клеток данный белок не обнаружен. У вибриоидных клеток в дополнение к белку MreB имеется белок кресцентин, локализующийся в углублении «запятой» и участвующий в искривлении палочковидной клетки.

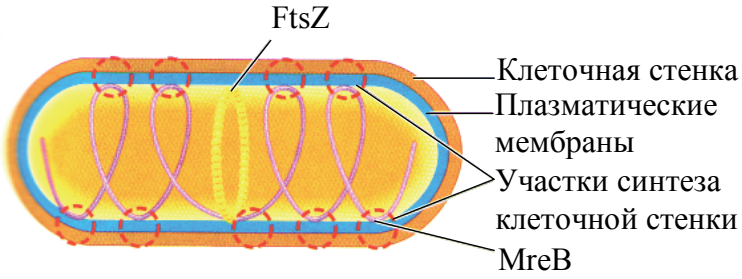
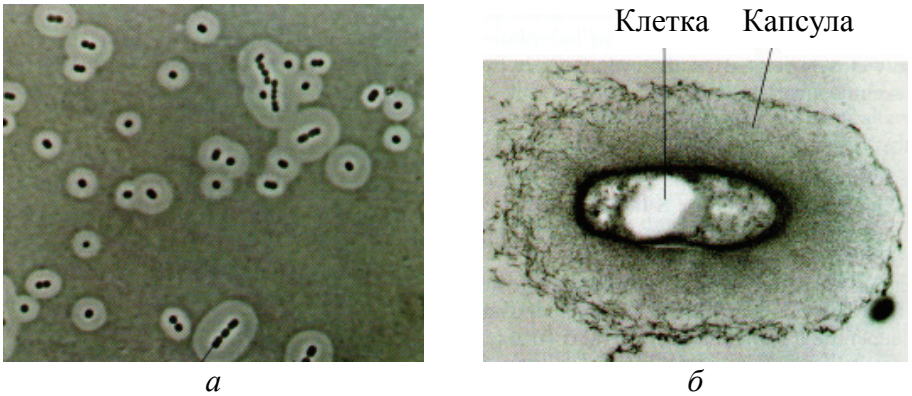


Рис. 1.13. Белок цитоскелета MreB, формирующий спиральную структуру в палочковидной клетке

В геномах архебактерий обнаружены гены, кодирующие очень похожие на MreB белки, и можно ожидать, что им также свойственны функции определения формы клеток.

Бактериальные капсулы и слизи. Многие прокариоты имеют на поверхности клеточной стенки дополнительный слизистый слой (рис. 1.14).



а *б*

Рис. 1.14. Бактериальные капсулы:
а – результат выявления капсул *Acinetobacter* sp. с помощью негативного контрастирования;
б – электронная микрофотография среза клетки *Rhizobium trifolii* (диаметр клетки ~0,7 мкм)

Капсулы и слизи характеризуются сходным составом и предназначением, а различия между ними состоят в степени прикрепления к клетке: капсулы имеют более компактную структуру и прочно удерживаются клеткой, слизи – более рыхлые и могут «соскальзывать» с клеточной поверхности при встряхивании суспензии. Чаще всего эти структуры состоят из полисахаридов, но иногда, как, например, у некоторых видов *Bacillus*, – из остатков глутаминовой кислоты.

Функции капсул и слизей разнообразны. Для патогенных бактерий наличие капсул является защитой от **фагоцитоза**, поскольку их антигенные детерминанты завуалированы слоем слизи и не распознаются иммунной системой инфицированного организма. Капсульные бактерии поэтому являются более высоковирулентными, чем их бескапсульные формы. В то же время некоторые бактерии синтезируют слизистые слои в качестве резервных полисахаридов, используя их затем при голодании с помощью внеклеточных ферментов. Известно, что капсулы и слизи могут аккумулировать из внешней среды питательные вещества, концентрация которых вблизи клеточной поверхности, таким образом, увеличивается. Кроме того, слизистые слои несут защитную функцию: спасают клетки от кратковременного высушивания, перепадов pH, действия токсикантов.

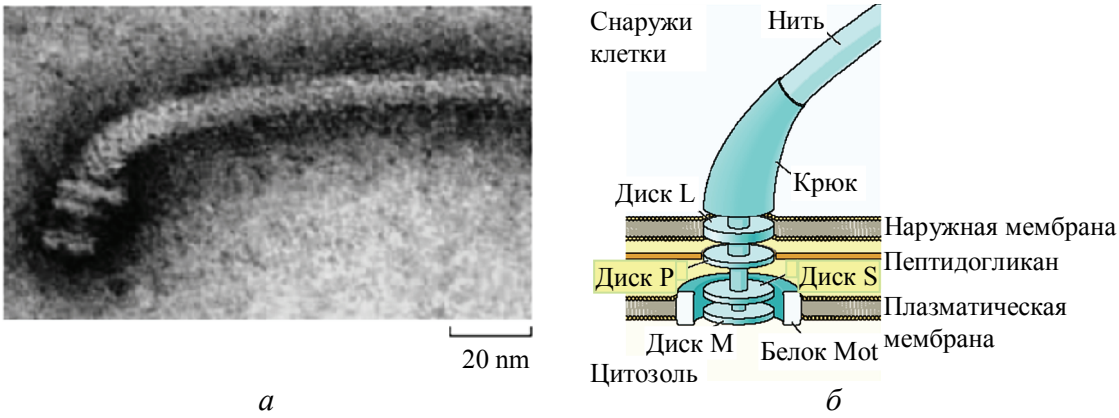
Иногда бактерии, формирующие капсулы и слизи, создают с их помощью так называемый **матрикс**, который используется для прикрепления к субстрату и удерживания возле него. Примером могут служить молочнокислые стрептококки, обитающие в ротовой полости и вызывающие кариес зубов. Их слизистые слои представляют собой **леваны** (полифруктоза), которые откладываются на поверхности зубов. Так формируется зубной налет, где размножаются стрептококки и накапливаются продукты их жизнедеятельности, в первую очередь молочная кислота, которая разрушает эмаль.

Капсульные полисахариды бактерий имеют большое практическое значение. Ксантан, внеклеточный полисахарид *Xanthomonas campestris*, используется в составе смазок, при добыче нефти, в пищевой промышленности для улучшения вкусовых свойств консервированных и замороженных продуктов, соусов, кремов и др., а также в косметической промышленности. Декстраны, синтезируемые *Leuconostoc mesenteroides* и некоторыми другими бактериями, применяются в качестве кровезаменителей, для лечения ожогов, для разделения и очистки биологических молекул, в качестве полиэлектролитов. Бактерии образуют также альгинаты (*Pseudomonas*, *Azotobacter*), геллаты (*Pseudomonas elodea*), курдлан (*Alcaligenes faecalis*) и множество

других капсульных полисахаридов, находящих самое разнообразное применение в народном хозяйстве.

Органы движения прокариот. Среди прокариот есть подвижные и неподвижные формы. Первых больше, и они способны двигаться с использованием разных приспособлений. Наиболее универсальный способ движения бактерий – с помощью жгутиков. Жгутики представляют собой длинные выросты, которые крепятся к плазматической мембране и клеточной стенке и состоят из одиночной спиральной фибриллы (рис. 1.15). Толщина этой фибриллы у эубактерий составляет 15–20 нм, а у архебактерий – 10–14 нм (они тоньше). Фибриллы организованы множеством субъединиц белка **флагеллина**, причем у представителей домена Эубактерии этот белок очень консервативен по составу, в то время как у разных архебактерий он может довольно сильно различаться, а в некоторых случаях даже быть представлен гликопротеинами.

Крюк (утолщенная часть основания жгутика) крепит фибриллу к белку Mot, который функционирует как мотор. Диски L, P, S и M закрепляют жгутик в наружной мембране, в слое пептидогликана и в плазматической мембране.



а *б*

Рис. 1.15. Бактериальные жгутики:
а – электронная микрофотография;
б – схематическое изображение

Жгутики совершают вращательные движения с большой частотой (до 300 об/с), как бы ввинчивая клетку в жидкость. При этом клетка в секунду перемещается на расстояние, соответствующее 60-кратной ее длине. Для сравнения, гепард, развивающий среди высших животных при беге наибольшую скорость, способен за секунду преодолевать расстояние не более 25-кратной длины своего тела.

В мембранах некоторых бактерий присутствуют специфические белки, которые могут контролировать направление вращения жгутиков. Это дает возможность клеткам совершать направленные движения в сторону привлекательных питательных субстратов (**хемоаттрактантов**) или от токсичных веществ. Такое движение называют **хемотаксисом**, и оно обусловлено наличием в поверхностных структурах клеток **хеморецепторов**. Кроме того, различают **магнитотаксис** – движение вдоль линий магнитного поля Земли; **фототаксис** – движение в направлении изменения интенсивности освещения, характерное для фотосинтезирующих бактерий, а также **аэротаксис** – движение в направлении изменения концентрации молекулярного кислорода.

Тип жгутикования (характер расположения жгутиков на клетке) является для прокариот важным таксономическим признаком. На рис. 1.16 охарактеризованы типы жгутикования прокариот, а на рис. 1.17 приведены фотографии бактерий с наиболее распространенными типами жгутикования.

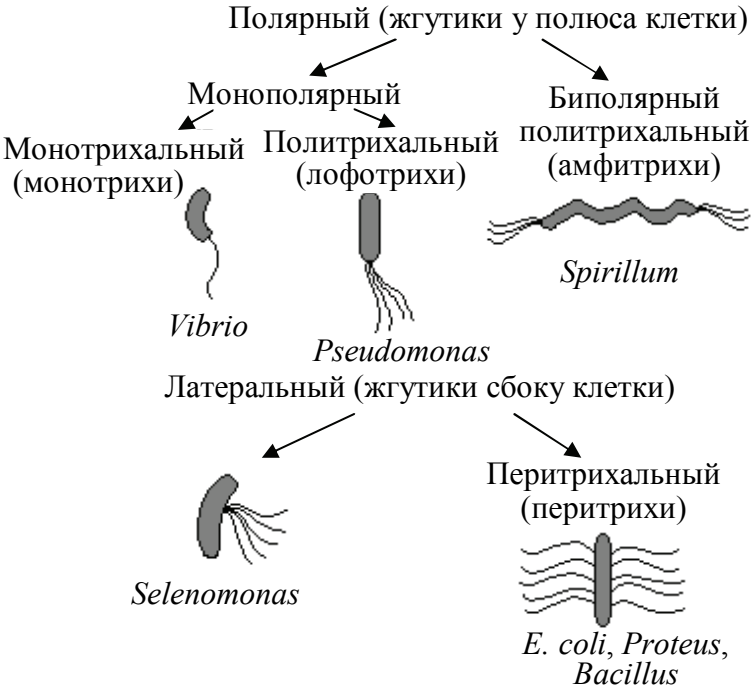
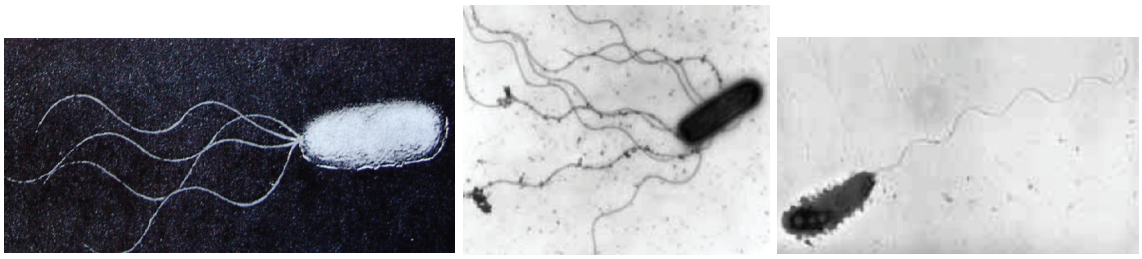


Рис. 1.16. Типы жгутикования прокариот

Кроме использования жгутиков, для некоторых прокариот характерны другие типы движения. В частности, довольно распространенным является скользящий тип движения, который используют цианобактерии, цитофаги, миксобактерии, флавобактерии. Все они нуждаются в

контакте с твердым субстратом. При этом цианобактерии движутся за счет выделения слизи на заднем конце клетки, которая как бы отталкивает клетку от субстрата; цитофаги тоже выделяют слизь и способны в ходе скольжения вращаться вокруг своей длинной оси; миксобактерии используют для скользящего движения особые пили типа IV, способные сокращаться и удлиняться, а также адгезионный белковый комплекс; флавобактерии не выделяют слизистых веществ, а перемещаются по субстрату за счет движения белков наружной мембраны, которые изменяют свою конформацию под действием протонного градиента.



а *б* *в*

Рис. 1.17. Эубактерии:
а – лофотрихи (*Pseudomonas* sp.);
б – перитрихи (*Escherichia coli*);
в – монотрихи (*Vibrio* sp.)

Особым способом движения обладают спирохеты, которые передвигаются в жидких средах за счет сокращения фибриллярных нитей (периплазматических жгутиков), связанных с клеточной стенкой.

Структуры, используемые для прикрепления. Способность клеток прикрепляться к субстрату – важная особенность микроорганизмов, используемая ими для выживания. Она позволяет клеткам взаимодействовать друг с другом, а также служит инициирующим фактором для патогенеза. Многие бактериальные клетки имеют на поверхности структуру, называемую **гликокаликсом**, которая предназначена для прикрепления к поверхностям.

Гликокаликс представляет собой массу перепутанных нитей полисахаридов или разветвленных олигосахаридов на поверхности клетки (рис. 1.18). Часто гликокаликс не отличим от слизистых слоев. Эти структуры, как показано выше, могут, например, использоваться стрептококками для прикрепления к зубам, а также для связывания клеток друг с другом при формировании агрегатов.

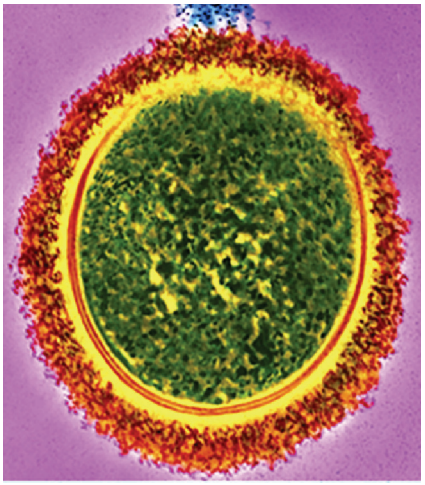
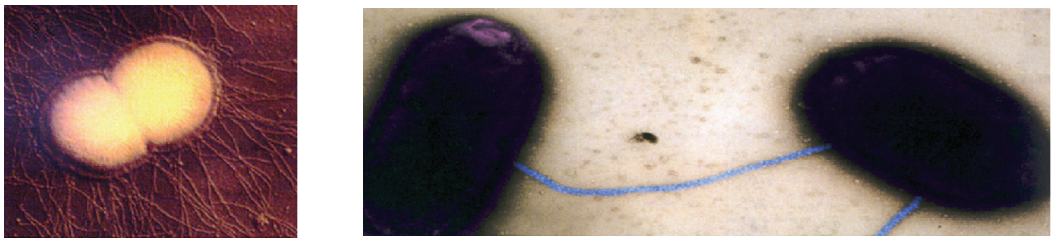


Рис. 1.18. Гликокаликс на поверхности клетки *Streptococcus pyogens*

Другой тип бактериальных структур, используемых для прикрепления, может быть представлен **фимбриями** и **пилями**. Это тонкие неизогнутые белковые отростки на клеточной поверхности некоторых бактерий (рис. 1.19).



а *б*

Рис. 1.19. Фимбрии *Neisseria gonorrhoeae* (*а*) и F-пили *E. coli*, соединяющие конъюгирующие клетки (*б*)

Фимбрии обычно играют роль **адгезинов**, обеспечивая бактериям возможность колонизировать поверхность субстрата. Например, бактерии *Neisseria gonorrhoeae* (возбудитель гонореи) прикрепляются к поверхности клеток мочеполовой системы человека с помощью фимбрий (рис. 1.19, *а*), после чего начинают размножаться и осуществлять патогенез. Пили похожи на фимбрии, однако в большинстве случаев длиннее фимбрий и не столь многочисленны (по одной или несколько на клетке). Известно несколько типов пилей: например, описанный выше тип IV, с помощью которого бактерии (*Pseudomonas*, *Moraxella*) совершают особый тип скользящего движения по субстрату – «рывками». Другой тип пилей (F-пили) образуется донорскими бактериями

и обеспечивает конъюгацию. С помощью F-пилей осуществляется узнавание клеток друг другом и устанавливается контакт между ними (рис. 1.19, *б*). Хотя половые ворсинки представляют собой полые образования, перенос ДНК, по-видимому, осуществляется на следующей стадии, когда конъюгирующие клетки сближаются так, что контактируют их клеточные стенки. На F-пилях располагаются рецепторы для некоторых бактериофагов; последние называются «мужскими» фагами, поскольку способны инфицировать только мужские (донорские) клетки.

Бактериальные эндоспоры. Это особый тип прокариотических покоящихся форм, отличающийся необычайно высокой термостойкостью (сохраняют жизнеспособность при кипячении в течение нескольких часов). Термостойкость эндоспор бактерий обусловлена сложной структурой многочисленных оболочек (рис. 1.20), низким содержанием воды (до 15%, как, например, в шерсти), присутствием в коре споры кальциевой соли дипиколиновой кислоты, а также наличием в цитоплазме зародыша споры множества небольших кислоторастворимых белков (SASP). Комплекс дипиколиновой кислоты с ионами кальция облегчает ее дегидратирование, а также связывается с ДНК, увеличивая ее устойчивость к повышенной температуре. Белки SASP прочно прикрепляются к ДНК, защищая ее от высушивания, ультрафиолета и сухого жара. Устойчивость к ультрафиолету ДНК приобретает за счет перехода из B- в A-форму, в которой ДНК менее подвержена формированию пиримидиновых димеров и денатурации. Кроме того, белки SASP используются при прорастании споры в качестве источника углерода и энергии.

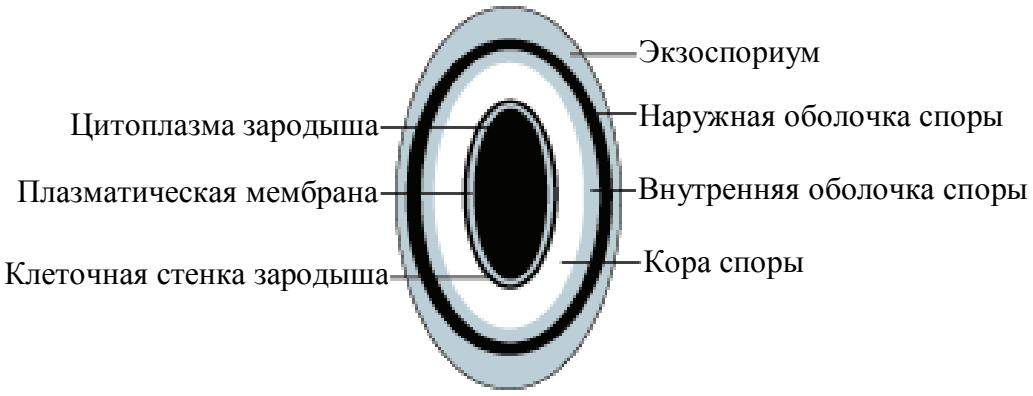


Рис. 1.20. Строение эндоспор бактерий

В состоянии эндоспор бактерии переживают неблагоприятные условия: длительное голодание, повышение температуры (некоторые эндоспоры способны выживать при 150°C, хотя большинство инактиви-

руется при температуре автоклавирования 121°С), высушивание и другие факторы, губительные для **вегетативных клеток**. Зародыш споры находится в покоящейся эндоспоре в состоянии **анабиоза**, при котором его обмен с окружающей средой сведен до минимума. Эндоспоры могут сохранять жизнеспособность необычайно долго: в кишечнике пчелы, попавшей в янтарь, обнаружены жизнеспособные споры бактерий, возраст которых составляет 25–40 млн лет.

К образованию эндоспор способно небольшое число родов бактерий. Наиболее распространенными из них являются *Bacillus* и *Clostridium*, а также *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* и др. При этом следует учитывать, что формирование эндоспор – не обязательная стадия развития культуры. Эндоспоры образуются в неблагоприятные для развития бактерий периоды: при истощении питательных субстратов, накоплении продуктов метаболизма, избытке некоторых ионов и т. п.

Процессу споруляции предшествует накопление клеткой белковых и запасных веществ, синтез дипиколиновой кислоты и поглощение ионов кальция. Процесс споруляции очень сложен, он занимает у бактерий *Bacillus subtilis* до 8 ч, в нем принимают участие продукты почти 200 генов! Образование эндоспор начинается с репликации ДНК, копии нуклеоида расходятся к полюсам клетки, после чего осуществляется инвагинация плазматической мембраны, приводящая к формированию протопласта споры (рис. 1.21).

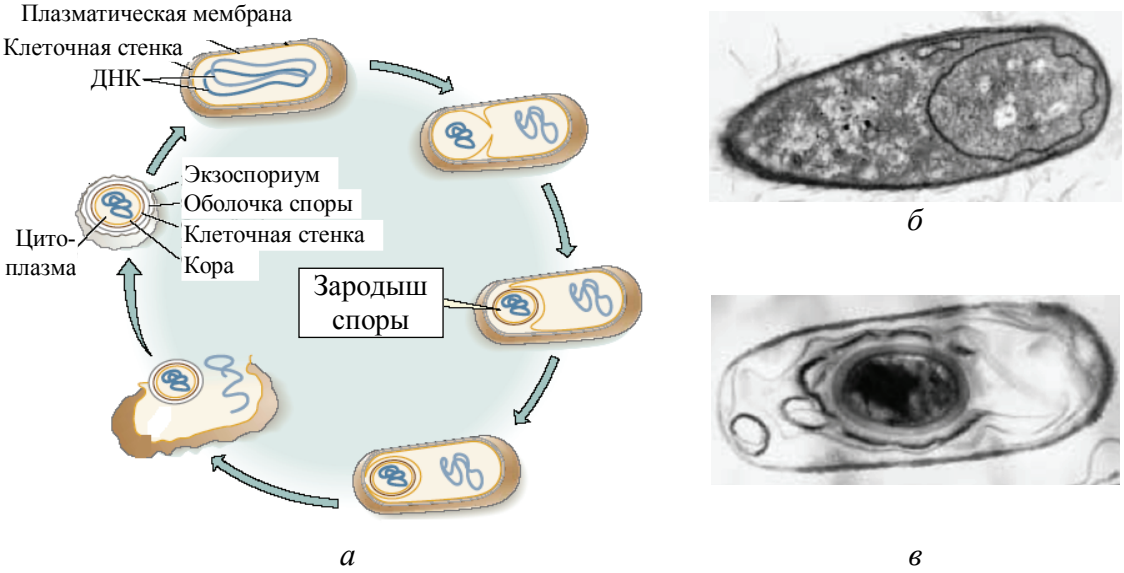


Рис. 1.21. Образование эндоспор:
а – схема процесса; *б* – начальная стадия;
в – зрелая спора в клетке

Протопласт споры обволакивается вторым мембранным слоем, и происходит синтез двух оболочек, напоминающих по структуре клеточные стенки (внутренняя и наружная оболочки споры), а также формирование коры споры. Самый внешний слой споровой оболочки (экзоспориум) обнаруживается в составе эндоспор только некоторых бактерий.

Часто (особенно это характерно для бактерий рода *Clostridium*) диаметр эндоспор превышает диаметр материнской клетки, в результате чего последняя деформируется, приобретая вид «разливной ложки» (рис. 1.22), если спора расположена у полюса, или «веретена», если спора находится в центре клетки.

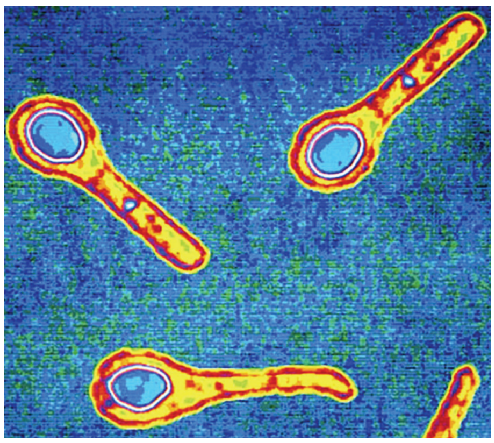


Рис. 1.22. Клетки *Clostridium tetani* с эндоспорами

Высвобождение эндоспоры происходит вследствие лизиса материнской клетки. Иными словами, одна бактериальная клетка может дать начало только одной эндоспоре и только после собственной гибели. Таким образом, процесс формирования эндоспор у бактерий – это не способ размножения, а лишь способ пережить неблагоприятные условия!

Прорастание эндоспор происходит в подходящих для вида условиях: при достаточном количестве воды, питательных веществ, при оптимальной температуре. Этот процесс начинается с набухания споровых оболочек, которые затем лопаются, и формируется удлиняющийся вырост, превращающийся в вегетативную клетку.

Удивительной является скорость, с которой спора перестраивает свой метаболизм, переходя от состояния анабиоза к интенсивному запасанию АТР и синтезу белка: это происходит всего за несколько минут!

Существование терморезистентных эндоспор вызывает определенные проблемы в пищевой промышленности, где термическая стерилизация применяется для предотвращения порчи продуктов. Приходится ужесточать режимы стерилизации или использовать тиндализацию. В то же время способность формировать эндоспоры – удобный признак, который используют при выделении споровых бактерий из внешней среды. В этом случае пробы подогревают в режиме, обеспечивающем гибель вегетативных клеток, но не эндоспор. Некоторые способы хранения бактерий (**лиофилизация**, замораживание) основаны на переводе клеток в состояние анабиоза с их обезвоживанием, что заимствовано человеком у природы при изучении особенностей эндоспор.

Любопытным является тот факт, что ни у одного из видов архебактерий не обнаружена способность к формированию эндоспор. Это может свидетельствовать о том, что данный признак возник у эубактерий уже после того, как разошлись филогенетические ветви доменов Эубактерии и Архебактерии.

Глава 2

ОСНОВЫ СИСТЕМАТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

§ 2.1. Принципы систематики

Под **систематикой** понимают процесс описания, обозначения и распределения организмов по **таксонам** на основании данных об их сходстве и различии, а также установление эволюционной истории организмов. Для всех клеточных организмов характерны сходные принципы, методы и задачи систематики. Существование этого раздела биологии позволяет создать стройную систему классификации организмов, получить возможность ориентироваться в огромном разнообразии населяющих нашу планету видов, определить ход эволюции и положение организмов каждой группы в стройной системе эволюционных взаимосвязей.

Разделами систематики являются: таксономия, классификация, номенклатура и филогения. **Таксономия** разрабатывает теоретические основы классификации: ее принципы, методы и правила. **Классификация** – это распределение всего множества живых организмов по определенной системе иерархически соподчиненных групп – таксонов (классы, семейства, роды, виды и др.).

Номенклатура представляет собой название (наименование) организмов в соответствии с установленными правилами таксономии. В частности, для всех клеточных микроорганизмов принята **бинарная** (двойная) **номенклатура**: в названии микроорганизма присутствует обозначение рода и вида. При этом используется латинский язык, который господствовал в науке в те времена, когда впервые описывали и называли микроорганизмы. Обозначение рода пишется с прописной буквы, а вида – со строчной, например *Bacillus subtilis*. Если обозначение рода широко известно, его можно представлять в сокращенном виде, тогда сохраняется лишь первая его буква, например *B. subtilis*. Бывают случаи, когда видовая принадлежность какого-либо

микроорганизма не известна. Тогда при его упоминании записывают род и добавляют сокращение sp. (от англ. *species* – вид). Например, *Bacillus* sp. При упоминании нескольких видов одного рода можно пользоваться сокращением spp. (виды). В печатном тексте родовые и видовые обозначения пишутся *курсивом*. Правила номенклатуры микроорганизмов устанавливаются международными комитетами.

Филогения определяет эволюционную историю организмов. Прямого знания хода эволюции мы получить не можем, поэтому филогения опирается на косвенные данные, в первую очередь, на результаты секвенирования геномов или отдельных генов. Это оправдано тем, что, согласно теории эволюции, все организмы связаны общностью происхождения, и последовательности нуклеотидов в их геномах являются отражением их родословной. Иными словами, эволюция – это процесс накопления изменений в геномах, и анализ этих изменений должен обеспечить реконструкцию филогенетической истории.

Практическое использование разделов систематики состоит, в первую очередь, в возможности **идентификации** любого организма. Под идентификацией подразумевают процесс выявления сходства неизвестного организма с представителями определенных групп, т. е. размещение этого организма в соответствующем таксоне. В большинстве случаев идентификация заключается в определении родовой и видовой принадлежности организмов.

Различают **филогенетические** (основанные на генетическом родстве организмов, т. е. общности происхождения) и **фенетические** (базирующиеся на сходстве между организмами) **системы классификации**. Филогенетические системы классификации отражают результат эволюционного процесса, т. е. строятся на объективных различиях между организмами, поэтому их называют естественными. Наоборот, фенетические системы классификации, будучи искусственными, постепенно утрачивают свое значение в биологии.

В настоящее время стройной, законченной филогенетической системы классификации населяющих Землю организмов еще не существует. Тем не менее для многих групп микроорганизмов изучены генеалогические связи, позволяющие судить о наличии общих предшественников и характеризовать эволюционные «расстояния», которые прошли те или иные представители, построены **генеалогические древа**.

Слабая морфологическая дифференцировка микроорганизмов приводит к необходимости использовать для их описания и идентификации большое число разнообразных признаков и свойств. Эти

свойства и признаки, характерные для всех микроорганизмов данной группы и не характерные для микроорганизмов других групп, называют критериями систематики. Различают генетические, филогенетические, фенотипические и серологические критерии систематики микроорганизмов.

§ 2.2. Генетические критерии систематики

Признаки этой группы занимают в настоящее время первое место в систематике микроорганизмов как наиболее объективные и дающие представление о филогенетических связях между организмами. Разработано несколько специфических методов, позволяющих дифференцировать микроорганизмы с помощью определения их генетических характеристик.

Гибридизация нуклеиновых кислот. В основу этого метода положен принцип комплементарности между нуклеотидами в антипараллельных цепях молекулы ДНК. Двухцепочечную молекулу ДНК можно разделить на одноцепочечные молекулы при повышении температуры, а затем, при понижении температуры, заставить реассоциировать. Если смешивать одноцепочечные ДНК, выделенные из клеток разных видов, и добиваться их реассоциации, можно определять степень гомологии этих молекул. Чем большее количество нуклеотидов в антипараллельных цепях будет участвовать в формировании водородных комплементарных связей между реассоциированными цепями, тем больше степень гомологии исследуемых ДНК. Аналогичным образом можно определять степень гомологии ДНК – РНК.

Обычно для этого анализа ДНК одного из организмов метят радиоактивными изотопами (^{32}P или ^{3}H) и после реассоциации цепей измеряют уровень радиоактивности гибридных ДНК. Если степень гибридизации составляет не менее 70%, организмы причисляют к одному виду; при степени гибридизации от 25 до 70% делают вывод о принадлежности организмов к одному роду, но к разным видам; а при степени гибридизации менее 25% организмы относят к разным родам. За 100% принимают степень гибридизации меченных изотопами и немеченых цепей ДНК одного организма.

Относительное содержание GC-пар в ДНК. Молекулы ДНК разных микроорганизмов отличаются друг от друга относительным содержанием гуанина (G) и цитозина (C), которые формируют комплементарные пары в антипараллельных цепях ДНК. Близкородственные

микроорганизмы имеют схожее содержание GC-пар в ДНК, а далеко отстоящие в генетическом родстве – сильно различающееся относительное содержание этих азотистых оснований. Наибольшим вариациям данный признак подвержен у простейших (колеблется от 20 до 65 мол. %), грибов (20–60 мол. %) и бактерий (20–80 мол. %). В то же время, например, у разных видов *Pseudomonas* содержание GC-пар меняется в пределах 61,8–69,5 мол. %. Таким образом, этот признак является специфическим для вида, и его можно рассматривать как важное таксономическое свойство. Для определения содержания GC-пар в ДНК разработаны нетрудоемкие физические методы.

Среди других генетических критериев систематики следует упомянуть определение молекулярной массы ДНК, а также способность формировать фертильное (плодовитое) потомство при скрещиваниях. Последний признак определяется только для тех микроорганизмов, которые способны к половому процессу. В этом случае образование фертильного потомства является показателем принадлежности организмов к одному виду.

§ 2.3. Филогенетические критерии систематики

Применение генетических зондов. Этот метод основан на определении специфического участка молекулы ДНК данного микроорганизма. Зонд представляет собой небольшой отрезок ДНК (меченный флуоресцентным красителем или радиоизотопом), нуклеотидная последовательность которого может быть уникальна для данного вида или рода микроорганизма. Если ДНК идентифицируемых клеток содержит комплементарную зонду последовательность, произойдет ее связывание с зондом за счет спаривания комплементарных нуклеотидов, и это можно будет распознать в флуоресцентном микроскопе или на радиоавтографе. Тогда идентифицируемый микроорганизм можно будет отнести к тому же виду (роду), из клеток которого получен зонд. Подобные методы часто называют филогенетическим окрашиванием.

Анализ нуклеотидных последовательностей. Определение последовательности нуклеотидов в ДНК называется секвенированием, или сиквенс-анализом, и оно дает возможность проводить сопоставительный анализ последовательностей нуклеотидов в тех или иных молекулах ДНК или РНК. Наиболее адекватным признаком в систематике является последовательность нуклеотидов в геномах организмов. Однако секвенирование целого генома пока остается трудоемкой,

длительной и дорогостоящей процедурой. Гораздо чаще анализируются нуклеотидные последовательности генов рибосомальных РНК: для прокариот – 16S-рРНК, а для эукариот – 18S-рРНК (16S и 18S – величина отдельных субъединиц рРНК, выраженная в единицах Сведберга). Эти типы РНК представляют собой весьма консервативные молекулы, так что любое изменение в их нуклеотидной последовательности можно рассматривать как результат эволюционного расхождения между микроорганизмами. Чем больше различий в последовательности нуклеотидов в генах малых рРНК у двух организмов, тем раньше началось расхождение между ними, тем, следовательно, дальше отстоят они друг от друга в генетическом родстве. Считается, что прокариоты, чьи последовательности генов 16S-рРНК отличаются более чем на 3% от других организмов, должны быть признаны новыми видами; а если подобные отличия достигают 5% и более, то организмы нужно отнести к новому роду. Столь же консервативными и также используемыми в филогенетическом анализе являются гены *rec*A (кодирует рекомбиназу) и *gir*B (определяет структуру ДНК-гиразы).

Применение данного метода в систематике позволило определить филогенетические связи между многими организмами и проследить истинный ход эволюции (см. § 2.7).

Гены малых рРНК считают «золотым стандартом» для идентификации микроорганизмов и учреждения новых видов. Однако они слишком короткие и консервативные, а поэтому при сопоставлении близкородственных, но генетически не однородных организмов могут показать отсутствие различий. В таком случае прибегают к мультигенному анализу, в котором нуклеотидные последовательности нескольких генов неизвестного организма сопоставляют с таковыми для коллекционных организмов с помощью компьютерных программ. В подобном анализе используют методы **кладистики**: сопоставляется каждый нуклеотид в гене и каждый отличительный вариант признается аллелью и нумеруется. В результате исследуемый штамм оказывается обозначенным каким-то числом, которое представляет **аллельный профиль**, или **мультилокусный тип** организма. Взаимосвязь между отдельными аллельными профилями отражается на дендрограмме в соответствии с расстояниями, которые колеблются от 0 (для идентичных штаммов) до 1 (для штаммов с отдаленной степенью родства).

Наиболее информативным в филогении является, конечно, анализ целых геномов. В настоящее время полностью секвенированы более 670 геномов, из которых более 550 – бактериальные. В результате

подобного анализа биологи получают не только сведения о филогенетических связях организмов, но и знание спектра генов в исследованных геномах, порядка их расположения, величины и структуры геномов и др.

Рестрикционный анализ фрагментов ДНК. Методы данной группы основаны на различиях в расположении сайтов рестрикции для эндонуклеаз в ДНК разных микроорганизмов. Используют разнообразные фрагменты ДНК: определенные участки отдельных генов, регуляторных элементов, высококонсервативных повторяющихся внегенных элементов и др. После расщепления выделенных фрагментов ДНК рестриктазами их разделяют по величине методом гель-электрофореза, получая набор «полос ДНК» – рестрикционный профиль (фингерпринт). Как правило, таким способом устанавливают генетические различия между штаммами одного вида.

Ферментативная амплификация уникальных последовательностей ДНК. Метод состоит в увеличении числа копий заданных фрагментов ДНК с помощью ДНК-полимераз *in vitro* в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Здесь используют специфические олигонуклеотидные праймеры, определяющие специфичность и длину амплифицируемых фрагментов ДНК. Генетические различия между микроорганизмами обусловливают получение наборов амплифицированных фрагментов ДНК, различающихся по величине для разных штаммов или видов микроорганизмов, что устанавливают при разделении ампликонов посредством гель-электрофореза. Метод пригоден для видовой идентификации микроорганизмов, а в сочетании с рестрикционным анализом – для ДНК-типирования штаммов одного вида.

Используется множество разновидностей перечисленных методов, а также их совместные вариации, что существенно расширяет возможности филогенетического анализа.

§ 2.4. Фенотипические критерии систематики

Фенотипические признаки (проявление **генотипа**) объединяют те признаки и свойства микроорганизмов, которые можно увидеть или распознать с помощью определенных методов. Эти признаки дают представление о свойствах микроорганизмов и имеют большое практическое значение. К фенотипическим критериям относят морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки.

Морфологические критерии систематики. К их числу принадлежат наиболее легко определяемые свойства, которые характеризуют

особенности клеток или их скоплений: форма и величина клеток, их взаимное расположение в скоплениях, способность формировать капсулы и слизи, наличие и тип запасных веществ и клеточных включений, наличие и тип фотосинтезирующих пигментов, наличие и тип органов движения. Кроме перечисленных, для каждой группы микроорганизмов характерны специфические морфологические признаки:

– для бактерий: отношение к окраске по Граму, способность к движению, способ движения, тип жгутикования, наличие эндоспор и характер их расположения в клетке и др.;

– для мицелиальных грибов: наличие септ в гифах, морфология органов бесполого спороношения и бесполых спор, характер гаметангиев, способность образовывать плодовые тела и их тип и др.;

– для дрожжей: тип псевдомицелия, степень его дифференцировки, характер половых и бесполых спор и др.;

– для микроводорослей и простейших: наличие клеточной стенки, наличие хлоропластов, особенности зачаточных органов питания и пищеварения и др.;

– для вирусов: тип нуклеиновой кислоты, тип симметрии капсида, наличие суперкапсида, наличие, сократимость и длина отростка.

Культуральные признаки. Эта группа признаков характеризует особенности роста чистой культуры микроорганизма на плотной или в жидкой питательной среде. При выращивании на плотной среде отмечают характер колоний: их форму, величину, консистенцию, характер края, профиль, цвет, способность образовывать слизь, погружение в толщу среды и др. При выращивании в жидких средах регистрируют способность образовывать осадок и его плотность, характер мути, образование пигментов и пузырьков газа, наличие пленки и ее тип, наличие пристеночного кольца и т. п.

Физиолого-биохимические признаки. К ним причисляют: тип метаболизма, отношение к молекулярному кислороду, тип применяемых источников биогенных элементов, зависимость роста от физических и химических факторов, параметры роста клеточных популяций, тип используемых источников энергии и доноров электронов, характерные места обитания, фаготип, спектр устойчивости к антибиотикам, способность деградировать токсичные вещества, особенности строения клеточных стенок, мембраны, аппарата синтеза белка, химический состав запасных веществ и включений, особенности взаимоотношения с макроорганизмами и друг с другом, последовательность аминокислот в определенных пептидах, хроматографический анализ липидов в составе мембран и т. п.

§ 2.5. Серологические критерии систематики

Название этих критериев, а также методов для их определения происходит от латинского слова *serum* – сыворотка. Данная группа методов основана на реакциях *in vitro* антигенов (идентифицируемых микроорганизмов и их макромолекул) с антителами в составе сывороток. Между антигенами и соответствующими антителами существует высокая специфичность связывания, что положено в основу методов серологической диагностики.

Если коллекционным (известной видовой и штаммовой принадлежности) микроорганизмом иммунизировать лабораторное животное, а затем получить сыворотку его крови, то в ней будут содержаться антитела, специфичные к данному штамму. Теперь такую антисыворотку можно использовать для выявления родственных микроорганизмов, обладающих такими же антигенными детерминантами, что и коллекционный штамм. Для этого разработан ряд методов, в которых можно зарегистрировать взаимодействие антигенов с антителами. Простейшими из них служат реакции агглютинации (образование агглютинов, или «комочков») и преципитации (формирование осадка). Облегчить процедуру выявления комплексов антиген − антитело можно, например, с помощью меченных флуоресцентными красителями антител. В данном случае комплексы антигенов с антителами легко обнаруживаются при флуоресцентной микроскопии.

С применением подобных принципов можно распознавать изменения в иммунологических свойствах белков, каждый из которых имеет несколько антигенных детерминант, а антисыворотки против чистого белка содержат антитела против каждой из этих антигенных детерминант. Таким образом, с помощью набора антисывороток у микроорганизмов можно находить видоизмененные белки – продукты измененных генов. Подобный подход позволяет выявлять степень взаимного родства микроорганизмов.

§ 2.6. Иерархическая структура систем классификации

Системы классификации организмов состоят из нескольких иерархических уровней. При этом низшие уровни (таксоны) объединяются в более высокие, и каждый уровень отличается от другого заданной степенью однородности организмов. Чаще всего в биологических системах классификации виды объединяются в роды, роды –

в семейства, затем следуют порядки, классы, отделы, царства, домены. Наиболее близкая степень родства характерна для представителей одного вида, а наиболее удалены друг от друга в филогенетическом родстве представители разных доменов.

Основной таксономической единицей считается **вид** (*species*). Для организмов, размножающихся половым путем, определение вида включает два основных условия: наличие у представителей высокой степени сходства и способность к скрещиванию внутри себя (с образованием плодовитого потомства), но не с представителями других видов. Сложнее определить вид для прокариот, которые не размножаются половым путем, но могут обмениваться генетической информацией, причем иногда – с представителями других родов! Поэтому концепция вида для прокариот четко не определена. Тем не менее к главным признакам вида для эубактерий и архебактерий можно отнести следующие: это почти полная степень сходства для штаммов, объединяемых в вид, и наличие существенных отличий их от других таких же совокупностей.

Альтернативой биологическому виду для прокариот является концепция генеалогического, или филогенетического, вида. Согласно ей, вид прокариот – это группа штаммов, которые на основании анализа последовательностей ДНК множества генов тесно связаны друг с другом филогенетически (имеют общего предка) и существенно отличаются от других групп штаммов.

Несмотря на то, что виды являются основными таксономическими единицами в системах классификации микроорганизмов, генетическая вариабельность последних приводит к необходимости вводить дополнительное подразделение вида на подвиды (*subspecies*). При этом подвиды могут различаться физиологически (*biovar*), морфологически (*morphovar*) или по антигенным свойствам (*serovar*).

Виды (подвиды) состоят из **штаммов** – культур генетически однородных микроорганизмов. Штаммами одного вида принято считать чистые культуры микроорганизмов, выделенные из разных источников, либо из одного источника, но в разное время, либо полученные в ходе генетических манипуляций (индукция мутаций, элиминация плазмид, генетический обмен и др.). Различия между штаммами одного вида не выходят за рамки этого вида.

Обычно начало штамму дает один клон микроорганизмов. **Клон** – это потомство одной клетки, полученное на плотной питательной среде. По сути, клон представляет собой изолированную колонию чистой культуры микроорганизмов.

§ 2.7. Филогения микроорганизмов

Наиболее обширные базы данных, на которые опирается филогения, накоплены по сиквенсам генов малых рибосомальных РНК, чему есть объяснение: данные гены имеются у всех организмов, их функции постоянны, они относительно консервативны с точки зрения накопления изменений и имеют небольшую длину. В базе данных Ribosomal Database Project II содержится более 2 млн сиквенсов и множество аналитических программ.

В то же время для филогенетического анализа стали все чаще привлекаться сиквенсы других генов: кодирующих структуру 23S-РНК, фактора трансляции Tu, белков теплового шока, гистонов, некоторых тРНК-синтетаз. Причем обнаружились довольно весомые несовпадения в структуре генеалогических связей, полученных при анализе генов малых ядерных РНК и других генов (см. гл. 6). Поэтому для адекватной реконструкции эволюционной истории организмов теперь обязательно используют сиквенсы нескольких генов, а также сравнивают вторичные структуры РНК и аминокислотные последовательности белков, анализируют положение в геноме и функции отдельных генов.

Основной процедурой филогении является «выравнивание» сиквенсов – это процесс их сопоставления, выполняемый специальными компьютерными программами, в ходе которого обнаруживаются замены нуклеотидов, инсерции, делеции и другие мутации, причем выявляются те из них, которые являются филогенетически информативными. Наиболее популярной программой для решения данных задач считается BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Основываясь на полученных данных, создают картину филогенетических взаимоотношений между организмами, т. е. строят филогенетические (генеалогические) древа. Для этого располагают группы организмов относительно их общих и непосредственных предшественников в виде ветвей определенной длины. При этом каждое разветвление (узел) указывает на эволюционную точку расхождения, а верхушки ветвей символизируют ныне живущие организмы, чьи сиквенсы изучаются. Длина ветвей отражает число изменений, накопленных в ДНК. На рис. 2.1 приведен фрагмент филогенетического древа, из которого можно извлечь следующую информацию: наиболее близкородственными являются организмы А и В, поскольку они имеют общего предшественника (ветви расходятся из одной точки); организм С в эволюционном плане равноудален как от А, так и от В, он имеет общего предшественника с группой организмов А и В;

длительность эволюции организмов А и В одинаковая, поскольку они берут начало от одного предшественника в одно время, но скорость эволюции В больше, чем А – на это указывает бóльшая длина ветви, идущей к организму В; следовательно, организм В успел накопить большее число изменений в ДНК, чем организм А.

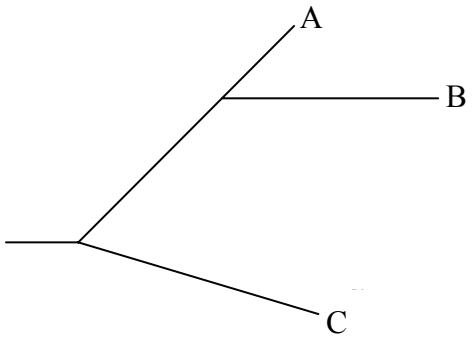


Рис. 2.1. Генеалогия организмов А, В, С

В настоящее время филогенетические системы служат основой систематики организмов и микроорганизмов в том числе, как будет показано в следующих главах.

§ 2.8. Современная классификация клеточных организмов и положение микроорганизмов в ней

В 1886 г. Эрнст Генрих Геккель (Ernst Heinrich Haeckel, 1834–1919) поместил все одноклеточные микроскопические организмы в царство **Протисты**, противопоставив его двум другим царствам – Растения и Животные, объединявших макроорганизмы. Эта система классификации просуществовала почти столетие. В 50-х гг. XX в. были разработаны методы электронной микроскопии, позволившие выявить существенные различия между представителями протистов: стало понятно, что эта группа неоднородна, в ней присутствуют прокариотические и эукариотические микроорганизмы. Поэтому для прокариот было организовано четвертое царство Monera (Монеры), или Procaryotae. При этом в царстве Протисты остались преимущественно одноклеточные эукариотические микроорганизмы. В 1967 г. по предложению Роберта Уиттекера (Robert Whittaker, 1920–1980) из царства Протисты были исключены грибы, и их поместили в пятое царство Fungi, которое объединило микроорганизмы с осмотрофным типом питания. Все эти переустройства системы классификации живых существ основывались на

фенотипических признаках и не учитывали филогенетического родства между организмами.

В 80-х гг. прошлого века Карл Воуз (Carl Woese, 1928–2012) предпринял попытку осуществить филогенетический анализ клеточных организмов путем сопоставления последовательности нуклеотидов в генах 16S- и 18S-рРНК. Оказалось, что среди прокариот есть две далеко отстоящие в генетическом родстве группы – архебактерии и эубактерии. Их представители так же сильно отличаются друг от друга по структуре генов малых рРНК, как и от эукариот. Эти наблюдения послужили основанием для разграничения среди клеточных форм жизни трех доменов (наивысших биологических таксонов): **Eucarya** (Эукариоты), **Bacteria** (Эубактерии) и **Archaea** (Архебактерии). Важно отметить, что и по фенотипическим свойствам представители трех доменов существенно различаются между собой (таблица). Существование трех доменов подтверждается анализом более 30 генов, присутствующих в ДНК более 190 видов эубактерий, архебактерий и эукариот.

Сопоставительный анализ фенотипических свойств представителей трех доменов

Свойство	Домены		
	Эукариоты	Архебактерии	Эубактерии
Организация клеток	Эукариоты	Прокариоты	Прокариоты
Число хромосом	>1	1	1
Форма хромосом	Линейная	Кольцевая	Кольцевая
Муреин в клеточной стенке	Отсутствует	Отсутствует	Присутствует
Тип рибосом	80S	70S	70S
Наличие интронов в генах	Есть	Есть в генах некоторых тРНК	Нет
Наличие оперонов	Нет	Есть	Есть
Кэпирование и полиаденилирование мРНК	Есть	Нет	Нет
Наличие плазмид	Редко	Есть	Есть
Жирные кислоты в мембранных липидах	Присутствуют	Отсутствуют	Присутствуют
Мембранные органеллы	Есть	Нет	Нет
Митоз и мейоз	Есть	Нет	Нет
Первая аминокислота в синтезируемом полипептиде	Метионин	Метионин	N-формилметионин
Чувствительность синтеза мРНК к рифампицину	Устойчив	Устойчив	Чувствителен

Окончание таблицы

Свойство	Домены		
	Эукариоты	Архебактерии	Эубактерии
Чувствительность синтеза белка к хлорамфениколу	Устойчив	Устойчив	Чувствителен
Чувствительность синтеза белка к дифтерийному токсину	Чувствителен	Чувствителен	Устойчив
Диссимиляционная редукция S^0, SO_4^{2-}, Fe^{3+}, NO_3^-	Нет	Есть	Есть
Фиксация азота	Нет	Есть	Есть
Хемолитотрофия	Нет	Есть	Есть

На рис. 2.2 приведено универсальное филогенетическое древо, построенное по данным последовательностей нуклеотидов в генах малых рибосомальных РНК. На нем первая точка ветвления представляет собой точку эволюционного расхождения всех организмов, происходящих от последнего вселенского общего предка LUCA (Last Universal Common Ancestor).

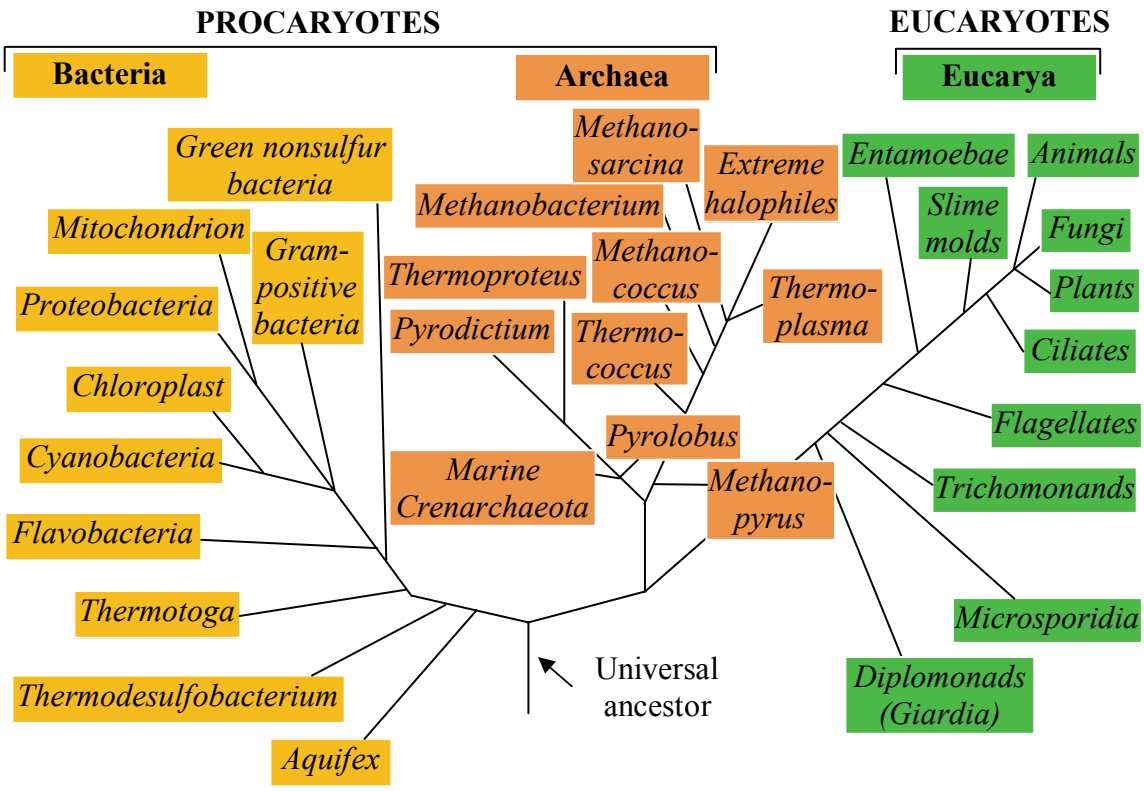


Рис. 2.2. Универсальное филогенетическое древо («древо жизни»), построенное по результатам анализа генов 16S- и 18S-рРНК

Таким образом, особенностями эволюционной истории клеточных организмов являются:

1) уже вскоре после образования прокариоты стали филогенетически неоднородными;

2) архебактерии филогенетически ближе к эукариотам, чем к эубактериям, поскольку от LUCA произошли две эволюционные ветви – домен Эубактерии и вторая главная ветвь, которая вскоре дивергировала с образованием доменов Архебактерии и Эукариоты.

Можно видеть (рис. 2.2), что многоклеточные организмы (растения, животные, грибы) образуют лишь верхнюю часть небольшой ветви генеалогического древа, остальные его ответвления ведут к одноклеточным микроорганизмам – эубактериям, архебактериям и протистам (на этом, сокращенном, варианте древа не приведены филогенетические ветви водорослей и некоторых других эукариотических микроорганизмов, они охарактеризованы в главе 6).

Таким образом, клеточными объектами микробиологии являются все прокариоты – представители доменов Эубактерии и Архебактерии, а также большинство филогенетических ветвей третьего домена Эукариоты, за исключением растений и животных. К эукариотическим микроорганизмам относятся грибы, слизевики, простейшие и водоросли.

Глава 3

МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, ОСОБЕННОСТИ КЛАССИФИКАЦИИ ПРОКАРИОТ

В настоящее время охарактеризовано более 7000 видов прокариот, а по прогнозам их количество гораздо больше: от 100 000 до 1 000 000. В этой главе отражены особенности морфологии их клеток, способов размножения, приведены сведения об их классификации.

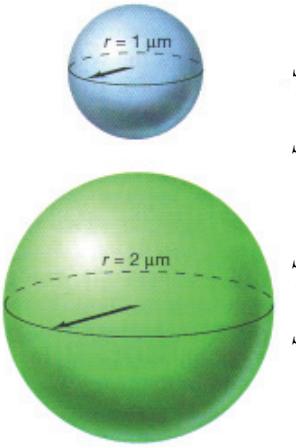
§ 3.1. Морфология клеток прокариот

Размер клеток. Размер клеток прокариот является систематическим признаком, который хоть и зависит от условий культивирования, все же меняется в незначительных пределах. Разные виды прокариот существенно отличаются по размеру, который колеблется в диапазоне 0,2–700,0 мкм. При этом величина клеток большинства прокариот равна 1–3 мкм. Типичными по размеру являются, например, бактерии *E. coli*: диаметр их палочковидных клеток составляет 1 мкм, а длина – 2 мкм. Среди гигантов можно привести в пример *Epulopiscium fishelsoni*: длина их клеток достигает 600 мкм, а диаметр – 75 мкм. Чтобы в такой огромной клетке поддерживать необходимый уровень белков, эти бактерии содержат несколько тысяч копий геномов, сопоставимых по размеру с геномом *E. coli*.

Самыми маленькими клеточными существами являются так называемые нанобактерии, размер которых по некоторым свидетельствам составляет 0,1 мкм и меньше. Однако существование таких клеток остается спорным вопросом, поскольку, согласно расчетам, эффективность процессов с участием макромолекул ограничена объемом 0,15 мкм. В то же время описано достаточно большое количество свободноживущих (в основном океанических) и паразитических прокариот размером 0,2–0,4 мкм.

Следует отметить, что у маленьких клеток есть очевидные преимущества перед крупными, поскольку для них достигается большее

значение отношения площади к объему, что наглядно демонстрирует рис. 3.1. С увеличением отношения S / V возрастает скорость обмена клетки с окружающей средой, а следовательно, и скорость роста. Вместе с этим увеличивается численность популяций, а это означает, что возрастает количество событий репликации ДНК и, соответственно, частота мутагенеза. В результате возможности адаптации и скорость эволюционных процессов у видов с маленьким размером клеток становится выше таковых для видов с более крупными клетками.



$r = 1$ μm
$S = 12{,}6$ μm^2
$V = 4{,}2$ μm^3
$S / V = 3$

$r = 2$ μm
$S = 50{,}3$ μm^2
$V = 33{,}5$ μm^3
$S / V = 1{,}5$

Рис. 3.1. Взаимосвязь между площадью поверхности клеток и их объемом (увеличение размера сопровождается уменьшением отношения S / V)

Форма клеток прокариот. Форма клеток бактерий, а также характер клеточных скоплений – это важный таксономический признак, который легко выявляется при микроскопировании. Как показано в главе 1, форму клеток прокариот определяют специфические белки цитоскелета. Для эубактерий характерны три принципиально различающиеся формы клеток: сферическая (кокковидная), цилиндрическая (палочковидная) и извитая.

Сферические клетки (кокки) по форме напоминают шары, но могут выглядеть как эллипсоиды, быть слегка уплощенными или односторонне вогнутыми. Особенностью сферических клеток является способность делиться в нескольких плоскостях. При этом клетки могут не расходиться после деления, формируя скопления характерных очертаний (рис. 3.2).

Кокки, делящиеся в одной плоскости, могут образовывать скопления в виде пар клеток (**диплококки**) и цепочек разной длины

(**стрептококки**). Если сферические клетки делятся в двух плоскостях и не расходятся после деления, их скопления имеют вид тетрад кокков (**тетракокки**). При делении в трех взаимно перпендикулярных плоскостях формируются пакетики кокков, включающие 8 клеток (**сарцины**). Кроме того, некоторые виды образуют неправильные по форме (нерегулярные) скопления кокков – **стафилококки**, которые могут напоминать по очертанию гроздья винограда (рис. 3.2).

Рис. 3.2. Типы клеточных скоплений, формируемых кокками

Палочковидные клетки по форме напоминают цилиндры (характеризуются одинаковым диаметром на протяжении всей длины). Палочки делятся только в одной плоскости – перпендикулярно оси цилиндра. При этом они могут не формировать скоплений и располагаться поодиночке, либо образовывать скопления в виде пар клеток (**диплобактерии**) или цепочек (**стрептобактерии**) (рис. 3.3).

Для палочек характерны разные типы клеточных окончаний, что тоже является таксономическим признаком. Чаще всего палочки имеют закругленные окончания, реже – суженные или срезанные под определенным углом (рис. 3.3).

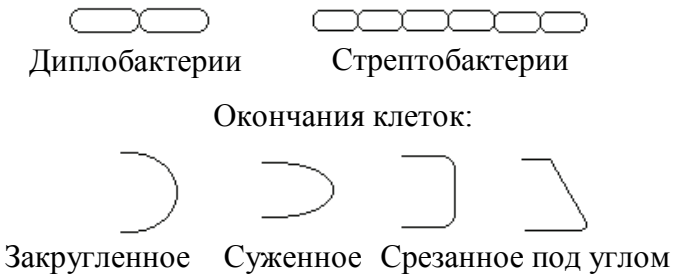


Рис. 3.3. Типы скоплений и форма окончаний палочковидных клеток

Иногда палочковидные клетки, содержащие эндоспоры, называют **бациллами**. Некоторые микробиологи предлагали даже подразделять все прокариоты на бактерии (не образуют эндоспор) и бациллы (формируют эндоспоры). Однако такое деление не закрепилось в микробиологической практике. Например, целое семейство молочнокислых бактерий носит название Lacto**bacillaceae** (лакто**бациллы**), хотя они не способны к образованию эндоспор.

Извитые клетки могут иметь разное число завитков в своем составе, что закреплено генетически (видоспецифичный признак) и определяет название бактерий. Содержащие один завиток клетки называют **вибрионами**, включающие 3–5 завитков – **спириллами**, имеющие большее число завитков – **спирохетами** (рис. 3.4).

Рис. 3.4. Форма извитых клеток

Кроме перечисленных форм, которые преобладают среди прокариот, встречаются клетки необычной формы, а отдельные виды, кроме того, формируют клетки, изменчивые по форме и размерам (**плеоморфизм**).

К необычным формам можно отнести: клетки с выростами, с утолщениями, булавовидной формы, нитчатые (цепочки палочек, окруженные общим чехлом), веретенообразные, коккобактерии (переходная форма между кокками и палочками) и др.

Архебактерии часто имеют экзотическую форму клеток: ланцетовидную, пластинкообразную, крючковидную, овальную, спиралевидную и др.

§ 3.2. Характеристика способов размножения прокариот

Подавляющее большинство прокариот размножается **бинарным делением**, в результате которого формируются две идентичные клетки. Важно отметить, что среди них нельзя выделить материнскую и дочернюю, эти клетки одинаковы по структуре, форме и размеру.

Процесс размножения обычно начинается, когда клетка достигнет максимальных размеров. Делению клетки предшествует репликация (удвоение ДНК). Обеспечивают деление клеток прокариот особые белки – Fts-белки, среди которых основным является FtsZ – аналог тубулина, участвующего в делении эукариотических клеток. Fts-белки широко распространены среди прокариот и имеются даже у митохондрий и хлоропластов, что еще раз доказывает происхождение этих органелл от прокариот. В совокупности Fts-белки формируют дивисому – аппарат для деления клеток. Дивисома управляет синтезом новой плазматической мембраны и материала клеточной стенки, разграничивающих делящиеся клетки. Fts-белки взаимодействуют с MreB-белками (см. рис. 1.13 на с. 39), и считается, что между процессами деления клеток и определения их формы существует взаимосвязь.

Механизм бинарного деления у грамположительных и грамотрицательных бактерий может несколько отличаться. У грамположительных бактерий деление чаще начинается с образования **инвагинаций** (впячиваний) плазматической мембраны, которые вскоре встречаются, а затем между ними формируется пептидогликановый слой. Подобная структура называется перегородкой, она делит содержимое клетки на две части. В этом случае диаметр делящейся клетки не изменяется на протяжении всего процесса деления (рис. 3.5).

У грамотрицательных бактерий бинарное деление может сопровождаться образованием перетяжки, которая формируется при сужении в центральной части клетки плазматической мембраны и клеточной стенки. При этом диаметр клетки в центре постепенно уменьшается, как будто кто-то перетягивает ее пополам. Отверстие между образующимися отсеками становится все уже, пока, наконец, не исчезнет совсем и перетяжка не разделит клетку на две части (рис. 3.6).

У многих прокариот клетки после деления расходятся благодаря воздействию на срединный слой перегородки ферментов – автолизинов. Наиболее распространен среди автолизинов лизоцим. У других бактерий формирование перегородки может быть неполным или же автолизины не разрушают срединный слой перегородок – в этих случаях образуются клеточные скопления определенного типа.

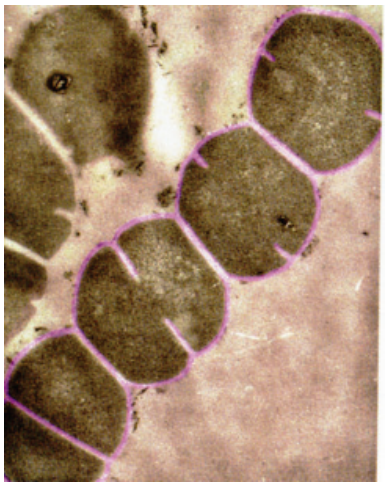


Рис. 3.5. Микрофотография бинарно делящихся грамположительных стрептококков

Рис. 3.6. Микрофотография бинарно делящейся *Escherichia coli*

Еще одним типом размножения, характерным для некоторых прокариот, в первую очередь для представителей группы почкующихся бактерий, а также многих цианобактерий, является **почкование**. Это неравное деление. Его результатом становится формирование материнской клетки (более крупной, стареющей, неподвижной) и дочерней (меньших размеров, молодой, растущей, часто подвижной). При почковании в определенном месте на поверхности клетки образуется небольшой бугорок (почка), в который переходит копия нуклеоида. Почка постепенно увеличивается в размерах и, наконец, отделяется от материнской клетки. У некоторых бактерий почки формируются на выростах.

Отдельные представители цианобактерий способны размножаться **множественным делением**, когда внутри клетки разграничивается цитоплазма и образуется несколько (иногда до 1000) мелких сферических клеток, которые высвобождаются при разрыве клеточной стенки.

Актиномицеты могут размножаться путем **фрагментации мицелия** и с помощью **неполовых спор** – способами, типичными для мицелиальных грибов (см. гл. 7).

Следует подчеркнуть, что многие упомянутые способы размножения (почкование, фрагментация мицелия, с помощью неполовых спор) характерны также для эукариот, однако у эукариот этим процессам предшествует деление ядра в ходе митоза, а для прокариот митоз не характерен.

§ 3.3. Особенности классификации прокариот

Номенклатура и описание прокариот регламентируется Международным кодексом номенклатуры бактерий, который разработан и контролируется Международным комитетом по систематике прокариот. При определении нового вида прокариот следует получить эубактерии или архебактерии в виде чистой культуры, описать их и дать им название, а также показать их отличие от уже описанных видов. Данную информацию необходимо опубликовать в журнале International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM). Бактерио-

логический кодекс предусматривает сдачу типового штамма нового вида в международные коллекции микроорганизмов (депонирование). Имеется два официальных сайта, которые содержат обновляемую информацию об утвержденных названиях видов прокариот: http://www.bacterio.cict.fr; http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm.

Существует и другая практика: можно выделить из обнаруженных в каких-либо источниках клеток прокариот ДНК либо рРНК, определить последовательность нуклеотидов в них и произвести сопоставительный анализ с нуклеиновыми кислотами, внесенными в базу данных. По степени гомологии с известными последовательностями можно определить, что выделен новый вид.

В настоящее время официальной завершенной классификации эубактерий и архебактерий еще не существует. Наиболее распространенной и авторитетной является «Таксономическая схема прокариот», основанная на втором издании энциклопедии прокариот «Руководство Берджи по систематической бактериологии» (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), которое было издано в 2001–2012 гг. В этом руководстве прокариоты классифицируются в соответствии со строением генов 16S-рРНК и организацией геномов в сочетании с фенотипическими признаками. Вторым по значимости изданием по классификации прокариот является руководство «Прокариоты» (The Prokaryotes), в котором содержится информация о выделении из окружающей среды, культивировании и свойствах представителей многих групп эубактерий и архебактерий. Третье издание «Прокариоты» вышло в 2006 г. и состоит из 7 томов. В совокупности названные руководства содержат исчерпывающую информацию о филогении и таксономии прокариот, а также пригодны для идентификации вновь выделенных представителей.

В главах 4 и 5 приведена характеристика наиболее важных для биотехнологии представителей филогенетических ветвей прокариот.

Глава 4

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ДОМЕНА BACTERIA

В настоящее время известно более 80 филогенетических ветвей эубактерий, многие из которых получены в виде чистых культур, другие идентифицированы в ходе секвенирования ДНК, выделенных из состава микробных сообществ. О фенотипических признаках этих «заочно» идентифицированных групп эубактерий известно немного, поэтому в данной главе внимание будет сфокусировано на представителях тех филогенетических ветвей, которые хорошо изучены и имеют народнохозяйственное значение. Именно для этих бактерий на рис. 4.1 приведены филогенетические ветви домена Bacteria, генеалогические связи между которыми установлены на основании анализа последовательностей генов 16S-рРНК.

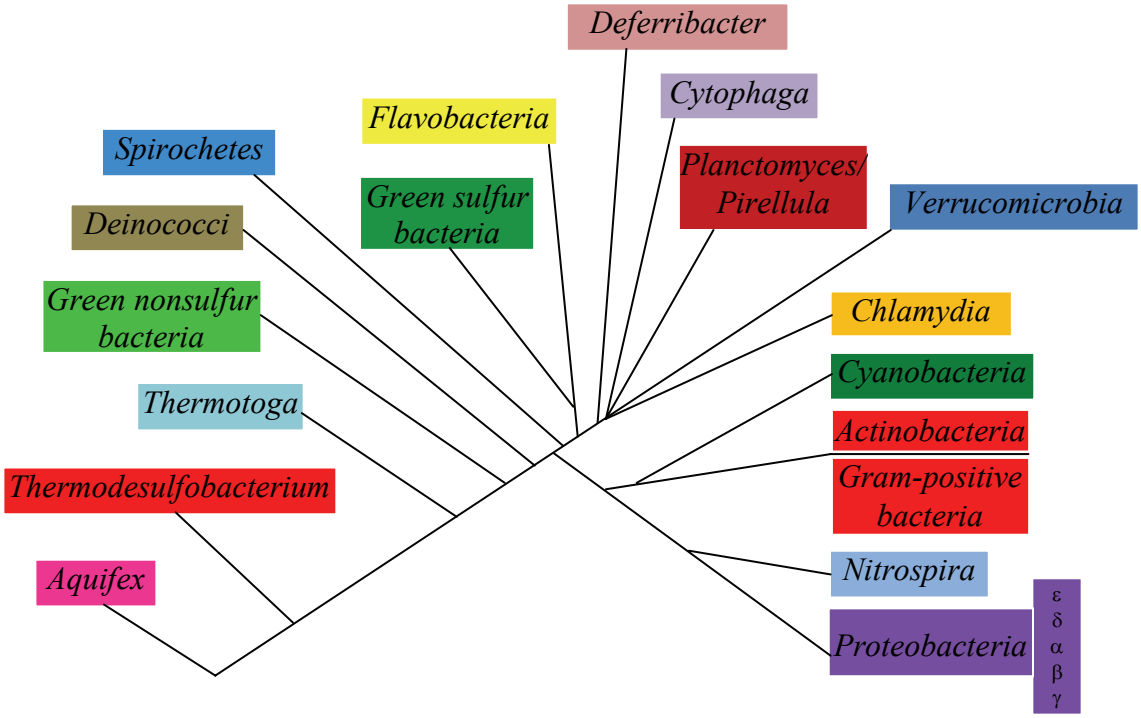


Рис. 4.1. Фрагмент филогенетического древа домена Bacteria (Эубактерии)

Особенностями филогении эубактерий, которые можно проследить на рис. 4.1, являются:

– только две филогенетические ветви (Актинобактерии и Грамположительные бактерии) объединяют в своем составе бактерии, имеющие клеточную стенку грамположительного типа; остальные филогенетические ветви представлены грамотрицательными бактериями;

– самой крупной и разнообразной по составу является ветвь Протеобактерии;

– наиболее филогенетически древними считаются представители рода *Aquifex* (самая нижняя ветвь на древе) и родственные ему эубактерии, все они представлены гипертермофильными водородными хемолитотрофами. Расположенные по соседству ветви (*Thermodesulfobacterium*, *Thermotoga*, Зеленые несерные бактерии) также содержат виды термофильных бактерий.

Начнем филогенетический обзор эубактерий с характеристики представителей самой крупной ветви Протеобактерии.

§ 4.1. Протеобактерии

Протеобактерии – наикрупнейшая и наиболее гетерогенная в морфологическом, физиологическом и биохимическом плане группа, в ее составе находятся наиболее значимые для биотехнологии, медицины и сельского хозяйства виды. Здесь имеются хемолитотрофные, хемоорганотрофные и фототрофные бактерии; облигатные аэробы и анаэробы, факультативные анаэробы; прямые и изогнутые палочки, кокки, спириллы, почкующиеся клетки и клетки с отростками; подвижные за счет жгутиков и выделения слизи, а также неподвижные клетки. В соответствии со структурой генов 16S-рРНК протеобактерии подразделяются на пять классов (альфа, бета, гамма, дельта и эпсилон). Представители разных классов часто характеризуются сходными физиолого-биохимическими свойствами, например, фототрофы встречаются в трех классах, нитрификаторы – в четырех и т. п. Это еще раз подчеркивает несовпадение филогенетических и фенетических систем классификации.

В таблице приведена краткая характеристика ветви Протеобактерии, к которой по составу 16S-рРНК наиболее близки митохондрии и хлоропласты большинства эукариот, после чего следует краткий обзор наиболее важных представителей протеобактерий, которые рассмотрены в составе фенетических групп.

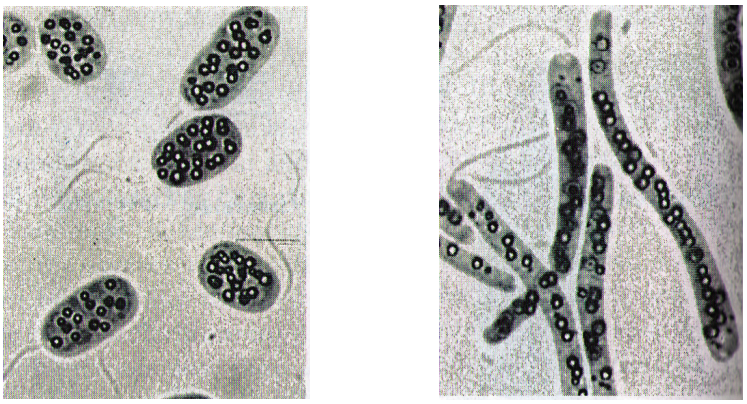
Структура филогенетической ветви Протеобактерии (Proteobacteria)

Основные фенетические группы	Наиболее распространенные группы, роды
Ферментирующие палочки и вибрионы	Энтеробактерии, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Zymomonas*
Аэробно дышащие палочки и кокки	*Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Legionella*, *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Rickettsia*
Образующие чехлы	*Spaerotilus*, *Leptothrix*, *Crenothrix*
Образующие простеки	*Caulobacter*, *Hyphomicrobium*
Паразиты бактерий	*Bdellovibrio*
Спириллы и магнитоспириллы	*Spirillum*, *Aquaspirillum*, *Magnetospirillum*, *Campylobacter*, *Helicobacter*
Миксобактерии	*Polyangium*, *Myxococcus*
Восстанавливающие сульфаты и серу	*Desulfovibrio*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfuromonas*
Нитрифицирующие бактерии	*Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*
Окисляющие серу и железо	*Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thermothrix*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Gallionella*
Окисляющие водород	*Ralstonia*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Aquapirillum*
Метилотрофы	*Methylomonas*, *Methylocystis*, *Methylobacter*, *Methylococcus*
Фототрофные пурпурные бактерии	Серные: *Chromatium*, *Thiospirillum*, *Thiocapsa*; несерные: *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodocyclus*

Фототрофные пурпурные бактерии. Представители данной группы способны осуществлять аноксигенный фотосинтез, который отличается от такового у зеленых растений и цианобактерий тем, что в качестве доноров электронов вместо воды используются какие-либо иные восстановленные неорганические или органические соединения. В результате этот процесс не сопровождается выделением молекулярного кислорода, как это имеет место у оксигенных бактерий и растений.

Кроме хлорофилла в клетках аноксигенных бактерий много каротиноидов, и они окрашены в яркие цвета. Клетки могут иметь любую типичную для бактерий форму, есть неподвижные и подвижные за счет жгутиков или скользящего типа формы. Пурпурные бактерии содержат в клетках большое количество мембранных систем разной морфологии, которые образуются из впячиваний плазматической мембраны.

Местами обитания служат бескислородные зоны увлажненных почв и водоемов. Эти бактерии в аэробных условиях способны к гетеротрофному росту и часто вызывают цветение загрязненной органикой воды. Пурпурные серные бактерии (*Chromatium*, *Thiospirillum*) используют в качестве доноров электронов сульфиды и окисляют их до элементарной серы, которую накапливают внутри клеток (рис. 4.2). Впоследствии сера может окисляться до сульфатов.



а *б*

Рис. 4.2. Фазово-контрастная микроскопия пурпурных серных бактерий с глобулами элементарной серы внутри клеток: *а – Chromatium okenii*; *б – Thiospirillum jenense*

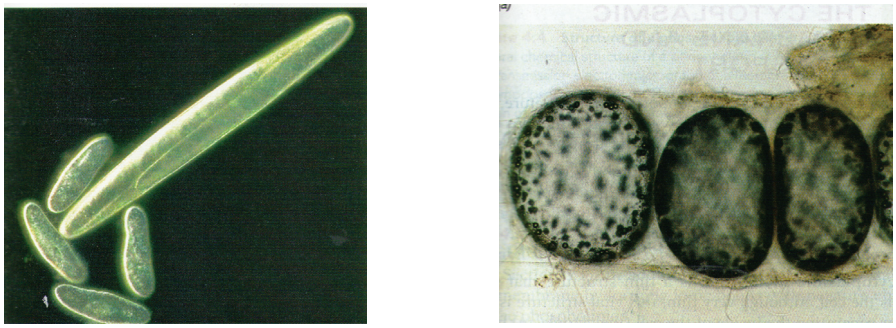
Пурпурные несерные бактерии (*Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*) растут предпочтительно за счет ассимиляции простых органических веществ, используя их также в качестве доноров электронов при фотосинтезе (фотоорганогетеротрофный тип питания).

Нитрифицирующие бактерии. К этой группе относятся бактерии, способные запасать энергию при окислении соединений азота (хемолитотрофный метаболизм). Деятельность хемолитотрофов чрезвычайно важна для биогеохимического круговорота веществ. Нитрифицирующие бактерии делят на окисляющие нитрит (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*) и окисляющие аммиак (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira* и др.). Особенностью многих из них, как и у пурпурных и метилотрофных бактерий, является наличие развитой сети внутриклеточных мембранных структур. В этих мембранах расположены ферменты, катализирующие процесс нитрификации. Большинство нитрификаторов – облигатные хемолитотрофы и облигатные аэробы.

Окисляющие соединения серы и железа бактерии. Так же, как и нитрифицирующие, эти бактерии осуществляют хемолитотрофный метаболизм. Среди бесцветных (нефотосинтезирующих) сероокисляющих

бактерий встречаются все формы клеток и типы движения. К ним относят: *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Achromatium*, *Beggiatoa* и др. У этих бактерий довольно крупные клетки, встречаются даже гиганты (рис. 4.3), что, как полагают, связано с необходимостью запасать внутри клеток большое количество серы.

Бактерии рода *Beggiatoa* отличаются способностью формировать длинные нити, окислять сероводород и откладывать серу внутри клеток. Эти бактерии могут образовывать ковер (мат) на поверхности морских донных осадков. Ацидофильные представители данной группы способны окислять ионы железа и/или марганца, осаждая их во внеклеточных структурах: капсулах, чехлах, стебельках.



а *б*

Рис. 4.3. Клетки окисляющих соединения серы гигантских эубактерий:
а – Epulupiscium fishelsoni длиной 600 мкм рядом
с инфузориями (протисты) длиной 75 мкм;
б – Thiomargarita namibiensis (400 мкм в диаметре)

Окисляющие водород бактерии. Группа объединяет хемолитотрофные водородные бактерии, способные использовать H_2 в качестве единственного донора электронов и восстанавливать при этом O_2. Большинство этих бактерий автотрофы, фиксирующие CO_2. Наиболее изученными водородными бактериями являются представители родов *Ralstonia*, *Pseudomonas* и *Paracoccus*. Почти все водородные бактерии – факультативные литотрофы, способные переключаться на органотрофный метаболизм в присутствии органики. Некоторые водородные бактерии могут использовать в качестве донора электронов монооксись углерода (CO), окисляя ее в двуокись (CO_2). Этим бактериям принадлежит важная роль в природе по детоксикации CO.

Метанотрофы, метилотрофы. Представители родов *Methylomonas*, *Methylocystis*, *Methylobacter*, *Methylococcus* и др. отличаются способностью использовать в качестве единственных источников углерода и энергии одноуглеродные соединения (метан, метанол, формальдегид,

формиат и др.). Все они являются аэробами и широко распространены в природе (почвенные, водные экосистемы). Они рассматриваются как перспективные продуценты белка одноклеточных на дешевых одноуглеродных субстратах и используются в производстве кормовых добавок для животных. В природе роль метилотрофных бактерий чрезвычайно важна и обусловлена их участием в круговороте углерода: они конвертируют метан в CO_2, который возвращают в атмосферу.

Pseudomonas spp. и другие псевдомонады. Группа представлена прямыми или слегка изогнутыми одиночными палочками (см. рис. 1.17, *а* на с. 43), аэробами, запасающими энергию в ходе дыхания, хемоорганотрофами, способными к движению с помощью полярных жгутиков (большинство – лофотрихи). Многие представители окрашены, обычно за счет флуоресцирующих и желтых пигментов. Отдельные виды *Pseudomonas* могут использовать в качестве доноров электронов молекулярный водород. Типовыми родами являются: *Pseudomonas*, *Commamonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, в этой группе также *Xanthomonas*, *Zoogloea* и др.

Данные бактерии широко распространены в почвенных, водных экосистемах, а также являются обычными обитателями активного ила аэротенков. Псевдомонады обладают следующей особенностью, которая заключается в способности деградировать широкий круг природных и синтетических субстратов (в том числе токсичных для человека и животных), не утилизируемых другими микроорганизмами. Многие виды утилизируют в качестве источников углерода и энергии до 100 разных соединений (углеводов, жирных, дикарбоновых и трикарбоновых кислот, одноатомных и многоатомных спиртов, ароматических соединений, аминокислот, аминов и др.) и лишь немногие – менее 20. Данное свойство *Pseudomonas* spp. используется при рекультивации почв и борьбе с разливами нефтепродуктов в водоемах. В то же время псевдомонады обычно не имеют гидролитических ферментов, необходимых для расщепления полимеров.

Бактерии *P. syringae* характеризуются весьма необычным свойством – облегчают образование кристаллов льда. Это, с одной стороны, может вызывать болезни растений, а с другой – находит применение на практике в процессах формирования снега на лыжных трассах. Внесение этих бактерий в снегообразующие устройства позволяет повысить температуру замерзания воды, а значит, сэкономить энергию, которая расходуется на процесс охлаждения.

Среди псевдомонад встречаются патогены человека, животных и растений. В частности, *P. aeruginosa* может приводить к абсцессам,

воспалению среднего уха, мочеполовых путей, *Burkholderia cepacia* вызывает циститы. Фитопатогенные виды встречаются в составе родов *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*. Многие псевдомонады продуцируют применяемые в народном хозяйстве капсульные полисахариды – альгинаты, гелланы, ксантаны и др.

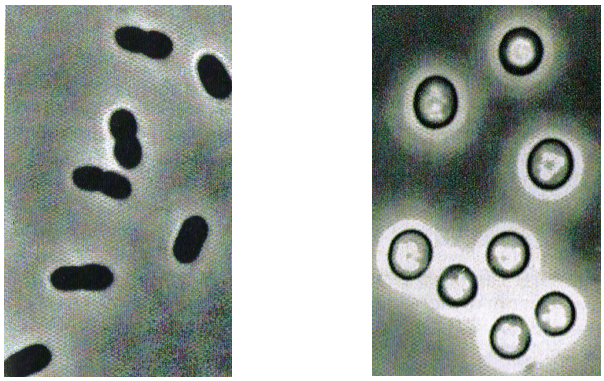
Филогенетически близки к псевдомонадам бактерии рода *Zymomonas*, которые хоть и являются строго ферментирующими (сбраживают глюкозу в этанол), но так же, как и псевдомонады, катаболизируют углеводы по пути Энтнера – Дудорова. Это крупные короткие палочки, микроаэрофилы. Во многих странах Южной и Центральной Америки, Африки, Азии зимомонады используются в качестве основных продуцентов этанола так же, как в странах Северного полушария и в Европе эту роль выполняют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Уксуснокислые бактерии. Это аэробные бактерии, различающиеся по морфологии и биохимии. Их объединяет способность к неполным окислениям, в частности, бактерии родов *Gluconobacter* и *Acetobacter* окисляют этанол до уксусной кислоты, что используется в производстве уксуса. Они могут также окислять ряд других субстратов, в частности, *Gluconobacter oxydans* окисляет сорбитол в сорбозу. Эта реакция служит одним из этапов производства аскорбиновой кислоты. Различия между представителями названных родов состоят в том, что *Gluconobacter* spp. имеют полярно расположенные жгутики и не содержат ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), из-за чего не способны окислять ацетат до CO_2; а клетки *Acetobacter* spp. являются перитрихами и обладают полным ЦТК, что позволяет им окислять ацетат до углекислоты.

Уксуснокислые бактерии способны синтезировать целлюлозу, которая формирует матрикс снаружи их клеточных стенок. Микрофибриллы целлюлозы помогают клеткам всплывать на поверхность жидкости, где самая высокая концентрация O_2, необходимого уксуснокислым бактериям для дыхания.

Азотфиксирующие бактерии. Данная группа объединяет свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов. Типичными представителями свободноживущих фиксаторов азота являются облигатно-аэробные бактерии родов *Azotobacter* (рис. 4.4), *Azomonas* и *Beijerinckia*. Это крупные (шириной 1,5–4,5 мкм) прямые или слегка изогнутые палочки, для *Azotobacter* характерен плеоморфизм. Неспорообразующие, но способные формировать цисты (эти покоящиеся формы характеризуются едва уловимым уровнем дыхательной активности, устойчивы к высушиванию, механической дезинтеграции, ультрафиолету и иони-

зирующей радиации, но отличаются от эндоспор невысокой устойчивостью к повышенной температуре). Многие обладают капсулами. Подвижные виды характеризуются перитрихальным жгутикованием. Азотобактерии являются активными несимбиотическими фиксаторами N_2 и используются для обогащения почв связанными формами азота. *Azotobacter chroococcum* – первый вид, для которого выявлена способность фиксировать молекулярный азот в отсутствие молибдена: в таких условиях функционируют две «альтернативные нитрогеназы», содержащие вместо молибдена ванадий и железо. Позже подобные ферменты обнаружили и у других прокариот, в том числе у архебактерий.



а *б*

Рис. 4.4. *Azotobacter vinelandii*:
а – вегетативные клетки (2 мкм в диаметре);
б – цисты (диаметром 3 мкм)

Представители родов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* являются симбиотическими азотфиксаторами. Они инфицируют бобовые растения и вызывают у них формирование специфических корневых опухолей – **клубеньков**. В клубеньках в тесных симбиотических отношениях с растениями бактерии осуществляют фиксацию N_2, поэтому их называют **клубеньковыми бактериями**. Показано, что наибольшее количество азота из воздуха фиксируют бактерии рода *Rhizobium*. В свободном состоянии эти бактерии имеют палочковидную форму, а в клубеньках они увеличиваются в размерах и приобретают неправильную форму, названную **бактероидами** (рис. 4.5).

Еще один род данного семейства – *Agrobacterium* (рис. 4.6) – также характеризуется способностью вызывать опухоли растений (**корончатые галлы**), но эти бактерии не в состоянии фиксировать молекулярный азот. Индукция опухолей агробактериями детерминируется содержащейся в их клетках крупной плазмидой (**Ti-плазмида**). Ti-плазмида широко используется в генетической инженерии как репликон,

служащий основой для создания клонирующих векторов для растений. Заболевания растений, индуцируемые бактериями рода *Agrobacterium*, наносят большой ущерб сельскому хозяйству.

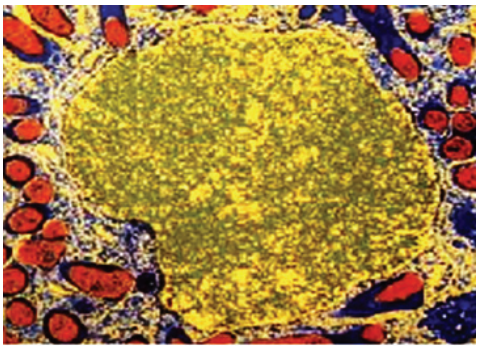


Рис. 4.5. Бактероид *Rhizobium* sp. в тканях клубенька

Рис. 4.6. Бактерии *Agrobacterium* sp. на корневом волоске

Другие грамотрицательные аэробные палочки. Среди отдельных представителей данной группы значение для биотехнологии имеют бактерии вида *Zoogloea* – толстые палочки с закругленными концами, подвижные за счет полярного жгутика, формирующие капсулы. При росте в жидкой среде клетки окружаются гелеобразным матриксом и образуют **зооглеи** – структуры с характерной «древовидной» или «пальцевидной» морфологией (рис. 4.7). Эти бактерии являются обязательными компонентами активного ила в аэротенках и участвуют в разложении органики на всех стадиях аэробной очистки сточных вод.

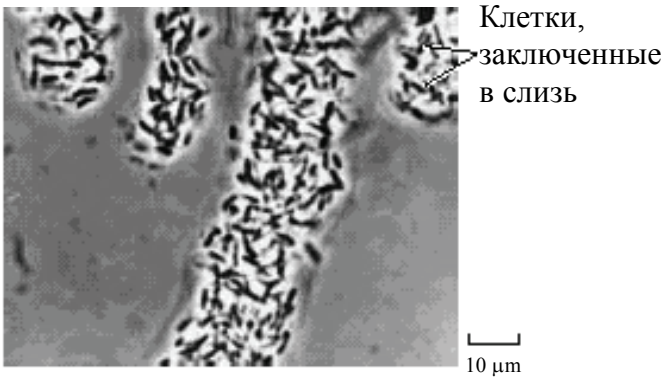


Рис. 4.7. Зооглеи

Факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки. Эта группа объединяет грамотрицательные факультативно-анаэробные бактерии, бóльшая часть которых палочковидные, за исключением

представителей рода *Vibrio*, для которых характерна изогнутая или вибриоидная форма. Среди бактерий данной группы встречаются как свободноживущие формы, так и обитающие в ассоциациях с животными и растениями. Наиболее важным семейством группы является Enterobacteriaceae.

Многие представители семейства Enterobacteriaceae обитают в кишечнике (enteron) человека и животных, отсюда происходит название семейства. Энтеробактерии представляют собой прямые палочки небольшого размера, подвижные (перитрихи) или неподвижные; метаболизм дыхательный и бродильный (муравьинокислое брожение), способны переключаться с брожения на дыхание; распространены повсеместно. Встречаются патогены человека и животных: *Salmonella* – возбудители брюшного тифа и гастроэнтеритов, *Shigella dysenteriae* – возбудитель дизентерии, *Klebsiella pneumonia* – возбудитель пневмонии, а также фитопатогенные виды (представители рода *Erwinia*).

Наиболее типичным родом этого семейства является *Escherichia*, а видом – *Escherichia coli* (рис. 4.8). Это наиболее изученные на сегодняшний день с физиологической, биохимической и генетической точек зрения бактерии. Кишечная палочка является нормальным обитателем кишечника человека и животных, выполняя там важные функции: синтез витамина К и потребление O_2, что обеспечивает анаэробиоз другим обитателям кишечника. Однако есть и патогенные штаммы *E. coli*, вызывающие желудочно-кишечные заболевания, инфекции мочеполовых путей, менингиты. Бактерии *E. coli* нетребовательны к питательным средам и легко культивируются в лабораторных условиях. Особенностью бактерий этой группы является редкая среди дышащих бактерий способность сбраживать лактозу. Перечисленные свойства *E. coli* позволяют использовать данный вид в качестве санитарно-показательного для определения качества воды и продуктов.

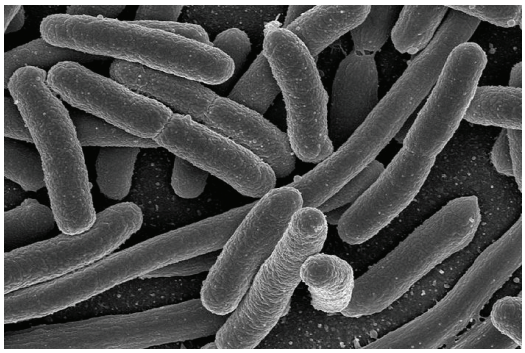


Рис. 4.8. Клетки *Escherichia coli*

К числу энтеробактерий относятся также представители родов *Enterobacter* (почвенные бактерии, отличаются от *E. coli* только особенностью брожения); *Proteus* (представитель нормальной кишечной биоты, на агаризованных средах характеризуется пленочным ростом); *Serratia* (чудесная палочка – продуцент красного пигмента продигиозина, штаммы *S. marcescens* с нарушенной регуляцией являются продуцентами аминокислот).

Среди бактерий данной группы, не относящихся к семейству Enterobacteriaceae, стоит упомянуть семейство Vibrionaceae, содержащее роды *Vibrio*, *Allivibrio*, *Photobacterium*, все представители которого способны к свечению (**биолюминесценции**), включая *Vibrio cholera* – возбудителя холеры. Это палочки или искривленные палочки (см. рис. 1.17, *в* на с. 43). Названные бактерии являются факультативными анаэробами, но биолюминесценцию осуществляют только в присутствии O_2, который необходим для окисления $FMNH_2$ под действием люциферазы. Биолюминесценция регулируется с помощью необычного механизма *Quorum-sensing*, в котором уровень экспрессии генов зависит от численности микробной популяции.

Бактерии, обладающие чехлом. Эти бактерии имеют палочковидную или дисковидную форму и образуют скопления в виде длинных цепочек, окруженных общим чехлом. Поэтому их называют хламидобактериями (рис. 4.9). Некоторые представители, как, например, *Leptothrix discophora*, осаждают окислы металлов (железа или марганца) в чехле или на его поверхности (рис. 4.9, *б*). Аэробы и хемогетеротрофы. Обитают в водных экосистемах, очистных сооружениях.

а *б*

Рис. 4.9. Хламидобактерии:
а – клетки *Sphaerotilus natans* в чехле;
б – клетки *Leptothrix* sp. в чехле,
инкрустированном окислами железа

Слизистые чехлы помогают клеткам прикрепляться к субстрату и аккумулировать питательные вещества, а также выполняют защитную функцию, особенно если пропитываются окислами металлов.

Одним из видов наиболее распространенных хламидобактерий является *Sphaerotilus natans* (рис. 4.9, *а*), который обитает в водоочистных сооружениях, богатых органикой водоемах. При бурном размножении эти бактерии забивают коммуникации, нанося ощутимый ущерб.

§ 4.2. Грамотрицательные эубактерии других филогенетических ветвей

Цианобактерии. Данная филогенетическая ветвь представляет собой самую обширную и разнообразную группу фотосинтезирующих бактерий, насчитывающую более 1000 видов. Их клетки имеют ряд признаков, позволяющих считать цианобактерии переходным звеном между прокариотами и микроводорослями. Строение клеточной стенки, отсутствие истинного ядра и органелл, 70S-рибосомы дают основание рассматривать их в числе прокариот, однако колониальный образ жизни многих цианобактерий, наличие фикобилинов (присущи красным водорослям), отсутствие жгутиков и соответствующего типа движения, оксигенный фотосинтез сближают их с водорослями, что в свое время определило их устаревшее название «сине-зеленые водоросли».

Среди цианобактерий есть одноклеточные, колониальные и нитчатые формы, последние иногда образуют многоядерные структуры в виде сложных многоклеточных талломов. Неподвижны или движутся за счет скольжения. Можно выделить пять основных групп цианобактерий:

1) одноклеточные (палочки или кокки), размножающиеся бинарным делением (*Gloeothece*, *Gloeobacter*, *Synechoccus*, *Synechocystis*);

2) одноклеточные с множественным делением, сопровождающимся образованием сферических мелких клеток, называемых **беоцитами** (колониальные) (*Xenococcus*, *Dermocarpa*);

3) нитчатые, образующие гетероцисты, в которых происходит фиксация азота (*Oscillatoria*, *Spirulina*);

4) нитчатые, не образующие гетероцист, формирующие нитчатые структуры (**трихомы**), состоящие только из вегетативных клеток (*Nostoc*, *Anabaena*);

5) ветвящиеся нитчатые формы (*Fischerella*, *Stigonema*).

На рис. 4.10 приведены микрофотографии представителей каждой из перечисленных групп.

а *б* *в* *г* *д*

Рис. 4.10. Цианобактерии:
а – одноклеточная *Gloeothece* sp.; *б* – колониальная *Dermocarpa* sp.;
в – нитчатая с гетероцистами *Oscillatoria* sp.; *г* – нитчатая *Anabaena* sp.;
д – ветвящаяся нитчатая *Fischerella* sp.

Цианобактерии, способные к фиксации N_2, играют важную роль в экологии как организмы, которые могут благодаря толерантности к экстремальным условиям среды заселять экстремальные экологические ниши и обусловливают накопление в них органики (вещество клеток), необходимой гетеротрофам. Цианобактерии находят в горячих источниках, соленых озерах, на поверхности скал и даже внутри скальных пород. Среди цианобактерий много термофильных и ацидофильных видов, есть симбионты печеночников, папоротников, цикад; многие цианобактерии участвуют в формировании лишайников. Отдельные цианобактерии продуцируют токсины и вызывают отравление животных во время своего бурного развития при цветении водоемов.

Интересной особенностью цианобактерий является способность накапливать в клетках в качестве запасного вещества полимер аминокислот аспартата и аргинина, названный цианофицином. В отдельных случаях он может составлять до 10% массы клетки. В этом полимере аспарагиновая кислота выполняет роль источника азота, а аргинин – источника углерода и энергии. При расщеплении аргинина с помощью особой аргинин-дегидролазы происходит запасание АТР:

$$\text{Аргинин} + \text{ADP} + H_3PO_4 + H_2O \rightarrow \text{Орнитин} + 2NH_3 + CO_2 + \text{ATP}.$$

В клетках цианобактерий в качестве фотосинтетических пигментов присутствуют хлорофилл *a* и фикобилины – это основное их отличие от близкородственной группы фототрофных бактерий – прохлорофитов.

Прохлорофиты. В клетках этих бактерий имеются хлорофиллы *b* и *a*, фикобилины отсутствуют. Типовыми родами прохлорофитов являются: *Prochloron* (одноклеточные сферические организмы без выраженного слизистого чехла, внеклеточные симбионты в ассоциациях с колониальными асцидиями); *Prochlorothrix* (нитчатые организмы с неразветвленными трихомами неопределенной длины, содержащими цилиндрические клетки, свободноживущие); *Prochlorococcus* (одноклеточные,

обитающие в достаточно освещенных зонах океана; возможно, наименьший фотосинтетический организм на Земле: диаметр клеток составляет 0,5–0,8 мкм). Содержание прохлорофитов, особенно бактерий *Prochlorococcus*, в океанах очень велико (достигает 10^5 в 1 мл), что делает эти организмы весьма важными первичными продуцентами.

Цитофаги. В составе данной филогенетической ветви присутствуют бактерии родов *Cytophaga*, *Rhodothermus*, *Salinibacter*, *Flexibacter*. Их клетки представлены палочками разной длины, часто ярко окрашенными в желтый, оранжевый, красный цвет. Это облигатные аэробы или факультативные анаэробы с метаболизмом дыхательного или бродильного типа, способные к скользящему движению. Все представители разлагают один или несколько видов органических полимеров (белков, целлюлозы, агара, хитина, пектина, крахмала), поэтому играют важную роль в экологии в качестве редуцентов. Бактерии рода *Cytophaga* продуцируют нерастворимые целлюлазы, связанные с клеточной стенкой, что объясняет способность цитофаг прочно прикрепляться к волокнам целлюлозы и разлагать ее.

Многие представители этой ветви являются экстремофилами. Например, виды *Salinibacter* – экстремальные галофилы, превосходящие по галофильности и галотолерантности все известные эубактерии и сопоставимые с галофильными архебактериями. Обитают в солеварнях, как и галобактерии, используют для поддержания водного баланса клетки ионы калия, в то время как другие эубактерии утилизируют для этого органические соединения. С галобактериями их сближает также способность использовать аминокислоты в качестве доноров электронов. Такое физиолого-биохимическое сходство далеко отстоящих в филогенетическом плане эубактерий и архебактерий является примером конвергентной эволюции, когда у неродственных организмов признаки изменялись сходным образом под действием уникальных условий в экстремальных местообитаниях.

Зеленые серные бактерии. В данной ветви собраны роды *Chlorobium*, *Chlorobaculum*, *«Chlorochromatium»*, *Prosthecochloris*, осуществляющие аноксигенный фотосинтез. В качестве доноров электронов они используют восстановленные соединения серы, а элементарную серу, которая является продуктом их окисления, накапливают снаружи клеток, в отличие от пурпурных бактерий. В клетках зеленых несерных бактерий много хлоросом, которые заполнены вспомогательными фотосинтетическими пигментами, а главный пигмент – хлорофилл *a* находится в плазматической мембране. Эти бактерии очень эффективно улавливают световую энергию, что позволяет им осуществлять

фотосинтез в сильно затененных местах водоемов, где отсутствует O_2 и много H_2S. Они облигатные анаэробы.

Представители данной ветви часто формируют тесные симбиотические ассоциации с хемоорганогетеротрофами. Самым распространенным примером является консорциум *«Chlorochromatium aggregatum»* (это название берется в кавычки, поскольку не имеет формального таксономического значения, так как обозначает два разных организма), состоящий из центральной хемоорганотрофной клетки, окруженной 12 клетками зеленых серных бактерий. В таком консорциуме хемоорганотрофная центральная клетка использует органику, выделяемую фотоавтотрофными зелеными бактериями, которые, в свою очередь, будучи неподвижными, получают выгоду от взаимодействия с подвижной центральной клеткой, приобретая возможность перемещаться в зоны водоема с оптимальным освещением и концентрацией сероводорода.

§ 4.3. Грамположительные эубактерии

Грамположительные бактерии представляют большую и разнообразную группу эубактерий. Ранее их делили на две подгруппы в соответствии с относительным содержанием GC-пар в ДНК (менее 50% – низкое содержание; более 50% – высокое содержание, характерное для актинобактерий). В настоящее время этим признаком пользуются реже, поскольку более информативным для филогении является сиквенс-анализ. Все же, однако, приведенные различия остаются напоминанием о существенных филогенетических различиях между актинобактериями и остальными грамположительными бактериями.

Клетки грамположительных бактерий могут иметь сферическую, палочковидную форму или формировать нити. Есть ветвящиеся формы. Размножение у большинства представителей осуществляется бинарным делением, у актиномицетов – бесполыми спорами и фрагментацией мицелия. Некоторые представители образуют покоящиеся формы – эндоспоры или споры на гифах. Запасают энергию в ходе дыхания или брожения, один вид осуществляет фотосинтез. Встречаются все типы по отношению к молекулярному кислороду.

Грамположительные бактерии, образующие эндоспоры. Эта группа объединяет палочки и кокки, способные к образованию эндоспор (роды *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* и др.). Большинство представителей подвижны за счет перитрихального жгутикования. Почти все окрашиваются

по Граму положительно, кроме бактерий рода *Desulfotomaculum*, которые имеют клеточную стенку грамположительного типа, но окрашиваются отрицательно.

Наиболее важные представители – роды *Bacillus*, *Paenibacillus* (строгие аэробы и факультативные анаэробы) и *Clostridium* (облигатные анаэробы). Представители этих родов широко распространены в окружающей среде, и их присутствие следует учитывать при стерилизации пищевых продуктов и сред, так как они образуют терморезистентные эндоспоры. Бактерии рода *Bacillus* широко используются в биотехнологии как продуценты внеклеточных ферментов, полипептидных антибиотиков, средств биологической борьбы с насекомыми. В частности, бациллы синтезируют антибиотики: бацитрацин, полимиксин, тироцидин, грамицидин, циркулин. *P. popilliae* и *B. thuringiensis* продуцируют ларвициды, вызывающие заболевания личинок насекомых. Оба этих вида бацилл образуют кристаллизующийся белок в процессе споруляции (параспоровое тельце), который оказывается токсичным для личинок. Белок *B. thuringiensis* (Bt-токсин) в организме личинки модифицируется и вызывает «протекание» плазматических мембран клеток кишечника. Гены, кодирующие Bt-токсин, клонированы в растениях, которые приобрели устойчивость к чувствительным к Bt-токсину насекомым.

Среди спорообразующих палочек есть патогенные виды: *Bacillus anthracis* – возбудитель сибирской язвы, *Clostridium perfringens* – возбудитель газовой гангрены, *C. tetani* – возбудитель столбняка. *C. botulinum*, развиваясь на богатых белком продуктах, продуцирует ботулинистический токсин и вызывает тяжелые формы пищевого отравления.

Описан только один род спорообразующих кокков – *Sporosarcina*. Их сферические или овальные клетки (в виде диплококков или тетрад) способны к движению за счет немногочисленных жгутиков и могут содержать сферические эндоспоры. Эти облигатные аэробы широко распространены в почве, их легко выделить на щелочной среде, содержащей 8% мочевины. Остальные бактерии погибают уже при 2% мочевины в среде, а бактерии *Sporosarcina ureae* активно расщепляют мочевину на углекислоту и аммиак и сохраняют жизнеспособность при повышении pH до 10.

Среди грамположительных спорообразующих бактерий найдены необычные представители, способные осуществлять аноксигенный фотосинтез (гелиобактерии). Известны четыре рода этих бактерий: *Heliobacterium*, *Heliophilum*, *Heliorestis*, *Heliobacillus*. Все они представлены палочковидными клетками, часто имеющими суженные

окончания, строгими анаэробами. Бактерии рода *Heliophilum* образуют пучки клеток, которые движутся вместе, как одна единица. По типу питания гелиобактерии относятся к фотогетеротрофам и напоминают пурпурные несерные бактерии. Эндоспоры гелиобактерий термостойкие за счет содержащихся в них дипиколиновой кислоты и ионов кальция. Эти бактерии содержат необычный хлорофилл *g*, не обнаруженный у каких-либо других организмов. Фиксируют молекулярный азот. Встречаются в щелочных озерах и почвах.

Актинобактерии, образующие филаменты. Представителей этой группы объединяет способность образовывать нитевидные ветвящиеся клетки, или гифы, совокупность которых называется **мицелием** (рис. 4.11). Гифы актиномицетов имеют диаметр до 2 мкм и все признаки прокариотических клеток. Мицелий может быть субстратным и воздушным.

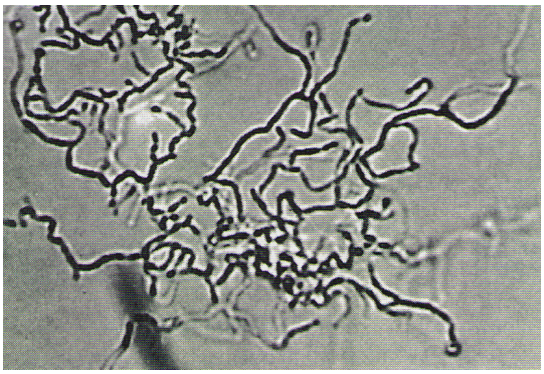


Рис. 4.11. Формирующаяся колония актиномицетов рода *Nocardia*. Диаметр филаментов 0,8–1,0 мкм

Большинство актиномицетов формирует споры, причем способ их образования сильно различается и служит признаком, разграничивающим подгруппы. В совокупности филаментообразующие актиномицеты – тесная (состоит из близкородственных таксонов) филогенетическая группа, так что способность к мицелий- и спорообразованию имеет одновременно и филогенетическое и таксономическое значение. Наиболее значимым родом является *Streptomyces*, в котором содержится более 500 видов. Стрептомицеты характеризуются способностью формировать развитый воздушный мицелий со спороносцами, на которых образуются конидии (рис. 4.12). Конидии сильно отличаются от эндоспор других бактерий, поскольку они образуются в ходе фрагментации филаментов на отдельные клетки. Это одни из самых распространенных продуцентов антибиотиков (~75% используемых в настоящее время антибиотиков получают с помощью стрептомицетов).

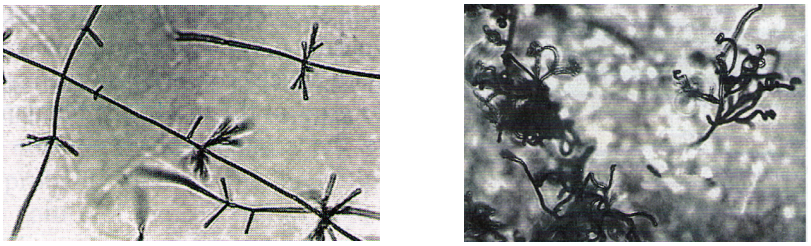


Рис. 4.12. Конидии стрептомицетов разного типа

В числе широко известных антибиотиков можно назвать аминогликозиды: стрептомицин (продуцент *Streptomyces griseus*), спектиномицин (*Streptomyces* spp.), неомицин (*S. fradiae*); тетрациклин и хлортетрациклин (продуценты *S. aureofaciens*), макролиды: эритромицин (*Saccharopolyspora erythraea*), клиндамицин (*S. lincolnensis*); полиены: нистатин (*S. noursei*), амфотерацин В (*S. nodosus*); хлорамфеникол (образуется *S. venezuelae*).

Еще одним ценным для биотехнологии родом стрептомицетов является *Nocardia*. Нокардиоформные бактерии образуют нити, распадающиеся на более короткие неподвижные клетки. Некоторые формируют воздушный мицелий. Аэробы. Часто пигментированы. *Nocardia mediterranei* синтезирует около 20 разных **рифамицинов** – предшественников антибиотиков, в частности **рифампицин**, который используется при лечении туберкулеза, проказы.

Представители рода *Thermoactinomyces* образуют термостойкие споры благодаря высокому содержанию в их оболочках дипиколиновой кислоты. *Thermoactinomyces vulgaris* относится к термофильным бактериям и, участвуя в процессах компостирования растительных отходов, обусловливает их саморазогревание.

Стрептомицеты – это строгие аэробы. Их конидии часто бывают пигментированными, что придает колониям определенную окраску. Кроме того, на зрелых колониях часто образуется порошкообразный налет, при этом они отличаются компактностью, что позволяет легко идентифицировать стрептомицеты на плотной среде.

Стрептомицеты широко распространены в природе, и их экологическое значение состоит в разложении органики в почве, в том числе таких труднодеградируемых веществ, как целлюлоза и хитин. Запах почвы обусловлен сесквитерпеноидами – геосминами, продуцируемыми стрептомицетами. Наряду с другими актиномицетами эти бактерии принимают активное участие в процессах компостирования растительных отходов, эти бактерии утилизируют широкий круг органических веществ (один изолят способен расщеплять более 50 различных источников углерода). Род *Frankia* содержит бактерии, которые в симбиозе с небобовыми растениями осуществляют фиксацию молекулярного азота.

Глава 5

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ДОМЕНА ARCHAEA

Как отмечалось ранее, архебактерии составляют обособленную группу прокариот, которая имеет статус домена (надцарства), и отличаются от эубактерий и эукариот генетическими и фенотипическими признаками (см. таблицу на с. 60–61).

Можно видеть, что домен Архебактерии разделяется на две основные филогенетические ветви: Crenarchaeota и Euryarchaeota (рис. 5.1). Это разделение подтверждается результатами секвенирования целых геномов.

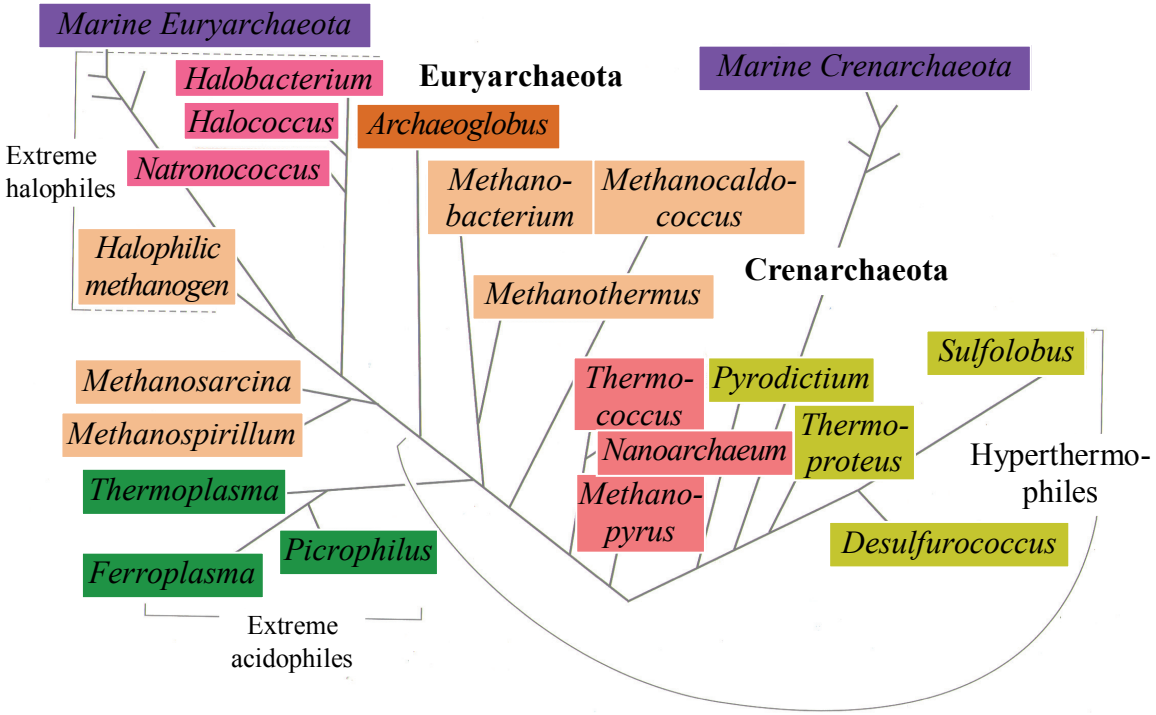


Рис. 5.1. Филогенетическое древо домена Archaea (Архебактерии), основанное на данных сиквенс-анализа генов 16S-рРНК

Представители Crenarchaeota в большинстве своем относятся к гипертермофилам, чей температурный оптимум роста превышает 80°С. Многие из них являются хемолитоавтотрофами, они заселяют экстремальные местообитания и, поскольку фототрофные прокариоты при такой температуре обычно не выживают, остаются в этих экологических нишах практически единственными первичными продуцентами. Согласно распространенной точке зрения, именно эти прокариоты были первыми формами жизни на нашей планете.

Euryarchaeota является филогенетически разнородной ветвью. Здесь объединены метаногенные, галофильные, гипертермофильные, не содержащие клеточных стенок бактерии. Ветвь Euryarchaeota, как и Crenarchaeota, содержит большое число некультивируемых видов.

§ 5.1. Физиолого-биохимические особенности архебактерий

Основными отличительными характеристиками архебактерий являются:

– нуклеотидные последовательности рРНК сильно отличаются от соответствующих последовательностей эубактерий и эукариот;

– в состав клеточных стенок архебактерий не входит муреин, поэтому они устойчивы к антибиотикам, нарушающим процесс синтеза клеточной стенки;

– липиды плазматической мембраны не содержат жирных кислот и представлены простыми эфирами глицерола и спиртов с длинными алифатическими цепями;

– некоторые гены тРНК содержат, как и ДНК эукариот, **интроны**;

– ДНК-зависимые РНК-полимеразы (ферменты, катализирующие синтез мРНК) отличаются по строению от подобных ферментов эубактерий и нечувствительны к антибиотикам рифампицину, стрептолидигину;

– аппарат синтеза белка отличается некоторыми особенностями, и данный процесс нечувствителен к хлорамфениколу, в отличие от эубактерий, но чувствителен к дифтерийному токсину, как и у эукариот;

– в клетках архебактерий содержатся уникальные кофакторы, не характерные для других организмов.

Результаты окрашивания архебактерий по Граму могут быть положительными или отрицательными, поскольку типы клеточных стенок

сильно различаются. У грамположительных видов клеточные стенки состоят из псевдомуреина и других полисахаридов, а грамотрицательные клетки в качестве поверхностных слоев содержат протеины или гликопротеины.

Среди архебактерий встречаются представители с самой разной формой клеток. Размножение происходит путем бинарного деления, почкования, фрагментации. Колонии бывают пигментированы. Эти бактерии часто заселяют экстремальные экологические ниши.

§ 5.2. Euryarchaeota

Экстремально галофильные архебактерии. В этой группе собраны экстремально галофильные аэробы. Свое название они получили благодаря уникальному свойству – облигатной **галофилии** (способности расти только в средах, содержащих не менее 1,5 М NaCl). Для большинства из них оптимальная концентрация NaCl составляет 2–4 М. Все представители способны расти при содержании 5,5 М NaCl, что является пределом насыщения растворов этой соли. Чтобы поддерживать водный баланс в сильно гипертонических средах, галобактерии перекачивают в клетку ионы калия. Некоторые представители (*Natrobacterium*, *Natrococcus*) являются к тому же **алкалофилами**, растущими только при pH 9–11, другие (*Halobacterium*, *Halococcus*) предпочитают нейтральные значения pH. Еще одной уникальной способностью некоторых видов галобактерий является необычный способ запасания энергии – движимый светом синтез АТР, в котором принимают участие не хлорофиллы, а бактериородопсин (белок, очень напоминающий по структуре фоторецептор глаза). Например, в условиях слабой аэрации бактерии *Halobacterium solinarum* синтезируют белок бактериородопсин и встраивают его в плазматическую мембрану; при поглощении кванта света ретиналь в составе бактериородопсина изомеризуется, что обусловливает перенос протона через мембрану; в результате на внутренней поверхности мембраны создается протонный градиент, чья энергия расходуется на синтез АТР. Стимулируемый светом протонный насос также обеспечивает перенос ионов: Na^+ – наружу клетки, K^+ – внутрь. У галобактерий имеются и дополнительные, движимые светом родопсины, обеспечивающие перенос через мембрану ионов хлора и фототаксис.

Наличие в клетках галобактерий бактериородопсина и каротиноидов делает их ярко окрашенными (пурпурные, красные, розовые,

оранжевые тона). Это аэробы и гетеротрофы. Заселяют экосистемы с экстремально высоким содержанием хлористого натрия: солеварни, Мертвое море, соленые озера, встречаются также в засоленных пищевых продуктах.

Большинство галобактерий являются грамотрицательными, размножаются бинарным делением, не образуют покоящихся форм, неподвижны. Лишь несколько штаммов способны передвигаться с помощью жгутиков. Среди экстремально галофильных архебактерий часто встречаются штаммы с необычной формой клеток, в частности в виде параллелепипедов (рис. 5.2).

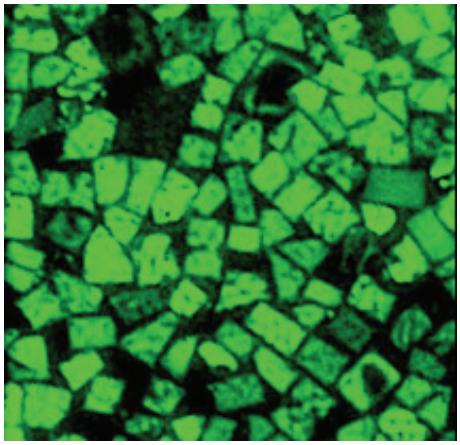
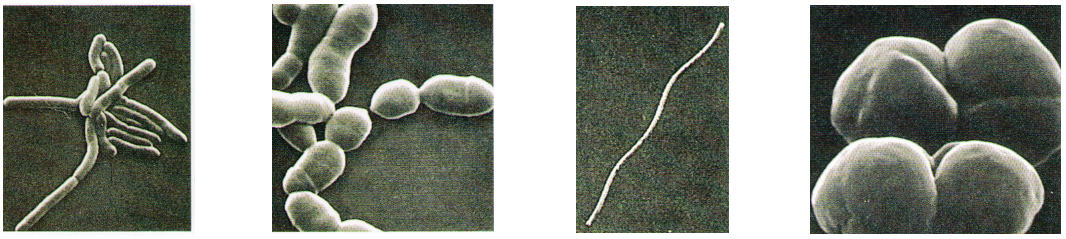


Рис. 5.2. Клетки *Haloqadratum walsbyi* из Австралийского соленого озера

Метаногены. Процесс образования метана носит название метаногенеза, а осуществляющие его архебактерии называются метаногенами. Это строго анаэробные архебактерии, способные образовывать метан как основной конечный продукт катаболизма. При этом донором электронов выступает H_2 или определенные органические вещества (формиат, ацетат, метанол, метиламин и др.). Первостепенное значение среди этого круга веществ в метаногенезе имеет ацетат: более 75% метана, образующегося в природе, происходит из ацетата. В качестве основного акцептора электронов метаногенные архебактерии используют CO_2. Все реакции конверсии субстратов в метан являются экзотермическими, энергия, выделяющаяся при этом, расходуется на создание протонного градиента на плазматической мембране, который запускает синтез АТР (окислительное фосфорилирование). В метаболизме метаногенов принимают участие необычные кофакторы: кофермент М, фактор 420, фактор 430, метаноптерин.

Форма клеток метаногенов очень разнообразна и положена в основу разграничения пяти порядков этих архебактерий (рис. 5.3). Она может быть представлена длинными и короткими палочками (*Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*), крупными кокками, собранными в пакетики (*Methanosarcina*), одиночными или формирующими скопления неправильной формы кокками (*Methanococcus*), симметрично изогнутыми палочками в форме α-спирали (*Methanospirillum*) и др.



а *б* *в* *г*

Рис. 5.3. Метаногенные архебактерии:
а – Methanobrevibacter ruminantium;
б – Methanobrevibacter arboriphilus;
в – Methanospirillum hungatei;
г – Methanosarcina barkeri

Метаногены – это свободноживущие формы, обитающие обычно в ассоциациях с другими бактериями, которые выделяют в ходе метаболизма водород, углекислоту, органические кислоты. Данные ассоциации очень важны для процессов, происходящих в желудках жвачных животных, таких как коровы, которые, кстати, считаются основными источниками метана, поступающего в атмосферу. Метаногенез характерен для илистых почв, болот, лиманов, отстойников очистных сооружений. Образующийся при анаэробной переработке органических отходов биогаз (смесь метана и углекислоты) широко используется в хозяйствах как источник дешевого топлива. Существуют и промышленные установки (метантенки) для получения биогаза.

Термоплазмы. Это микоплазмоподобные архебактерии, чьи клетки либо вовсе не имеют клеточной стенки, либо содержат S-слои. Обитают в отвалах каменного угля, запасают энергию в ходе «серного» дыхания, а в качестве доноров электронов используют органику или сероводород. Крайние ацидофилы (растут при pH 2) и термофилы (температурный оптимум 55°C). У термоплазм необычная плазматическая мембрана, содержащая липогликаны и гликопротеины, но не содержащая стеролы; такое строение делает мембрану устойчивой к

кислой реакции среды в совокупности с высокой температурой. Очень маленькая по размеру геномная ДНК связана с белками, которые организуют ее в глобулярные частицы, похожие на нуклеосомы эукариот. Некоторые виды способны расти при pH 0, например, оптимум pH для архебактерий *Picrophilus* spp. составляет 0,7.

Thermococcales и Methanopyrus. Эти архебактерии представлены несколькими ответвлениями филогенетической ветви Euryarchaeota, расположенными у самого ее основания. Они заселяют термальные местообитания и являются гипертермофилами. Два рода (*Thermococcus* и *Pyrococcus*) очень близки по свойствам к гипертермофильным представителям ветви Crenarchaeota и организуют один порядок Thermococcales. Температурный оптимум роста видов *Pyrococcus* составляет 100°C, а максимум – 106°C. Третий род (*Methanopyrus*) представлен метаногенами, весьма схожими с описанными выше, но отличается от них гипертермофилией. Эти архебактерии выделены из стенок «черных курильщиков», их температурный максимум составляет 110°C! В плазматической мембране *Methanopyrus* spp. обнаружены уникальные липиды, представленные ненасыщенными формами дифитанилтетраэфиров.

Archaeoglobales. В этом порядке архебактерий обращает на себя внимание род *Archaeoglobus*, представители которого окисляют молекулярный водород и способны восстанавливать до сероводорода сульфаты, сульфиды, тиосульфат. Клеточная стенка этих бактерий состоит из белка, и результат окраски по Граму отрицательный. Форма клеток кокковидная или треугольная. Строгие анаэробы, термофилы (диапазон температуры для роста 60–95°C), предпочитают соленые растворы (диапазон солености 0,9–3,6%). Заселяют глубоководные морские гидротермальные экосистемы. Образуют небольшие количества метана, однако в геноме не содержатся гены, кодирующие ключевой фермент метаногенеза – метил-CoM-редуктазу. Вопрос о механизме метаногенеза этих архебактерий пока остается открытым.

Nanoarchaeum и Acidiprofundum. *Nanoarchaeum equitans* представляет вид очень необычных прокариот – это один из мельчайших среди известных клеточных организмов (его коккоидные клетки имеют диаметр 0,4 мкм) с одним из самых маленьких геномов (10,5% генома *E. coli*). Кроме того, эти архебактерии являются облигатными симбионтами представителя Crenarchaeota – *Ignicoccus* sp. и реплицируются только в прикрепленном к их клеткам состоянии. Температурный оптимум этой симбиотической ассоциации составляет 90°C. Метаболизм *Nanoarchaeum equitans* плохо изучен.

§ 5.3. Crenarchaeota

Представители филогенетической ветви Crenarchaeota заселяют экстремальные местообитания, характеризующиеся как очень высокими, так и чрезмерно низкими значениями температуры. Большинство кренархет являются гипертермофилами и могут расти при температуре, превышающей точку кипения воды. Их находят в наземных горячих источниках, а также в морских придонных источниках и в районах вблизи разломов земной коры на очень большой глубине (2000–4000 м), где за счет высокого гидростатического давления достигается самая большая температура.

Гипертермофилы из наземных вулканических местообитаний. Здесь температура может превышать 100°С. Архебактерии двух основных филогенетически родственных родов выделены из этих местообитаний: *Sulfolobus* и *Acidianus*. Виды *Sulfolobus* растут в термальных источниках, богатых серой, с температурой воды выше 90°С и при значении pH 1–5. Это аэробы, хемолитоавтотрофы, окисляющие сероводород до элементарной серы и сульфатов (акцептор электронов – O_2); способны также окислять ионы Fe^{+2} до Fe^{+3}, что может использоваться на практике при высокотемпературном процессе выщелачивания железа из руды. Форма клеток этих бактерий крайне неправильная (рис. 5.4).

Рис. 5.4. Клетка ацидофильных гипертермофильных архебактерий *Sulfolobus acidocaldarius*

Гипертермофилы из подводных вулканических местообитаний. Типичными обитателями этих зон являются роды *Pyrodictium* и *Pyrolobus*, для которых температурные оптимумы роста составляют 105 и 106°С соответственно. Архебактерии рода *Pyrodictium* имеют изменчивую форму клеток, растут прикрепляясь к кристаллам элементарной серы; образуют много фибриллярных белков, которые

используются для прикрепления к субстрату. Клеточная стенка состоит из гликопротеинов.

Клетки *Pyrolobus* spp. имеют блюдцевидную или дисковидную форму, их клеточные стенки состоят из белков; используют в качестве доноров электронов H_2, в роли акцепторов – нитраты, тиосульфат. Максимальная температура для роста составляет 113°С, сохраняют жизнеспособность при автоклавировании (121°С) в течение 1 ч! Эти бактерии выделены из стенок «черных курильщиков».

В данной группе находятся организмы, самые термофильные из числа известных, – архебактерии, получившие условное название «штамм 121». Их оптимум роста составляет 106°С, а максимум – 121°С. Клетки штамма 121 выживают даже при температурной обработке 130°С на протяжении 2 ч! Эти архебактерии выделены из гидротермальных источников северо-восточной части Тихого океана. Их клетки имеют кокковидную форму с пучком жгутиков (лофотрихи); строгие анаэробы; хемолитотрофы, окисляющие молекулярный водород и переносящие электроны на ионы Fe^{+3}.

В этой же группе находится род *Ignicoccus*, который, как упоминалось, составляет симбиотические ассоциации с наноархебактериями *Nanoarchaeum equitans*.

Нетермофильные Crenarchaeota. Клетки этих архебактерий находят в морской воде, в снегу, во льду буквально по всему свету. Это планктонные организмы, содержание которых часто достигает 10^4 в 1 мл. Особенностью их местообитаний является очень низкое содержание органики в воде, низкая температура (не превышающая +4°С, а иногда и меньше 0°С (во льду)). Данные архебактерии составляют до 40% прокариот глубоководных океанических местообитаний и играют главную роль в глобальном круговороте углерода. У некоторых из них обнаружена способность к нитрификации, что делает их активными участниками процессов круговорота азота.

§ 5.4. Способы адаптации архебактерий к высокой температуре

Приведенная в данной главе характеристика архебактерий дает возможность заключить, что эти прокариоты, как никакие другие, адаптированы к выживанию в экстремальных местообитаниях с гипервысокой температурой. Какие же особенности организации их клеток способствуют этому?

Во-первых, в клетках гипертермофилов присутствуют необычные белки, и есть факторы защиты белков от термической денатурации. Белки гипертермофилов содержат большее количество аминокислот, обеспечивающих формирование α-спиралей, что существенно стабилизирует молекулы. В молекулах ферментов гипертермофилов в их центральной части содержится особенно много аминокислот с незаряженными боковыми группами, за счет чего эта часть белка приобретает гидрофобные свойства и уменьшается его тенденция к анфолдингу в ионном окружении. На поверхности молекул глобулярных белков гипертермофилов, наоборот, сосредоточены аминокислоты с заряженными боковыми группами, что увеличивает количество ионных взаимодействий и также препятствует анфолдингу. Становится понятным, что именно фолдинг определяет термостабильность белковых молекул. Кроме того, вносят вклад в термостабильность ионные мостики, число которых обычно выше в белках гипертермофилов, чем в белках мезофильных прокариот. Дополнительно к этому, гипертермофильные архебактерии содержат в клетках особый класс белков теплового шока (шаперонинов), обеспечивающих рефолдинг частично денатурированных белков. Например, у *Pyrodictium abyssi* основным шапероном является белковый комплекс – термосома, задача которого состоит в поддержании других белков в состоянии надлежащего фолдинга. Сама термосома резистентна к высокой температуре.

Во-вторых, в клетках гипертермофильных архебактерий имеются способы защиты молекул ДНК. Одним из таких способов является увеличение концентрации растворенных веществ, в частности комплексов ионов калия с органическими молекулами, которые повышают стабильность ДНК, а также поддерживают белки в активной форме. Только у гипертермофилов обнаружен уникальный белок – обратная ДНК-гираза, которая обеспечивает формирование позитивных петель ДНК при спирализации, в отличие от обычной гиразы, формирующей негативные петли. Позитивная суперспирализация значительно стабилизирует ДНК, предотвращая ее денатурацию.

В поддержании стабильности ДНК и других молекул участвуют также полиамины, такие как путресцин, спермидин, которые в совокупности с ионами магния стабилизируют молекулы ДНК, РНК, а также рибосомы.

В клетках архебактерий рода *Sulfolobus* обнаружены небольшие термостабильные белки, прочно связанные с ДНК в районе большого желобка. Это способствует повышению температуры плавления ДНК на 40°С! У других архебактерий выявлены белки, очень похожие на

гистоны эукариот. Эти белки обеспечивают очень плотную упаковку ДНК в нуклеосоме, в результате чего ДНК даже при очень высокой температуре остается в двухцепочечном состоянии.

В-третьих, у гипертермофильных архебактерий в составе мембран преобладают липиды типа дибифитонила, которые формируют липидный монослой, а не бислой, как у большинства прокариот. Эта структура связана ковалентными связями вместо слабых нековалентных взаимодействий, поддерживающих монослои липидов в обычной бислойной мембране, за счет чего значительно возрастает термоустойчивость мембран гипертермофилов.

Наконец, стабильность малых молекул, таких как ATP и NAD^+, в клетках гипертермофилов тоже поддерживают другие, более термостабильные молекулы: соли, сахара и др. А в некоторых случаях более стабильные молекулы выполняют функции менее стабильных молекул: например, белки с негемовым железом замещают никотинамидные кофакторы.

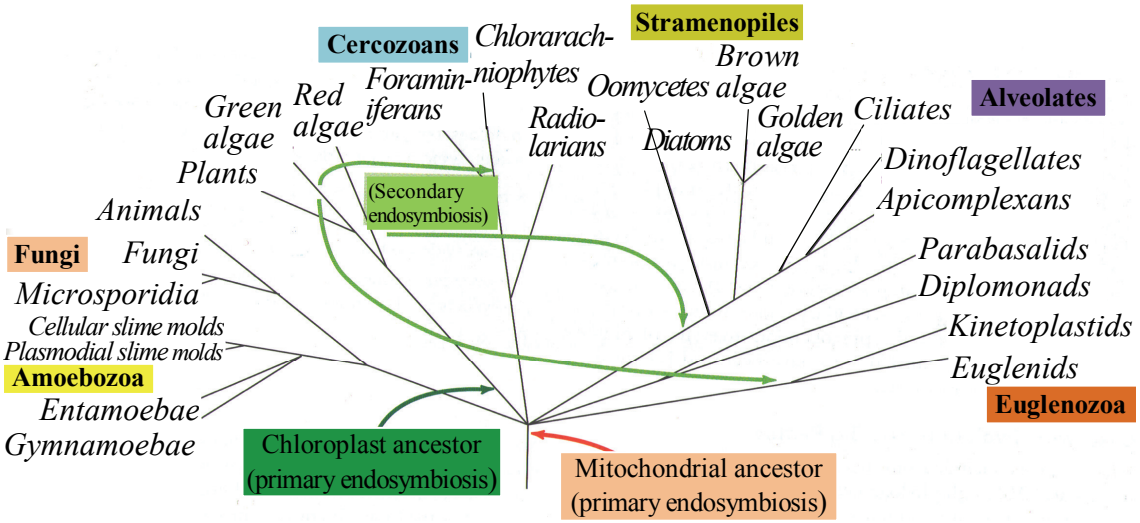
В заключение следует отметить, что наиболее устойчивыми к высокой температуре являются термофильные хемолитотрофные архебактерии (известный на сегодняшний день предел их роста составляет 121°C); меньшую термоустойчивость проявляют термофильные хемоорганотрофные архебактерии (предел роста 110°C); еще ниже предел устойчивости к температуре у термофильных фототрофов – всего 73°C.

Глава 6

ФИЛОГЕНИЯ ДОМЕНА EUCARYA

В § 2.7 уже отмечалось, что привлечение для построения филогенетических древ сиквенсов альтернативных генов микроорганизмов приводит к несовпадению структуры генеалогических связей, основанных на этих данных и данных анализа генов малых рРНК (16S- и 18S-рРНК). В наибольшей мере это касается филогении эукариот.

Накопление данных о последовательности нуклеотидов в разных генах эукариот и последовательности аминокислот в их белках позволило прийти к заключению, что филогения эукариот, основанная на результатах сопоставления сиквенсов генов 18S-рРНК, не отражает истинного хода эволюции. Поэтому были предприняты попытки построить альтернативные филогенетические древа, основанные на анализе других структурных генов и белков эукариот (тубулины, РНК-полимераза, субъединицы АТР-синтазы, белки теплового шока и близкородственные им шаперонины и др.). На рисунке приведен фрагмент такого филогенетического древа, демонстрирующий генеалогию эукариот.



Филогенетическое древо домена Eucarya (Эукариоты), основанное на анализе сиквенсов разнообразных генов и белков

Сопоставление данного филогенетического древа с тем, которое представлено на рис. 2.2 (см. на с. 61), позволяет найти существенные различия:

1) очевидно (рисунок), что эволюционное расхождение эукариот, т. е. появление нескольких главных филогенетических ветвей, началось одновременно, спустя непродолжительное время после возникновения их общего предка. Из этого следует, что, в частности, такие группы эукариот, как дипломонады и парабазалиды, возникли не раньше других эукариот, как это следует из 18S-рРНК-древа (рис. 2.2);

2) животные и грибы, вероятно, более эволюционно близки друг к другу (рисунок), чем предполагалось (рис. 2.2);

3) микроспоридии, которые, согласно 18S-рРНК-последовательностям, возникли раньше большинства остальных эукариот (рис. 2.2), оказались высокоразвитой группой, близкородственной другой высокоразвитой группе – грибам (рисунок). Примечательно, что у микроспоридий расселительной стадией служат мелкие, похожие на споры структуры, во многом схожие со спорами грибов.

На рисунке также можно проследить роль эндосимбиоза в возникновении хлоропластов у некоторых одноклеточных фототрофных эукариот. В процессе первичного эндосимбиоза цианобактерии в клетках «ранних» эукариот, содержащих митохондрии, превратились в хлоропласты и дали начало филогенетическим ветвям красных и зеленых водорослей, а позже – растений. Затем, в ходе независимых событий вторичного эндосимбиоза, предки некоторых групп протистов (Euglenozoa, Cercozoans) «поглощали» зеленые водоросли, а предки некоторых альвеолят и страменофилов «поглощали» красные водоросли. События вторичного эндосимбиоза оцениваются как относительно недавние в ходе эволюции.

Таким образом, хотя филогения, основанная на анализе генов малых рРНК и других генов и белков, подтвердила существование доменов Эубактерии, Архебактерии и Эукариоты, воззрение на эволюцию эукариот претерпело значительные изменения с появлением новой информации о структуре новых генов и белков. Кроме того, новые аспекты эволюции эукариот нашли подтверждение при более пристальном изучении морфологии клеток эукариот. В частности, стало ясно, что организмы, отнесенные ранее к «безмитохондриальным» (дипломонады, микроспоридии, парабазалиды), на самом деле содержат структуры, выполняющие функции митохондрий (гидрогеносомы, митосомы). Это свидетельствует о том, что данные группы эукариот возникли в эволюционной истории не в самом ее начале, а позже.

Наиболее правдоподобной кажется теория, согласно которой приобретение митохондрий в ходе первичного эндосимбиоза привело к появлению эукариотической клетки с кардинально измененными метаболическими свойствами, что стало спусковым крючком разделения эукариот на филогенетические ветви.

Несмотря на значительные успехи в изучении филогении и эволюции эукариот, многое до сих пор остается неясным, и филогенетические древа эукариот нельзя считать окончательными.

Отсутствие на сегодняшний день уточненной филогенетической системы эукариот вызывает определенные сложности с классификацией этих организмов. Особые трудности касаются протистов: чем большее число новых видов привлекают к генетическим исследованиям, тем больше не совпадают системы, построенные по данным электронной микроскопии и молекулярной генетики.

В главах 7 и 8 приведена характеристика крупных групп эукариотических микроорганизмов – грибов, протистов и микроводорослей.

Глава 7

МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ ГРИБОВ

В современной филогенетической системе грибы представлены крупным, достаточно обособленным филогенетическим кластером, по степени генетического родства наиболее близким к животным (см. рисунок на с. 98). Ранее в системе классификации живых организмов истинным грибам было отведено отдельное царство Fungi.

Различают шляпочные и мицелиальные грибы, а также дрожжи. Объектами микробиологии являются последние две группы. На сегодняшний день описано более 100 000 видов грибов, но по оценкам их число составляет около 1 500 000.

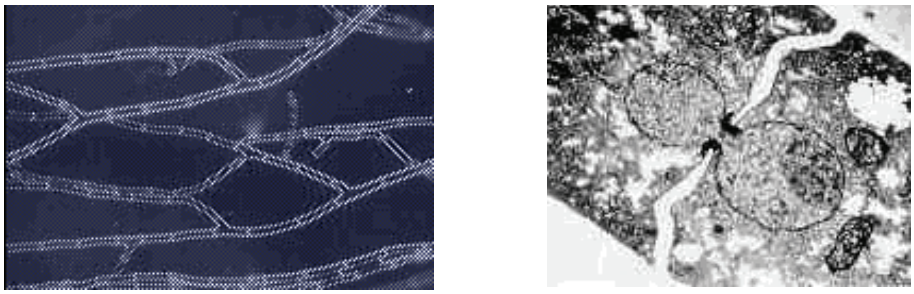
§ 7.1. Особенности организации и филогения грибов

Грибы представляют собой эукариотические гетеротрофные организмы (используют углерод в составе органических соединений), осуществляющие **осмотрофный способ питания** (поглощают растворенные вещества всей поверхностью плазматической мембраны), характеризующиеся ветвящимся ростом и способностью формировать споры. В жизненном цикле грибов чередуются стадии полового и бесполого размножения. Все грибы – хемоорганотрофы, т. е. используют энергию химических связей органических соединений, для них не характерен фотосинтез.

Большинство грибов многоклеточные, их клетки обладают **апикальным ростом** (удлиняются с помощью своих концевых частей) и способны к ветвлению. Клетки грибов достигают большой длины при малом диаметре и образуют **гифы** – полые трубочки с ригидной клеточной стенкой, заполненные многоядерной цитоплазмой. Многократное переплетение гиф формирует **мицелий**, или вегетативное (не принимающее участие в репродукции) тело гриба – **таллом**. Хотя гифы и споры грибов являются микроскопическими, грибные колонии

могут иметь очень большие размеры, особенно в природной среде, и хорошо различимы невооруженным глазом. Существуют и одноклеточные грибы – **дрожжи**.

В грибных гифах в процессе роста могут формироваться перегородки (**септы**) между отдельными клетками (рис. 7.1, *а*). Септы снабжены порами, через которые свободно перемещается цитозоль с органеллами и ядрами (рис. 7.1, *б*). Представители, имеющие в гифах септы (септированные), относятся к высшим грибам (дикариомицетам и несовершенным). Асептированный (не имеющий перегородок в гифах) мицелий характерен для низших грибов, или фикомицетов, к которым относят хитридио-, зиго- и гломеромицеты.



а *б*

Рис. 7.1. Гифы мицелиальных грибов:
а – общий план при малом увеличении (заметны септы);
б – фрагмент гифы при большом увеличении (видна септа с порой, через которую перемещается ядро)

Асептированные гифы содержат множество ядер и, по сути, являются одноклеточными многоядерными организмами. Наличие перегородок в гифах не мешает ядрам транспортироваться между отсеками, и в отдельных отсеках (клетках) может содержаться несколько ядер. Таким образом, большинство грибов являются многоядерными (**ценоцитными**) организмами.

Среди грибов различают **макромицеты** (их плодовые тела имеют крупные размеры, все шляпочные грибы относятся к их числу) и **микромицеты** – микроскопические грибы (плесневые, или мицелиальные, грибы, а также дрожжи).

Грибы имеют фенетические черты сходства с представителями других царств эукариот. Подобно растениям, грибы характеризуются неподвижным образом жизни, их клетки имеют ригидные клеточные стенки и вакуоли с клеточным соком, между клетками наблюдается движение протоплазмы. Подобно животным, грибы обладают хемоорганогетеротрофным типом питания, запасают в

клетках гликоген, а не крахмал, содержат в клеточных стенках хитин, а не целлюлозу и гораздо ближе к животным с точки зрения филогенетического родства.

На рис. 7.2 приведена филогения истинных грибов, основанная на данных сиквенс-анализа генов 18S-рРНК. В филогенетическом кластере грибов присутствуют пять филогенетических ветвей, которые полностью соответствуют пяти отделам грибов, выделяемым ранее на основании фенетических признаков (способов полового размножения). Таким образом, ветви представляют собой однородные с филогенетической и фенотипической точек зрения группы. Самой эволюционно древней ветвью являются Хитридиомицеты, а самыми развитыми – Аскомицеты и Базидиомицеты.

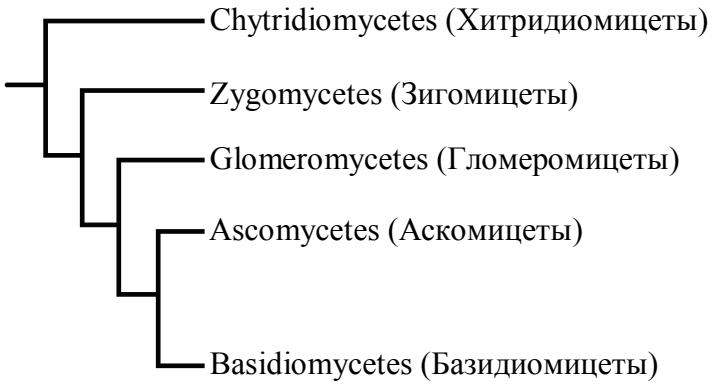


Рис. 7.2. Филогенетическое древо грибов

Поскольку фенетические системы классификации грибов основывались на способах полового размножения, те представители, для которых не была установлена способность к половому процессу, относили в отдел Deuteromycota (дейтеромицеты, они же несовершенные, или имперфектные, грибы). В настоящее время появилась возможность их переноса в соответствующие таксоны совершенных грибов на основании сходства в строении малых рРНК, и деление грибов на совершенные (перфектные) и несовершенные (имперфектные) практически утратило свое значение.

Грибы чрезвычайно широко распространены в окружающей среде, их основным местом обитания является суша. Среди грибов есть представители, способные развиваться в экстремальных условиях: при температуре среды ниже –5°С и выше +62°С; при активности воды 0,65 (для сравнения – растения увядают при активности воды 0,98); при концентрации O_2 всего 0,2% (в воздухе ~20% молекулярного кислорода); при значениях pH 1 и 9.

Особенности наиболее распространенных и важных групп микромицетов будут описаны в ходе характеристики представителей филогенетических ветвей после знакомства со способами питания, роста и размножения грибов.

§ 7.2. Физиология грибов

Способы питания грибов. Как отмечалось выше, по типу питания все грибы относятся к хемоорганогетеротрофам.

При этом следует отметить, что данные организмы способны использовать весьма широкий круг субстратов, в числе которых такие труднодеградируемые соединения, как целлюлоза, хитин, кератин, лигнин, гемицеллюлозы и др. Названные вещества образуются в природе в огромных количествах как продукты опада, в основном при сезонном отмирании частей растений и гибели организмов. Именно грибы, наряду с бактериями, осуществляют разложение этих веществ, участвуя в круговороте биогенных элементов. При этом в атмосферу выделяется углекислый газ, а в почву возвращаются соединения азота и других биогенных элементов, которые могут быть использованы растениями. Поэтому так важна в природе роль грибов в качестве **редуцентов**.

Основная часть грибов, в том числе редуценты, по типу питания являются **сапротрофами** (используют органику, содержащуюся в неживой материи). В то же время среди грибов есть патогенные для животных и человека, а также для растений виды (поселяются в живых клетках и тканях, нанося ущерб хозяину, чаще всего за счет выделения **микотоксинов**). Среди фитопатогенных микроорганизмов грибы являются преобладающими, что, вероятно, объясняется кислой реакцией клеточного сока растений, а большинство грибов, в отличие от бактерий, предпочитают низкие значения pH (4–6).

Еще одной важной группой грибов являются **симбионты**, в частности лишайники и микоризные грибы. Эти формы грибов приспособились к тесному симбиозу с растениями или водорослями, они играют огромную роль в природе.

Встречаются и хищные грибы, у которых в процессе эволюции появились приспособления для захвата и умерщвления мелких животных. Такой способностью, в частности, обладает вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*), а также *Arthrobotrys dactyloides* (рис. 7.3).

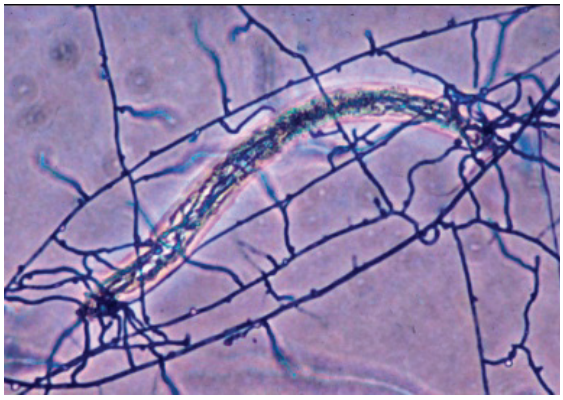


Рис. 7.3. Нематода, пойманная в «силки»
Pleurotus ostreatus

Мицелиальные грибы чаще всего запасают энергию в ходе аэробного дыхания, а бóльшая часть хозяйственно важных видов дрожжей способна к спиртовому брожению и дыханию.

У грибов отсутствуют специализированные органы, с помощью которых можно заглатывать пищу, и они поглощают («всасывают») растворенные в воде питательные вещества в ходе абсорбции всей поверхностью плазматической мембраны (осмотрофный тип питания). При этом показано, что гифы мицелиальных грибов могут распространяться радиально на огромные расстояния в поисках питательных субстратов, достигая в длину более десятка метров. Как только обнаруживаются подходящие питательные вещества, таллом мобилизует свои ресурсы на их утилизацию. Этот механизм имеет адаптационное значение: при отсутствии способности к движению апикальный рост позволяет грибам исследовать большие площади в поисках пищи.

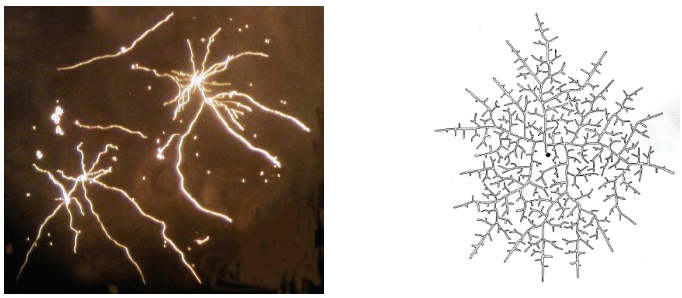
Грибы-сапротрофы способны прикрепляться к субстрату специализированными гифами – **ризоидами**. На агаризованных средах ризоиды могут погружаться в толщу среды. Паразитические формы грибов часто образуют особые гифы – **гаустории**, которые глубоко погружаются в клетки или ткани других организмов и обеспечивают «всасывание» питательных веществ.

Сложные полимерные субстраты разлагаются грибами при помощи внеклеточных литических ферментов, разнообразными комплексами которых богаты эти организмы. В клетки поступают продукты расщепления – олиго- и моносахариды, олигопептиды и аминокислоты, жирные кислоты, спирты и др.

Рост мицелиальных грибов. Это процесс удлинения гиф, который осуществляется только на сáмом их кончике (апикальный рост). Характеризуя физиологию мицелиальных грибов, следует помнить,

что речь идет о многоклеточных организмах, и в данном случае под термином «рост» подразумевается не только увеличение массы и размеров талломов, но и увеличение в их составе числа клеток (или ядер у асептированных грибов). При этом увеличение числа клеток в составе мицелиальной колонии носит экспоненциальный характер так же, как при делении бактерий в клеточной культуре. В основе этого процесса у грибов лежит деление ядер с помощью митоза, причем данный процесс является удивительно сбалансированным: несмотря на апикальный тип роста и большую длину гиф, ядра в цитоплазме распределяются довольно равномерно, независимо от наличия септ. Такое распределение ядер, а также других органелл в значительной мере обеспечивается явлением **транслокации**, под которым подразумевают процесс перемещения внутри гиф питательных веществ, органелл, включений, обусловленный движением протоплазмы.

Рост мицелиальных грибов сопряжен с ветвлением гиф. Если на плотную питательную среду поместить грибную спору (или кусочек мицелия), она прорастет, дав начало гифе, которая, в свою очередь, будет ветвиться и удлиняться, формируя радиальную колонию (рис. 7.4). Размеры такой колонии зависят от наличия питательных веществ в субстрате, которые поглощаются контактирующей со средой поверхностью гиф. Если питания достаточно, то периферийный рост не ограничен, и у некоторых базидиомицетов в природной среде таллом может занимать площадь диаметром до 15 м.



а *б*

Рис. 7.4. Мицелиальные колонии:
а – различные стадии прорастания спор
или репродуктивных клеток грибов;
б – радиальная колония мицелиального гриба

Способы размножения грибов. Для большинства грибов характерны как бесполые, так и половые способы размножения, причем у многих представителей в жизненном цикле происходит их чередование. В основе бесполого размножения лежит деление ядра в ходе

митоза (равное деление, в результате которого обе образованные клетки получают равный набор хромосом). А в основе полового размножения – слияние половых гамет, которые формируются в процессе мейоза (редукционное деление, сопровождающееся **кроссинговером** и уменьшением числа хромосом в образующихся клетках вдвое). Митоз и мейоз у грибов протекают иначе, чем у других эукариот и имеют следующие отличия: ядерная оболочка не исчезает, аппарат веретена формируется внутри ядра, центриоли отсутствуют.

Кроме бесполого и полового размножения, для многих грибов характерна **парасексуальность** – необычное явление, в ходе которого в **соматических клетках** происходит слияние гаплоидных ядер с образованием диплоидных, некоторые из которых являются гетерозиготными (возникают из генетически различных ядер). Важным отличием парасексуального процесса считается ассоциация хромосом в диплоидном ядре с прохождением кроссинговера, что не характерно для обычного митоза. Иногда после этого вновь возникают гаплоидные ядра, генетически отличные от исходных. Эти новые ядра потом опять могут участвовать в гетерокариотических комбинациях. Генетический эффект парасексуальных циклов аналогичен результату истинного полового цикла, но ход его иной. Полагают, что парасексуальный цикл позволяет несовершенным грибам, не имеющим стадии полового размножения, сохранять генетическую изменчивость.

Парасексуальный процесс у грибов основан на специфичном для этих организмов явлении – **гетерокариозе**, который представляет собой возникновение генетически различающихся ядер в общей цитоплазме. Это может происходить в ходе мутаций или в процессе случайного слияния генетически различающихся гиф, что широко распространено в природе. Гетерокариоз отчасти аналогичен диплоидности других организмов, поскольку фенотипические признаки гетерокариотических организмов определяются взаимодействием генетически различных ядер так же, как в диплоидах – взаимодействием мужских и женских гомологичных хромосом.

Способами бесполого размножения грибов являются: формирование бесполых спор, разлом гиф (фрагментация мицелия), почкование и бинарное деление (последние два способа характерны для дрожжей).

Размножение с помощью бесполых спор – наиболее характерный тип размножения мицелиальных грибов. Он сопровождается формированием особых воздушных гиф, которые отделяются от мицелия сплошными перегородками, – **спорангионосцев** или **конидиеносцев**

(рис. 7.5). На концах спорангиеносцев образуются мешочки – **спорангии**, внутри которых созревают **спорангиоспоры**. На концевых частях конидиеносцев формируются вздутия, на которых образуются собранные в цепочки споры – **конидии** (конидиоспоры). Различие между спорангиоспорами и конидиями состоит в том, что спорангиоспоры возникают в результате размежевания ценоцитной цитоплазмы спорангия на множество спор (эндогенно), а конидии образуются как отдельные структуры из модифицированных участков гиф (экзогенно). По мере созревания спорангиоспоры высыпаются из растрескивающихся спорангиев, а конидии отрываются и с током воздуха разносятся на большие расстояния. У низших грибов бесполые споры часто снабжены жгутиками и являются подвижными в воде (зооспоры), а созревание их осуществляется в **зооспорангиях**.

Рис. 7.5. Бесполое спороношение микромицетов:
а – конидии пенициллов и аспергиллов;
б – созревший спорангий зигомицетов *Mucor* sp.;
в – фрагментация мицелия и образование
артроспор *Geotrichum candidum*

Спорангиоспоры, конидии и зооспоры являются **митоспорами**, поскольку формируются в ходе деления ядер митозом. Митоспоры предназначены для быстрой репродукции и распространения грибов в природе. При этом митоспоры наземных видов (спорангиоспоры и конидии) образуются в огромных количествах и хорошо приспособлены к расселению: имеют малый объем и массу, гладкую поверхность, что в сухую погоду способствует их переносу с током воздушных масс. Иногда содержание митоспор в воздухе достигает 10^4 на 1 м^3. Некоторые митоспоры имеют клейкую поверхность и распространяются, прилипая к телу насекомых или других животных. У нескольких видов споры с силой «выстреливаются» в воздух, отдаляясь от спорангия на расстояние до 2 м.

При размножении путем фрагментации мицелия происходит распадение гиф на отдельные короткие клетки (**артроспоры**, или **оидии**), каждая из которых дает начало новой мицелиальной колонии (рис. 7.5, *в*). Этот процесс удивительно похож на размножение с помощью конидий, и часто артроспоры считают одним из типов конидий. Если эти фрагменты окружаются толстостенными темноокрашенными оболочками, их называют **хламидоспорами**. Хламидоспоры, в отличие от артроспор, являются более устойчивыми к некоторым неблагоприятным факторам окружающей среды благодаря своей оболочке. Следует отметить, что принудительная фрагментация мицелия (например, разрыв гиф при посеве) также будет способствовать увеличению числа талломов, поскольку по причине чрезвычайно слабой дифференциации практически каждый фрагмент гифы способен дать начало новой особи.

У дрожжей бесполое размножение чаще всего осуществляется почкованием, редко – бинарным делением и неполовыми спорами (см. § 7.8).

Половое размножение грибов может осуществляться несколькими способами, но общим для них (за исключением соматогамии) является наличие следующих стадий:

1) формирование специализированных органов полового спороношения – **гаметангиев**;

2) образование в гаметангиях в ходе мейоза половых клеток – **гамет**, которые имеют **гаплоидный** (половинный) **набор** хромосом;

3) слияние половых клеток или продуктов их прорастания – **плазмогамия**, в ходе которой формируется **дикарион** (клетка, содержащая два не слившихся ядра);

4) кариогамия – процесс слияния ядер с образованием **диплоидной зиготы** (содержит ядро с двойным набором хромосом). Эта стадия у большинства грибов очень короткая и вслед за ней происходит мейоз (5), сопровождающийся перекомбинированием генов в хромосомах и формированием гамет (у аскомицетовых и базидиомицетовых грибов они называются половыми спорами). Половые споры прорастают в мицелий, после чего снова может наступить плазмогамия.

По способу переноса гамет и осуществления плазмогамии различают следующие типы полового размножения грибов:

– **изогамия** – процесс слияния одинаковых по размеру подвижных гамет, который осуществляется вне гаметангиев;

– **гетерогамия** – отличается от изогамии тем, что сливающиеся гаметы неодинаковы по величине;

– **оогамия** – слияние гамет, осуществляемое в женских гаметангиях (**оогониях**). Мужские гаметы могут быть подвижны и проникают в оогонии самостоятельно, либо на мужских гаметангиях (**антеридиях**) формируются выросты, через которые мужские гаметы проникают в оогоний. Половой продукт – ооспора;

– **зигогамия** – процесс слияния двух многоядерных гаметангиев (**гаметангиогамия**) с образованием специфической половой структуры – **зигоспорангия**. Внутри зигоспорангия гаметы (в данном случае просто ядра) сливаются в одно или более диплоидных ядер (зигот);

– гаметангиогамия с образованием продуктов слияния – **асков**. Здесь тоже происходит слияние многоядерных гаметангиев, но оно всегда завершается формированием специализированного органа – сумки, или аска, с гаплоидными аскоспорами;

– **соматогамия** – слияние двух клеток вегетативного мицелия. Половой продукт – **базидия**, на которой образуются четыре гаплоидные **базидиоспоры**.

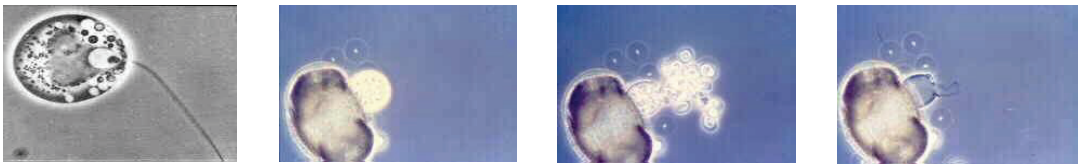
Некоторые виды грибов способны к самооплодотворению, т. е. половому процессу в пределах одного штамма, их называют **гомоталломными**. Другие – **гетероталломны** и требуют для полового размножения присутствия штаммов с разными типами спаривания (для грибов вместо термина «пол» используют словосочетание «тип спаривания», и разные половые знаки мицелиев условно обозначают «+» или «–», хотя внешне они могут быть неразличимы).

§ 7.3. Хитридиомицеты (Chytridiomycetes)

Хитридиомицеты представляют самую древнюю филогенетическую ветвь истинных грибов и являются типичными низшими грибами. Стоит напомнить, что низшие грибы отличаются от высших следующими признаками: у низших отсутствуют септы в гифах (за исключением концевого участка, где возникает спорангий или гаметангий); их органами бесполого спороношения являются спорангии, в которых митоспоры развиваются эндогенно, в то время как у высших грибов митоспоры развиваются экзогенно на конидиеносцах; у низших грибов бесполое размножение и половое могут осуществляться на одном мицелии в одних условиях, а у высших грибов половые и бесполые репродуктивные формы часто развиваются в разное время, на разных субстратах, так что они могут даже иметь разные названия.

Вегетативные тела хитридиомицетов могут не иметь мицелиальной структуры и представлять собой плазмодий – слизистую неклеточную массу либо иметь зачаточный асептированный мицелий. Это преимущественно водные формы, распространенные в пресных и морских водоемах. Встречаются и паразиты наземных растений, насекомых, других грибов, водорослей.

Бесполое размножение осуществляется с помощью подвижных за счет одного жгутика зооспор (рис. 7.6, *а*), которые развиваются в зооспорангиях (рис. 7.6, *б–г*). Половое размножение может быть представлено изогамией, гетерогамией или оогамией. В клеточных стенках преобладает хитин.



а *б* *в* *г*

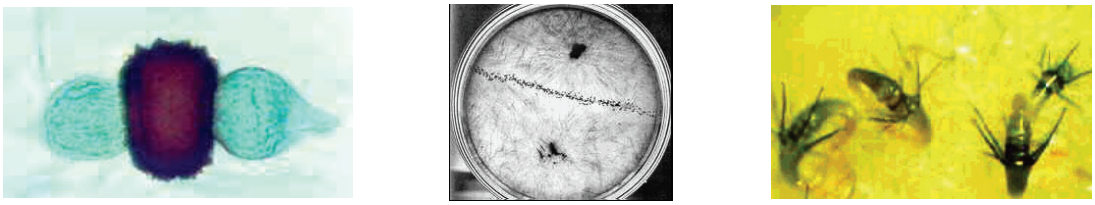
Рис. 7.6. Бесполое размножение хитридиомицетов:
а – зооспора со жгутиком;
б–г – последовательные стадии созревания
и высвобождения зооспор в зооспорангии *Chytridium lagenaria*,
прикрепленном к пыльцевому зерну сосны

Среди хитридиомицетов много видов, наносящих существенный ущерб возделываемым растениям. Можно назвать *Olpidium brassicae*, вызывающий заболевание «черная ножка» капустной рассады, при котором стебель растения темнеет, истончается и загнивает. Другие виды рода *Olpidium* могут поражать корни табака, бобовых, льна и других растений. Еще один распространенный род хитридиевых грибов – *Synchytrium*. Его представители поражают разнообразные высшие наземные растения, в том числе обусловливают рак картофеля (возбудитель *S. endobioticum*) – заболевание, проявляющееся в формировании на клубнях бугристых наростов или опухолей в виде губки.

§ 7.4. Зигомицеты (Zygomycetes)

Эта ветвь объединяет низшие грибы с хорошо развитым асептированным мицелием. Свое название зигомицеты получили благодаря способности образовывать особые половые структуры (зигоспорангии) в процессе слияния двух многоядерных, недифференцированных

на гаметы, гаметангиев (зигогамия). Зигоспорангии формируются в местах соприкосновения способных вступить в контакт гаметангиев после растворения их клеточных стенок и слияния (рис. 7.7).



а *б* *в*

Рис. 7.7. Зигоспорангии:
а – зигоспорангий (в центре) *Mucor* sp. в месте контакта двух гаметангиев; *б* – скопление зигоспорангиев (темная полоса между двумя мицелиальными колониями) *Phycomices* sp.; *в* – увеличенное фото зигоспорангиев *Phycomices* sp.

Бесполое размножение осуществляется с помощью спорангиоспор, созревающих в митоспорангиях, которые обычно бывают темно окрашены и придают мицелию черный оттенок (рис. 7.7, *б*).

Отдел зигомицетовых грибов насчитывает более тысячи видов. Один из знакомых всем представителей – *Rhizopus stolonifer*, или хлебная плесень, – образует похожую на вату черную плесень на богатых углеводами субстратах и обусловливает быструю порчу продуктов. Отдельные виды рода *Rhizopus* обладают высокой ферментативной (амилолитической и протеолитической) активностью, благодаря чему используются в некоторых азиатских странах для производства ферментированных продуктов из сои («соевый сыр»), злаков, кокосов, а также для получения спирта из клубней картофеля. Другие представители этого рода патогенны для животных и человека и вызывают микозы легких, головного мозга и других органов.

Некоторые виды зигомицетовых обладают **диморфизмом** – способностью при изменении условий культивирования переходить от мицелиального роста к одноклеточному, характерному для дрожжей, и наоборот. Так, например, *Mucor rouxii* формирует дрожжеподобные клетки при культивировании в условиях повышенного содержания CO_2 в воздухе, но приступает к апикальному росту и ветвлению гиф с образованием мицелия, когда концентрация CO_2 снижается до атмосферной. Стоит отметить, что диморфизм характерен, в первую очередь, для патогенов растений, человека и животных. Многие мукоровые грибы вызывают серьезные заболевания человека и животных и вместе с представителями *Rhizopus* обусловливают порчу продуктов, особенно в овощехранилищах.

§ 7.5. Гломеромицеты (Glomeromycetes)

Это относительно малочисленная ветвь низших грибов, включающая всего порядка 160 видов, но имеющая очень большое значение в биосфере. Все известные виды гломеромицетов обладают характерной способностью развиваться в тесном симбиозе с корневой системой растений (**микориза**). Гифы гломеромицетов проникают в живые клетки корневой системы самых разнообразных растений (**эндомикориза**) и обмениваются с растением питательными веществами. Эти грибы, в частности, обладают эффективным способом поглощения прочно удерживаемых почвой и недоступных для растений соединений фосфора и переносят их в клетки растений, стимулируя развитие последних, поскольку фосфор часто является лимитирующим фактором для роста растений. Сами грибы получают от растения органику. Считается, что не менее 90% всех высших растений участвуют в **мутуалистических взаимоотношениях** с гломеромицетами. Таким образом, данные грибы вносят весомый вклад в повышение урожайности возделываемых культур.

Гифы гломеромицетов асептированные, бесполое размножение осуществляется при участии спорангиев, которые заключены в толстостенные округлые тела желтоватого цвета величиной от нескольких миллиметров до 2–3 см (спорокарпы). Половое размножение, если оно представлено, сходно с зигомицетовыми. Наиболее представительный род гломеромицетов – *Glomus*.

§ 7.6. Аскомицеты (Ascomycetes)

Филогенетические ветви Аскомицеты и Базидиомицеты, в отличие от описанных выше, включают высшие истинные грибы, имеющие определенные особенности:

1) мицелий высших эумицетов септированный, диаметром примерно 5 мкм и более устойчивый к внешним воздействиям, чем мицелий фикомицетов;

2) высшие грибы могут развиваться в условиях, непригодных для низших грибов: при меньшей влажности, а также на трудноделадируемых субстратах со сложной структурой. Они, в частности, способны заселять и приводить к порче ткань, бумагу, картон, древесину, краску, кожу, воск, реактивное топливо, изоляционные материалы, оптику и др.;

3) все высшие эумицеты содержат в составе клеточных стенок хитин, большинство обладает апикальным ростом и формирует мицелий, отдельные представители являются одноклеточными (дрожжи);

4) среди высших грибов распространена способность вегетативных гиф к слиянию, которое сопровождается обменом ядрами.

Аскомицеты – это самая многочисленная филогенетическая ветвь грибов, объединяющая до 30% всех известных грибных видов, среди которых множество мицелиальных форм, а также большинство видов дрожжей. Половое размножение у аскомицетов осуществляется в ходе гаметангиогамии и всегда сопровождается формированием сумки, носящей название **аск**. В аске происходит слияние ядер зиготы, а затем мейотическое деление диплоидного ядра с образованием гаплоидных аскоспор. Короткая дикариотическая стадия представлена периодом между плазмогамией и кариогамией. Аски формируются обычно внутри сложной структуры из плотно переплетенных гиф – аскокарпа, имеющего во многих случаях макроскопические размеры. Аскокарп может быть открытым в виде чаши (апотеций), замкнутым и округленным (клейстотеций), колбообразным с мелкой порой для выхода аскоспор (перитеций). Эти признаки особенно важны с таксономической точки зрения.

Бесполое размножение происходит посредством конидий, при фрагментации гиф, а также с помощью хламидоспор. Все перечисленные структуры неподвижны. В состав клеточных стенок аскомицетов входят в основном глюканы и хитин. У дрожжей, кроме того, присутствуют маннаны и маннано-протеидные комплексы.

Среди аскомицетов встречаются сапротрофы, паразиты растений, человека и животных, симбиотические виды. Здесь много хозяйственно ценных грибов. К числу широко распространенных родов относятся, например, *Erysiphe* – возбудитель мучнистой росы злаков; *Chaetomium* – продуцент комплекса целлюлолитических ферментов, разрушающий древесину, бумагу, ткани; *Trichophyton* – **дерматофит**, возбудитель трихофитии; *Microsporum* – также дерматофит, вызывающий микроспорию (стригущий лишай). Сюда же относится большинство дрожжей, которые будут рассмотрены отдельно в § 7.8. Стоит упомянуть также род *Neurospora*, один из видов которого стал модельным объектом для изучения генетики эукариот: биохимические мутации *N. crassa* (рис. 7.8) позволили ученым разгадать функции гена.

Большинство несовершенных грибов, которых в целом насчитывается порядка 30 000 видов, по молекулярно-генетическим признакам, а также по многим морфологическим характеристикам относят

к аскомицетам, несмотря на то, что для них не установлены ни наличие, ни тип половой репродукции. Отсутствие сведений о половом процессе может быть следствием недостаточной изученности дейтеромицетов или утратой ими полового способа репродукции в ходе эволюции. В основу классификации несовершенных грибов положены, в первую очередь, морфологические особенности конидий и способ их формирования, тип конидиеносцев (см. рис. 7.5, *а* на с. 108) и молекулярно-генетические признаки.

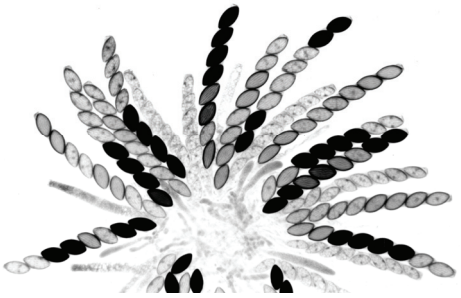


Рис. 7.8. Аски *Neurospora crassa* с аскоспорами

Многие из этих несовершенных грибов имеют большое хозяйственное значение и очень широко распространены в окружающей среде. К числу таких представителей следует отнести виды *Aspergillus* и *Penicillium* – типичные почвенные грибы, которые можно считать вездесущими, поскольку они обнаруживаются практически на любых субстратах. Многие из них обладают способностью расщеплять целлюлозу и часто поражают древесину, а также изделия из нее. *Aspergillus niger* используется для промышленного получения лимонной кислоты, а также в производстве широкого круга ферментов: амилаз, протеиназ, пектиназ, липаз, глюкозооксидаз; *A. oryzae*, *A. wentii* продуцируют амилазы, промышленные препараты которых получают из этих грибов; *A. oryzae* применяют на Востоке для приготовления соевого соуса, а в Японии – для первых этапов производства традиционного алкогольного напитка сакэ. В то же время *A. flavus*, поражающий ядра арахисовых орехов, продуцирует очень опасный микотоксин (**афлатоксин**), обладающий мощным **канцерогенным действием**.

Penicillium italicum вызывает гниль плодов цитрусовых, а *P. camembertii* и *P. roquefortii* придают определенным сортам сыра («Камамбер», «Рокфор») изысканный привкус и аромат и используются в сыродельной промышленности; *P. chrysogenum* и *P. notatum* являются продуцентами антибиотика пенициллина, сделавшего

революцию в лекарственной терапии, поскольку он был первым антибиотиком, найденным человеком. Некоторые виды *Penicillium* и *Trichoderma* применяются для промышленного получения целлюлаз.

Среди несовершенных грибов встречается много паразитов древесных растений, которые, благодаря способности продуцировать расщепляющие древесину ферменты, поселяются на ней и осуществляют быструю деструкцию. К числу таких грибов, кроме упомянутых, относятся *Fusarium*, *Trichoderma*, *Botrytis* и некоторые другие.

Несовершенный гриб *Tolypocladium inflatum* используется в качестве продуцента циклоспорина, а *T. niveum* – кладоспорина. Эти соединения применяются для подавления иммунных реакций при пересадке органов и тканей.

§ 7.7. Базидиомицеты (Basidiomycetes)

Эта филогенетическая ветвь объединяет наиболее сложно организованные высшие грибы, бóльшая часть которых образует плодовые тела макроскопических размеров (шляпочные грибы). Все базидиомицеты имеют септированный мицелий. Их основной отличительной особенностью является способность формировать базидиоспоры на поверхности специализированных булавовидных выростов – базидий. Половых органов у этих грибов нет, и половой процесс осуществляется путем слияния двух вегетативных клеток гаплоидного мицелия, вырастающего из базидиоспоры. Большинство базидиомицетов – гетероталломные, т. е. у них сливаются клетки гиф, относящихся к противоположным по знаку мицелиям («+» и «–»). После плазмогамии образуется дикарион. Мицелий с дикарионом может формировать мясистое спорообразующее тело – базидиокарп, который мы называем шляпочным грибом. В базидиокарпе на концах дикариотных гиф образуются базидии, в которых осуществляется кариогамия; за ней сразу же следует мейоз с образованием четырех гаплоидных ядер; каждое ядро мигрирует в одну из четырех базидиоспор (рис. 7.9). У некоторых грибов базидии с базидиоспорами могут возникать прямо на мицелии.

Еще одной особенностью базидиомицетов является способность образовывать мицелий с пряжками, которые формируются на дикариотических гифах при делении клетки и обеспечивают правильное распределение генетически различных ядер. Бесполое размножение с помощью митоспор (конидий) у базидиомицетов встречается очень редко.

Рис. 7.9. Четыре базидиоспоры на базидии

Среди базидиомицетов есть съедобные и ядовитые шляпочные грибы, трутовики, фитопатогенные формы, микоризные, активные разрушители древесины – возбудители белой и бурой гнили.

Бурая гниль древесины сопровождается разложением только целлюлозных компонентов (остается нетронутым бурый лигнин), а белая гниль обусловлена деструкцией и целлюлозы, и лигнина. Поражение древесины грибами наносит огромный ущерб деревообрабатывающей промышленности и часто является причиной преждевременного разрушения деревянных построек. К числу активных деструкторов древесины следует отнести роды базидиомицетов: *Coriolus*, *Phlebia*, *Coniophora*, *Serpula* и др. Одним из самых распространенных видов грибов этой категории является *Coniophora puteana* (кониофора обыкновенная), которая используется в качестве тест-культуры в методах определения степени биостойкости древесины, как активный ее разрушитель и космополит.

Фитопатогенные базидиомицеты представлены некоторыми трутовыми грибами, а также ржавчинными и головневыми. Виды двух последних групп поражают зерновые культуры, нанося ущерб, оцениваемый в мире миллиардами долларов. Их отличительным признаком является отсутствие базидиокарпов. Известно более десятка тысяч видов ржавчинных и головневых грибов, поражающих пшеницу, рожь, ячмень, овес, барбарис, дикорастущие травы.

§ 7.8. Особенности морфологии и физиологии дрожжей

Дрожжами считают грибы, чей таллом представлен одиночной клеткой на протяжении всего или большей части жизненного цикла. Чаще всего клетки грибов имеют округлую форму, что можно

рассматривать как адаптационный признак: в такой форме отношение площади поверхности клетки к объему достигает минимума, и это облегчает регуляцию осмотического давления внутри клетки. Последнее обстоятельство чрезвычайно важно для дрожжей – ведь большинство из них обитает в средах с повышенной концентрацией сахаров, например в нектарах цветов, на поверхности плодов, зеленых частей растений.

В настоящее время описано порядка 700 видов дрожжей, большинство из них близкородственны аскомицетам, и лишь некоторые относятся к базидиомицетам. Таким образом, термин «дрожжи» не имеет статус таксона и не рассматривается как отдельная систематическая группа грибов. Это понятие служит скорее для обозначения физиолого-биохимических особенностей его обладателей: способности к бесполому размножению путем почкования или деления, а также к спиртовому брожению.

Условный характер термина «дрожжи» подтверждается существованием, как отмечалось выше, видов грибов, способных к диморфизму (*Mucor rouxii*, некоторые виды *Candida*), у которых в жизненном цикле могут чередоваться мицелиальная и дрожжеподобная стадии. Кроме того, брожение способны осуществлять и некоторые не относящиеся к дрожжам грибы, в частности отдельные виды *Aspergillus*, *Paecilomyces* и др.

Морфология дрожжей. Клетки дрожжей имеют размер 1–10 мкм, чаще 3–7 мкм. В большинстве случаев они характеризуются овальной формой, но могут быть также шаровидными, удлиненными, цилиндрическими, лимоновидными, треугольными, серповидными, стреловидными (рис. 7.10). У одних видов дрожжей форма клетки постоянна и служит таксономическим признаком, у других – изменчива.

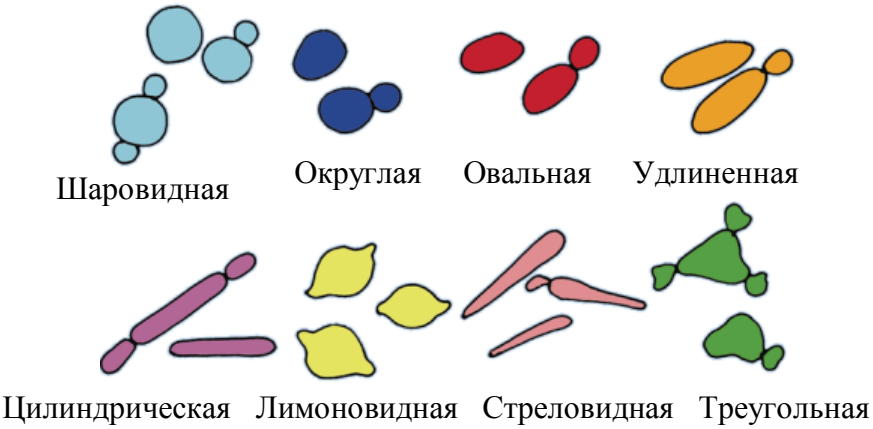


Рис. 7.10. Формы клеток дрожжей

В ходе основного способа размножения дрожжей – почкования могут формироваться скопления клеток, которые называются ложным мицелием, или **псевдомицелием**. **Истинный мицелий** образуется дрожжами, способными к делению, например представителями рода *Trichosporon*. Эти два типа мицелия отличаются площадью соприкосновения клеток: в истинном мицелии клетки отделены друг от друга широким основанием, а в ложном – узким (рис. 7.11).

а *б*

Рис. 7.11. Ложный мицелий (*а*) дрожжей *Candida* и истинный мицелий (*б*) дрожжей *Trichosporon*, распадающийся на артроспоры

Псевдомицелий может быть **примитивным** и состоять из клеток только одного вида либо **дифференцированным**, в состав которого входят клетки разного размера и формы. Базидиомицетовые дрожжи обычно формируют мицелий с пряжками (рис. 7.12).

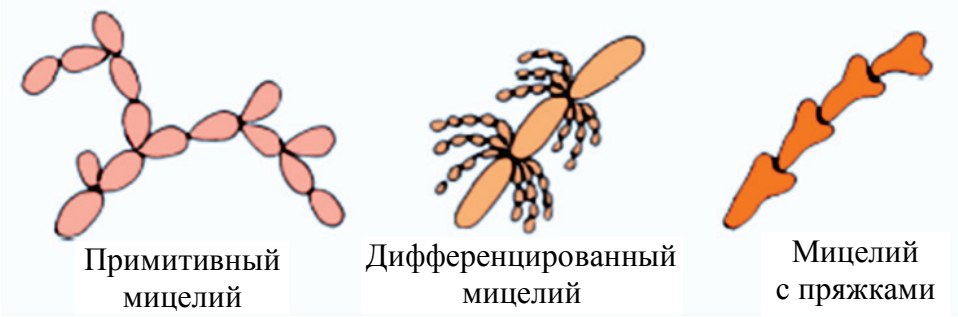
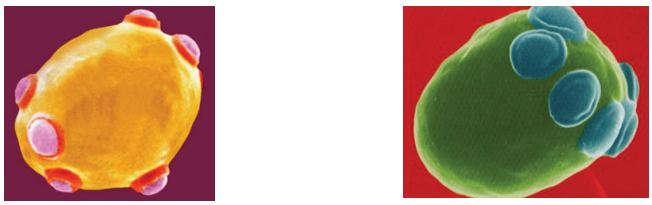


Рис. 7.12. Типы дрожжевого мицелия

На плотных питательных средах дрожжи образуют колонии разной морфологии, больше похожие на бактериальные, чем на грибные.

Бесполое размножение дрожжей. Основным способом бесполого размножения дрожжей является почкование. Оно начинается с митотического деления ядра, после чего на поверхности клетки появляется небольшой сферический вырост, в который переходят одно ядро и копии органелл. Вырост постепенно увеличивается в размерах и может отделяться от материнской клетки (если не формируется

псевдомицелий), оставляя на ней почечный рубец (рис. 7.13). Одна клетка в процессе жизненного цикла способна образовать 25–40 почек. Почкование может осуществляться на любой части клеточной поверхности, и тогда его называют **многосторонним** (рис. 7.13, *а*), либо только по полюсам (**одностороннее почкование**, рис. 7.13, *б*). Многостороннее почкование может сопровождаться формированием на одной клетке одновременно двух и более почек – это пример **множественного почкования**.



а *б*

Рис. 7.13. Почечные рубцы на клетках дрожжей:
а – от многостороннего почкования;
б – от одностороннего почкования

Другим, значительно более редким типом бесполого размножения дрожжей является деление. Ему тоже предшествует митоз, но в результате, в отличие от почкования, образуются две равноценные по морфологии и возрасту клетки. Этот способ размножения характерен для дрожжей рода *Schizosaccharomyces* (рис. 7.14), у которых после деления клетки расходятся, а также для представителей рода *Trichosporon*, формирующих истинный мицелий (см. рис. 7.11, *б* на с. 119).

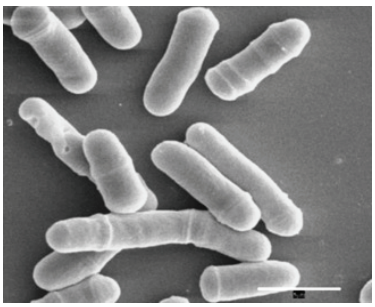
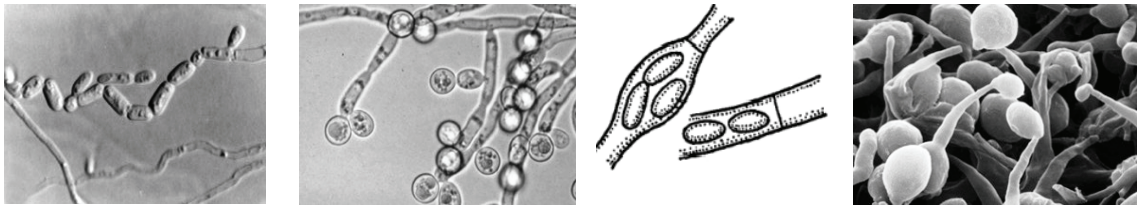


Рис. 7.14. Клетки дрожжей
Schizosaccharomyces pombe
(в нижней части фото видны клетки,
не успевшие разойтись после деления)

Для некоторых видов дрожжей одним из способов бесполого размножения является образование митоспор, среди которых различают артроспоры (оидии), хламидоспоры, эндоспоры и баллистоспоры (рис. 7.15).



а *б* *в* *г*

Рис. 7.15. Митоспоры дрожжей:
а – артроспоры *Trichosporon cutaneum*;
б – хламидоспоры (округлые образования) *Candida albicans*;
в – эндоспоры; *г* – баллистоспоры *Sporobolomyces* sp.

Артроспоры и хламидоспоры (описаны в § 7.2) характерны для *Trichosporon cutaneum*. **Эндоспоры** дрожжей представляют собой вегетативные клетки, которые разграничиваются внутри клетки или гифы (рис. 7.15, *в*). Они образуются в старых культурах дрожжами *Trichosporon*, *Candida*, *Cryptococcus*. **Баллистоспоры** формируются на заостренных выростах вегетативных клеток – стеригмах и при созревании отбрасываются в воздух капельно-выделительным механизмом (рис. 7.15, *г*). Баллистоспоры могут образовывать представители родов *Sporobolomyces*, *Bullera*. Следует подчеркнуть, что митоспоры дрожжей так же, как и мицелиальных грибов, служат одновременно для размножения, распространения в окружающей среде, а в некоторых случаях – для перенесения неблагоприятных условий.

Половое размножение дрожжей. Как уже отмечалось, перфектные дрожжи могут размножаться половым путем, чаще – с помощью аскоспор, реже – базидиоспорами. К группе дрожжей с аскомицетовым типом развития относится более половины известных родов, в том числе такие распространенные и хозяйственно ценные, как *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Lipomyces*, *Pachysolen*, *Kluyveromyces*, *Schwanniomyces*.

У аскомицетовых дрожжей половой процесс представляет собой слияние двух клеток или аскоспор с образованием зиготы. Зигота может приступить к бесполому размножению почкованием или делением, либо в ходе деления ядра мейозом преобразоваться в аск, в котором вокруг каждого гаплоидного ядра формируется оболочка и возникает 4–8 аскоспор. Гаплоидные аскоспоры высвобождаются при разрушении стенки аска и могут размножаться бесполым путем либо сливаться с другими аскоспорами (рис. 7.16).

К базидиомицетовым дрожжам относятся, например, представители родов *Rhodosporidium*, *Leucosporidium*, *Filobasidium*. Особенности их полового размножения состоят в том, что после мейотического

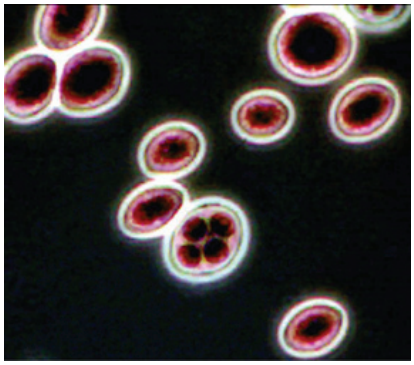


Рис. 7.16. Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (в центре фото находится аск с четырьмя аскоспорами)

деления ядер в структурах, формирующихся из зиготы (промицелий или базидии), на них экзогенно образуются гаплоидные базидиоспоры, как и у мицелиальных грибов.

Следует отметить, что среди дрожжей есть как гомоталломные, так и гетероталломные виды. Кроме того, в зависимости от продолжительности существования гаплоидной и диплоидной фаз различают **диплоидные дрожжи**, чьи клетки вегетативно размножаются, находясь в диплофазе (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii* и др.), а также **гаплоидные дрожжи**, которые вегетативно размножаются в гаплофазе (*Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Zygosaccharomyces* и др.).

Для дрожжей, как и для остальных грибов, характерно понятие жизненного цикла, в котором происходит смена фаз и способов размножения. На рис. 7.17 приведен жизненный цикл пекарских дрожжей.

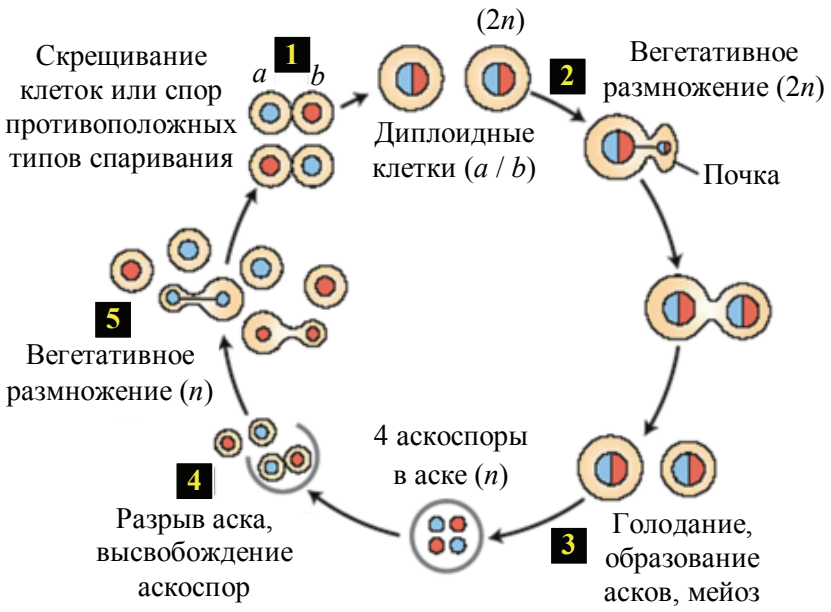


Рис. 7.17. Жизненный цикл дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

К аспорогенным (имперфектным) дрожжам, для которых не обнаружены перечисленные выше способы полового размножения, относятся представители родов *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon* и др.

Глава 8

МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТЕЙШИХ И ВОДОРОСЛЕЙ

В этой главе рассмотрены филогенетические ветви эукариотических микроорганизмов, большинство которых на сегодняшний день относят к протистам. Это пять крупных кластеров протистов, а также красные и зеленые водоросли (см. рисунок на с. 98). Безусловно, все разнообразие протистов и микроводорослей не ограничивается рассмотренными группами, оно гораздо шире.

Протисты (Protists) иначе называют Protozoa, что означает «простейшие животные». В настоящее время эта группа не носит статус таксона. Традиционно к протистам относили одноклеточных эукариот, не имеющих клеточных стенок, неокрашенных (без фотосинтетических пигментов) и подвижных. Из этого правила есть очень много исключений: клетки многих эукариот, классифицируемых сегодня в составе протистов, окрашены, поскольку являются фототрофными, многие имеют клеточные стенки. Такая ситуация объясняется изменением подхода к систематике организмов: на первое место вышли филогенетические критерии систематики, а фенотипические, даже столь весомые как способность к фотосинтезу, тип питания и способность к движению (которые, кстати, до сих пор являются определяющими при разграничении животных и растений), утратили свое значение.

Стоит напомнить, что протисты – самая разнообразная и филогенетически неоднородная группа эукариот. Все же попытаемся назвать их наиболее характерные признаки:

– организм представлен либо одной клеткой, либо колониальной формой, но не имеющей дифференцированных тканей;

– большинство представителей способно к фаготрофному типу питания;

– большинство в состоянии передвигаться;

– не имеют ригидной клеточной стенки.

В настоящее время описано более 80 000 видов протистов. Обитают они в морских и пресноводных водоемах, а также в почве.

Многие ведут паразитический образ жизни, являясь возбудителями тяжелых заболеваний человека и животных.

Средний размер клеток протистов составляет 50–150 мкм, но встречаются и более мелкие представители (до 10 мкм для многих паразитирующих видов), а также гигантские формы, достигающие нескольких сантиметров (фораминиферы, грегорины).

Среди протистов есть виды, характеризующиеся непостоянной формой клеток, которая меняется за счет перетекания цитоплазмы и образования ложноножек (амебы), но большинство все же представлено видами с относительно постоянной формой тела, которая обусловлена наличием опорных структур. Среди подобных структур наиболее распространенной является **пелликула** (гибкий спиралевидный слой белковых фибрилл, обеспечивающих передвижение клеток за счет изменения формы). Толщина и степень эластичности пеллikулы у разных протистов неодинаковы.

Некоторые гетеротрофные протисты содержат в клетках одно ядро, другие – два и более. Причем в последнем случае ядра могут быть идентичными либо нет. У многих представителей есть **макронуклеус** (бóльшее ядро) и один или несколько **микронуклеусов** (меньшие по размеру ядра). Макронуклеус обычно контролирует процессы жизнедеятельности клетки, а микронуклеус обеспечивает репродукцию макронуклеуса.

Размножаются протисты в основном неполовым путем, в большинстве случаев с помощью разных форм деления клетки. Некоторые представители способны также к разнообразным формам полового процесса.

Многие протисты на определенной стадии жизненного цикла формируют покоящиеся формы – **цисты**, которые характеризуются очень низкой метаболической активностью. Цисты обычно снабжены клеточной стенкой, которой нет у вегетативных форм. В форме цист протисты переживают неблагоприятные условия среды: голодание, высушивание, отсутствие молекулярного кислорода, изменения pH и др. Большую роль цисты играют в процессах передачи болезнетворных форм человеку.

§ 8.1. Эвгленозои (Euglenozoans)

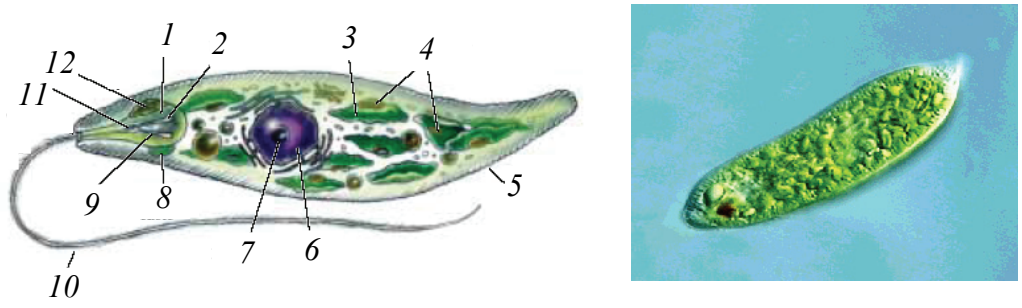
Типовые роды: *Trypanosoma*, *Euglena*.

Эвгленозои представляют собой разнообразную группу одноклеточных жгутиковых эукариот, отличающихся от остальных протистов присутствием в составе жгутиков кристаллического стержня, функции

которого неизвестны. Эта группа включает фототрофные и гетеротрофные формы с одним-двумя, реже с несколькими жгутиками, выходящими из дна жгутикового резервуара. Описано около 2000 видов этих протистов, среди которых встречаются свободноживущие формы, комменсалы позвоночных и беспозвоночных животных, паразиты животных и растений. Среди эвгленозой различают кинетопластид и эвгленид.

Эвгленоиды (Euglenids). В отличие от трипаносом, эвгленоиды являются непатогенными и фототрофными протистами, обитающими исключительно в водных экосистемах. У эвгленовых водорослей в хлоропластах преобладают хлорофиллы *a* и *b*, что делает их похожими на зеленые водоросли. Однако запасным веществом служит не крахмал, а парамилон (полимер глюкозы с β(1→3)-гликозидными связями). Имеются и другие отличия. Все эвгленовые – одноклеточные, содержащие 1–3 перистых жгутика. Они не имеют ригидной клеточной стенки, под плазматической мембраной у них находится уже упоминавшаяся в этой главе пелликула. Размножаются эвгленовые делением, половое размножение неизвестно.

Название типа происходит от широко распространенного рода *Euglena* (эвглена), представители которого обитают преимущественно в пресных водоемах, богатых органикой, и часто обусловливают их цветение. Длина этих водорослей составляет 4–500 мкм, форма клеток чаще веретеновидная (рис. 8.1), реже – овальная или вытянутая.



а *б*

Рис. 8.1. *Euglena gracilis*:
а – строение клетки: *1* – глотка; *2* – базальное тельце;
3 – хлоропласт; *4* – парамилоновые гранулы; *5* – пелликула;
6 – ядро; *7* – ядрышко; *8* – сократительные вакуоли;
9 – короткий жгутик; *10* – длинный жгутик;
11 – основание жгутика; *12* – глазок;
б – микрофотография

Клетки эвглен сложно организованы: имеют множество мелких хлоропластов, сократительную вакуоль, стигму, парамилоновые гранулы, ядро с ядрышком, остальные присущие эукариотам органеллы, длинный и короткий жгутики, глотку (рис. 8.1). Сократительная вакуоль собирает избыток воды из всех частей клетки и выбрасывает ее в глотку (выделительный орган). Стигма обеспечивает эвгленам способность к фототаксису.

Эвгленовым водорослям свойственно автотрофное и гетеротрофное (сапротрофное) питание. В последнем случае питательные вещества поступают в клетку в растворенном виде, всасываясь всей ее поверхностью (осмотрофный тип). Некоторые виды характеризуются также фаготрофным способом питания. Известны ауксотрофные представители эвглен, зависимые по витаминам B_{12} и B_1.

Если эвглен долго культивировать в подходящей питательной среде в темноте, они могут утрачивать хлоропласты и неограниченно долго демонстрировать гетеротрофный тип питания, ничем не отличаясь в этом случае от простейших.

Практическое значение эвгленовых водорослей, которых насчитывается до 900 видов, определяется, с одной стороны, их способностью к миксотрофному питанию, что позволяет им участвовать в самоочищении водоемов, загрязненных органикой. С другой стороны, наличие большого количества эвглен в водоеме служит индикатором его загрязненности, а неприхотливость и легкость культивирования этих водорослей позволяет использовать их для биоиндикации токсикантов. С помощью зависимых по витаминам эвглен можно также определять содержание этих соединений в растворах.

Среди гетеротрофных представителей с фаготрофным типом питания следует упомянуть свободноживущих перанем (*Peranema* spp.). Эти простейшие по строению клетки очень похожи на эвглен, но окончательно утратили способность к фотосинтезу и перешли к хищническому образу существования. Возле глотки у них имеется палочковый аппарат, палочки которого при соприкосновении с жертвой (бактерии, дрожжи) вонзаются в нее, передняя часть глотки расширяется и обволакивает добычу, а палочки проталкивают ее в глотку.

§ 8.2. Альвеоляты (Alveolates)

Инфузории (Ciliata). Эта группа наиболее сложно организованных одноклеточных протистов отличается тем, что входящие в состав представители на всех или некоторых стадиях жизненного цикла

покрыты разнообразно расположенными рядами ресничек (рис. 8.2, 8.3). Координированное колебание ресничек обеспечивает передвижение клеток в воде, а также помогает загонять частицы пищи в ротовое отверстие (**цитостом**).

Размножаются инфузории различными половыми и бесполыми способами. Бесполое размножение в большинстве случаев осуществляется путем бинарного деления, а половое – в ходе конъюгации. Ядерный аппарат представлен двумя или несколькими ядрами двух типов – полиплоидного макронуклеуса и диплоидного микронуклеуса (рис. 8.2). Макронуклеус обусловливает бесполое размножение, а микронуклеус – половое.

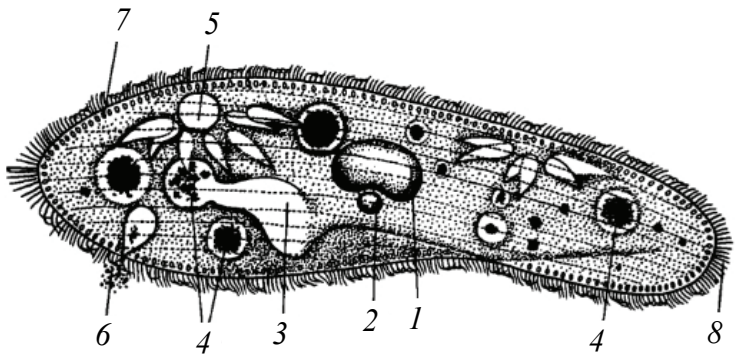


Рис. 8.2. Строение клетки *Paramecium caudatum*:
1 – макронуклеус; *2* – микронуклеус; *3* – цитостом;
4 – пищеварительные вакуоли; *5* – сократительная вакуоль;
6 – непереваренные остатки пищи, выводящиеся наружу
через порошицу; *7* – трихоцисты; *8* – реснички

Известно около 7500 видов инфузорий, которые обитают в пресноводных и морских водоемах, а также в почве. Это одни из самых крупных свободноживущих простейших: размеры некоторых особей могут достигать 2 мм в длину. Инфузории высокоустойчивы к различного рода загрязнениям, благодаря чему находят применение в очистке сточных вод, являясь компонентами активного ила аэротенков. Наиболее распространенными и изученными считаются следующие роды: *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Vorticella*, *Stentor*, *Didinium* (рис. 8.3).

Все свободноживущие инфузории осуществляют фаготрофный тип питания, используя в качестве пищи другие микроорганизмы, в том числе инфузорий. Один из примеров – заглатывание инфузориями *Didinium* инфузорий-туфелек (*Paramecium caudatum*). Это крайний случай хищнических взаимоотношений, поскольку жертва крупнее

хищника, кроме того, оба являются представителями одного класса. При заглатывании парамеции клетка дидиния сильно раздувается, но процесс переваривания длится всего около 2 ч, после чего дидиний снова готов к охоте.

У большинства инфузорий пища поступает в цитоплазму в ходе эндоцитоза с помощью пищеварительных вакуолей, формирующихся одна за другой у основания цитостома. Вакуоли циркулируют в клетке с током цитоплазмы до тех пор, пока не закончится процесс пищеварения. Непереваренные остатки выбрасываются наружу через специальное отверстие на заднем конце клетки – **цитопрокт**.

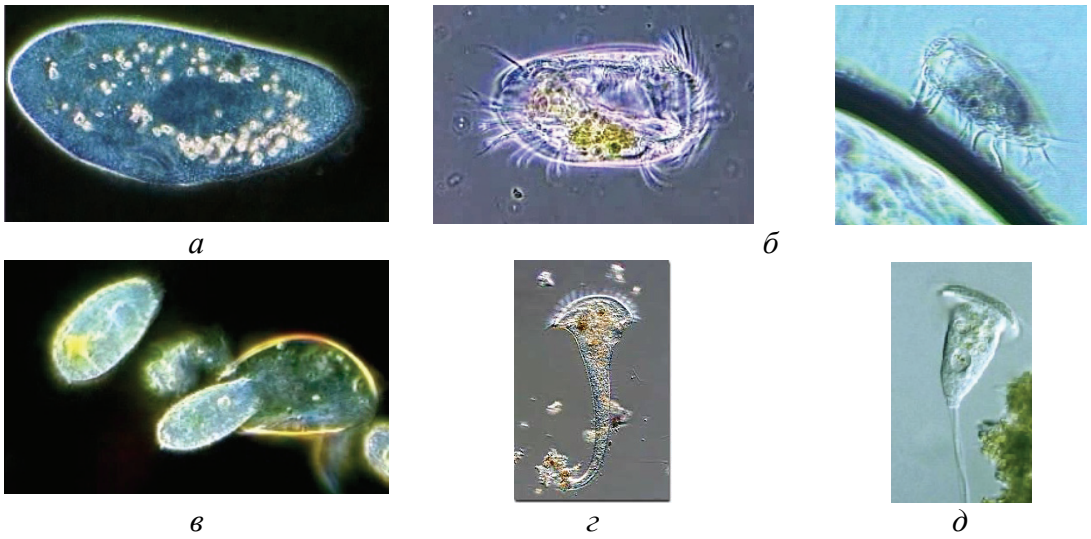


Рис. 8.3. Микрофотографии инфузорий:
а – Paramecium caudatum
(видны пищеварительные вакуоли и цитостом);
б – Euplotes (просматриваются сросшиеся реснички (цирри),
которые используются для передвижения по субстрату);
в – инфузории *Coleps*, поедающие рачка;
г – Stentor (трубач); *д – Vorticella* (сувойка)

Большую и интересную группу инфузорий представляют сидячие, прикрепленные к субстрату формы, известные как кругоресничные. Широко распространенными представителями этой группы являются сувойки (виды рода *Vorticella*). Сувойки напоминают цветок на длинном стебельке. Эти простейшие питаются бактериями, которых загоняют с помощью ресничного аппарата в цитостом. Расселение неподвижных бóльшую часть жизни сувоек осуществляется с помощью подвижных стадий – бродяжек, образование которых связано с бесполым размножением.

§ 8.3. Страменофилы (Stramenophiles)

Типовые роды: *Phytophthora*, *Nitzschia*, *Dinobryon*.

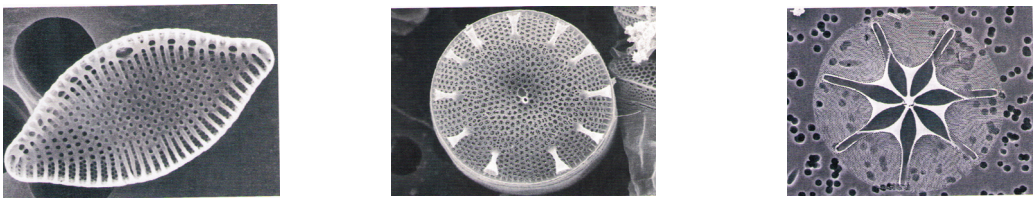
Группа иначе называется Хромисты (Chromista), включает как хемоорганотрофные, так и фототрофные организмы, содержащие перистые жгутики. Основными филогенетическими ветвями страменофилов являются оомицеты, диатомовые, золотистые и бурые водоросли. Бурые водоросли здесь не рассматриваются, поскольку все они являются многоклеточными и не относятся к числу микроорганизмов.

Диатомеи (Diatoms). Эта группа насчитывает более 100 000 видов в основном одноклеточных морских и пресноводных фототрофных организмов. Они имеют уникальные двустворчатые панцири, состоящие из кремнезема ($SiO_2 \cdot nH_2O$) и формирующие две половинки, вставляющиеся одна в другую. Створки панциря имеют тонкую орнаментацию, выглядят очень красиво, отличаются поразительным разнообразием и тончайшей филигранностью (рис. 8.4).

Диатомеи играют очень важную роль в трофических связях водных организмов, являясь основным компонентом фитопланктона, а также придонных осадков. Будучи фотосинтезирующими организмами, они служат главным источником пищи для пресноводных и морских животных. Считается, что на их долю приходится до четверти всего совершаемого на нашей планете фотосинтеза.

Хлоропласты диатомей содержат хлорофиллы *a* и *c*, а также фукоксантин. Размножение в основном бесполое – путем деления клетки. Запасным веществом служит лейкозин.

У диатомей жгутиковая стадия представлена только мужскими гаметами (у некоторых видов). Поэтому подвижные формы передвигаются за счет направленного перетекания цитоплазмы в районе шва панциря, в котором цитоплазма и мембрана граничат с окружающей средой.



а *б* *в*

Рис. 8.4. Диатомеи:
а – Nitzschia sp. с билатеральной симметрией панциря;
б – Thalassiosira sp. с радиальной симметрией панциря;
в – Asteriolampra sp. с радиальной симметрией панциря

При отмирании клеток кремниевые скелеты не разрушаются, они накапливаются в течение сотен миллионов лет на дне водоемов. Эти отложения называют диатомовым илом и используют в качестве абразивного материала для полировки, а также для фильтрования.

Золотистые водоросли (Golden algae). Иначе эти водоросли называются Хризофиты (Chrysophyta). Насчитывается более тысячи описанных видов золотистых водорослей, большинство из которых представлено подвижными за счет жгутиков одноклеточными формами, однако встречаются и нитевидные, и колониальные виды (например, представители рода *Dinobryon*). Некоторые имеют амебоидное строение клеток и отличаются от амеб только наличием хлоропластов. Они в большом количестве присутствуют в соленых и пресных водоемах и служат основным источником питания для зоопланктона. Их особенностью является способность легко переключаться с автотрофного на гетеротрофный тип питания при отсутствии подходящего освещения или при изобилии легкоусвояемой органики. Поэтому их относят к факультативным гетеротрофам. Многие золотистые водоросли способны питаться бактериями. Запасным веществом хризофитов служит хризоламинарин (от этого слова происходит название отдела). Фотосинтетические пигменты представлены хлорофиллами *a* и *c*, а также каротинами и ксантофиллами, которые придают клеткам золотисто-коричневый оттенок. Размножение у большинства золотистых водорослей бесполое – с помощью зооспор.

§ 8.4. Амебозои (Amoebozoa)

Типовые роды: *Amoeba*, *Entamoeba*, *Physarum*, *Dictyostelium*.

Амебозои представляют разнообразную группу наземных и водных протистов, использующих похожие на лопасти псевдоподии (ложноножки) для передвижения и питания. Основными филогенетическими ветвями являются голые амебы, энтамебы, клеточные и плазмодиальные слизевики.

Голые амебы (Gymnamoebae). Это свободноживущие протисты, занимающие водные и наземные местообитания. Используют фагоцитоз: захватывают псевдоподиями клетки бактерий, протистов, органику. Амебоидное движение осуществляют за счет перетекания цитоплазмы и формирования ложноножек. Виды рода *Amoeba* – обычные обитатели пресноводных стоячих водоемов. Размеры клеток варьируют от 15 до 750 мкм.

Энтамебы (Entamoebae). В отличие от голых амеб, энтамебы являются паразитами позвоночных и беспозвоночных животных, заселяют ротовую полость или кишечный тракт. Несколько видов энтамеб инфицируют человека. Например, *Entamoeba histolytica* вызывает амебную дизентерию. Этот паразит передается от человека человеку в форме цист через контаминированную фекалиями воду, пищу, посуду. Размножение осуществляется бесполым путем в ходе бинарного деления.

Слизевики (Slime molds). Слизевики ранее классифицировали вместе с грибами, отсюда и название этих микроорганизмов – слизистые плесени. Анализ малых рРНК слизевиков свидетельствует об их филогенетической удаленности от истинных грибов. Различают две группы слизевиков: клеточные и плазмодиальные слизевики. Общим для всех слизевиков является наличие сложного жизненного цикла, напоминающего таковой для грибов. В неблагоприятных условиях слизевики образуют спорангии, в которых развиваются споры, окруженные структурами, которые напоминают клеточную стенку. Попадая в окружающую среду, споры прорастают в **миксамебы**. В отличие от грибов, все слизевики характеризуются фаготрофным типом питания, а их вегетативные клетки лишены клеточной стенки (амебоидный тип) – признаки, сближающие слизевиков с простейшими.

Клеточные слизевики – это немногочисленная группа из 65 видов, представители которой бóльшую часть жизненного цикла существуют в виде отдельных клеток, имеющих клеточные стенки, богатые целлюлозой.

Бесполое размножение осуществляется спорами, которые созревают в особых плодовых телах – **спорокарпах**. В составе спорокарпов клетки характеризуются наличием клеточных стенок. Попав в благоприятные условия, споры прорастают в миксамебы – амебоидные клетки с псевдоподиями. По специфическому химическому сигналу, которым служит секретирующийся циклический аденозинмонофосфат (cAMP), миксамебы могут сливаться или агрегировать с образованием **псевдоплазмодия**, после дифференцировки которого формируется спорокарп. Часто у клеточных слизевиков встречается и половой тип размножения с участием макроцист.

Обитают эти микроорганизмы в почве, особенно много их в лесной подстилке. Там они питаются бактериями. Один из известных видов клеточных слизевиков – *Dictyostelium caveatum* является хищником других клеточных слизевиков.

Плазмодиальные слизевики (Myxomycetes) – наиболее многочисленная группа слизевиков, насчитывающая более 450 видов. Представители формируют миксамебы, или плавающие клетки. Оба этих типа клеток сливаются с формированием **плазмодия** – многоядерной «голой» протоплазмы, имеющей вид тонкой текучей массы. Плазмодий передвигается как амеба, поглощая и переваривая клетки бактерий, дрожжей, споры грибов, мелкие частицы разлагающейся органики. По мере роста плазмодия в нем происходит многократное синхронное деление ядер. Движущийся плазмодий напоминает по форме веер с текучими протоплазматическими трубочками.

В неблагоприятных условиях плазмодий дифференцируется на ряд мелких бугорков, каждый из которых превращается в спорангий. После мейоза в спорангиях развиваются гаплоидные половые споры. Эти споры не только обеспечивают перекомбинирование генов, но и являются факторами сохранения вида, поскольку устойчивы к экстремальным условиям внешней среды. Споры прорастают либо в миксамебы, либо в подвижные за счет двух жгутиков клетки. Слияние этих клеток дает зиготу, превращающуюся в плазмодий.

§ 8.5. Красные и зеленые водоросли

Красные и зеленые водоросли – две крупные филогенетические ветви, наиболее близкородственные растениям (см. рисунок на с. 98). Их представители получили хлоропласты в результате первичного эндосимбиоза при захватывании эукариотической гетеротрофной клеткой цианобактерий. Поскольку цианобактерии осуществляют оксигенный фотосинтез, все виды названных групп также используют этот способ запасания энергии.

Красные водоросли. Иначе красные водоросли называются Родофиты (Rhodophyta) и включают виды, в клетках которых есть особый класс фотосинтетических пигментов – **фикобилинов** (фикоцианин и фикоэритрин), придающих им красную окраску (поэтому их еще называют багрянками). Эти вспомогательные пигменты маскируют цвет основного фотосинтетического пигмента – хлорофилла *a*. Преобладающим резервным веществом багрянок является крахмалоподобный полисахарид.

Клеточные стенки этих водорослей содержат целлюлозу или другие полисахариды, погруженные в слизистый матрикс, который представлен, в свою очередь, агаром или каррагинаном. Эти компоненты

делают красные водоросли гибкими и скользкими на ощупь. Некоторые багрянки откладывают в клетках карбонат кальция, что придает им жесткость. Такие формы играют важную роль в формировании коралловых рифов.

Красные водоросли не имеют жгутиков, большинство ведет неподвижный образ жизни в прикрепленном к камням или другим водорослям состоянии. Отдел объединяет преимущественно многоклеточные формы и насчитывает порядка 6000 видов.

Багрянки отличаются особым типом полового размножения с помощью оогамии, причем их жизненные циклы довольно сложные: включают гаплоидную и две различающиеся по строению и функциям диплоидные фазы.

Большинство представителей этого отдела обитают в соленых водоемах. Их основное хозяйственное значение состоит в том, что они образуют агар, который находит применение в изготовлении капсул для лекарственных препаратов, в косметике, в пищевой промышленности (желирующее вещество, добавка к хлебобулочным изделиям, предотвращающая их черствление), в микробиологической практике в качестве уплотнителя питательных сред. Другой полисахарид, образуемый красными водорослями, – каррагинан используют для стабилизации эмульсий красок, косметических средств и молочных продуктов (пудингов). Красная водоросль *Porphyra* культивируется в Японии и употребляется в пищу.

Редкие одноклеточные формы красных водорослей представлены видами родов *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* и *Galdieria*. Они являются экстремофилами, обитают в кислых горячих источниках с температурой воды 35–56°С и значением pH 0,5–4,0. В таких условиях другие фототрофные организмы не могут существовать.

Зеленые водоросли иначе называются Хлорофиты (Chlorophyta). Их хлоропласты содержат хлорофиллы *a* и *b*, придающие клеткам характерную зеленую окраску. Это самая многочисленная и самая разнообразная группа водорослей как по морфологии, так и по физиологическим особенностям; она насчитывает около 20 000 видов. Ее представители могут быть одноклеточными (некоторые колониальные), а также многоклеточными. Большинство – одноядерные, но встречаются и ценоцитные формы. Каротиноиды в хлоропластах многих одноклеточных зеленых водорослей формируют скопление в виде «глазка» (стигмы). Многие виды содержат в клетках сократительные вакуоли, участвующие в осморегуляции. Одноклеточные формы обычно подвижны за счет двух одинаковых жгутиков. Основным

резервным материалом зеленых водорослей является крахмал, а клеточные стенки большинства видов состоят из целлюлозы. Эти признаки в совокупности с химическим составом фотосинтезирующих пигментов и некоторыми особенностями строения отдельных клеточных элементов делают зеленые водоросли очень похожими на растения. Кроме того, как и у растений, у зеленых водорослей наблюдается смена генераций в жизненном цикле. Подобное сходство позволяет считать зеленые водоросли непосредственными предками наземных растений. Исследование малых рРНК показало, что отдельные представители данной группы, в частности харовые водоросли, даже ближе по степени филогенетического родства к растениям, чем к другим водорослям.

Многие многоклеточные морские водоросли данной группы достигают внушительных размеров (более 8 м в длину). Они способны впитывать воду и растворенные в ней питательные вещества всей поверхностью таллома (осмотрофный тип), а водная толща поддерживает таллом в «парящем» состоянии. Поэтому они не нуждаются в необходимых растениям специализированных органах и сосудистых тканях. В отличие от растений, для зеленых водорослей не характерна дифференцировка тканей, хотя некоторые талломы могут включать клетки нескольких типов.

Зеленые водоросли распространены в основном в пресноводных водоемах, однако встречаются также в морских местообитаниях, в почве, на стволах деревьев, а некоторые, как, например, отдельные виды *Chlamydomonas* (рис. 8.5), способны развиваться на снегу.

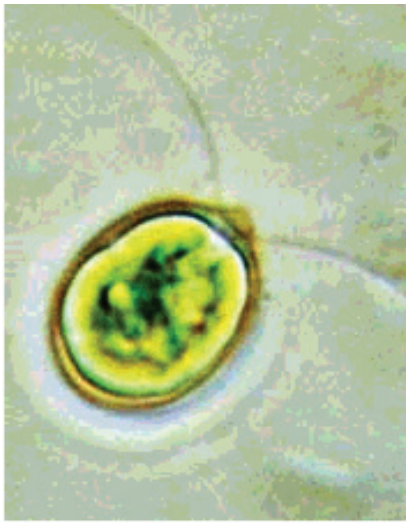


Рис. 8.5. Подвижные клетки *Chlamydomonas* sp.

Неподвижные, одноклеточные, мелкие водоросли рода *Chlorella* – первые из выращиваемых в культуре водорослей, которые стали модельным объектом для изучения закономерностей фотосинтеза. Известны витаминизированные добавки из хлореллы, которые используются в качестве источника витаминов, белка, макро- и микроэлементов. Среди колониальных представителей можно упомянуть род *Volvox*. Колонии вольвокса имеют сферическую форму и включают до 60 000 двужгутиковых клеток, среди которых преобладают вегетативные клетки, но содержится также небольшое количество репродуктивных форм (гонидий). Таким образом, между клетками колонии наблюдается разделение функций, кроме того, они располагаются в сфере особым образом, так что можно рассматривать их как многоклеточные организмы с намечающейся дифференцировкой клеток.

Одним из наиболее хорошо изученных родов зеленых водорослей является спирогира (*Spirogira*), нитчатые талломы которой часто формируют слизистые скопления на поверхности пресных водоемов. Еще один распространенный род зеленых водорослей *Ulva* известен под названием «морской салат» и употребляется в пищу как зелень.

Глава 9

НЕКЛЕТОЧНЫЕ ФОРМЫ ЖИЗНИ

Неклеточные формы живой материи занимают обособленное положение в системе классификации существ, населяющих нашу планету (см. рисунок на с. 4), поскольку кардинально отличаются от клеточных форм своей организацией и способами воспроизведения. В отношении многих из них продолжается научная полемика, призванная решить: стоит ли относить эти объекты к живой материи и чем определяется граница, отделяющая живое от неживого? Тем не менее в настоящее время вирусы, вироиды, прионы и некоторые другие неклеточные организмы являются объектами микробиологии. Наиболее глубоко и всесторонне из представителей этой группы изучены вирусы, для них установлены как раз те особенности, которые отличают их и от клеточных организмов, и от неживой материи.

§ 9.1. Вирусы

Особенности организации вирусов. Вирусы – самые многочисленные обитатели нашей планеты. Их основными отличительными особенностями являются следующие:

1) имеют неклеточную организацию;

2) являются облигатными внутриклеточными паразитами, поскольку способны репродуцироваться только в живой клетке;

3) для них не характерно понятие «обмен веществ», так как они не имеют собственного белоксинтезирующего аппарата, механизмов запасания энергии, поглощения и выделения веществ и т. п.;

4) для вирусов не применимо понятие «физиология», поскольку они не растут, не питаются, даже не размножаются как клеточные организмы, а лишь репродуцируются (тиражируются). Особенностями подобной репродукции является то, что все образующиеся в инфицированной клетке вирусные частицы имеют одинаковую

структуру, возраст и размер, при этом материнской вирусной частицы не существует;

5) содержат нуклеиновую кислоту лишь какого-то одного типа: либо ДНК, либо РНК, и никогда – обоих типов.

Перечисленные свойства делают вирусы столь не похожими на известные клеточные организмы, что возникает вопрос: почему же эти объекты рассматривает биология? Ответом могут служить следующие особенности вирусов:

– они все же способны к воспроизведению себе подобных частиц, хоть и с участием клеточных систем, т. е. обладают наследственностью;

– вирусы характеризуются изменчивостью. Это можно проследить на примере вируса гриппа группы А, который незначительно «меняет» свою антигенную структуру каждый год, благодаря чему способен инфицировать людей, переболевших гриппом год назад. Более существенные изменения антигенных структур этого вируса происходят каждые 10–15 лет, и это совпадает с пандемиями гриппа (Сингапур, 1957 г.; Гонконг, 1968 г., Виктория, 1972 г.);

– способность приспосабливаться к меняющимся условиям среды (адаптация);

– приуроченность к определенным экологическим нишам, которая выражается в специфичности вирусов к хозяевам: например, вирус бешенства инфицирует только млекопитающих, бактериофаг Т4 – только бактерии группы кишечной палочки и т. п.

Перечисленные свойства характерны для всех живых существ и отличают живое от неживого.

Таким образом, очевидно, что вирусы характеризуются рядом признаков, делающих их и похожими, и непохожими на остальные организмы. Наиболее метко сказал об этом французский микробиолог и биохимик Андре Львов (Andre Lwoff): «Вирусы – это вещества со свойствами существа или существа со свойствами вещества».

Неоднозначному суждению о природе вирусов во многом способствовала история становления представлений о них. В 1892 г., когда Дмитрий Иванович Ивановский доложил, что агент, ответственный за развитие болезни табака (табачной мозаики), способен проходить через бактериологические фильтры, стало очевидным его небактериальное происхождение, и многие микробиологи сразу посчитали его объектом неклеточной природы. Позже Мартин Бейеринк (M. W. Beijerink) показал, что вирусные частицы способны диффундировать через агаровые гели и сохранять инфекционность после осаждения спиртом, а Стэнли (W. M. Stanley) сумел получить кристаллы

вирусных частиц, похожие на кристаллы белка, что послужило основанием для предположения о белковой (неживой) природе вирусов. Лишь обнаружение несколькими годами позже нуклеиновой кислоты в составе частиц вируса табачной мозаики пролило свет на истинную природу этого агента: стало понятно, что он представляет собой нуклеопротеидный комплекс.

После вирусов растений были открыты вирусы животных, а позже – бактерий. Последние названы бактериофагами (буквально означает «пожиратели бактерий»). Вирусология получила мощный толчок для развития в 40-х гг. XX в. после изобретения электронного микроскопа.

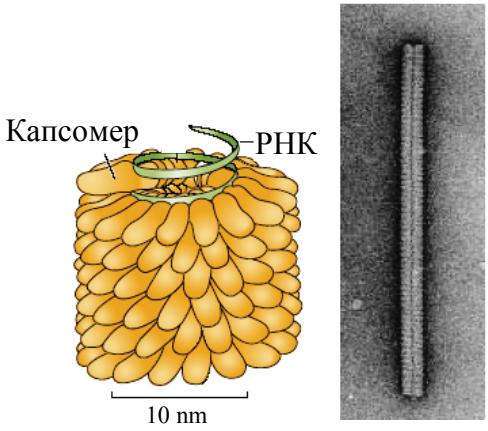
Строение вирусов. Вирусы могут существовать в виде внеклеточных и внутриклеточных форм. Внеклеточная вирусная частица называется **вирионом**. Размеры вирионов колеблются от 15 до 300 нм в диаметре, так что рассмотреть большинство из них можно только в электронный микроскоп.

Основными структурными частями вириона являются: нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) – носитель генетической информации и **капсид**, состоящий из белковых субъединиц (**капсомеров**), выполняющий защитную функцию, а также участвующий в процессах адсорбции вириона на клетке. Таким образом, вирусная частица представляет собой нуклеокапсид.

Геном вирусов обычно очень маленький и кодирует только функции, нужные для инфицирования клеток-хозяев и адаптации. Он может состоять из линейной или циклической однонитевой или двухнитевой ДНК, линейной однонитевой или двухнитевой РНК. Вирусные гены могут содержаться в одной, заключенной в капсид, молекуле нуклеиновой кислоты либо в нескольких. В последнем случае говорят, что геном вируса сегментированный.

Капсиды вирусов иногда состоят из одного типа белка, в других случаях – из нескольких. При этом капсомеры в составе капсида организованы особым образом, в результате чего вирионы приобретают упорядоченное геометрическое строение: они обладают определенным типом симметрии (спиральным, кубическим или комбинированным). Капсиды со спиральной симметрией, как, например, у вируса табачной мозаики, построены из капсомеров, уложенных по спирали, и имеют форму жесткого цилиндрического полого стержня (18×300 нм). Молекула РНК расположена между витками капсомеров таким образом, что не соприкасается с полостью стержня и защищена со всех сторон белком. Так устроены палочковидные вирионы (рис. 9.1). Спиральный тип симметрии имеют также нитевидные вирионы. Они

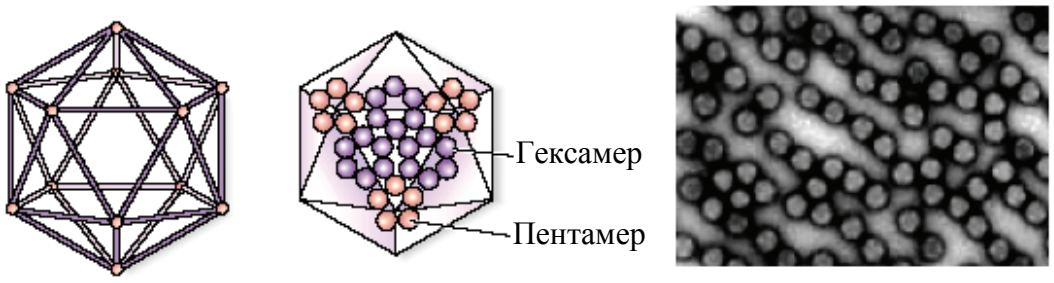
отличаются от палочковидных бóльшим шагом между витками спирали и бóльшей гибкостью, в результате чего имеют вид изогнутых нитей (колифаг fd, вирусы свеклы, картофеля).



а *б*

Рис. 9.1. Схематическое изображение вириона (*а*) и электронная микрофотография вируса табачной мозаики (*б*)

Вирусы, обладающие кубическим типом симметрии, выглядят сферическими, хотя фактически имеют форму многогранников. Их капсиды обычно состоят из нескольких белковых субъединиц, формирующих пентамеры, гексамеры или и те, и другие, объединенные в более сложные структуры. Наиболее частой формой полиэдрических капсидов является **икосаэдр** – геометрическая фигура, построенная из 20 равносторонних треугольников (рис. 9.2, *а*). Икосаэдрические вирионы характерны для вируса герпеса, риновирусов (возбудителей простудных заболеваний), вируса некроза табака и др.



а *б* *в*

Рис. 9.2. Икосаэдрические вирионы:
а – фигура икосаэдр;
б – расположение субъединиц белков (капсомеров) в капсиде с кубическим типом симметрии;
в – вирионы с кубическим типом симметрии

Комбинированный тип симметрии характерен, прежде всего, для бактериофагов. На рис. 9.3 представлена структура составного фага Т4 кишечной палочки, вирион которого состоит из икосаэдрического капсида и сократимого отростка со спиральным типом симметрии. В капсиде расположена линейная двухнитевая ДНК. Полый стержень внутри сократимого чехла служит каналом, через который ДНК инъецируется в клетку. Базальная пластинка и шипы используются на стадии адсорбции вирусной частицы на клеточной поверхности.

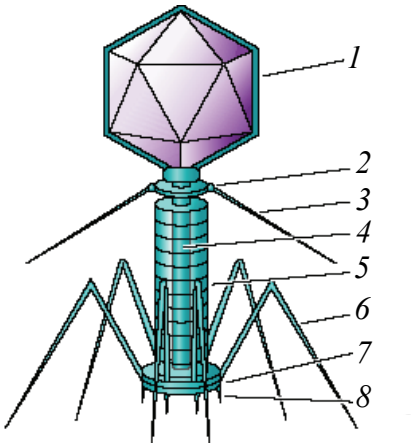


Рис. 9.3. Структурные части вириона бактериофага Т4 с комбинированным типом симметрии:
1 – головка; *2* – воротничок; *3* – усы; *4* – полый стержень; *5* – чехол; *6* – нити; *7* – базальная пластинка; *8* – шипы

Кроме описанных выше, существуют вирионы с длинными и короткими несократимыми отростками, с фибриллярными отростками на поверхности полиэдрических капсидов и др. Все эти вирионы относятся к группе простых, поскольку они не заключены в дополнительную оболочку.

В противоположность простым, сложные вирионы имеют на своей поверхности мембранную структуру в виде дополнительной оболочки, которая называется **суперкапсидом**. Эта структура может маскировать вирус, предохраняя его от распознавания клеткой-хозяином, а значит, и от уничтожения. Кроме того, суперкапсиды играют особую роль в инициации прикрепления вириона к клеточной поверхности. Суперкапсид состоит из фосфолипидов и белков, причем часть этих компонентов (в первую очередь липиды и гликопротеины) вирион получает из состава ядерной или плазматической мембраны клетки, когда покидает ее в ходе почкования. Другая часть

компонентов суперкапсида (преимущественно специфические белки) определяется вирусными генами. Это те белки, которые используются для прикрепления вируса к клетке. Суперкапсиды характерны в основном для вирионов животных (вирусы гриппа, чумы птиц, оспы, паротита, иммунодефицита человека) и не присущи вирусам растений.

Важно отметить особую устойчивость вирусных частиц к факторам окружающей среды, что объясняется, во-первых, чрезвычайной простотой организации вирусов, а во-вторых, особыми свойствами белков капсидов. В этих глобулярных белках концевые пептидные группы защищены либо путем ацетилирования, либо благодаря особой укладке, так что не подвержены воздействию протеаз. Кроме того, они обеспечивают вирусам устойчивость к ряду физических и химических агентов. В частности, вирус полиомиелита выдерживает изменение pH в диапазоне от 1,6 до 10,0; обработку 0,5%-ным раствором фенола, 50%-ным раствором сернокислого аммония, эфиром, ацетоном и др.

В вирионах большинства вирусов не содержатся ферменты. Однако есть исключения, касающиеся в основном сложных вирусов: у некоторых из них обнаружены лизоцим, аденозинтрифосфатаза, ферменты, участвующие в репликации вирусной нуклеиновой кислоты, и некоторые другие.

Номенклатура и классификация вирусов. Правила номенклатуры и классификации вирусов разрабатывает, а также осуществляет надзор за их использованием Международный комитет по таксономии вирусов. Для классификации вирусов применяются следующие таксономические единицы (указаны в порядке укрупнения): виды → роды → семейства → подсемейства → порядки. Виды, в свою очередь, могут подразделяться на подвиды, подвиды – на штаммы. В настоящее время утверждено 6 порядков, 19 подсемейств, 87 семейств, 348 родов и 2285 видов вирусов.

Для классификации вирусов в качестве основных критериев используют признаки: тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), число цепей в нуклеиновой кислоте, способ транскрипции генома, тип симметрии вириона, наличие суперкапсида, круг хозяев. Дополнительными признаками служат:

1) особенности морфологии вирионов (наличие и тип отростков, шипов, их длина, особенности строения);

2) физико-химические свойства (молекулярная масса вириона, константа скорости седиментации, устойчивость к действию температуры, значений pH, катионов, детергентов, иррадиации и др.);

3) особенности генома (последовательность нуклеотидов, размер, линейный или циклический геном, смысловая или антисмысловая РНК, число сегментов в геноме, процент гуанин-цитозиновых пар);

4) особенности организации белков, липидов, функции ферментов (если имеются), аминокислотная последовательность белков и др.;

5) способ взаимодействия с клетками-хозяевами, симптомы заболевания, серотип.

Для наименования вирусов в настоящее время применяется официальная и неофициальная номенклатура, причем и в той, и в другой не используются биноминальные латинские названия.

Официальная номенклатура вирусов предписывает написание названий семейства, подсемейства и рода вируса с заглавной буквы *курсивом*, после чего называется сам вирус (его вид) со строчной буквы прямым шрифтом. Неофициальная номенклатура (общеупотребимая) не требует использования заглавных букв и курсива для обозначения таксонов, например семейство пикорнавирусов. Сами вирусы (их виды) имеют тривиальные названия, в которых обозначается круг хозяев, симптомы или название заболевания, а для вирусов микроорганизмов часто вводят номерные и буквенные символы, например: вирус бешенства млекопитающих, вирус гриппа человека, вирус табачной мозаики, колифаг fd, бактериофаг T4 *E. coli*, бактериофаг P1, фаг энтеробактерий PRD1.

Взаимодействие вирусов с представителями разных царств. Вирусы способны поражать представителей всех известных царств. Вирусы растений (фитопатогенные) в большинстве случаев содержат сегментированную РНК и не обладают активными системами внедрения в клетки. В растение они попадают обычно через повреждения клеточной поверхности и с помощью насекомых или нематод. Фитопатогенные вирусы вызывают более тысячи известных заболеваний растений. Наиболее типичными вирусными болезнями растений являются некрозы (появление участков мертвых тканей) и мозаики (появление пятен на листьях и стеблях). В большей степени от вирусных заболеваний страдают следующие возделываемые культуры: картофель, томаты, огурцы, горох, ячмень.

Вирусы животных и человека вызывают такие заболевания, как СПИД, грипп, ящур, бешенство, полиомиелит, гепатит, корь, некоторые виды рака. Среди этих вирусов есть ДНК- и РНК-содержащие. Они попадают в клетки обычно в ходе эндоцитоза.

Вирусы бактерий называются бактериофагами, или просто **фагами**. Они наиболее детально изучены, поскольку по сравнению с

другими вирусами легко культивируются. Большинство фагов содержат двухцепочечную ДНК. Некоторые фаги репродуцируются в клетках одного вида или штамма бактерий (обладают узким спектром литического действия), другие – во многих грамположительных и грамотрицательных бактериях (фаги-космополиты). Для большинства бактериальных видов известны специфические бактериофаги, однако наибольшее число исследований выполнено на фагах кишечной палочки (колифагах), и можно считать их модельными объектами. В таблице охарактеризовано несколько таких фагов.

Характеристика распространенных колифагов

Фаг	Тип симметрии капсида	Наличие суперкапсида	Тип нуклеиновой кислоты
λ (лямбда)	Комбинированный	Нет	Линейная двухнитевая ДНК
φ6	Кубический	Есть	Три сегмента двухнитевой РНК
fd	Спиральный	Нет	Циклическая однонитевая ДНК
T4	Комбинированный	Нет	Линейная двухнитевая ДНК
M13	Спиральный	Нет	Циклическая однонитевая ДНК
P1	Комбинированный	Нет	Циклическая двухнитевая ДНК

Некоторые из представленных в таблице бактериофагов используются для переноса генов между бактериями, а также в генетической инженерии в качестве основы для конструирования клонирующих векторов и для получения отдельных ферментов (например, геномы фагов λ и M13, лигаза фага T4).

По способу взаимодействия с клетками-хозяевами можно выделить два типа вирусов – **вирулентные** (литические) и **умеренные**. Вирулентные вирусы обусловливают **продуктивную инфекцию**, которая включает несколько характерных стадий и всегда заканчивается гибелью инфицированных клеток, в которых происходит тиражирование вирусных частиц. Закономерности продуктивной инфекции лучше всего изучены на примере бактериофагов, по отношению к которым данный процесс носит название **литический цикл** (рассмотрен ниже).

Умеренные вирусы взаимодействуют с клетками иначе: их нуклеиновая кислота может неограниченно долго поддерживаться в клетке, претерпевая синхронные с клеточной ДНК акты удвоения и наследуясь дочерними клетками, не приводя к их гибели. Такой процесс носит название **вирогения**, а его частный случай, характерный для бактериофагов, – **лизогения** (рассмотрен ниже).

Литический цикл. Продуктивная инфекция бактериофагов начинается со случайного столкновения их с клетками, поскольку фаги, как и остальные вирусы, не обладают органами движения и их перемещение происходит хаотически. Если на клеточной поверхности имеются специфические для данного фага участки (рецепторы), с которыми он способен связываться, наступает стадия адсорбции (рис. 9.4), которая в большинстве случаев необратима. Таким образом, между бактериофагом и чувствительной клеткой существует высокая степень специфичности: требуется связывание (химическое взаимодействие) между соответствующими сайтами на поверхности вирусной частицы и на поверхности клетки. Если на клетке отсутствуют рецепторы, специфические для данного вируса, она будет устойчивой к нему. Роль фаговых рецепторов на бактериальных поверхностях в большинстве случаев выполняют гликопротеины. На одной клетке может адсорбироваться несколько сотен фагов.

Рис. 9.4. Микрофотография адсорбированного на клеточной стенке *E. coli* вириона фага Т4

Вслед за адсорбцией следует проникновение вирусной нуклеиновой кислоты в клетку. У бактериофага Т4 это осуществляется в ходе инъекции: при адсорбции фага на клетке в сократимом чехле происходят конформационные изменения, в результате чего он сокращается, и полый стержень прокалывает клеточную стенку. Через полый стержень ДНК «впрыскивается» в периплазматическое пространство, а затем преодолевает мембранный барьер и оказывается в цитоплазме. Следует обратить внимание на то, что фаговый капсид при этом остается снаружи клетки и не принимает участия в дальнейших событиях, хотя может долго находиться прикрепленным к клетке («тень» фага). У вирусов растений и животных отсутствуют подобные приспособления для инъекции нуклеиновой кислоты в клетку и используются иные способы (см. выше). При этом иногда в клетки животных попадают целые вирионы (при

эндоцитозе). В таком случае происходит «раздевание» вирусной нуклеиновой кислоты с помощью специфических ферментов.

После проникновения вирусной нуклеиновой кислоты в клетку начинается так называемый **латентный** (скрытый) **период**, в течение которого осуществляется необратимая перестройка клеточного метаболизма на нужды вируса, но внешне это не обнаруживается. В самом начале латентного периода считываются **«ранние» гены** вируса и синтезируются **«ранние» белки**. Нуклеиновая кислота фага Т4, например, кодирует порядка 20 «ранних» белков, среди которых: нуклеаза, расщепляющая клеточную ДНК на мономеры, необходимые для синтеза фаговой ДНК; ферменты, блокирующие синтез клеточной мРНК и белка; полипептиды, «заставляющие» клеточные РНК-полимеразы синтезировать фаговые мРНК; ДНК-полимеразы, реплицирующие ДНК фага Т4, и др. Затем считываются **«средние»**, а во второй половине латентного периода – **«поздние» вирусные гены** и синтезируются **«средние»** и **«поздние» белки**, к числу которых относятся белки капсида, отростка, шипов и других составных частей вирионов, а также ферменты, в частности фаговые эндолизины. Латентный период длится всего несколько минут, после чего наступает стадия созревания, завершающаяся формированием зрелых вирусных частиц.

В ходе созревания вирусных частиц происходит, во-первых, воссоединение капсомеров с образованием капсидов. Отдельно формируются части отростков. Затем из этих структур комбинируются «пустые» вирионы, головки которых путем сложного механизма, под высоким давлением (в 10 раз превышающим давление в бутылке с шампанским) заполняются нуклеиновой кислотой. Все происходящие в процессе созревания события обеспечиваются продуктами вирусных генов. В одной клетке обычно формируется порядка 100 зрелых вирусных частиц, однако могут быть отклонения от этого числа в бóльшую и меньшую стороны.

Выход зрелых вирусных частиц из клеток осуществляется по-разному. Вирионы Т4 высвобождаются из клеток *E. coli* с помощью литического фермента – Т4-лизоцима, который разрушает пептидогликановый слой клеточной стенки. В результате плазматическая мембрана не выдерживает перепада осмотического давления и лопается (осмотический шок). Так зрелые фаговые частицы оказываются во внешней среде (рис. 9.5), где они могут адсорбироваться на чувствительных клетках и повторять весь процесс продуктивной инфекции. Длительность полного цикла взаимодействия большинства фагов с клетками колеблется от 20 до 60 мин, а вирусов животных – от 8 до 40 ч.

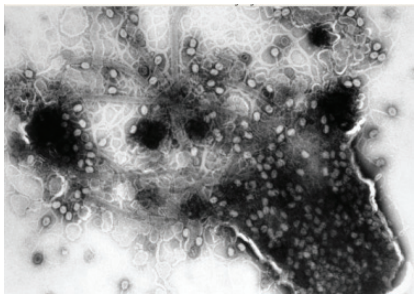


Рис. 9.5. Лизис клетки и выход зрелых фаговых частиц

Простые вирусы животных (не имеющие суперкапсида) высвобождаются из клеток также путем их лизиса. Кодируемые вирусным геномом протеины нарушают метаболизм клеточных макромолекул, что влечет за собой гибель и разрушение клеток. Сложные вирусы обычно покидают хозяйские клетки в ходе почкования, когда вирусная частица обволакивается плазматической мембраной, в состав которой включаются вирусные белки, – так формируются суперкапсиды вирионов (рис. 9.6). Некоторые вирионы могут отпочковываться от органелл, в которых они локализуются (ядро, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум). В этом случае они оказываются заключенными в мембранные везикулы, которые мигрируют к плазматической мембране и выделяются из клетки путем экзоцитоза. Независимо от способа высвобождения вирионов клетка после этого погибает (иногда спустя определенное время, как, например, при почковании). Причиной этого является необратимое нарушение ее метаболизма, в первую очередь – разрушение ДНК.

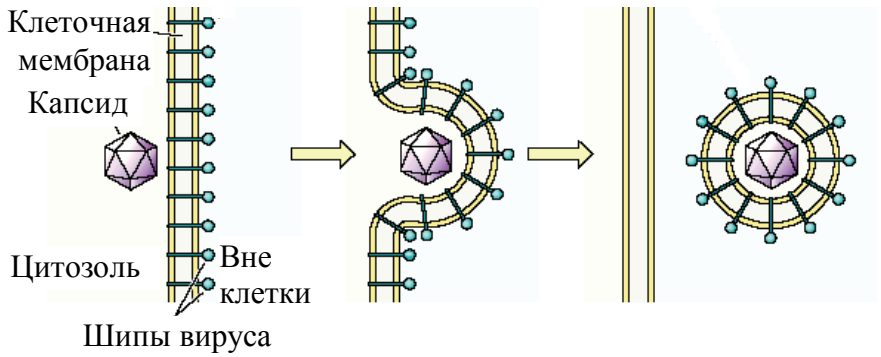


Рис. 9.6. Процесс формирования суперкапсида сложного вируса при выходе из клетки путем почкования

Лизогения. Это не менее распространенный способ взаимодействия фагов с бактериями, чем литический цикл, характерный для

умеренных бактериофагов. Первые несколько стадий лизогении (случайное столкновение фаговых частиц с бактериями, специфическая адсорбция и инъекция нуклеиновой кислоты в клетку) совпадают с таковыми для литического цикла. Затем события развиваются по иному сценарию.

Лучше всего явление лизогении изучено на примере взаимодействия фага λ с бактериями *E. coli*: обнаружено, что фаговые гены кодируют структуру четырех регуляторных белков, среди которых репрессорный белок cI (кодируется геном *cI*) блокирует развитие событий литического цикла, а антирепрессорный белок Cro (кодируется геном *Cro*), наоборот, запускает их. Когда ДНК фага λ попадает в клетку, выбор между литическим и лизогенным путями взаимодействия зависит от относительной скорости накопления регуляторных белков: если преобладает антирепрессорная функция белка Cro, то развиваются события литического цикла, если успевает проявиться функция репрессорного белка cI, литический цикл не осуществляется. Абстрагируясь от сложных регуляторных механизмов этого процесса, отметим лишь, что в последнем случае белок cI связывается с ДНК фага λ в особых участках, препятствуя транскрипции фаговых генов, ответственных за репликацию его ДНК и синтез его белков. При этом фаговая ДНК вступает в события сайт-специфической рекомбинации с хромосомой и встраивается в нее (интегрирует с клеточной ДНК). После этого ДНК фага λ реплицируется с клеточной ДНК как единая структура, и все дочерние клетки при делении получают копию фаговой ДНК в составе нуклеоида (рис. 9.7). Подобные клетки называются **лизогенными**, а нуклеиновая кислота умеренного фага в них – **профагом**.

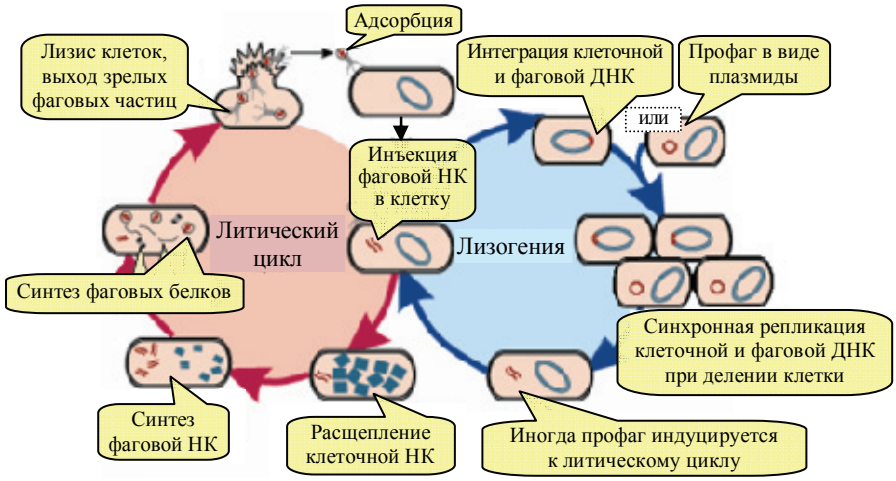


Рис. 9.7. Способы взаимодействия вирулентных и умеренных фагов с клетками бактерий

Состояние лизогении поддерживается благодаря постоянному образованию репрессорного белка cI и довольно неустойчиво: в любой момент может произойти переключение на литический путь из-за антирепрессорных функций белка Cro. Действительно, показано, что в популяции лизогенных бактерий в одной из 10^2–10^5 клеток происходит спонтанная индукция профага к литическому циклу, и эти клетки подвергаются лизису. Эффективность данного процесса зависит от множества условий: состояния бактерии-хозяина, разнообразных физических и химических факторов. Мощными индукторами перехода лизогения → литический цикл являются: ультрафиолетовое излучение и другие виды иррадиации, митомицин С, алкилирующие агенты, для некоторых фагов – температура. Выявить события индукции профага к литическому циклу можно, добавив к культуре лизогенных бактерий клетки чувствительных к данному фагу штаммов: на мутном «газоне» бактерий будут заметны негативные колонии фага (зоны лизиса чувствительных клеток, рис. 9.8).

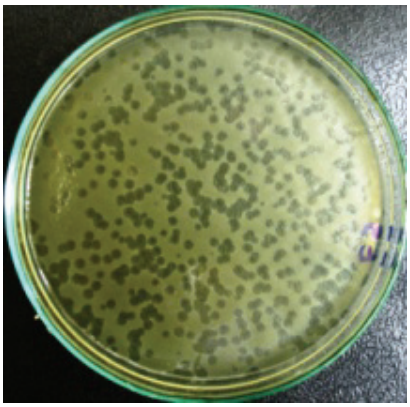


Рис. 9.8. Негативные колонии (бляшки) фагов на «газоне» чувствительных бактерий

Явление индукции профага к литическому циклу очень важно учитывать при составлении многокомпонентных заквасок для получения кисломолочных продуктов. Если в составе таких заквасок окажутся лизогенные бактерии и нелизогенные, но чувствительные к фагу, обусловившему лизогению, произойдет явление **фаголизиса**, столь опасное и характерное для молочной промышленности. Впрочем, фаголизис может вызываться и вирулентными фагами, попадающими в технологические потоки при плохой организации производства. Явление фаголизиса наблюдается также в процессах микробного синтеза аминокислот и значительно снижает рентабельность этих отраслей биотехнологии.

Кроме описанного случая взаимодействия фага λ с бактериями *E. coli*, когда состояние лизогении сопровождается интеграцией фаговой ДНК в хромосому, существуют другие примеры, в которых профаг поддерживается в лизогенной клетке в автономном от хромосомы состоянии, подобно плазмиде. Так ведет себя, в частности, умеренный фаг P1: его ДНК присутствует в лизогенных клетках *E. coli* в виде кольцевой молекулы в числе одной копии на хромосому, будучи связанной не с нуклеоидом, а с плазматической мембраной. Фаговые репрессорные гены координируют репликацию фагового генома с репликацией клеточной ДНК, в результате чего при делении клетки оба репликона удваиваются синхронно и каждая дочерняя клетка получает копию профага. Принципы регуляции выражения генов для фага P1 аналогичны описанным для фага λ, т. е. и здесь возможно переключение между двумя способами взаимодействия фага с клеткой: лизогенией и литическим циклом.

Лизогенные бактерии могут менять некоторые свои свойства. Это явление названо **фаговой конверсией**. Наиболее общим ее проявлением служит иммунность лизогенных бактерий к фагам того же типа, что и профаг. Аналогичные явления известны для некоторых патогенных штаммов клостридий, которые способны выделять токсины, обусловливающие симптомы ботулизма и газовой гангрены, только при участии специфических бактериофагов. Причем высказывается мнение, что один и тот же бактериальный штамм продуцирует разные токсины в зависимости от того, каким фагом он инфицирован. Кроме того, фаговая конверсия может проявляться в изменении у лизогенных клеток некоторых морфологических и физиологических признаков, например характера клеточной поверхности, скорости роста, устойчивости к факторам среды и др. Учитывая перечисленные обстоятельства, а также то, что многие природные штаммы бактерий являются лизогенными, можно предположить, что лизогения – очень распространенное явление, помогающее бактериям выживать в определенных условиях.

На лизогенных бактериях могут адсорбироваться частицы других фагов и инъецировать внутрь свою нуклеиновую кислоту. Такие бактерии становятся суперинфицированными. Их судьба зависит, в первую очередь, от того, чувствительна ли ДНК суперинфицирующего фага к репрессорному белку, кодируемому геномом резидентного профага (который изначально присутствовал в лизогенной клетке). Если нет, то в клетке произойдут все события литического цикла и она лизируется под действием суперинфицирующего фага. Если же

геном суперинфицирующего фага чувствителен к белку-репрессору, то состояние клеток не изменится, а суперинфекция станет **абортивной**: суперинфицирующий фаг не может обусловить литический цикл, и его нуклеиновая кислота не реплицируется синхронно с хромосомой. Поэтому при делении клеток потомство не получает копии суперинфицирующей нуклеиновой кислоты и доля бактерий, содержащих ее, постоянно уменьшается в популяции. В этом случае говорят, что лизогенные клетки «иммунны» к суперинфицирующему фагу, но такую «иммунность» нельзя путать с устойчивостью бактерий к фагам.

Фагоустойчивость (способность бактерий противостоять инфекции как вирулентными, так и умеренными фагами) может определяться отсутствием на клетке специфических для данного фага рецепторов. В этом случае фаг вообще не адсорбируется на клетке. Устойчивость бактерий к фагам может быть обусловлена и другими причинами: в частности, наличием в клетках мощных систем рестрикции-модификации, которые сразу расщепляют попавшую в клетку чужеродную ДНК; блокированием процесса инъекции фаговой нуклеиновой кислоты в клетку; реализацией механизмов абортивной инфекции, одним из проявлений которых является массовая гибель инфицированных клеток.

Участие вирусов в онкогенезе. Первые свидетельства участия вирусов в канцерогенезе получены еще в 1908 г. В. Эллерманом (V. Ellermann), который перевивал у кур лейкемию с помощью фильтратов крови. В настоящее время роль в развитии рака доказана для нескольких РНК-содержащих вирусов (вирус саркомы Рауса, вызывающий саркому у кур, вирус Т-клеточного лейкоза людей, вирус гепатита В), а также для ДНК-содержащих вирусов (обезьяний вирус SV40, онкогенный для новорожденных грызунов, некоторые папилломавирусы, аденовирусы, герпес-вирусы, которые могут быть онкогенными для людей). Эти вирусы называют онкогенными. По некоторым оценкам доля раковых заболеваний, обусловленных онкогенными вирусами, составляет до четверти всех онкологических заболеваний.

Секвенирование геномов онкогенных вирусов показало наличие в них участков, не типичных для вирусов и сходных по строению с определенными генами животных и человека. Данные вирусные гены получили название **вирусные онкогены** (v-*onc*), а соответствующие клеточные гены, частично отличающиеся по структуре, – **протоонкогены**. Когда белки – продукты вирусных онкогенов синтезируются в

клетке, происходит **трансформация** нормальных клеток в раковые. При этом клетки утрачивают дифференцировку и приобретают свойство бесконтрольно делиться, формируя раковый клон, перерастающий в опухоль.

Эффективность раковой трансформации клеток неодинакова у разных вирусов, например, вирус саркомы Рауса трансформирует почти каждую зараженную им клетку, другие онкогенные вирусы трансформируют только одну из 10^3–10^5 клеток. Однако общим для всех онкогенных вирусов является то, что они способны переходить в состояние провируса и существуют в клетке в интегрированном с клеточной ДНК состоянии. При этом активными остаются только некоторые гены вируса, которые придают клеткам новые свойства.

Считается, что вирусные онкогены происходят от протоонкогенов животных и включились когда-то в геном вирусов в ходе рекомбинации, а затем претерпели изменения. Нормальные клеточные протоонкогены не вызывают канцерогенез. Их продукты принимают участие в регуляции клеточного роста и абсолютно необходимы организму на ранних этапах развития. Однако протоонкогены способны превращаться в онкогены (обусловливают онкогенез) и без участия вирусов, а в ходе мутагенеза и разного рода перестроек ДНК. Такие генетические дефекты могут быть вызваны **канцерогенными факторами** (например, компонентами табачного дыма, фенолформальдегидными смолами, УФ-излучением, рентгеновскими лучами, α- и β-излучением и др.).

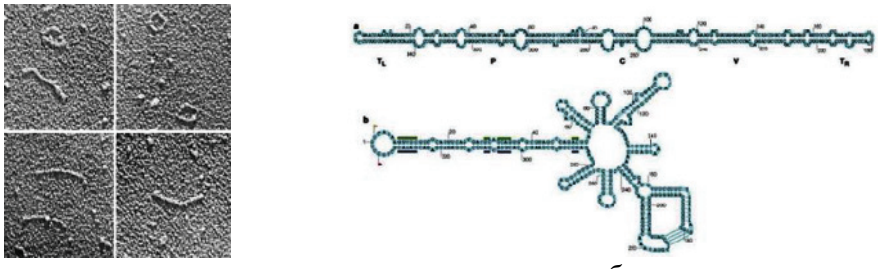
Рассматривая проблему вирусного канцерогенеза, стоит упомянуть еще об одной интересной группе вирусов – **онколитических**. Их особенностью является избирательность по отношению к раковым клеткам, в которых они особенно активно репродуцируются и вызывают гибель. Онколитические вирусы обнаружены, в частности, в семействе реовирусов (*Reoviridae*) и относительно безвредны для нормальных тканей.

Следует отметить, что организм животного и человека не безразличен к вирусным инфекциям. Он снабжен несколькими защитными механизмами, призванными обезвредить вирусы, среди которых особое значение имеет группа специфических гликопротеинов – **интерферонов**. Эти вещества продуцируются эукариотическими клетками в ответ на вирусную инфекцию и внедрение других патогенов. Интерфероны синтезируются инфицированными клетками, выделяются ими наружу и связываются со специфическими рецепторами в мембранах соседних клеток. В ответ на это в клетках вырабатываются белки, расщепляющие вирусные РНК и останавливающие синтез белка, в том

числе «ранних» вирусных белков. Образование интерферонов – это неспецифический ответ клетки на инфекцию, поскольку он направлен на любые вирусы, которые содержат двухнитевые РНК или вызывают их образование в клетках. Кроме того, организмы позвоночных животных и человека обладают специфическим ответом на вирусные инфекции – иммунитетом.

§ 9.2. Вироиды

В 70-х гг. прошлого столетия исследователи обнаружили еще более просто организованных, чем вирусы, возбудителей заболеваний растений, которые назвали **вироидами**. Это «голые» (не имеют никаких оболочек или капсидов) однонитевые циклические инфекционные РНК. Содержат всего 246–399 нуклеотидов, т. е. примерно десятую часть генома вирусов. Особенностью вироидов является наличие большого количества внутримолекулярных спариваний комплементарных нуклеотидов, в результате чего под микроскопом они выглядят палочковидными (рис. 9.9, *а*). РНК вироидов не кодирует структуру каких-либо белков. Последовательности нуклеотидов разных вироидов довольно консервативны, что выдает общность их происхождения; их автономная репликация осуществляется в клетках растений с помощью ферментов самого хозяина. Зато выявлено несколько **рибозимных активностей** вироидов.



а *б*

Рис. 9.9. Вироиды:
а – электронная микрофотография разных вироидов;
б – структура вироида веретеновидности клубней картофеля (сверху) и вироида мозаики персиков (снизу)

Механизм патогенеза, обусловленного вироидами, до конца не выяснен. Предполагается, что эти молекулярные патогены нарушают регуляцию клеточного метаболизма и тем самым способствуют развитию заболеваний. Известно, в частности, что вироид PSTV, вызывающий

веретеновидность клубней картофеля, активирует один из ферментов, снижающих темп синтеза белка, что приводит к развитию симптомов заболевания. Вироиды вызывают болезни картофеля, кокосовых пальм, хризантем, томатов, цитрусовых, груш, персиковых деревьев, авокадо и наносят ощутимый экономический ущерб растениеводству. Пока не известны вироиды, инфицирующие животных или клетки прокариот.

Распространение вироидов происходит обычно при вегетативном размножении растений, с помощью инфицированных семян, а также во время сельскохозяйственных операций: при прополке, рыхлении почвы и др. В частности, показано, что вироиды PSTV передаются через ножи, которыми режут клубни для посадки, причем вироиды на контаминированном лезвии сохраняют жизнеспособность даже при дезинфекции многими химическими веществами. Тем не менее их можно инактивировать обработкой гипохлоридом натрия. Переносчиками вироидов служат также насекомые.

§ 9.3. Сателлиты

Сателлитами называют субвирусные агенты, содержащие нуклеиновые кислоты, нуждающиеся в вирусах-помощниках, которые обеспечивают тиражирование сателлитов и/или их перенос между клетками-хозяевами.

Сателлиты классифицируют на две группы: сателлитные вирусы и сателлитные нуклеиновые кислоты.

Сателлитные вирусы содержат одноцепочечную РНК. Примером служит маленький икосаэдрический вирус растений, который усугубляет симптомы заболевания, вызванные вирусом табачной мозаики. Вирусы-сателлиты – это одни из самых мелких самовоспроизводящихся биологических объектов, что объяснимо, поскольку их репродукция зависит одновременно и от клетки-хозяина, и от вируса-помощника. Частица сателлита вируса табачной мозаики состоит из 60 идентичных копий единственного белка, формирующего капсид, и 1063 нуклеотидов в составе одноцепочечного РНК-генома, кодирующего капсид и еще один белок с неизвестной функцией.

Сателлитные нуклеиновые кислоты могут быть представлены одноцепочечными сателлитными ДНК, а также одно- и двухцепочечными сателлитными РНК.

Одноцепочечные сателлитные ДНК имеют очень узкое разнообразие. Хорошо изученным представителем является ДНК-сателлит вируса закручивания листьев томатов. Сателлит представлен единственной

циклической однонитевой ДНК, способной к саморепликации в клетках растений, но нуждается в вирусе-помощнике, который инкапсулирует ее в свой капсид и переносит между хозяевами. Установлено, что данный сателлит облегчает течение заболевания растения, вызванного вирусом-помощником.

Двухцепочечные сателлитные РНК так же, как и описанный выше сателлит, нуждаются в вирусах-помощниках для переноса между хозяевами. Изучен РНК-сателлит вируса М *Saccharomyces cerevisiae* и РНК-сателлит вируса Т1 *Trichomonas vaginalis*.

Одноцепочечные сателлитные РНК в отличие от рассмотренных выше довольно разнообразны. Они подразделяются на три подгруппы:

− крупные линейные сателлитные РНК;

− маленькие линейные сателлитные РНК;

− циклические сателлитные РНК, которые иначе называют **вирусоидами**.

Молекулярные патогены-вирусоиды так же, как и вироиды, состоят из нескольких сотен рибонуклеотидов, организованных в однонитевую циклическую РНК. Примером вирусоида является сателлитная РНК вируса кольцевой пятнистости табака. Вирусом-помощником здесь выступает вирус кольцевой пятнистости табака. Похожий агент обнаружен также в клетках животных – это дельта-вирус гепатита человека (HDV), вызывающий особо тяжелую форму гепатита D. Его геном представлен однонитевой РНК, он обладает рибозимной активностью и представляет собой самый маленький из известных геномов вирусов животных. С РНК связан белок – дельта-антиген. Все вместе (РНК и дельта-антиген) упаковано в составе частицы вируса гепатита В, который выступает в роли вируса-помощника.

Распространение сателлитных РНК вирусов растений осуществляется подобно вироидам, а дельта-вирус гепатита человека может передаваться через кровь, слюну, возможно половым путем.

Иногда термин «вирусоид» используется в более широком смысле и относится ко всем сателлитам.

§ 9.4. Прионы

Прионы, или инфекционные белки, открыты совсем недавно и пока еще представляют собой загадку для ученых. До сих пор в составе этих частиц не выявлено нуклеиновых кислот – ни ДНК, ни РНК, но установлено, что они способны передавать свои инфекционные свойства другим, нормальным белкам.

Прионы являются причиной неизлечимых дегенеративных заболеваний центральной нервной системы человека (болезнь Крейтцфельдта – Якоба, куру) и животных (скрейпи овец, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, или «коровье бешенство»). Эти заболевания сопровождаются появлением необратимых изменений в тканях мозга, в частности заполнением клеток нитевидными агрегатами аномального прионного белка. К отличительной особенности данных заболеваний относится то, что они могут возникать внезапно, без видимых причин, могут быть наследственными и передаваться потомкам, а также могут развиваться в ответ на инфицирование организма прионами. При этом независимо от причины возникновения заболевание может передаваться другим индивидуумам в ходе инфекционного процесса.

Наилучшим образом свойства прионов изучены по отношению к возбудителю скрейпи у мышей. Известно, что эти агенты чувствительны к протеолитическим ферментам, которые расщепляют белки, но чрезвычайно устойчивы к факторам, инактивирующим любые клетки, вирусы, вироиды, в первую очередь к ультрафиолету. Это наблюдение позволяет судить об отсутствии нуклеиновых кислот в составе возбудителей скрейпи. Но такое заключение противоречит основной догме биологии: каждый воспроизводящий себя организм имеет наследственную программу, записанную в виде последовательности нуклеотидов в молекулах ДНК или РНК. Для объяснения феномена инфекционности прионов высказано предположение о том, что данные агенты представляют собой особую форму белка, способную воспроизводить свои свойства посредством автокаталитического механизма.

Экспериментально подтвердил это предположение Стенли Прузинер (Stanley B. Prusiner, 1942–), который обнаружил в нервных клетках больных скрейпи мышей две формы одного и того же белка: нормальную (характеризуется хорошей растворимостью в воде, чувствительностью к протеазам) и аномальную (с повышенной гидрофобностью, меньшей чувствительностью к протеазам, склонностью к слипанию и формированию агрегатов). Необычным являлось то, что аномальные белки переводили нормальные в аномальную форму при столкновении (рис. 9.10). За эти открытия С. Прузинер удостоен в 1997 г. Нобелевской премии.

Изучение структуры аномальных и нормальных белков позволило установить, что они не различаются между собой аминокислотной последовательностью, но имеют разную пространственную укладку. В частности, у аномального белка более выражена β-складчатая структура.

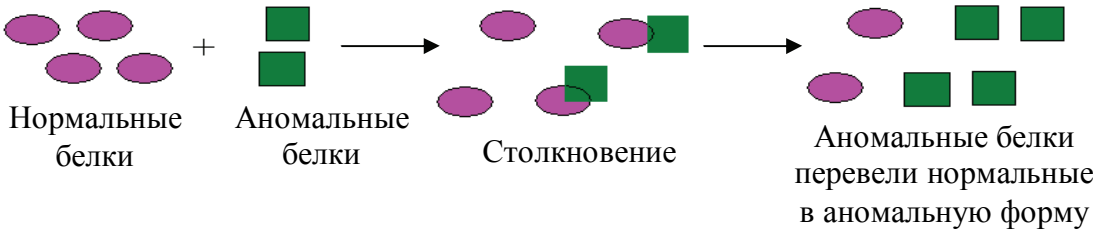
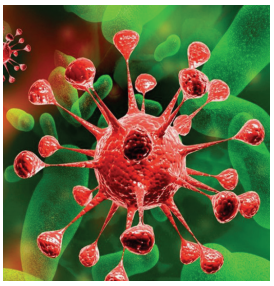


Рис. 9.10. Мисфолдинг белков: белки с нормальной пространственной укладкой (результат нормального фолдинга) меняют укладку при столкновении с аномальными белками

Знание аминокислотной последовательности прионных белков позволило выявить в геноме мышей ген (PRNP), кодирующий данный белок. Оказалось, что этот ген присутствует в геномах всех млекопитающих, включая человека. Он определяет структуру мембранного белка с сигнальными функциями. Как и почему этот нормальный белок вдруг становится аномальным, еще остается выяснить. Прионные белки обнаружены также у дрожжей и мицелиальных грибов, показана их адаптивная функция для этих организмов. Становится понятным, что подобные белки могут быть широко распространены в природе.

Открытие прионов привело к появлению нового термина **«белковая наследственность»**, который стали трактовать как способность прионоподобных белков передавать информацию о своей пространственной форме без участия нуклеиновых кислот.

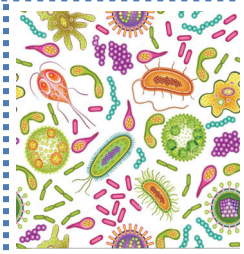
Часть II



ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глава 10

ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ



Питание – это совокупность процессов, включающих поступление в организм, переваривание, всасывание и усвоение питательных веществ, что является составной частью обмена веществ. Благодаря питанию организмы получают различные химические соединения, которые используются для роста, жизнедеятельности и воспроизведения себе подобных.

В окружающей среде микроорганизмы способны развиваться лишь в том случае, если они находят все химические вещества, обеспечивающие им запасание энергии и синтез клеточных компонентов. Эти соединения называют **питательными веществами**. В лабораториях для культивирования микроорганизмов используют **питательные среды**, которые содержат все необходимые данным микроорганизмам питательные вещества, в большинстве случаев в растворенном виде.

Чтобы установить, какие именно вещества необходимы определенным микроорганизмам для питания, следует, прежде всего, представлять химический состав их клеток, а также знать, к какой группе питания они принадлежат и в виде каких веществ потребляют те или иные химические элементы.

§ 10.1. Химический состав микробной клетки

В любой живой клетке более половины ее содержимого представлено водой. В типичном случае вода составляет 70–85% массы клетки. Сухое вещество, на которое приходится 15–30% клеточной массы, имеет химический состав, совершенно отличающийся от состава земной коры по относительному содержанию и химических элементов, и веществ.

Количественно преобладают в сухом веществе микробных клеток 6 химических элементов, которые обычно составляют более 95% его массы, почему их и называют **биогенными элементами** (табл. 10.1). К биогенным элементам относятся углерод, кислород, азот, водород, сера и фосфор. Они имеют первостепенное значение для развития микроорганизмов и, как правило, лимитируют их рост в естественных местах обитания. Углерод и водород входят в состав всех органических соединений. В состав многих из них входит также кислород, к тому же его молекулярная форма выполняет функцию конечного акцептора электронов при аэробном дыхании. Азот – обязательный компонент всех аминокислот, нуклеиновых кислот, многих кофакторов («помощников» ферментов) и витаминов. Фосфор в составе остатков фосфорной кислоты – неотъемлемый компонент нуклеиновых кислот, нуклеозидфосфатов, без которых невозможно превращение энергии в клетках, фосфолипидов, из которых формируются биомембраны, тейхоевых кислот. Сера участвует в формировании серосодержащих аминокислот (цистеин и метионин), некоторых белков с каталитическими функциями, кофакторов.

Несколько химических элементов присутствует в сухом веществе клеток в относительно высоких концентрациях в виде катионов или анионов: калий, натрий, кальций, магний, хлор, железо, – их относят к **макроэлементам** (табл. 10.1). Эти элементы являются кофакторами и активаторами многих важных ферментных систем, а также принимают участие в транспорте веществ через мембраны, поддержании осмотического давления в клетке на определенном уровне, рецепции сигналов.

Наконец, ряд химических элементов, обязательных для жизнедеятельности клетки, содержится в ней в ничтожно малых количествах – это **микроэлементы** (табл. 10.1). На долю микроэлементов обычно приходится в совокупности не более 0,3% сухого вещества, это, в первую очередь, марганец, кобальт, медь, молибден, цинк, а также никель, ванадий, бор, селен, кремний, вольфрам и некоторые другие.

Микроэлементы присутствуют в клетках в таких малых количествах, что их бывает сложно определить. Обычно микроэлементы не требуется вносить в питательные среды, поскольку бывает достаточно тех следовых их количеств, которые есть в воде или в качестве примесей в составе веществ. Микроэлементы могут участвовать в катализе реакций в виде кофакторов, являться регуляторами ферментативной активности. Например, кобальт служит активатором ферментов дыхательной цепи; железо и молибден входят в состав компонентов нитрогеназной системы, фиксирующей молекулярный азот; атомы железа, помимо этого, входят в состав цитохромов – неотъемлемых ферментных систем всех дышащих организмов; марганец определяет агрегацию мономеров рибосом, участвуя, таким образом, в процессе синтеза белка.

Таблица 10.1

Элементный состав сухого вещества прокариотической клетки

Категория	Элемент	Содержание, %
Биогенные элементы	Углерод	50
	Кислород	20
	Азот	14
	Водород	8
	Фосфор	3
	Сера	1
Макроэлементы	Калий	1
	Натрий	1
	Кальций	0,5
	Магний	0,5
	Хлор	0,5
	Железо	0,2
Микроэлементы	Преобладают: марганец, кобальт, цинк, медь, молибден	~0,3

Химические элементы, в первую очередь биогенные, формируют так называемые **малые молекулы**, состав которых ограничен и более или менее одинаков для всех живых существ. Наиболее важные классы малых молекул представлены аминокислотами, моносахаридами, жирными кислотами и нуклеотидами. Из малых молекул строятся **макромолекулы** – основные компоненты клеток, в большинстве своем полимерные вещества. Макромолекулы составляют в сумме не менее 90% массы сухого вещества клеток (табл. 10.2) и обеспечивают большинство их функций, в том числе структурные.

Таблица 10.2

Содержание и функции основных макромолекул в прокариотической клетке

Тип веществ	Содержание в сухом веществе, %	Основные функции
Белки	52	Каталитическая, транспортная, рецепторная
Полисахариды	17	Структурная, запасная
Липиды	9	Структурная (в составе мембран), барьерная, запасная
РНК	16	Посредник в синтезе белка
ДНК	3	Носитель наследственной информации

Как следует из представленных в табл. 10.2 данных, основным классом клеточных веществ являются белки. Так же, как растительные и животные, белки микроорганизмов содержат заменимые и незаменимые аминокислоты, а их перевариваемость может конкурировать с белками растений.

§ 10.2. Источники биогенных элементов для микроорганизмов

Из химического состава микробной клетки (см. табл. 10.1 на с. 159) следует, что для своего роста она должна получать из внешней среды в больших количествах биогенные элементы. Их источниками могут быть разнообразные вещества, большей или меньшей степени сложности, и у микроорганизмов существует специфичность по отношению к данным веществам. Это означает, что микроорганизмы разных групп усваивают один и тот же химический элемент в составе разных соединений, что следует учитывать при составлении питательных сред.

Необходимо также знать, что потребляемые клеткой вещества могут служить как строительным материалом, так и источниками энергии или донорами электронов (см. § 10.4), но в любом случае их относят к питательным веществам.

Источники углерода. Углерод входит в состав всех органических соединений, а также неорганических, таких как CO_2 и соли угольной кислоты. По отношению к источникам углерода все организмы делят на автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы (от греч. autos – сам, trophe – пища, питание) используют неорганические источники углерода и все (либо почти все)

клеточные вещества, включая малые молекулы, синтезируют самостоятельно. При этом происходит восстановление CO_2 – процесс, требующий затрат энергии. Поэтому для запасания энергии этим организмам дополнительно требуются питательные вещества, выполняющие роль источников энергии и доноров электронов. К автотрофным микроорганизмам относятся водоросли, фотосинтезирующие прокариоты, а также бактерии, окисляющие неорганические вещества в ходе хемосинтеза.

Гетеротрофы (от греч. heteros – иной, trophe – пища, питание) в качестве источников углерода используют разнообразную органику. На начальных стадиях органические вещества в клетках окисляются и разлагаются, выступая в большинстве случаев одновременно в роли доноров электронов и источников энергии. Образуются малые молекулы, из которых клетка строит собственные макромолекулы.

Среди микроорганизмов гетеротрофов большинство. Это простейшие, грибы, слизевики, очень многие прокариоты. Все они в совокупности способны использовать любые органические соединения, образующиеся в природе, а также огромное количество искусственно синтезированных человеком органических веществ.

Наиболее доступными источниками углерода для гетеротрофов являются углеводы, из них – моносахариды, среди сахаров легче усваиваются гексозы, а среди них – глюкоза. Глюкозу можно считать универсальным источником углерода и энергии, поскольку ее способны утилизировать практически все гетеротрофные микроорганизмы. Олиго- и полисахариды используются многими, но не всеми микроорганизмами: для расщепления этих молекул требуется наличие соответствующих гидролитических ферментов. Многие микроорганизмы утилизируют пентозы, которые образуются при гидролизе некоторых полисахаридов.

Хорошими источниками углерода являются органические кислоты, многоатомные спирты, аминокислоты, жирные кислоты. Многие микроорганизмы, особенно паразитические, способны также усваивать белки и нуклеиновые кислоты.

Некоторые микроорганизмы, в частности определенные виды дрожжей, коринебактерий, микобактерий, псевдомонад, метилотрофных бактерий, используют в качестве источников углерода углеводороды нефти, этиловый и метиловый спирты, фенол, ацетон, ксилолы и другие редко усваиваемые, часто токсичные для представителей макромира соединения. Это имеет большое значение для биотехнологии (производство белка одноклеточных, биологически активных веществ

на дешевых субстратах), а также для экологии (очистка окружающей среды от **ксенобиотиков**).

Гетеротрофные микроорганизмы, способные использовать для питания органические соединения мертвых тел (органику опада) или выделения животных, называют **сапротрофными** (от греч. sapros – гнилой). Сапротрофы составляют большинство среди микроорганизмов и являются важным звеном в круговороте веществ и энергии, участвуя в минерализации органических соединений. Другая часть гетеротрофов представлена микроорганизмами, использующими для питания органику живых клеток. Это **паразиты**, которых довольно много среди всех групп микроорганизмов. Их деятельность в большинстве случаев обусловливает развитие заболеваний организмов-хозяев.

Источники кислорода. Кислород входит в состав воды, CO_2 и многих органических соединений. Эти вещества используются микроорганизмами в качестве источников элемента кислорода. Но многим микроорганизмам, кроме того, требуется молекулярный кислород, который выполняет роль конечного акцептора электронов при аэробном дыхании.

Источники азота. Азот встречается в природе в виде окисленных и восстановленных неорганических соединений, в составе органических веществ (аминогруппы аминокислот, азотистые основания нуклеотидов), а также в виде молекулярного азота атмосферы. Каждая из этих форм может использоваться микроорганизмами, и по отношению к источникам азота их делят на четыре группы:

1) использующие восстановленные неорганические соединения азота: аммиак и соли аммония. Надо сказать, что большинство микроорганизмов способно усваивать азот в этом виде. В ферментативных реакциях аммиачный азот включается в состав аминогрупп аминокислот, а затем в ходе обменных процессов – в другие азотсодержащие соединения клетки. Такой процесс называется **ассимиляционным**. Кроме того, существует **диссимиляционное усвоение** восстановленных форм азота. Здесь аммонийный азот окисляется в дыхательной цепи, выступая в роли донора электронов. Данный процесс сопряжен с запасанием энергии на уровне окислительного фосфорилирования. Продуктами окисления аммонийного азота являются нитриты и нитраты, которые удаляются из клеток, накапливаясь в окружающей среде. Поэтому иначе диссимиляционное усвоение аммонийного азота называется **нитрификацией**, а осуществляющие его микроорганизмы – нитрификаторами. К нитрификации способны только некоторые прокариоты (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrobacter* и др.);

2) усваивающие окисленные формы азота (нитраты и нитриты). Эти соединения восстанавливаются в клетках, и процесс называется **нитратредукцией**, или **денитрификацией**. Различают ассимиляционную и диссимиляционную нитратредукцию. В первом случае нитраты и нитриты восстанавливаются до аммонийного азота, который включается в состав аминокислот. Это способны осуществлять многие прокариоты (отдельные виды родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*), некоторые грибы, в частности дрожжи *Debaryomyces hansenii*, *Pichia pinus* и др. Для них данный признак является видоспецифичным и используется в таксономии. Нитраты и нитриты усваивают также водоросли.

При диссимиляционной нитратредукции нитраты (нитриты) выполняют роль конечных акцепторов электронов в дыхательной цепи. При этом запасается энергия, а продуктами процесса являются окислы азота и молекулярный азот. Способные к диссимиляционной нитратредукции микроорганизмы называются денитрификаторами. К этой группе относятся только некоторые прокариоты;

3) **аммонификаторы** – это микроорганизмы, усваивающие азот в составе органических веществ: белков и составляющих их аминокислот, мочевины, реже аминов, нуклеотидов. В клетках аммонификаторов данные соединения расщепляются с выделением аммиака. Аммонификация довольно широко распространена среди микроорганизмов. Ее осуществляют многие прокариоты, грибы, слизевики, простейшие, некоторые водоросли;

4) **азотфиксаторы** – те микроорганизмы, которые способны усваивать молекулярный азот. Азотфиксаторы встречаются только среди прокариот. Это симбиотические бактерии родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, которые осуществляют данный процесс только в симбиозе с растениями, а также свободноживущие *Clostridium*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, многие цианобактерии. N_2 в их клетках восстанавливается с помощью **нитрогеназной системы** до аммиака, а затем включается в состав аминогрупп аминокислот. Азотфиксирующие бактерии являются важными факторами плодородия почвы, поскольку именно благодаря их деятельности атмосферный азот превращается в связанную форму, доступную для усвоения растениями. Запасы минерального азота в почве невелики, и этот элемент является основным лимитирующим фактором развития растений. Поэтому в качестве альтернативы внесению азотных удобрений рассматривается перспектива клонирования генов, ответственных за процесс азотфиксации, в клетках растений, а также конструирования более продуктивных штаммов азотфиксирующих бактерий методами генетической инженерии.

Источники водорода. Водород, как и кислород, входит в состав воды, а также всех органических соединений. Поэтому недостатка в этом элементе микроорганизмы никогда не испытывают. В то же время существует группа **водородных бактерий**, которые используют молекулярный водород, окисляя его в дыхательной цепи и извлекая при этом энергию. Эти бактерии часто обитают в сообществах с микроорганизмами, выделяющими H_2 при метаболизме.

Источники фосфора. Основными соединениями фосфора, которые используются практически любыми микроорганизмами, являются соли фосфорной кислоты, предпочтительнее одно- или двухзамещенные. Чаще всего в питательных средах используются фосфаты калия. Кроме того, микроорганизмы утилизируют фосфор, входящий в состав фосфорных эфиров (множество клеточных соединений), и только некоторые представители, в основном приспособленные к паразитическому образу жизни, способны расщеплять нуклеиновые кислоты, используя входящий в их состав фосфор.

Источники серы. Универсальными источниками серы служат сульфаты. В то же время некоторые микроорганизмы способны использовать сульфиты, а также элементарную серу. Это в основном прокариоты и некоторые грибы. Например, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* утилизируют элементарную серу. Большинство микроорганизмов используют органические вещества в качестве источников серы, прежде всего, аминокислоты метионин и цистеин, а также биотин, некоторые кофакторы.

Существует, помимо этого, обширная группа прокариот, способных окислять разнообразные восстановленные соединения серы (сероводород, тиосульфат, S^0, тритионат и др.) в дыхательной цепи, извлекая при этом энергию. Кроме того, известна группа сульфатредуцирующих бактерий, осуществляющих процесс анаэробного «сульфатного» дыхания, связанного с выделением в среду сероводорода.

§ 10.3. Факторы роста

Помимо биогенных и макроэлементов (источниками последних служат соли соответствующих металлов), многим микроорганизмам необходимы так называемые **факторы роста**. Факторами роста называют органические вещества, которые микроорганизмы не способны синтезировать самостоятельно, но без которых жизнедеятельность клетки оказывается невозможной. К факторам роста относятся амино-

кислоты, пуриновые и пиримидиновые азотистые основания, витамины, в редких случаях – ненасыщенные жирные кислоты или стеролы.

Уровень биосинтетических возможностей у каждого вида микроорганизмов различен. Некоторые из них самостоятельно синтезируют все необходимые органические вещества (неважно, из каких источников) – их называют **прототрофами**. В противоположность прототрофам, **ауксотрофы** нуждаются для жизнедеятельности в одном или нескольких факторах роста, поскольку лишены способности синтезировать его (их) самостоятельно.

Примером прототрофных микроорганизмов могут служить природные штаммы *E. coli*, которые самостоятельно синтезируют все 20 протеиногенных аминокислот, азотистые основания и витамины. Ауксотрофные микроорганизмы также широко распространены в окружающей среде, они встречаются среди прокариот, грибов, водорослей, простейших. Классическим примером ауксотрофных прокариот являются молочнокислые бактерии: они проявляют множественную зависимость по аминокислотам, пуринам, пиримидинам, пяти-шести витаминам. В частности, *Leuconostoc mesenteroides* нуждается в 17 аминокислотах! Подобные микроорганизмы называют **полиауксотрофными**.

Дрожжи наиболее часто нуждаются в одном-двух витаминах. Сахаромицеты, например, не способны синтезировать биотин и пантотеновую кислоту. Однако следует учитывать, что при длительном культивировании дрожжей в анаэробных условиях требуется добавлять в среду стерол и ненасыщенные жирные кислоты, поскольку синтез этих веществ происходит в присутствии O_2. Таким образом, длительный анаэробиоз сказывается на развитии у дрожжей зависимости по дополнительным факторам роста.

Необычные типы ауксотрофности демонстрируют некоторые микоплазмы: они часто зависят по стеролам, жирным кислотам, глицеролу – веществам, необходимым для построения мембран.

Ауксотрофность может быть не только природным свойством микроорганизмов, она может возникать в результате спонтанных или индуцированных мутаций. Использование **мутагенеза** для получения ауксотрофных штаммов – это основной прием в методах конструирования продуктивных биотехнологических штаммов микроорганизмов. Он позволяет **маркировать** штаммы, т. е. делать их различимыми по фенотипически проявляемым признакам, например, зависимости по разным аминокислотам, витаминам и др. Ауксотрофность используется также при отборе потомства микроорганизмов после генетического обмена.

Фенотип ауксотрофных мутантов обозначают латинскими символами, указывающими соединение, которое необходимо добавлять в среду для обеспечения их роста, и надстрочным знаком минус («–»). Например, ауксотрофные по лейцину микроорганизмы обозначаются символом Leu^-, по пролину – Pro^-. В таком случае штаммы дикого типа (прототрофные) могут быть обозначены Leu^+ и Pro^+ соответственно.

Факторы роста необходимы микроорганизмам в очень маленьких концентрациях: L-аминокислоты – 20 мкг/мл; DL-аминокислоты – 40 мкг/мл (поскольку используются только L-изомеры); азотистые основания – 10–20 мкг/мл; витамины – 4–20 мкг/мл. Кроме растворов чистых веществ – факторов роста, можно использовать натуральные продукты, содержащие их в высоких концентрациях. Это, в первую очередь, экстракты печени и сердца животных, семена и проростки растений. Аминокислотами богаты гидролизаты белка, в частности молочного и мясного. Витаминов и других факторов роста много в дрожжевых экстрактах.

§ 10.4. Типы питания микроорганизмов

Микроорганизмы характеризуются большим разнообразием типов питания, поэтому для их определения оказывается недостаточно самого простого критерия, используемого для животных и растений, – отношения к источникам углерода. Приходится вводить дополнительные признаки: отношение к источникам энергии и донорам электронов. Как указывалось выше, по отношению к источникам углерода микроорганизмы можно разделить на автотрофы и гетеротрофы.

Отношение к источникам энергии. Микроорганизмы, как и остальные живые существа, способны использовать два типа источников энергии, которые они могут преобразовывать в доступную для клетки форму – АТР:

– энергию электромагнитного излучения. Ее способны использовать **фототрофные микроорганизмы**, в чьих клетках осуществляется особый способ запасания энергии – фотосинтез;

– энергию химических связей органических или неорганических соединений (субстратов). Ее запасают **хемотрофные микроорганизмы** в ходе окислительно-восстановительных реакций. Хемотрофы реализуют такие способы запасания энергии, как дыхание или брожение.

Отношение к донорам электронов. Термины «донор водорода» и «донор электронов» часто употребляются как синонимы, поскольку отщепление от субстрата двух электронов в большинстве случаев сопровождается отщеплением двух протонов.

Если в качестве доноров электронов микроорганизмы используют органические соединения, их называют **органотрофами**, если неорганические (молекулярный водород, сероводород, аммиак, окись углерода и др.) – **литотрофами**.

В соответствии с тремя перечисленными критериями выделяют четыре основные группы питания микроорганизмов: фотолитоавтотрофы, фотоорганоавтотрофы, хемолитоавтотрофы и хемоорганогетеротрофы, которые охарактеризованы ниже.

Фотолитоавтотрофы. Это фотосинтезирующие микроорганизмы, источником энергии для которых является видимый свет. В качестве доноров электронов они используют неорганические восстановленные соединения, а в качестве источника углерода – CO_2. Превращение световой энергии в энергию химических связей молекул АТР осуществляется при фотосинтезе по механизму **фотофосфорилирования**.

Представителями данной группы являются водоросли, цианобактерии, пурпурные и зеленые серные бактерии. Все они содержат в клетках фоточувствительные пигменты, которые улавливают световую энергию (хлорофиллы разного типа, каротиноиды и др.). Причем у бактерий, по сравнению с водорослями, спектр этих пигментов более разнообразен, в результате чего они способны поглощать свет более широкого диапазона длин волн. Это существенно расширяет экологические ниши бактерий, в частности, позволяет им развиваться в водоемах под слоем водорослей.

Химизм фотосинтеза водорослей и цианобактерий похож на таковой для растений: эти микроорганизмы используют в качестве доноров электронов молекулы воды, при разложении которых обязательно выделяется молекулярный кислород (оксигенный фотосинтез). В отличие от них зеленые и пурпурные бактерии в качестве доноров электронов используют не воду, а сероводород, элементарную серу, тиосульфаты, молекулярный водород. При разложении этих веществ O_2 не выделяется (аноксигенный фотосинтез).

Фотоорганоавтотрофы. Тип питания членов этой группы отличается от предыдущей только тем, что в качестве доноров электронов они используют органические соединения. Это представители семейства Rhodospirillaceae, относящегося к аноксигенным эубактериям.

В данную группу входит всего несколько родов бактерий: *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* и др., чьи виды отличаются способностью перестраивать свой метаболизм с фотосинтеза (на свету) на дыхание в темноте. При этом на свету они ведут себя как анаэробы (не используют O_2), а в темноте – как аэробы.

Например, бактерии *Rhodobacter* на свету осуществляют фотосинтез, используя изопропанол в качестве донора электронов, а запасенную энергию затрачивают на восстановление углекислоты до органического вещества (CH_2O – шестая часть молекулы глюкозы $C_6H_{12}O_6$). Изопропанол окисляется до ацетона:

$$CO_2 + 2CH_3CHOHCH_3 \rightarrow$$
$$\rightarrow (CH_2O) + 2CH_3COCH_3 + H_2O.$$

Это пример фотоорганоавтотрофного типа питания. А в темноте эти бактерии становятся хемоорганогетеротрофами, используя органику в процессе дыхания, а молекулярный кислород – в качестве конечного акцептора электронов. Таким образом, данные бактерии являются связующим звеном между фотоавто- и хемогетеротрофами.

Хемолитоавтотрофы. Эта группа, как и предыдущая, представлена только прокариотами – эубактериями и архебактериями. Они обладают уникальной способностью окислять неорганику и извлекать при этом энергию, которую расходуют на фиксацию CO_2. Данный процесс открыт русским ученым С. Н. Виноградским и назван **хемосинтезом**.

Хемосинтезирующие бактерии характеризуются специфичностью по отношению к окисляемому субстрату: нитрификаторы окисляют аммиак и нитриты, тионовые бактерии – восстановленные соединения серы, водородные бактерии – молекулярный водород и т. п.

Процесс хемосинтеза отличается низкой эффективностью запасания энергии, и большинство хемосинтезирующих бактерий очень медленно растут.

Среди представителей данной группы есть облигатные и факультативные литотрофы. Последние способны в качестве доноров электронов использовать также органику. Их считают переходным звеном между лито- и органотрофами и называют **миксотрофами** – обладающими смешанным типом питания.

Хемоорганогетеротрофы. Это самая представительная группа микроорганизмов. К ней относятся все простейшие, некоторые эвгленозои, все грибы, слизевики, большинство прокариот. Они запасают энергию в ходе дыхания или брожения, при этом источником углерода,

донором электронов и источником энергии служит обычно одно и то же органическое вещество (субстрат). Данные микроорганизмы широко распространены в окружающей среде, большинство их относят к числу редуцентов, которые осуществляют минерализацию отмершей органики, делая ее, таким образом, доступной растениям (продуцентам). Только так может осуществиться круговорот биогенных элементов.

§ 10.5. Способы поступления питательных веществ в клетку

Любой клетке удается сохранять индивидуальность своего содержимого благодаря наличию плазматических мембран, которые имеются у всех клеток, обладают избирательностью транспорта веществ и обосабливают живое от неживого. У многих микроорганизмов есть к тому же клеточные стенки и слизистые слои – дополнительные барьеры для веществ, стремящихся попасть внутрь клетки или покинуть ее.

Таким образом, основным препятствием для питательных веществ являются мембраны, основу структуры которых составляет двойной слой полярных липидов, формирующий гидрофобную область, непроницаемую для крупных и заряженных молекул. Вода и питательные вещества преодолевают этот барьер несколькими способами: в ходе **пассивной** или **облегченной диффузии**, **активного транспорта**, а также с помощью **цитозов**. Механизмы перечисленных способов транспорта различаются между собой следующими признаками:

1) способностью самостоятельно (без участия белков) преодолевать бислой;

2) направлением транспорта;

3) потребностью в клеточной энергии;

4) необходимостью формирования мембранных везикул, в которые заключаются транспортируемые вещества.

Пассивная диффузия. В этом процессе не участвуют транспортные белки и молекулы веществ преодолевают бислой самостоятельно. Перенос осуществляется с той поверхности мембраны, где концентрация вещества больше, на ту поверхность, где она меньше (по градиенту концентрации). При этом не затрачивается энергия. Таким образом диффундируют через мембрану малые незаряженные молекулы, в

основном газов, и, как ни странно, вода. Считается, что молекулы воды достаточно малы, чтобы свободно диффундировать между молекулами фосфолипидов в бислое. Кроме того, в мембране имеются специфические белковые каналы для транспорта молекул воды – аквапорины, однако такой транспорт относится уже к облегченной диффузии. Перенос молекул воды через мембрану называется **осмосом**. Вода транспортируется через мембраны с очень высокой скоростью по градиенту *собственной концентрации*.

Свободное проникновение молекул воды через плазматические мембраны клеток создает микроорганизмам немалые проблемы, и им приходится осуществлять **осморегуляцию**, т. е. поддерживать осмотическое давление в клетке на постоянном уровне. Особое значение этот процесс имеет для водных обитателей. Многие из них характеризуются **изотоничностью** по отношению к среде обитания (концентрация растворенных веществ внутри клетки и снаружи одинакова). У других, как, например, у эвглен, содержимое клетки **гипертонично** по отношению к пресной воде (концентрация растворенных веществ в клетке выше, чем в среде). Следовательно, вода стремится внутрь клетки. Если в клетку поступит избыток воды, она может разбавить клеточное содержимое и даже разорвать мембрану. Поэтому избыток воды удаляется с помощью сократительной вакуоли, которая собирает воду из всех частей клетки и выкачивает ее наружу, ритмично сокращаясь.

Облегченная диффузия. Этот вид диффузии назван облегченной потому, что перенос веществ облегчается деятельностью транспортных белков. Но и в данном случае направление переноса не препятствует его осуществлению: вещества движутся по градиенту концентрации, причем здесь также учитывается градиент заряда на мембране, поскольку этим видом транспорта пользуются и заряженные молекулы. Энергия не расходуется.

Большинство питательных веществ, необходимых клетке, представлено заряженными молекулами и ионами, поэтому они проникают в клетку чаще в ходе облегченной диффузии, а не пассивной. Однако это оказывается возможным лишь при условии, что внутри клетки концентрация данного вещества меньше, чем снаружи. Легко себе представить, что такая ситуация складывается далеко не всегда: концентрация сахаров, аминокислот, органических кислот, спиртов и др. в клетке обычно выше, чем во внешней среде. В таком случае клеткам приходится прибегать к другому виду транспорта – активному.

Активный транспорт. Данный механизм позволяет клетке переносить в цитозоль молекулы питательных веществ против градиента их концентрации и заряда. Это оказывается возможным лишь при участии транспортных белков и довольно ощутимых затрат энергии. Чтобы осуществить перенос питательного вещества против электрохимического градиента, клетка создает на мембране градиент ионов или протонов. Специальные ионные насосы, мобилизуемые гидролизом АТР, постоянно выкачивают из клетки и накачивают внутрь определенные ионы металлов, создавая разницу их концентраций и зарядов. В результате у большинства эукариотических клеток на внешней поверхности мембраны оказывается избыток ионов натрия, а на внутренней – ионов калия. К тому же внутренняя поверхность оказывается заряжена отрицательно по отношению к внешней (на внешней поверхности мембраны скапливается больше положительных ионов, чем на внутренней). В созданном таким образом ионном градиенте заключена энергия, поскольку, согласно закономерностям облегченной диффузии, концентрация ионов стремится к уравниванию. Однако уравнивания не происходит благодаря постоянной работе ионных насосов. Энергия ионного градиента на мембране используется для переноса молекул питательных веществ.

У прокариот на мембране создается протонный градиент, который является движущей силой транспорта питательных веществ против электрохимического градиента.

Следует добавить, что энергия ионного градиента используется клетками не только для активного транспорта веществ, но также для осморегуляции, для рецепции сигналов, а у прокариот – для вращения жгутиков.

Все перечисленные выше способы транспорта веществ через мембраны требуют, чтобы поступающее в клетку вещество было растворено в воде. Тип питания, при котором растворенные в воде вещества всасываются всей поверхностью клетки (в ходе диффузии или активного транспорта), называют **осмотрофным**. Этот тип питания характерен для всех микроорганизмов, а для прокариот и грибов он является единственным.

Макромолекулы в большинстве случаев не способны преодолеть мембранный барьер, и их первичное расщепление до олигомеров или мономеров происходит во внешней среде либо в периплазматическом пространстве. С этой целью клетки **секретируют** (выделяют во внешнюю среду) соответствующие ферменты: протеазы –

для расщепления белков до аминокислот, гликозилазы – для расщепления полисахаридов, липазы – для расщепления липидов на глицерол и жирные кислоты и т. п.

В противоположность осмотрофному питанию, у многих микроорганизмов выработалось **фаготрофное питание**. Оно сопряжено с особым типом транспорта веществ через мембраны – **фагоцитозом**, или «заглатыванием» клеткой крупных частиц либо других клеток. Фагоцитоз является одной из разновидностей цитозов.

Цитозы. Эти виды транспорта характерны только для эукариот. Их отличительной особенностью является возможность проникновения через мембрану нерастворимых в воде веществ и частиц. Цитозы сопровождаются инвагинациями (впячиваниями) мембраны, после чего от нее отшнуровываются мембранные пузырьки, в которых оказывается заключенным транспортируемое вещество. Эти пузырьки диффундируют к соответствующим органеллам и сливаются с ними.

Разные виды цитозов отличаются друг от друга направлением транспорта и консистенцией захватываемой пищи. **Эндоцитозом** называют поглощение клеткой веществ, связанное с инвагинациями мембраны, а **экзоцитозом** – выделение. При экзоцитозе ненужные клетке вещества заключаются в мембранные мешочки, которые отшнуровываются от аппарата Гольджи и изливаются наружу при слиянии мешочка с плазматической мембраной.

Если фагоцитоз обозначает перенос через мембрану твердых нерастворимых в воде частиц или целых клеток, то **пиноцитоз** – это транспорт через мембрану в мембранных мешочках капелек жидкости с растворенными в ней веществами. По сути, принципиальной разницы между фаго- и пиноцитозом нет.

Фагоцитоз и, соответственно, фаготрофное питание характерны для эукариотических микроорганизмов, имеющих эластичную оболочку или специальные органы для заглатывания пищи. Это, в первую очередь, разнообразные простейшие, некоторые водоросли, в частности эвгленовые, клеточные и плазмодиальные слизевики.

Выше охарактеризованы способы транспорта веществ через плазматическую мембрану. Ригидные клеточные стенки микроорганизмов, в частности прокариот и грибов, представляют собой дополнительное препятствие для питательных веществ. Клеточные стенки, как правило, не пропускают крупные молекулы, а наружная мембрана в составе клеточных стенок грамотрицательных бактерий обладает избирательностью транспорта подобно плазматической мембране.

§ 10.6. Питательные среды

Выделение микроорганизмов из внешней среды, идентификация, наращивание биомассы, поддержание культур, изучение их свойств, селекция продуктивных вариантов – все эти лабораторные приемы требуют использования разнообразных питательных сред для микроорганизмов. В биотехнологических производствах тоже пользуются питательными средами определенного состава, позволяющими получать целевой продукт. Поскольку, как описано выше, питательные потребности микроорганизмов очень сильно отличаются, так же сильно различаются и питательные среды, пригодные для их культивирования или изучения.

Прежде чем приступить к характеристике разнообразных питательных сред, следует рассмотреть универсальные требования, предъявляемые к ним:

– питательная среда должна содержать достаточные количества биогенных, макро- и микроэлементов в составе тех веществ, которые используются данными микроорганизмами. При этом следует учитывать тип питания микроорганизмов;

– для инкубирования ауксотрофных микроорганизмов среда должна содержать необходимые факторы роста;

– среда должна содержать достаточное количество воды, чтобы все вещества в ее составе были в растворенном состоянии. Следует также учитывать потребность культивируемого микроорганизма к степени влажности, активности воды;

– среда должна характеризоваться определенным для данного микроорганизма значением pH и, по возможности, обладать высокой буферной емкостью, поскольку в процессе роста культуры микроорганизмов выделяют продукты обмена (чаще кислые), способные сильно изменить pH;

– среда должна быть стерильной.

Для упорядоченного изучения разных типов питательных сред обратимся к их классификации. Классифицируют среды по составу, консистенции и назначению.

Характеристика сред по составу. Различают натуральные, синтетические, полусинтетические и живые питательные среды.

Натуральные (синонимы: нативные, полноценные, естественные, сложные) **питательные среды** готовят из продуктов животного или растительного происхождения: соков, молока, крови, отваров, вытяжек, экстрактов мяса или органов животных, плодов или других

частей растений. Эти среды имеют неопределенный состав и содержат все необходимые микроорганизмам компоненты. Примерами натуральных сред являются: мясопептонный бульон (МПБ) – экстракт мяса и костей, пригоден для культивирования многих бактерий; солодовое сусло – получают при выдерживании в воде измельченных пророщенных зерен ячменя (солод), в процессе чего нерастворимая часть солода (крахмал и частично белки) под действием ферментов переходит в раствор (осахаривание), эта среда пригодна для выращивания грибов, в том числе дрожжей; картофельный отвар – применяют для фитопатогенных микроорганизмов; питательный бульон (ПБ) – гидролизат кильки или мясокостных субстратов, используют для культивирования широкого круга бактерий. Натуральные среды чаще всего применяют для наращивания биомассы, поскольку культуры на этих средах обычно быстрее растут. Кроме того, полноценные среды используют для хранения микроорганизмов и культивирования тех из них, чьи питательные потребности не выявлены.

Синтетические (минимальные, бедные) **среды**, в отличие от натуральных, имеют определенный состав. Они готовятся из чистых веществ – источников нужных микроорганизмам химических элементов и содержат эти вещества в строго определенных количествах. Такие среды пригодны для культивирования микроорганизмов, чьи питательные потребности четко определены. На этих средах можно получать стабильные результаты, и их часто используют в генетических экспериментах, поскольку они являются основой большинства селективных сред.

Полусинтетические среды готовят на основе синтетических, но в качестве источников факторов роста добавляют небольшие количества каких-либо натуральных продуктов. Например, среда для выращивания дрожжей рода *Saccharomyces* обычно должна содержать биотин и пантотеновую кислоту. Если эти витамины внести в синтетическую среду в виде растворов чистых веществ, она останется синтетической. Но можно вместо этого добавить к среде богатый витаминами дрожжевой экстракт, тогда среда будет уже полусинтетической, поскольку состав этой сложной добавки не определен.

Живые среды используют для культивирования микроорганизмов, способных размножаться только в живых клетках. Например, для культивирования бактериофагов живой питательной средой будет служить культура чувствительных бактерий; для вирусов растений – культура тканей соответствующих растений или сами растения; для вирусов животных – культура тканей животных или развивающиеся куриные эмбрионы.

Характеристика сред по консистенции. Различают жидкие, плотные, полужидкие и сыпучие питательные среды. **Жидкие среды** не содержат уплотнителей и чаще всего используются для накопления биомассы микроорганизмов.

Плотные (твердые) **среды** отличаются от жидких наличием уплотнителя и после его желирования приобретают относительную твердость. На плотных средах появляется возможность разобщить клетки микроорганизмов и получить изолированные колонии, дающие начало чистой культуре. Со времен Р. Коха, который ввел в практику твердые среды, микробиологи работают с чистыми культурами. Следует заметить, что не все микроорганизмы способны расти на плотных средах: на них формируют колонии прокариоты, слизевики и грибы. Водоросли и простейшие культивируются только в жидких средах. В качестве уплотнителей для твердых сред чаще всего используют агар-агар, желатин и силикагель. У каждого из этих веществ есть преимущества и недостатки, и встречаются ситуации, когда может быть использовано лишь одно из них.

Агар-агар представляет собой сложный полисахарид, который извлекают из талломов красных водорослей. Существенными преимуществами агара перед другими уплотнителями являются:

1) высокая температура плавления, составляющая для 2%-ного геля 98°С. Это позволяет инкубировать на агаризованных средах микроорганизмы в очень широком диапазоне температур, включая выращивание крайне термофильных представителей. Температура затвердевания 2%-ного раствора агара составляет 42°С;

2) этот сложный органический полимер не утилизируется в качестве источника углерода и энергии большинством микроорганизмов, а значит, не разжижается при их культивировании;

3) агар используется в малых концентрациях – для получения плотной среды достаточно внести в нее 1,5% агар-агара (если среда кислая, вносят 2% с учетом того, что при горячей стерилизации часть агара гидролизуется).

Желатин – это белковый материал (смесь полипептидов и их агрегатов), который получают из богатых коллагеном субстратов (костей, хрящей, сухожилий). Он имеет очень низкую температуру плавления (25–27°С), что является существенным недостатком, поскольку температурный оптимум роста большинства микроорганизмов находится выше этого значения. Еще один недостаток желатина состоит в том, что он гидролизуется многими микроорганизмами, разжижаясь при этом. Данное свойство положено в основу одного из физиолого-

биохимических тестов (тест на разжижение желатина), который используется в систематике прокариот и грибов. Положительная реакция теста свидетельствует о наличии в клетках протеолитических ферментов. Для уплотнения сред используются довольно высокие концентрации желатина (15–20%).

Силикагель (Na_2SiO_3 или K_2SiO_3) отличается от других уплотнителей тем, что это – неорганическое вещество. Он используется в основном для инкубирования облигатных литотрофов, которые не переносят даже следовых количеств органики в среде. Недостатками силикагеля являются большая сложность и длительность процедур приготовления пластин из него.

Полужидкие среды готовятся на основе жидких с добавлением меньшего количества уплотнителей, поэтому имеют «мягкую» консистенцию. Агар-агар вносят в полужидкие среды в концентрации 0,5–0,8%, желатин – 7–10%. Эти среды используют для работы с бактериофагами, для хранения культур, в тестах на разжижение желатина, в методах определения диффузии веществ в среду и др.

Сыпучие среды имеют ограниченное распространение в микробиологии. Их используют иногда для хранения культур (обычно методом высушивания в иммобилизованном на мелких носителях состоянии), для твердофазной ферментации в производстве, например при культивировании грибов на отрубях, лигнине, верховом торфе и др.

Характеристика сред по назначению. Обычно выделяют накопительные, элективные, дифференциально-диагностические и селективные среды.

Накопительные среды используют для накопления биомассы определенных видов микроорганизмов. Чаще это жидкие среды, иногда плотные. В большинстве случаев – натуральные.

Элективные среды служат для выделения микроорганизмов с определенными свойствами из природных источников. Их особенностью является такой состав, который способствует преимущественному развитию какой-либо одной группы микроорганизмов (той, что хотят выделить) и ограничивает развитие остальных. Чаще всего это жидкие синтетические или полусинтетические среды. Например, для выделения из внешней среды прототрофных бактерий, способных сбраживать лактозу, следует приготовить синтетическую среду с лактозой в качестве единственного источника углерода и энергии. Она и будет элективной для данных бактерий.

Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды позволяют различать микроорганизмы разных групп по внешнему виду:

обычно по изменению окраски колоний или самой среды. Чаще всего такие среды содержат один или несколько индикаторов, которые реагируют на изменение pH или подвергаются окислению-восстановлению. Консистенция этих сред в большинстве случаев плотная или полужидкая. Среды данной категории используют при идентификации микроорганизмов. Например, широко распространенная агаризованная среда EMB готовится на основе питательного агара, в котором источниками углерода являются преимущественно аминокислоты, с добавлением лактозы и двух индикаторов (эозин и метиленовый синий). EMB используется для выявления энтеробактерий среди других бактерий в пробах пищи, воде, клинических изолятах и др. Редкая способность энтеробактерий сбраживать лактозу регистрируется на среде EMB по изменению цвета колоний и среды вокруг них (синий с металлическим блеском) за счет кислых продуктов брожения, сдвигающих pH. Не сбраживающие лактозу бактерии формируют неокрашенные (розовые) колонии. Эозин и метиленовый синий ингибируют рост грамположительных бактерий, а также высокочувствительных к красителям, таких как молочнокислые.

Селективные среды служат для отбора потомства микроорганизмов после событий генетического обмена. Эти среды составляются таким образом, чтобы обеспечить рост только определенных микроорганизмов (отбираемых, или селектируемых) и предотвратить рост родительских форм. Это, как правило, синтетические среды, содержащие антибиотики и лишенные определенных факторов роста.

Глава 11

ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБНОГО РОСТА

Когда говорят о росте микроорганизмов, обычно подразумевают увеличение численности членов популяции, а не одной особи, поскольку микробиологи всегда имеют дело с более или менее многочисленными микробными культурами. В то же время **онтогенез** отдельно взятой микробной клетки обязательно сопряжен с ее ростом, и, таким образом, необходимо разграничить понятия «рост клетки» и «рост популяции».

§ 11.1. Рост микробной клетки

Это скоординированное необратимое увеличение всех химических компонентов, формирующих клеточные структуры. Рост клетки сопровождается увеличением ее массы и размеров. У некоторых микроорганизмов – большинства прокариот, слизевиков, многих простейших – не наблюдается полярности клеток, и рост их идет равномерно вдоль одной из осей (обычно длинной). Наоборот, для клеток грибов характерен апикальный рост, сопровождающийся удлинением только концевой части клеток (см. § 7.2).

Когда клетка достигает характерного для данного вида размера, она обычно делится или приступает к размножению иным путем. В некоторых случаях, однако, эта закономерность может быть нарушена. При определенных условиях клетки могут делиться, не достигая своих максимальных размеров (образуются миниклетки), либо удлиняться без деления с формированием нитевидных структур (**филаментов**). Эти явления могут быть связаны с мутациями или нарушением метаболизма при особых условиях культивирования, например при воздействии ультрафиолета. Кроме того, исчерпание питательных веществ и избыток продуктов метаболизма могут приводить к утрате

способности клеток к размножению и образованию вместо этого покоящихся форм либо к гибели.

Для некоторых микроорганизмов (актиномицетов, слизевиков, грибов) характерны сложные жизненные циклы с чередованием гаплоидной и диплоидной фаз. Для других (большинства эубактерий, архебактерий, многих водорослей, простейших) онтогенез, или индивидуальное развитие особи, можно определить как период между двумя клеточными делениями или между делением и гибелью. В таком клеточном онтогенезе различают несколько фаз: физиологической молодости, старения и отмирания.

Фаза физиологической молодости. Наступает сразу за образованием новой клетки. Молодая клетка активно растет, изменяется ее содержимое: исчезают запасные вещества (расходуются на интенсивный метаболизм), увеличивается количество РНК, рибосом. Цитоплазма становится более структурированной и лучше прокрашивается основными красителями. Величина клеток в этой фазе увеличивается в 2–3 раза. При благоприятных условиях клетка приступает к делению, при неблагоприятных может перейти в следующую фазу.

Фаза старения клетки. Сопровождается снижением интенсивности метаболических процессов, размеры клеток могут уменьшаться, в них происходит накопление запасных веществ, а количество РНК и рибосом резко сокращается. Цитоплазма становится хуже прокрашиваемой основными красителями. Если клетки к этому способны, они образуют покоящиеся формы (эндоспоры, цисты, миксоспоры и др.). Данная фаза может также перейти в третью, если условия существования не изменятся.

Фаза отмирания клеток. Характеризуется искажением их формы и размеров, возникают так называемые **инволюционные формы**, не способные к размножению. Обмен с окружающей средой затухает, а затем сводится к нулю. Клетка отмирает.

§ 11.2. Рост микробной популяции

Рост каждой микробной популяции подчиняется определенным закономерностям и в очень сильной степени зависит от условий окружающей среды. Легче всего это проследить на примере прокариот, тех из них, которые размножаются единственным способом – бинарным делением. Если в ограниченный объем питательной среды внести небольшое количество бактериальных клеток определенного

вида и инкубировать их в подходящих условиях, они начнут размножаться, формируя клеточную популяцию. Эта популяция в **статической культуре** (в условиях, когда к среде не добавляют питательные вещества и не отводят продукты метаболизма) в своем развитии пройдет несколько фаз роста. Данные фазы роста популяции отличаются друг от друга скоростью деления клеток, а также фазой роста индивидуальной клетки.

Зависимость концентрации жизнеспособных клеток в статической культуре от длительности культивирования описывается характерной кривой, которая называется **кривой роста клеточной популяции** (рис. 11.1). Поскольку концентрация бактериальных клеток изменяется в очень широких пределах, по оси ординат в этой зависимости откладывают логарифмы концентрации жизнеспособных клеток (log *N*). Можно видеть (рис. 11.1), что на кривой отчетливо выражены четыре отрезка, соответствующих четырем фазам (периодам) роста культуры. Поэтому такой вид культивирования (без смены среды) называется **периодическим**.

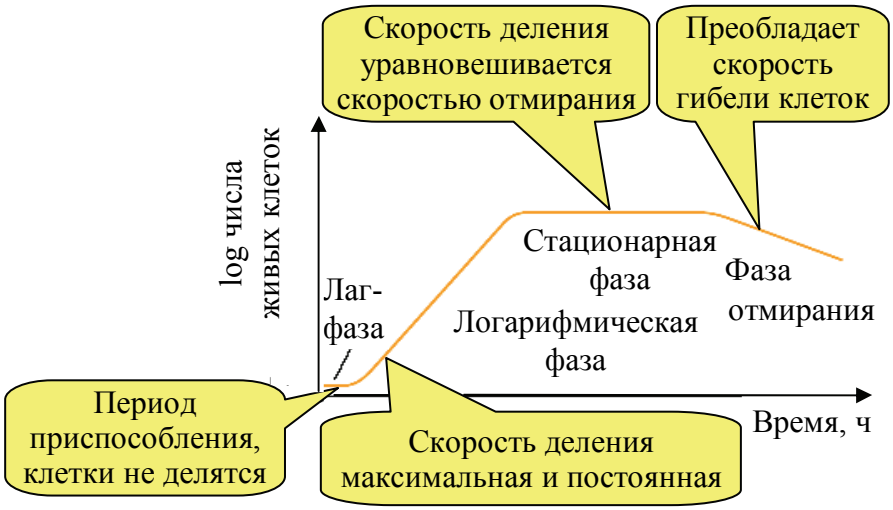


Рис. 11.1. Кривая роста бактериальной популяции в статической культуре

Лаг-фаза. Данная фаза роста клеточной популяции начинается сразу после инокуляции среды и продолжается до достижения бактериями максимальной скорости роста. В этой фазе происходит адаптация клеток к новым условиям культивирования: отмечается синтез новых ферментов, что связано с увеличением содержания РНК и рибосом. Интенсивность метаболизма постепенно увеличивается, достигая максимума в конце лаг-фазы. Клетки активно растут, их состояние соответствует фазе физиологической молодости.

Особенностью лаг-фазы является то, что деления клеток в ней почти не происходит, лишь в конце наблюдается плавный переход (характеризуется некоторым увеличением числа клеток) в следующую фазу.

Длительность лаг-фазы зависит от многих причин: возраста **инокулюма**, состава питательной среды и степени ее пригодности для данных микроорганизмов, от того, произошла ли смена источника углерода и энергии при переносе клеток в новую среду и др. Демонстрацией того, как смена субстрата вызывает необходимость адаптации клеток, является двухфазный, или **диауксический, рост**, который можно наблюдать при выращивании бактерий на смеси субстратов. На рис. 11.2 представлена типичная картина диауксического роста бактерий *E. coli* на среде с равными количествами глюкозы и сорбитола. Из-за распространенного у бактерий типа регуляции метаболизма – катаболитной репрессии, вначале происходит утилизация глюкозы, а по ее исчерпании клетки начинают утилизировать сорбитол. Первая лаг-фаза характеризует адаптацию клеток к утилизации глюкозы, которая в процессе первой log-фазы оказывается израсходованной. Наступает вторая лаг-фаза, в течение которой бактерии перестраивают свой метаболизм на утилизацию другого источника углерода и энергии – сорбитола.

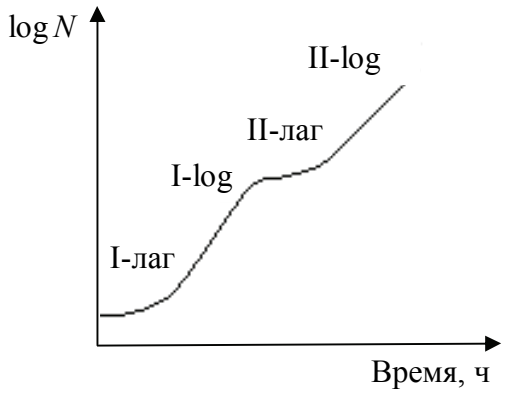


Рис. 11.2. Диауксический рост *E. coli* на среде с глюкозой и сорбитолом

Подобное явление наблюдается при периодическом культивировании дрожжей рода *Saccharomyces* в аэробных условиях на глюкозе. После исчерпания запасов глюкозы дрожжи в ходе второй лаг-фазы синтезируют ферменты, позволяющие им окислять накопленный в ходе первой логарифмической фазы этанол. Во второй log-фазе они извлекают энергию в процессе утилизации этанола.

Логарифмическая (log-) фаза. Иначе она называется **экспоненциальной**, поскольку увеличение числа клеток в ней идет в геометрической прогрессии (по экспоненте). Самой важной особенностью log-фазы является то, что деление клеток здесь происходит с **постоянной максимальной скоростью**. Поскольку речь идет о бактериях, размножающихся бинарным делением, увеличение числа клеток можно представить следующим образом:

$$1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \text{ и т. д.,}$$

или

$$2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow \ldots \rightarrow 2^n,$$

где n – число клеточных делений, или генераций.

Еще одной характеристикой логарифмической фазы является сбалансированный рост: величина клеток и их химический состав (содержание белка и других макромолекул) в течение всей фазы остаются постоянными, т. е. во времени пропорционально увеличиваются число клеток в популяции, их масса, общее количество белка и др. Экспоненциальная культура состоит из «стандартных клеток». Это означает, что, определив один из названных показателей культуры в log-фазе, можно вычислить любой другой.

Именно потому, что скорость деления клеток в логарифмической фазе остается постоянной, определение данного параметра осуществляют в этой фазе. Скорость деления зависит от видовой принадлежности микроорганизмов, а также от условий культивирования, в том числе и от состава среды. Этот показатель варьирует от 3–4 делений в час для клеток кишечной палочки (в идеальных условиях) до одного деления за 33 ч у возбудителей сифилиса – бактерий *Treponema pallidum*. Большинство органотрофных бактерий делятся 2–3 раза в час, у литотрофов скорость деления гораздо меньше – один раз за 5–10 ч, что связано с особенностями их метаболизма. Чем выше скорость деления бактерий, тем короче логарифмическая фаза роста популяции и тем больше угол наклона отрезка кривой, описывающего экспоненциальный рост, к оси абсцисс.

Экспоненциальная фаза клеточного роста продолжается до тех пор, пока в среде остается достаточное количество всех питательных веществ, концентрация клеток не достигнет критического значения и не накопится слишком много токсичных продуктов метаболизма. Все эти условия меняются постепенно, и также постепенно (плавный изгиб кривой на рис. 11.1 (см. на с. 180)) логарифмическая фаза переходит в стационарную.

Важно отметить, что если экспоненциально растущую культуру перенести в такую же среду и инкубировать в таких же условиях, то лаг-фазы не будет, в популяции будет продолжаться экспоненциальный рост.

Стационарная фаза. Переход в стационарную фазу роста обусловлен нехваткой одного или нескольких питательных веществ, обычно из числа биогенных элементов; увеличением содержания продуктов метаболизма, в том числе тех, которые тормозят рост; увеличением числа столкновений между клетками, обусловленным достижением слишком высокой их концентрации. Показано, что бактерии, как и другие одноклеточные микроорганизмы, с помощью рецепторов в составе поверхностных структур способны регистрировать состояния, когда столкновения между клетками становятся слишком частыми, и это является сигналом к прекращению репликации ДНК.

При переходе в стационарную фазу исчезает сбалансированность роста: клеточные компоненты синтезируются с разной скоростью, причем клетки перестают быть «стандартными»: они по-разному реагируют на изменение условий. Некоторые бактерии еще продолжают делиться, а другие уже переходят в фазу старения или отмирания. В результате устанавливается динамическое равновесие между скоростью деления и скоростью гибели клеток, и основным признаком стационарной фазы роста популяции является отсутствие изменений в концентрации клеток (соответствующий отрезок кривой роста на рис. 11.1 параллелен оси абсцисс). Время наступления стационарной фазы в культурах разных микроорганизмов различное. У клеток кишечной палочки она обычно наступает через 18–20 ч. Продолжительность этой фазы также отличается; некоторые бактерии демонстрируют очень длительную стационарную фазу. Однако условия существования клеток неизбежно ухудшаются, и после плавного перехода наступает фаза отмирания.

Фаза отмирания. Эта фаза роста культуры называется одинаково с третьей фазой роста клетки, и основным ее признаком является быстрая гибель клеток. Кинетика гибели бактерий в фазе отмирания так же, как кинетика деления в логарифмической фазе, имеет экспоненциальный характер, поскольку большинство бактерий уже не способно к размножению. Скорость гибели клеток, однако, вовсе не должна соответствовать скорости их деления, и наклон отрезков кривой роста к оси абсцисс для этих фаз чаще всего бывает разным.

Причинами гибели клеток могут являться: накопление в среде органических кислот и спиртов, токсичных продуктов метаболизма

(альдегиды, амины, аммиак, сероводород и др.); выделение клетками литических ферментов – **автолиз** (саморазрушение клетки). У многих микроорганизмов, в особенности у дрожжей и бактерий, явление автолиза служит приспособительным механизмом, помогающим популяции пережить неблагоприятные условия. Показано, в частности, что при автолизе из лизосом дрожжей высвобождаются литические ферменты, расщепляющие содержащиеся в клетке макромолекулы, в том числе входящие в состав мембраны и клеточной стенки. Такая клетка **лизируется** (ее содержимое смешивается с окружающей средой), а высвободившиеся продукты служат питательными веществами для оставшихся жизнеспособными клеток популяции.

В поздней фазе отмирания жизнеспособность сохраняют лишь единичные особи, которые переходят в состояние покоя, в котором в течение длительного времени могут переживать неблагоприятные условия. Виды, для которых характерно образование покоящихся форм, в первую очередь спор, имеют преимущества перед другими, поскольку их представители гораздо дольше остаются жизнеспособными.

§ 11.3. Параметры роста клеточной популяции

Рост клеточной популяции сопровождается как увеличением числа клеток, так и накоплением биомассы. Важно учитывать, что синхронность этих процессов характерна только для логарифмической фазы. В лаг-фазе происходит увеличение массы индивидуальных клеток и всех в совокупности, а прироста числа клеток почти нет. В стационарной фазе изменения числа жизнеспособных клеток не отмечается, а общее их количество и масса увеличиваются, поскольку часть клеток популяции продолжает делиться. Наконец, в фазе отмирания происходит уменьшение числа жизнеспособных клеток, а общее количество клеток может оставаться прежним, если не имеет место автолиз. По этой причине следует четко разграничивать параметры роста клеточной популяции, связанные с изменением числа клеток, и таковые, характеризующие изменение их массы (таблица).

Концентрация клеток. Устанавливается либо путем прямого подсчета числа клеток в определенном объеме суспензии под микроскопом, либо путем высева суспензий на плотные питательные среды с последующим учетом количества сформировавшихся колоний. В первом случае подсчитывают концентрацию всех клеток (и живых, и мертвых) и выражают результат в числе клеток в 1 мл (клеток/мл),

во втором – только жизнеспособных и выражают результат в количестве колониеобразующих единиц на 1 мл (КОЕ/мл). Существуют различные модификации этих методов, позволяющие определять концентрации клеток в сильно разряженных суспензиях, а также концентрацию тех микроорганизмов, для которых не подобраны условия лабораторного культивирования.

Основные параметры роста клеточной популяции

Для числа клеток	Для массы клеток
Концентрация (N, клеток/мл): число клеток на 1 мл	**Плотность** (x, мг/мл): сухая масса на 1 мл
Константа скорости деления (ν, $ч^{-1}$): число удвоений количества клеток в единицу времени	**Константа скорости роста** (μ, $ч^{-1}$): число удвоений массы клеток в единицу времени
Время генерации (g, ч): время, в течение которого происходит удвоение числа клеток	**Время удвоения** (t_d, ч): время, на протяжении которого происходит удвоение массы клеток

Помимо этого, существуют косвенные методы определения концентрации клеток, к числу которых относятся турбидиметрия (определение мутности суспензий), нефелометрия (определение светорассеяния), а также микрокалориметрия (определение тепловыделения клеток).

Константа скорости деления. Этот параметр находится через показатель n, который обозначает число совершившихся клеточных делений (генераций). Данный показатель легко вывести из выражения $N = N_0 \cdot 2^n$:

$$\lg N = \lg N_0 + n \cdot \lg 2;$$

$$n = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2} = \frac{\lg N - \lg N_0}{0{,}301} = 3{,}3 \cdot (\lg N - \lg N_0),$$

где N − концентрация клеток в логарифмической культуре в определенный момент времени, клеток/мл; N_0 − исходная концентрация клеток, клеток/мл; $\lg 2 = 0{,}301$.

В таком случае константа скорости деления клеток в логарифмической фазе роста (ν) может быть выражена отношением числа клеточных делений (n) к промежутку времени (t):

$$\nu = \frac{n}{t} = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2 \cdot (t - t_0)}.$$

Если за 5 ч концентрация клеток в бактериальной суспензии увеличилась с 10^3 до 10^6 клеток/мл, число клеточных удвоений составило 9,9, а константа скорости деления достигла двух удвоений в час:

$$n = 3{,}3 \cdot (\lg 10^6 - \lg 10^3) = 3{,}3 \cdot (6 - 3) = 9{,}9;$$

$$\nu = \frac{n}{t} = \frac{9{,}9}{5} = 2 \text{ ч}^{-1}.$$

Время генерации. Это время (g), необходимое для удвоения числа клеток в популяции, или показатель, обратный константе скорости деления:

$$g = \frac{t}{n} = \frac{1}{\nu}.$$

Для предыдущего примера g = 1/2 ч, или 30 мин.

Плотность клеточных суспензий. Определение массы клеток в единице объема суспензии можно осуществлять прямым измерением и косвенными методами. Прямое определение подразумевает извлечение клеток из определенного объема культуральной жидкости (центрифугированием, ультрафильтрацией) и определение их массы. Можно определять сырую массу, но этот показатель имеет сопоставительную ценность лишь при условии, что известна влажность образца. После высушивания до постоянного веса определяют сухую массу клеток. Прямые методы имеют очень высокую погрешность измерений, поэтому предпочтение отдают косвенным.

Среди косвенных методов определения плотности суспензий могут использоваться турбидиметрия, нефелометрия и калориметрия, а также определение общего белка, общего азота и углерода.

Константа скорости роста (удельная скорость роста). Этот параметр (μ) определяется в логарифмической фазе роста:

$$\mu = \frac{\lg x_t - \lg x_0}{\lg e \cdot (t - t_0)} = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t - t_0},$$

где x_t – плотность клеточной суспензии в определенный момент времени, мг/мл; x_0 – исходная плотность суспензии, мг/мл; $\lg e$ = 0,43429.

Как говорилось выше, соотношение между константами скорости роста и скорости деления в периодической культуре постоянно изменяется. Исключением является логарифмическая фаза роста, и для «стандартных» клеток рост клеточной массы пропорционален увеличению числа клеток. В этом случае $\mu = \nu \cdot \ln 2$, где $\ln 2$ = 0,693.

Время удвоения. Время, в течение которого происходит удвоение клеточной массы (t_d), вычисляется по формуле

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}.$$

Если, как отмечалось выше, $\mu = \nu \cdot \ln 2$ (для «стандартных» клеток), то время удвоения совпадает со временем генерации:

$$t_d = \frac{1}{\nu} = g.$$

Урожай. Это еще один параметр роста клеточной популяции, принимаемый во внимание при оценке продуктивности микроорганизмов. Под урожаем (X) понимают разность между максимальной и исходной массой клеток: $X = X_{max} - X_0$ (рис. 11.3). Обычно эту величину выражают в граммах сухого вещества.

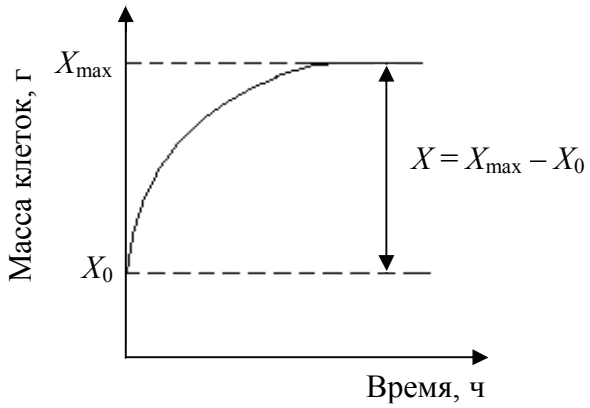


Рис. 11.3. Кривая роста клеток и определение урожая

Экономический коэффициент. Более объективным показателем продуктивности культуры служит экономический коэффициент (Y). Он определяется отношением урожая (X) к количеству потребленного субстрата (S), которое тоже выражено в граммах:

$$Y = \frac{X}{S}.$$

Глава 12

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

В идеальных условиях микроорганизмы способны размножаться с угрожающей скоростью: время генерации большинства прокариот и дрожжей достигает 20–30 мин (см. гл. 11). Это означает, что за сутки одна бактериальная клетка способна образовать 2^{72} потомков ($24 \cdot 3 = 72$ генерации), или $4{,}7 \cdot 10^{21}$ клеток. Масса этого количества клеток приближается к 4720 т! Если бы в природе не существовало факторов, ограничивающих рост микроорганизмов, они очень быстро заселили бы всю планету. Этого не происходит, потому что контролирующие развитие микроорганизмов факторы все же существуют.

Все многообразие этих факторов с определенной долей условности можно разделить на две категории:

– угнетающие (задерживающие) рост микроорганизмов, не приводя их к гибели. Такие факторы называют **ингибирующими**, или **биостатическими** (**микробостатическими**). Те из них, которые ингибируют рост бактерий, называют **бактериостатическими**, грибов – **фунгистатическими**, водорослей – **альгостатическими**;

– вызывающие гибель микроорганизмов. Это **биоцидные** (**микробоцидные**) **факторы**. Убивающие бактерий – **бактерицидные**, грибы – **фунгицидные**, водоросли – **альгицидные**, инактивирующие вирусы – **вирулицидные**.

Следует учитывать, что приведенная градация достаточно условна, поскольку действие фактора в очень сильной степени зависит от его дозы: в одной дозе он может вызывать микробостатический эффект, в другой – микробоцидный, а в низких дозах иногда даже стимулирует рост микроорганизмов. В качестве примера можно привести отношение бактерий кишечной палочки к лактозе: в концентрации 0,2% этот углевод используется ими как источник углерода и энергии (стимулирующее действие); в концентрации 10% ингибирует их рост; а 40%-ный лактозный сироп губителен для этих бактерий.

В целом характер действия того или иного фактора на микроорганизмы зависит от природы фактора, его дозы и свойств микроорганизма. Кроме того, что микроорганизмы характеризуются индивидуальной чувствительностью к факторам окружающей среды (это видоспецифичные или даже штаммоспецифичные свойства), многие из них обладают чрезвычайно высокой адаптационной способностью, позволяющей им приспосабливаться к любым, по сути, природным условиям.

Факторы окружающей среды, оказывающие воздействие на микроорганизмы, можно разделить на физические, химические и биологические. Последние обычно подразумевают взаимоотношения микроорганизмов друг с другом. Рассмотрим каждую из этих групп, выбирая среди огромного разнообразия факторов те, которые оказывают наиболее существенное влияние на развитие микроорганизмов.

§ 12.1. Физические факторы

Первостепенное воздействие на рост микроорганизмов оказывают следующие физические факторы: температура среды, аэрация (содержание O_2), доступность воды и иррадиация.

Температура. Микроорганизмы особо чувствительны к данному фактору, поскольку они не обладают системами терморегуляции и их клетки принимают температуру окружающей среды. При этом каждый вид микроорганизмов характеризуется определенным температурным диапазоном, в пределах которого его представители способны расти, а также температурным оптимумом – значением, при котором наблюдается самая высокая скорость роста популяции (самое малое время генерации) (рис. 12.1). В соответствии с этими параметрами принято делить микроорганизмы на три группы: психрофилы, мезофилы и термофилы.

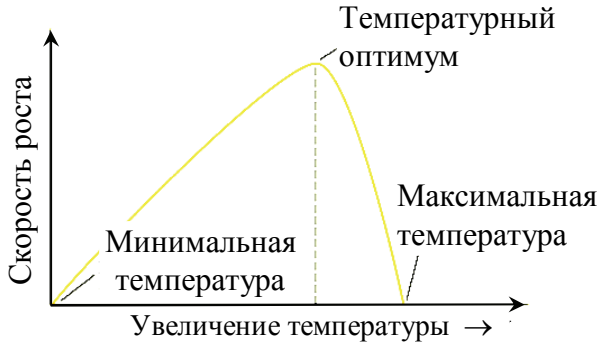


Рис. 12.1. Зависимость скорости роста микроорганизмов от температуры

Психрофилы предпочитают для развития температуру ниже +20°С. Эти микроорганизмы заселяют зоны Арктики и Антарктики, обитают в Мировом океане, в районах с умеренным климатом и резкими температурными колебаниями, в холодильниках, где они при +5°С вызывают порчу продуктов. Некоторые из психрофилов способны развиваться при 0°С и ниже. Чистая вода замерзает при 0°С, морская – при –2,5°С, однако на полюсах планеты, во льдах имеются солевые карманы, в которых вода сохраняет жидкое агрегатное состояние и при более низкой температуре. Самая низкая температура, при которой зарегистрирован рост психрофильных микроорганизмов, составляет –12°С. В клетках психрофилов имеются особые ферменты и рибосомы, активные при низких температурах за счет пониженного содержания слабых связей в белковых молекулах и менее выраженных взаимодействий между доменами, что позволяет им сохранять пластичность при низкой температуре. В составе ферментов психрофилов содержится больше α-спиралей и меньше β-складчатых слоев, чем в составе ферментов мезо- и термофилов.

Психрофилы имеют также особый состав мембран, которые остаются в жидкокристаллическом состоянии при низких температурах, а при повышении до средних утрачивают барьерные свойства, и клетки погибают. В липидах психрофилов содержится много полиненасыщенных жирных кислот или другие длинноцепочечные углеводороды с множеством двойных связей. Например, в мембранах антарктических бактерий обнаружены необычные углеводороды с девятью двойными связями.

Среди психрофильных микроорганизмов больше всего прокариот из групп светящихся морских бактерий, цианобактерий, а также много дрожжей, микроводорослей, простейших.

Мезофилы имеют оптимумы роста от +20 до +42°С, т. е. предпочитают среднюю температуру. К этой группе относится большинство микроорганизмов, в том числе эубактерий, слизевиков, грибов, водорослей и простейших. Среди них есть группа паразитов и комменсалов человека и животных, чей температурный оптимум приближается к +37°С (температура тела человека). Типичным примером последних являются бактерии *E. coli*. Большинство почвенных и водных представителей лучше развиваются при температуре, близкой к +25...+30°С.

Термофилы отличаются температурным оптимумом, который находится выше +42°С. Среди них есть так называемые **гипертермофилы**,

чей оптимум превышает +80°С. Отдельные виды гипертермофильных архебактерий имеют оптимум выше +100°С, в то время как оптимум эубактерий не превышает +95°С. Представители термофильных прокариот охарактеризованы в главах 4 и 5. В § 5.4 описаны способы адаптации архебактерий к высокой температуре. Кроме архебактерий, в водах горячих источников с температурой до +70°С обнаруживаются некоторые цианобактерии и водоросли.

Значения, которые выходят за рамки температурного диапазона соответствующей группы микроорганизмов, в большинстве случаев неприемлемы для их развития. При этом незначительные отклонения могут удовлетворять очень медленному росту, а более существенные сдвиги либо полностью его тормозят, либо приводят к гибели. Механизм действия повышенных и пониженных температур разный.

Повышенные температуры оказывают губительное действие на микроорганизмы, в первую очередь из-за инактивации ферментов, молекулы которых претерпевают необратимую денатурацию. Скорость гибели микроорганизмов при температуре, значительно превышающей оптимум, может быть гораздо выше скорости их роста и имеет экспоненциальный характер. Чем выше температура, тем больше скорость гибели клеток.

Механизм действия пониженных температур на микроорганизмы заключается в снижении ферментной активности, затормаживании процессов метаболизма, что ведет к переходу в состояние анабиоза. На этом принципе основан метод хранения продуктов в холодильниках, погребах. Однако следует учитывать, что многие болезнетворные микроорганизмы способны (хоть и очень медленно) развиваться при температуре +5°С и обусловливать порчу продуктов. В частности, бактерии *Clostridium botulinum* типа Е могут при этой температуре расти и продуцировать токсин. Замораживание до –20°С или ниже предотвращает развитие микроорганизмов полностью. Некоторые из них при замораживании погибают, поскольку в клетках формируются кристаллы льда, разрушающие мембраны. Однако многие микроорганизмы при замораживании сохраняют жизнеспособность и могут храниться в таком состоянии неограниченно долго. Из толщи антарктических льдов, возраст которых составлял не менее 2000 лет, выделены жизнеспособные прокариоты – представители многих существующих ныне групп. Замораживание используется для хранения микроорганизмов в коллекциях культур.

Аэрация. Кислород – это химический фактор, но обеспечение аэрации и создание анаэробиоза можно отнести к физическим процессам.

Эти условия оказывают огромное влияние на рост микроорганизмов, которые в подавляющем большинстве своем зависят от наличия и концентрации O_2 в окружающей среде.

По отношению к O_2 микроорганизмы принято делить на три группы: **облигатные** (обязательные, строгие) **аэробы**, **облигатные анаэробы** и **факультативные** (необязательные) **анаэробы** (рис. 12.2).

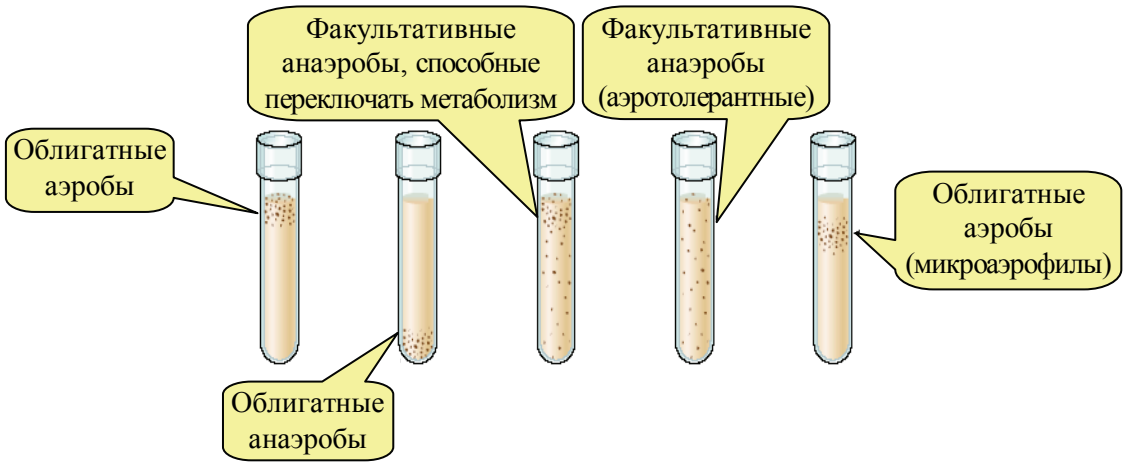


Рис. 12.2. Зоны роста микроорганизмов разных групп по отношению к молекулярному кислороду в агаризованной среде

Облигатные аэробы получают энергию только в ходе аэробного дыхания, в котором молекулярный кислород акцептирует электроны и восстанавливается до воды. Эти микроорганизмы не способны развиваться в отсутствие O_2. К ним относятся многие бактерии, грибы, простейшие. Большинство аэробов являются **микроаэрофилами**, растущими только при пониженных концентрациях O_2 (~5%), и лишь некоторые микроорганизмы хорошо развиваются в атмосфере воздуха, где содержится ~20% O_2.

Облигатные анаэробы не используют O_2 в своем метаболизме, и условием роста многих из них является полное отсутствие молекулярного кислорода, поскольку он для их клеток токсичен. Это, в первую очередь, отдельные представители прокариот, например бактерии рода *Clostridium*, метаногенные архебактерии, сульфатредукторы, а также некоторые грибы и простейшие. Степень чувствительности облигатных анаэробов к молекулярному кислороду разная: одни погибают уже при пересеве на воздухе, у других лишь тормозится рост.

Изучение причин чувствительности анаэробов к O_2 позволило установить, что окисление флавопротеинов или других доноров электронов, а также радиация приводят к восстановлению O_2, которое

сопровождается образованием супероксид-радикалов ($\cdot O_2^-$) и пероксид-анионов ($\cdot O_2^{2-}$). Эти активные формы кислорода легко связывают протоны и переходят в пероксид водорода (H_2O_2). В ходе последующих перестроек формируются также очень токсичные гидроксил-радикалы ($\cdot OH$). Все эти формы являются сильными окислителями, способными окислять сульфгидрильные группы ферментов, приводя их к инактивации, а также вызывать повреждения в ДНК.

Многие клетки синтезируют ферменты, защищающие их содержимое от токсичного действия радикалов кислорода. Каталаза и пероксидаза обусловливают разложение пероксидов в ходе следующих реакций:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Каталаза}} 2H_2O + O_2,$$

$$H_2O_2 + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{Пероксидаза}} 2H_2O + NAD^+.$$

Супероксиды разлагаются под действием супероксид-дисмутазы:

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{Супероксид-дисмутаза}} H_2O_2 + O_2.$$

Каталаза и супероксид-дисмутаза обычно обнаруживаются в клетках аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и обеспечивают им защиту от токсичного действия активных форм кислорода. Микроаэрофилы могут иметь либо не иметь каталазу (это видоспецифичный признак, используемый в систематике), но обычно содержат супероксид-дисмутазу. В противоположность им, облигатные анаэробы обычно не синтезируют данные ферменты или образуют их в малых количествах. Поэтому они не способны к детоксикации радикалов кислорода и не могут развиваться в его присутствии.

Факультативные анаэробы развиваются и в присутствии, и в отсутствии O_2. Эти микроорганизмы делятся на две группы:

1) аэротолерантные, чьи клетки не нуждаются в O_2, но могут развиваться в его присутствии. Примером служат молочнокислые бактерии;

2) способные переключать свой метаболизм с дыхания, в котором используется O_2, на брожение, где молекулярный кислород не участвует. Это, например, бактерии семейства Enterobacteriaceae, а также большинство дрожжей. Причем для последних характерен так называемый **эффект Пастера** – угнетение в аэробных условиях брожения и уменьшение потребления глюкозы, что объясняется большей эффективностью дыхания как способа запасания энергии по сравнению с брожением. Эффект Пастера наиболее выражен у **дышащих дрожжей**. Дышащие дрожжи (многие роды *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*,

Pichia и др.) в аэробных условиях сбраживают менее 30% потребляемой глюкозы, остальную расходуют в процессе дыхания. В противоположность им, **ферментирующие дрожжи** (*Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* и др.) в аэробных условиях расходуют на дыхание менее 10% катаболизируемой глюкозы. Различия между ферментирующими и дышащими дрожжами проявляются только в аэробных условиях при росте на глюкозе, маннозе и фруктозе.

Таким образом, предотвратить рост аэробных микроорганизмов можно, удалив молекулярный кислород. Этот прием используют для продления срока хранения продуктов (вакуумные упаковки, консервирование). Однако следует учитывать, что в анаэробных условиях могут развиваться такие широко распространенные облигатно-анаэробные бактерии, как *Clostridium botulinum*. Поэтому создание анаэробиоза следует сочетать с жесткими методами стерилизации.

Знание отношения микроорганизмов к молекулярному кислороду необходимо для того, чтобы выбрать нужные методы их культивирования в лабораторной практике и на производстве (см. § 13.5). Этими методами пользуются, кроме того, в лечебной практике. Например, развитие газовой гангрены, которую вызывают облигатно-анаэробные бактерии *Clostridium perfringens*, удается приостановить, нагнетая в рану под давлением жидкий кислород.

Осмотическое давление и доступность воды. Все микроорганизмы очень требовательны к содержанию воды в среде обитания. Во-первых, потому, что она составляет более двух третей массы их клеток (см. § 10.1) и все жизненные процессы связаны с наличием воды. Во-вторых, вода – это растворитель для питательных веществ, поступающих в клетку и функционирующих в ней. Все биохимические реакции протекают в воде. Поэтому доступность воды для микроорганизмов оказывает очень существенное влияние на скорость их роста.

Доступность воды зависит не только от ее содержания в среде обитания, т. е. от того – влажная эта среда или сухая, а также от концентрации растворенных веществ (солей, сахаров и др.).

Показателем доступности воды является **активность воды** (A_w). Это отношение концентрации воды в фазе пара в воздушном пространстве над данной средой к концентрации воды в воздухе над чистой водой, иначе говоря, это концентрация свободной воды, т. е. доступной для реакций. Для дистиллированной воды $A_w = 1{,}0$. Активность воды понижается при растворении в ней веществ. Например, насыщенный раствор NaCl имеет $A_w = 0{,}8$, а морская вода с концентрацией солей около 3% характеризуется $A_w = 0{,}98$.

Вода диффундирует из областей с высокой ее концентрацией в области с низкой – явление, называемое осмосом (см. § 10.5). Клеточный цитозоль обычно имеет более высокую концентрацию растворенных веществ, чем окружающая среда, и вода стремится попасть в клетку. Это вызывает определенные трудности для микроорганизмов. Однако многие микроорганизмы приспособились регулировать осмотическое давление в клетке, поддерживая его на определенном уровне. Другие малочувствительны к изменению осмотического давления из-за наличия ригидной клеточной стенки. Но такая защита оказывается эффективной лишь в определенном (среднем) диапазоне концентраций растворенных веществ и в течение ограниченного времени. В сильно гипертонических растворах гибель или ингибирование роста клеток происходит из-за их обезвоживания (вода выходит из клетки). На этом основаны некоторые способы консервирования продуктов: соления, варенья, засахаривание фруктов. В сильно гипотонических растворах открытые участки плазматической мембраны, которые образуются, например, при делении клеток, не выдерживают осмотического давления и разрываются (поэтому разводят клеточные суспензии не в воде, а в растворах солей).

Микроорганизмы разных групп существенно различаются по потребности в свободной воде и, соответственно, к содержанию в среде растворенных веществ. Большинство бактерий и дрожжей нуждаются в активности воды более 0,9, однако среди них существуют **осмотолерантные** (устойчивые к повышенному осмотическому давлению) и **осмофильные** (предпочитающие гипертонические среды) **формы**, способные развиваться при меньших показателях. Например, дрожжи *Saccharomyces rouxii* растут в концентрированных растворах сахара с $A_w = 0{,}6$, а галофильные архебактерии обитают в солевых растворах при $A_w = 0{,}75$. Кроме галобактерий, устойчивость к повышенному содержанию солей проявляют некоторые штаммы бактерий *Staphylococcus*, которые обитают на поверхности кожи человека. Эти стафилококки выдерживают концентрацию соли более 10%, что является необходимым адаптационным механизмом, поскольку секреты кожи содержат много солей. Большинство других эубактерий не растут при концентрации солей в воде, достигающей 3%. Мицелиальные грибы обычно менее требовательны к содержанию свободной воды и хорошо развиваются при $A_w = 0{,}65$.

Галофилы (осмофилы) содержат в клетках особые мембранные липиды и белки, а также необычные ферментные системы, позволяющие им успешно развиваться в водоемах с высокой степенью солености.

При росте в среде с низкой активностью воды клетки могут получить воду только при повышении концентрации внутриклеточного раствора. Это может быть достигнуто двумя способами: перекачиванием внутрь клетки неорганических ионов, что характерно для экстремально галофильных архебактерий (см. § 5.2), а также синтезом определенных растворимых в воде низкомолекулярных веществ, что показано для осмотолерантных эубактерий, водорослей и грибов. В частности, морские цианобактерии регулируют осмотическое давление благодаря синтезу α-глюкозилглицерола; морские водоросли – за счет маннитола, различных гликозидов, пролина, глицерола; ксерофильные мицелиальные грибы и дрожжи – за счет глицерола.

При понижении активности воды ниже переносимого тем или иным микроорганизмом уровня происходит увеличение вязкости цитоплазмы и снижение скорости всех клеточных процессов, после чего может наступить состояние анабиоза или гибель клеток.

В природе микроорганизмы часто подвергаются высушиванию, которое последовательно приводит к таким событиям: прекращается поступление питательных веществ в клетки, обезвоживается цитоплазма, останавливаются процессы метаболизма, клетки переходят в состояние анабиоза. В подобном состоянии большинство микроорганизмов может длительно сохранять жизнеспособность. Классическим примером служат бактерии туберкулезной палочки, которые в высохшей мокроте больного остаются жизнеспособными и сохраняют инфекционность в течение 10 мес. и более. Встречаются и крайне чувствительные к высушиванию микроорганизмы: возбудитель сифилиса *Treponema pallidum* погибает сразу же на воздухе или сухой поверхности, гонококки и холерный вибрион выдерживают высушивание на протяжении всего двух дней. Наибольшую устойчивость к высушиванию демонстрируют споры микроорганизмов. В частности, споры грибов с потоком ветра могут переноситься на огромные расстояния, даже с континента на континент, сохраняя при этом способность к прорастанию. Это их свойство служит проблемой для сельского хозяйства, поскольку обеспечивает легкое распространение возбудителей заболеваний растений. Бактериальные споры также весьма устойчивы к высушиванию. Известно, в частности, что эндоспоры бактерий сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) остаются жизнеспособными в высушенном состоянии в течение 10 лет и более.

Некоторые бактерии, чувствительные к высушиванию, приспособились осуществлять свой метаболизм в симбиозе с мицелиальными грибами, которые защищают их от высушивания в составе лишайников.

Метод высушивания используется при хранении продуктов. Кроме того, наблюдение за способностью бактерий сохранять длительно жизнеспособность в состоянии анабиоза легло в основу одного из самых надежных методов хранения музейных культур – **лиофилизации** (см. гл. 13).

Электромагнитные излучения. Воздействие факторов данной природы на микроорганизмы в очень сильной степени зависит от длины волны того или иного вида излучения. При этом существует обратная зависимость между длиной волны и антимикробным действием излучения, поскольку коротковолновая иррадиация заключает в себе бóльшую энергию, а длинноволновая – меньшую.

Инфракрасное излучение с длиной волны более 740 нм обладает незначительной энергией, и считается, что оно не оказывает какого-либо ощутимого воздействия на микроорганизмы. А вот видимый свет (400–740 нм) уже небезразличен для микроорганизмов. Некоторые из них (цианобактерии, зеленые и пурпурные бактерии, водоросли) используют его энергию в процессе фотосинтеза. Большинство нефотосинтезирующих микроорганизмов лучше растут в темноте. Есть и особо чувствительные к видимому свету представители. Например, туберкулезная палочка погибает от прямых солнечных лучей в течение 3–5 ч, вирус ящура – за 2 ч. Видимый свет способен вызывать повреждения в молекулах белков, нуклеиновых кислот, мембранах за счет поглощения ими фотонов. Многие микроорганизмы приспособились к защите своих клеток от фотодинамического действия света с помощью пигментов, в первую очередь каротиноидов. Эти вещества поглощают свет широкого диапазона волн еще до того, как успеет проявиться его разрушительное действие.

Ультрафиолетовое излучение (4–400 нм) характеризуется высокой энергией, но малой проникающей способностью. Наибольшей эффективностью по отношению к живым организмам обладает ультрафиолетовый свет (УФ) с длиной волны 260 нм. Это излучение интенсивно поглощается ДНК, в результате чего в ее цепях образуются сшивки между тиминовыми азотистыми основаниями (тиминовые димеры), которые обусловливают нарушение процессов репликации и транскрипции. Тиминовые димеры являются источниками мутаций, а слишком большое их количество приводит к гибели микроорганизма. В клетках существуют механизмы, призванные исправлять повреждения ДНК, вызванные УФ-облучением, но слишком большие дозы этого фактора оказываются губительными. Кроме нуклеиновых кислот, УФ поглощают белки и другие макромолекулы, что приводит к нарушению их

структуры и функций. Чувствительность микроорганизмов к ультрафиолету разная: бактерии *E. coli* погибают за 2 мин при УФ-облучении (260 нм) с расстояния 60 см. Для пигментированных форм требуется бóльшая доза. Гораздо более чувствительны к УФ клетки в логарифмической фазе роста, что объясняется наиболее интенсивным синтезом в них ДНК. Ультрафиолет используют в лабораторной практике для индукции мутаций у микроорганизмов, а также в качестве стерилизующего агента.

Ионизирующая радиация, под которой обычно подразумевают рентгеновское и γ-излучение, характеризуется очень малой длиной волны ($1–10^{-5}$ нм), огромной энергией и проникающей способностью. При поглощении γ- и Х-лучей в клетках ионизируются макромолекулы, образуются крайне реакционноспособные свободные радикалы, которые обусловливают химические превращения, приводящие к гибели клеток. Ионизирующая радиация вызывает разрушение водородных и двойных связей, циклических структур в различных молекулах. Хотя повреждаются самые разнообразные молекулы, критическим фактором, обусловливающим гибель клеток и вирусов, является нарушение структуры ДНК (или РНК у некоторых вирусов). Чувствительность микроорганизмов разных групп к ионизирующей радиации разная. Например, десятикратное уменьшение численности бактерий *Clostridium botulinum* (тип Е) достигается при дозе 0,3 Мрад, *E. coli* – только 0,03 Мрад, вируса Коксаки – 0,5 Мрад. Эндоспоры более резистентны к этому фактору, чем вегетативные клетки: снизить их концентрацию в 10 раз можно при повышении мощности ионизирующего излучения от 0,3 до 0,4 Мрад. Абсолютным «чемпионом» по устойчивости к ионизирующей радиации являются бактерии *Deinococcus radiodurans*, которые обитают в водах атомных реакторов, встречаются в залежах урановых руд. Эти бактерии в 20 раз более устойчивы к УФ и в 200 раз – к ионизирующей радиации, чем клетки *E. coli*. Это объясняется наличием в клетках деинококков особых репарационных систем, призванных исправлять повреждения в ДНК. Ионизирующее излучение используется в качестве стерилизующего фактора, в том числе для продления срока хранения некоторых продуктов (фруктов, овощей, морепродуктов).

Электромагнитное излучение сверхвысокой (СВЧ) и крайне высокой частоты (КВЧ), характеризующееся большой длиной волны и частотой электромагнитных колебаний (до 300 ГГц), оказывает на микроорганизмы различное воздействие: от стимуляции роста и интенсивности метаболизма до гибели клеток. Показано, что однократное

недлительное воздействие СВЧ- или КВЧ-излучения на культуры некоторых микроорганизмов приводит к «резонансному эффекту», при котором запускаются определенные клеточные механизмы и происходит активизация физиологических процессов. В то же время СВЧ-излучение большой мощности и частоты вызывает гибель большинства микроорганизмов (в первую очередь из-за теплового эффекта) и используется в качестве стерилизующего фактора.

Гидростатическое давление, или давление, оказываемое весом столба жидкости, может влиять на скорость роста микроорганизмов. Каждые 10 м глубины водоемов соответствуют приблизительно давлению в 0,1 МПа. Большинство микроорганизмов относительно толерантно к гидростатическому давлению, существующему в естественных водоемах, но проявляет чувствительность к экстремальным значениям этого фактора. Давление более 20 МПа обычно приводит к инактивации ферментов и нарушению транспорта веществ через мембраны.

Известны **баротолерантные** (выдерживающие повышенное гидростатическое давление) и **барофильные микроорганизмы** (лучше развивающиеся при повышенном давлении). К числу баротолерантных относятся, например, возбудители сибирской язвы, которые не утрачивают жизнеспособность после суточного воздействия давлением в 60 МПа. Барофильные микроорганизмы тоже представлены в основном бактериями, в частности, *Bacillus submarines* – это обитатели глубоководных впадин морей и океанов, где гидростатическое давление достигает 110 МПа.

Реакция среды. Концентрация протонов и ионов гидроксила оказывает на рост микроорганизмов очень заметное влияние. Каждый вид, иногда штамм, характеризуется определенным диапазоном значений pH, при которых он способен развиваться. Внутри этого диапазона есть показатель pH, удовлетворяющий наиболее быстрому росту данных микроорганизмов, – это **оптимум pH**. Большинство бактерий предпочитает близкие к нейтральным значения pH (6,5–7,5), их называют **нейтралофилами**. Среди этой группы есть много представителей, проявляющих толерантность к пониженным (до 4) и повышенным (до 9) значениям pH. К числу **ацидотолерантных** относятся бактерии, продуцирующие органические кислоты в процессе метаболизма, – уксуснокислые, пропионовокислые, молочнокислые бактерии и др. Среди **алкалотолерантных** встречаются энтеробактерии, аммонификаторы, представители рода *Azotobacter* и др.

Бóльшая часть грибов, водорослей и простейших предпочитают пониженные значения pH, т. е. являются **ацидофилами**. В частности,

наиболее благоприятные значения pH среды для роста большинства дрожжей находятся в пределах 3,5–5,0. Среди микроорганизмов встречаются крайние ацидофилы, которые представлены в основном грибами, продуцирующими органические кислоты (например, виды *Aspergillus*). Они способны развиваться при pH, близких к нулю. Крайне ацидофильными бактериями являются роды *Sulfolobus*, *Thiobacillus*, чей оптимум pH составляет 2,0–2,8, а нижняя граница – 0,6.

К **алкалофилам** относится небольшая группа бактерий, развивающихся лучше при pH выше 9. Это некоторые виды родов *Bacillus*, *Vibrio cholerae*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*.

Требования микроорганизмов к pH среды следует учитывать при составлении питательных сред, поскольку рост большинства из них возможен в довольно узком диапазоне показателей pH. Такое существенное влияние pH на развитие микроорганизмов объясняется следующими факторами: от реакции среды зависит степень диссоциации веществ и их растворимость, а значит, и эффективность их транспорта через мембраны; пространственная структура белковых молекул во многом определяется значением pH, поэтому и активность ферментов является функцией изменения pH; каждый фермент активен лишь в узком диапазоне значений pH.

При культивировании микроорганизмов часто происходит подкисление среды за счет выделения кислых продуктов метаболизма, реже подщелачивание. Поэтому производят контроль и корректирование pH в ходе длительных биотехнологических процессов. Частично, либо полностью, эту проблему можно решить при использовании питательных сред с высокой буферной емкостью. Буферами являются соли слабых кислот или оснований, поддерживающие концентрацию протонов на определенном уровне. Их вводят в состав сред в определенных пропорциях.

Ультразвук. Это высокочастотные (>16 кГц) механические колебания упругой среды, не воспринимаемые нашими органами слуха. При воздействии на микроорганизмы ультразвук создает большую разницу в давлении на отдельные части клеток и повреждает их: разжижается и вспенивается цитоплазма, разрушаются поверхностные структуры, содержимое клетки смешивается с окружающей средой. Чувствительность микроорганизмов к ультразвуку пропорциональна частоте колебаний и длительности воздействия, зависит от их индивидуальных особенностей и физиологического состояния. При длительном воздействии наблюдается 100%-ная гибель микроорганизмов, что используется в целях стерилизации. Кроме того, ультразвук

применяют для разрушения клеток с целью извлечения из них некоторых биологически активных веществ.

Чем крупнее клетки, тем более чувствительны они к воздействию ультразвука; палочки и извитые формы более чувствительны, чем кокки.

Кроме охарактеризованных физических факторов, на развитие микроорганизмов оказывает воздействие изменение напряжения магнитных полей. Этот фактор в настоящее время рассматривается как экологический, определяющий течение многих биологических процессов, в том числе появление и временное исчезновение инфекционных заболеваний, носящих характер **пандемий**. Особенно чувствительны к изменению напряжения магнитного поля магниточувствительные микроорганизмы, содержащие в клетках магнитосомы.

Небезразличны микроорганизмы также к действию земного притяжения, сотрясений, электрического тока (особенно в присутствии токсичных веществ).

§ 12.2. Химические факторы

Среди огромного разнообразия химических веществ естественного происхождения и искусственно синтезированных человеком трудно найти такие, которые бы не оказывали на микроорганизмы никакого воздействия. Большинство из них либо стимулируют рост микроорганизмов, либо угнетают его или даже приводят к гибели. Вещества, благотворно воздействующие на микроорганизмы, уже обсуждались в главе 10, большинство из них используются клетками в процессе питания. В данном параграфе внимание будет уделено химическим веществам, оказывающим отрицательное влияние на рост микроорганизмов, т. е. **антимикробным агентам**. Нелишне будет напомнить, что они могут проявлять микробостатическое или микробоцидное действие, причем это в сильной степени зависит от концентрации вещества и длительности обработки.

Антимикробные агенты принято делить на несколько категорий в соответствии с областью их применения: дезинфектанты, антисептики, консерванты, химиотерапевтические препараты, антибиотики.

Дезинфектанты и антисептики. Строгого различия между этими категориями нет, поскольку большое значение имеет концентрация вещества: в одной из них данный препарат может применяться как дезинфектант, в другой – как антисептик и т. п.

К дезинфектантам обычно относят химические соединения, обладающие высокой микробоцидной активностью по отношению к вегетативным клеткам (но необязательно к покоящимся формам) и неклеточным формам жизни, использующиеся для обработки неживых объектов (лабораторное или промышленное оборудование, медицинское оснащение, полы и стены в помещениях и др.). Под антисептиками понимают микробоцидные агенты, пригодные для наружного использования при обработке поверхностей кожи и слизистых оболочек (не для приема внутрь) с целью уничтожения патогенных микроорганизмов. Принципы использования антисептиков разработаны в 1867 г. английским физиком Джозефом Листером (Joseph Lister), который в качестве первого антисептика применил фенол. Несколько наиболее распространенных антимикробных агентов из числа дезинфектантов и антисептиков приведено в таблице.

Характеристика распространенных дезинфектантов и антисептиков

Агент	Особенности действия
Фенольные соединения	Денатурируют белки, растворяют липиды мембран, что приводит к нарушению их проницаемости и разрушению. В малых концентрациях используются как антисептики, в больших – как дезинфектанты
Галогены	Хлорирование широко применяется для дезинфекции питьевой воды, бассейнов, обеззараживания сточных вод; хлор в воде образует хлорноватистую кислоту – мощный окислитель. Иод – эффективный антисептик в виде 2–3%-ных растворов в 70%-ном этаноле, инактивирует белки; иодоформ – дезинфектант и антисептик
Спирты	Обладают бактерицидным и фунгицидным действием, но малоэффективны против эндоспор и некоторых вирусов; этанол и изопропанол в виде 70%-ных растворов обычно применяются как дезинфектанты и антисептики. Денатурируют белки и растворяют мембранные липиды
Соли тяжелых металлов	Серебро, медь, ртуть, цинк обладают биоцидным действием, их соли используются как дезинфектанты и антисептики. Связывают сульфгидрильные группы ферментов и кофакторов, обусловливая их инактивацию
Поверхностно-активные вещества	Мыла и детергенты применяются для механического удаления микроорганизмов с поверхности кожи. Анионные детергенты (стиральные порошки) обладают таким же действием по отношению к тканям. Катионные детергенты, включая четвертичные соединения аммония, обладают антимикробным действием (дезинфектанты и антисептики), способны встраиваться в мембраны, нарушая их проницаемость и приводя к деструкции

Окончание таблицы

Агент	Особенности действия
Формальдегид	Используется в виде 5%-ных растворов. Вызывает денатурацию белков, вступая с ними в реакции. Обладает микробоцидным действием по отношению к вегетативным клеткам, спорам, вирусам (универсален)
Окись этилена (газ)	Алкилирующий агент с широким спектром биоцидного действия, активен и против эндоспор, применяется для дезинфекции термолабильных материалов (изделий из резины, пластика)
Озон (O_3)	Сильный окислитель и мутаген, используется для дезинфекции воды, овощей и фруктов в хранилищах
Атомарный кислород	Выделяется при разложении во влажной среде хлорной извести, перманганата калия, перекиси водорода. Окисляет различные клеточные соединения, обусловливая быструю гибель микроорганизмов. Широкий спектр действия

Консерванты. Это микробостатические агенты, которые ограничивают рост нежелательной микробиоты в продуктах питания, косметических средствах и др. Данные вещества в используемых (эффективных) концентрациях не должны обладать токсичными, мутагенными или канцерогенными свойствами по отношению к организму человека. Наименее токсичными и чаще других применяемыми консервантами являются поваренная соль и сахар. Их добавление в продукты уменьшает концентрацию свободной воды и тем самым ограничивает развитие микробиоты. Широко используются также органические кислоты (лимонная, молочная, уксусная, пропионовая, бензойная, сорбиновая) и их соли. Действие данных соединений основано на снижении pH продукта, что отрицательно сказывается на развитии нейтралофильных и алкалофильных организмов. Кроме того, многие органические кислоты оказываются токсичными для микроорганизмов.

Для консервирования фруктов, ягод, соков, вин применяют сернистый ангидрид (SO_2), а также жидкие сульфиты. Долгое время для консервирования мясных и рыбных продуктов широко использовали нитриты и нитраты, которые эффективно ингибируют рост таких опасных возбудителей порчи богатых белком продуктов, как *Clostridium botulinum*, а также способствуют сохранению красно-розового цвета мясных продуктов. Однако выяснилось, что эти соли могут взаимодействовать с вторичными и третичными аминами, образуя нитрозамины – высококанцерогенные соединения, поэтому применение нитритов и нитратов в пищевых продуктах ныне ограничено.

В последнее время в качестве консервантов стали использовать бактериоцины, в частности низин. Механизм действия бактериоцинов на клетки близкородственных организмов основан на повреждении плазматических мембран, нарушении синтеза ДНК, РНК и белка.

Химиотерапевтические агенты и антибиотики. К химиотерапевтическим агентам, ограничивающим рост микроорганизмов, относят синтетические соединения, которые применяют для лечения заболеваний, вызванных микроорганизмами. Сюда можно отнести сульфаниламидные препараты, изониазид и этамбутол (противотуберкулезные средства), противовирусные препараты: азидотимидин, ацикловир, амантадин и др. Механизмы их воздействия на микроорганизмы различны. Например, сульфаниламидные препараты (стрептоцид, сульфадимезин, норсульфазол, этазол) сходны со структурной частью витамина B_9, необходимого для биосинтетических процессов клеток. Микроорганизмы, самостоятельно синтезирующие витамин B_9, включают в его состав сульфаниламидные соединения и не способны расти из-за неактивного витамина. В клетках человека витамин B_9 не синтезируется, поэтому для них сульфаниламидные препараты мало токсичны. Такой механизм действия антимикробных веществ носит название **антиметаболизм**, или **конкурентное ингибирование**.

Механизм действия большинства антивирусных препаратов заключается в ингибировании активности ферментов, осуществляющих синтез вирусных ДНК. Многие из этих веществ затрагивают также синтез клеточных ДНК, поэтому являются высокотоксичными.

Антибиотики – еще одна группа эффективных антимикробных соединений. К антибиотикам еще недавно причисляли лишь низкомолекулярные вещества, синтезируемые самими микроорганизмами, с высокой избирательностью действия по отношению к определенным группам микроорганизмов. В настоящее время это определение требует корректировки, поскольку, во-первых, появились синтетические антибиотики, которые, правда, являются аналогами природных; во-вторых, обнаружены антибиотики растительного и даже животного происхождения; в-третьих, найдены антибиотики, чье действие направлено не на микроорганизмы, а на клетки злокачественных опухолей. Назовем главные отличительные особенности антибиотиков: небольшая молекулярная масса (в отличие от бактериоцинов); очень высокая биоцидная или биостатическая активность (по сравнению с большинством дезинфектантов и антисептиков); избирательность действия,

которая отличает антибиотики от остальных антимикробных агентов (кроме бактериоцинов); природное происхождение (даже полностью синтетические антибиотики имеют структуру, похожую на какой-либо природный аналог). Большинство природных антибиотиков синтезируется актиномицетами и мицелиальными грибами.

Механизмы действия антибиотиков на клетки-мишени очень сильно различаются, в соответствии с чем можно выделить несколько их групп. Действие большинства антибиотиков направлено против бактерий. Среди них: нарушающие синтез клеточных стенок (пенициллины, цефалоспорины, ванкомицин, бацитрацин, циклосерин); ингибирующие процесс синтеза белка (стрептомицин, гентамицин, неомицин, канамицин, амикацин, тетрациклины, эритромицин, хлорамфеникол); нарушающие функции мембран (полимиксин, колистин); блокирующие синтез РНК (рифампицин, актиномицин D). Действие противогрибковых антибиотиков направлено на структуры в составе клеток грибов, которые отличаются от таковых у человека. Это, в первую очередь, мембраны, содержащие эргостеролы. Ряд антибиотиков (амфотерицин В, нистатин) предпочтительнее связываются с эргостеролом в плазматических мембранах грибов, чем с холестеролом в мембранах млекопитающих, увеличивают их проницаемость и приводят к гибели клеток грибов. Гризеофульвин разрушает митотическое веретено и, таким образом, ингибирует митоз у грибов. Этот весьма токсичный антибиотик используют чаще для наружного применения при лечении грибковых заболеваний кожи, волосяного покрова головы, ногтей.

В данном перечне приведена лишь небольшая часть из нескольких тысяч известных в настоящее время антибиотиков. Работа по поиску новых антибиотиков не прекращается, поскольку микроорганизмы быстро адаптируются к входящим в обиход новым их формам за счет приобретения **антибиотикорезистентности**. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам может быть природной (**наследственной**). В этом случае она обусловлена проявлением определенных генов, присущих данному виду, и выражается способностью клеток разрушать или инактивировать антибиотик, способностью противостоять переносу антибиотика через мембраны, отсутствием специфической мишени, на которую собственно воздействует антибиотик, способностью изменять ход метаболизма, нивелируя отрицательное действие антибиотика. Кроме того, устойчивость к антибиотикам может быть **приобретенной**. Иными словами, популяция чувствительных к антибиотику клеток может в определенных условиях стать устойчивой к

данному антибиотику. Это может произойти в ходе так называемой **вертикальной** или **горизонтальной эволюции**.

Высокая частота появления мутантных особей и большая плотность бактериальных популяций способствуют тому, что практически в каждой из них содержатся антибиотикорезистентные мутанты. Именно они приобретают преимущественную способность к размножению в условиях, когда в среду попадает определенный антибиотик. Устойчивость к антибиотикам в ходе разных способов генетического обмена может передаваться от одних бактерий к другим. Ситуация облегчается тем, что гены, детерминирующие устойчивость к антибиотикам, очень часто расположены у бактерий в составе плазмидных ДНК, которые особенно легко переносятся из клетки в клетку.

Таким образом, между патогенными микроорганизмами и человеком ведется постоянная борьба: человек все время находит новые антибиотики, а микроорганизмы очень быстро приобретают устойчивость к ним. Работа по поиску новых форм антибиотиков осуществляется в трех направлениях:

1) выделение из внешней среды продуцентов новых антибиотиков и селекция активных штаммов;

2) химическая модификация существующих антибиотиков и синтез антимикробных веществ, похожих по структуре на известные антибиотики;

3) изучение путей биосинтеза антибиотиков и манипуляция генами, кодирующими определенные ферменты, принимающие участие в биосинтезе (область генетической инженерии).

Кроме физических и химических факторов окружающей среды, действие которых на микробные популяции рассмотрено выше, существуют биологические факторы, которые тоже в значительной степени ограничивают численность микроорганизмов в естественных местообитаниях. К числу подобных факторов относят отрицательные типы взаимоотношений микроорганизмов друг с другом и с макроорганизмами. В данном случае членам популяций наносится ущерб.

Знание особенностей воздействия факторов окружающей среды на микроорганизмы разных групп позволяет человеку управлять численностью микробных популяций. На этом основаны, в частности, используемые в лабораторной практике и в биотехнологических производствах методы стерилизации, принципы которых изложены ниже.

§ 12.3. Методы стерилизации

Стерилизация, или обеспложивание, – это процесс уничтожения (инактивации) либо удаления из объекта всех жизнеспособных клеток, спор и других покоящихся форм, а также неклеточных микроорганизмов. Стерилизация имеет огромное значение в микробиологической практике: она позволяет работать с чистыми культурами микроорганизмов, а в биотехнологических производствах – получать целевые продукты, избегая контаминации посторонней микробиотой.

Важно знать, что стерилизация – это вероятностный процесс, и прежде чем применить какой-либо из методов, следует оценить его возможности в конкретных условиях, чтобы не допустить сохранения жизнеспособных организмов в объекте. Особую важность это имеет в консервной промышленности.

Гибель клеток микроорганизмов обычно описывается экспоненциальной кривой (рис. 12.3), по отношению к которой можно выразить два важных параметра: эффективность стерилизации и время десятикратного уменьшения клеток (D).

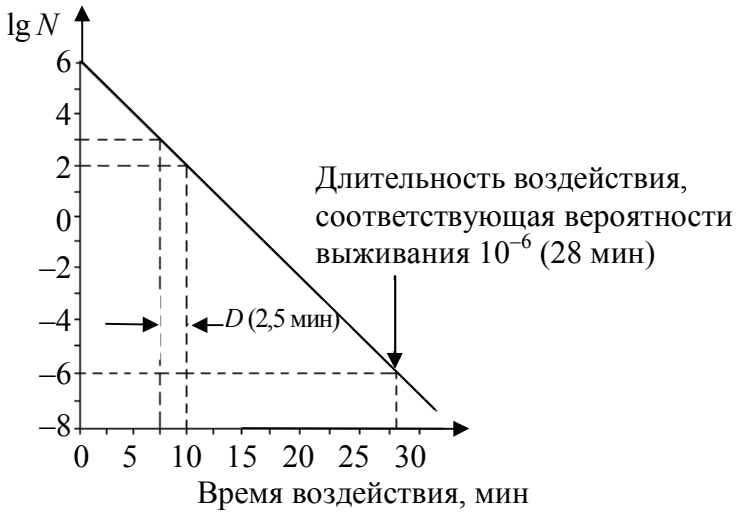


Рис. 12.3. Зависимость числа выживших клеток (lg N) от длительности «горячей» стерилизации. Определение параметра D и вероятности выживания микроорганизмов

Эффективность стерилизации определяется статистической вероятностью выживания клеток, и по окончании процессов стерилизации (с помощью методов: автоклавирования, сухим жаром, ионизирующим излучением, окисью этилена) она должна составлять не более 10^{-6}. Это означает, что из миллиона процедур стерилизации с помощью

определенного метода в определенных условиях только в одной могут остаться жизнеспособные микроорганизмы ($\lg 1/10^6 = -6$).

Параметр *D* используется для оценки скорости уничтожения жизнеспособных микроорганизмов (обычно в методах «горячей» стерилизации). Это время, необходимое при данной температуре для снижения количества жизнеспособных клеток на 90%, т. е. в 10 раз (рис. 12.3). В качестве подстрочного индекса часто обозначают используемую температуру, например D_{120}.

Процесс стерилизации, особенно на производстве, должен подвергаться контролю. Для этого применяют биологические индикаторы, представляющие собой носители (полоски бумаги, нити и др.) с иммобилизованными на них в определенной концентрации термоустойчивыми эндоспорами бактерий. Для этих образцов известны параметры *D* при различных условиях стерилизации и требуется установить соответствие одному из них полученного на проверяемом оборудовании параметра *D*.

От стерилизации следует отличать пастеризацию (частичная стерилизация, приводящая к гибели только вегетативных форм микроорганизмов) и консервирование, под которым подразумевают создание условий, препятствующих развитию микроорганизмов в продукте. Консервирование, впрочем, в большинстве случаев сопровождается стерилизацией.

Все методы стерилизации основаны на чувствительности микроорганизмов к определенным физическим и химическим факторам окружающей среды. Условно методы стерилизации делят на «горячие», в которых действующим агентом является высокая температура, и «холодные», где температурный фактор не используется.

Методы «горячей» стерилизации. К ним относят: автоклавирование, стерилизацию сухим жаром, кипячение, тиндализацию, стерилизацию ультравысокими температурами, прокаливание, обжигание.

Автоклавирование осуществляется в специальных устройствах – автоклавах, где создается повышенное давление насыщенного пара, в результате чего температура пара может достигать 120–130°С. Таким образом, действующим фактором здесь служит температура. Обычным режимом автоклавирования является 15 мин при 121°С, что соответствует давлению насыщенного пара 0,1 МПа. Таким способом стерилизуют питательные среды (не содержащие термолабильных ингредиентов), посуду с ватно-марлевыми пробками, бумажные фильтры для подсушивания сред в чашках Петри. Стерилизация насыщенным паром более эффективна, чем сухая стерилизация, поскольку пар обладает большей проникающей способностью, чем сухой жар.

Стерилизация сухим жаром осуществляется в сухожаровых печах или шкафах. Обычный режим стерилизации – 2 ч при 170°С. Таким методом стерилизуют посуду, мел, крахмал, минеральное масло.

Кипячение как метод стерилизации предусматривает помещение стерилизуемого образца (флакона с жидкостью, бактериологических фильтров, наконечников для пипеток и др.) в кипящую водяную баню и выдерживание в ней на протяжении 30 мин. Важно знать, что эндоспоры при этом могут сохранить жизнеспособность, поэтому данный метод применим для материалов, не содержащих эндоспоры и содержащих небольшое количество вегетативных форм микроорганизмов. Чаще всего кипячение используют для растворов термолабильных веществ (сахаров, аминокислот, витаминов, азотистых оснований), которые готовят в стерильной посуде.

Тиндализация, или дробная стерилизация, применяется для термолабильных веществ, содержащих эндоспоры. Принцип метода описан во введении. Обычно в качестве «мягких» условий стерилизации выбирают кипячение или автоклавирование при 110°С (0,05 МПа), которому материал подвергают трижды с перерывами в сутки. В перерывах материал выдерживают в благоприятных для прорастания спор условиях (обычно 30°С, в темноте).

Ультравысокая температура для стерилизации (135–150°С) используется в тех случаях, когда стерилизуемый материал может изменить свои свойства при длительном процессе стерилизации. Применение такой высокой температуры позволяет сократить время экспозиции до нескольких секунд. Используют для этого перегретый пар. Например, стерилизацию молока осуществляют при 141°С в течение 2 с, при этом молоко не утрачивает своих органолептических показателей и других свойств.

Прокаливание предназначено для стерилизации металлических предметов малой массы (бактериологические петли, препаровальные иглы). Для этого рабочую часть предмета вводят в пламя горелки и дожидаются, пока металл не раскалится докрасна.

Обжигание применяют для стерилизации металлических или стеклянных предметов относительно большой массы (шпатели, пинцеты, ножницы и др.). Предметы окунают в этанол, а затем проносят над пламенем горелки, дожидаясь, пока не выгорит весь спирт.

Методы «холодной» стерилизации. К числу этих методов относят: стерилизацию ионизирующей радиацией, ультрафиолетом, СВЧ-излучением, ультрафильтрацию, использование ультразвука, дезинфекцию. Данные способы обычно применяют для стерилизации термолабильных соединений и материалов.

Ионизирующую радиацию (чаще всего γ-лучи) используют для стерилизации пищевых продуктов, сырья и материалов, например, специй, сахара, пластиковых чашек Петри, наконечников для пипеток, больничных принадлежностей, антибиотиков, витаминов, гормонов, хирургических принадлежностей и др. **Ультрафиолет** применяется для стерилизации воздуха в помещениях, а также поверхностей в лабораториях и оборудования. **Микроволновая стерилизация** (СВЧ) становится все более распространенным способом, с помощью которого стерилизуют микробиологическую посуду и оборудование, не содержащее металла, а также питательные среды.

Фильтрация как метод стерилизации жидкостей и газов предусматривает использование фильтров с размером пор меньшим, чем самые маленькие клетки (вирусы и другие неклеточные микроорганизмы не задерживаются фильтрами). Такие фильтры могут быть выполнены из стекла, асбеста, тефлона, нитроцеллюлозы и ацетата целлюлозы (мембранные), а также других материалов. Фильтрация в данном случае должна быть принудительной (под давлением пропускаемой жидкости или отрицательным давлением в принимающем сосуде). Данный способ широко распространен в лабораторной практике, в медицинской и микробиологической промышленности.

Ультразвук при длительном воздействии на микроорганизмы оказывает 100%-ное летальное действие, и ультразвуковые датчики применяются для стерилизации пищевых продуктов, лабораторного оборудования, вакцин.

Под **дезинфекцией** понимают, строго говоря, уничтожение патогенных микроорганизмов с помощью химических веществ. Но, поскольку в процессе обработки объектов и материалов дезинфектантами происходит гибель любых микроорганизмов, а не только патогенных, значение этого термина можно расширить и обозначить им химическую стерилизацию. Для дезинфекции применяют газообразные или жидкие вещества, обладающие микробоцидным действием (см. таблицу на с. 202−203). Для стерилизации газообразными веществами используют специальные емкости, сосуды или герметичные камеры.

В некоторых случаях эффективность дезинфицирующих агентов усиливают воздействием электрического тока, который обеспечивает диссоциацию молекул на ионы и повышает биоцидный эффект веществ. Электролиз применяют при дезинфекции питьевой воды, обеззараживании сточных вод с участием таких дезинфицирующих агентов, как, например, хлор и хлорная известь.

Глава 13

ОСНОВЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Культивирование, или выращивание, микроорганизмов дает в руки экспериментатору неоценимую возможность изучать и использовать микроорганизмы в своих целях. Именно культивирование микроорганизмов является методической основой биотехнологических процессов, позволяющих получать огромный спектр полезных продуктов.

Существует большое разнообразие способов культивирования микроорганизмов. Они отличаются друг от друга целевой направленностью, приспособленностью к особенностям метаболизма тех или иных видов микроорганизмов, аппаратурным оснащением.

§ 13.1. Элективные методы культивирования

Микроорганизмы в своих естественных местах обитания в подавляющем большинстве случаев образуют сообщества, которые насчитывают десятки и сотни различных видов. Причем состав этих сообществ очень динамичен: при изменении условий окружающей среды меняется и спектр видов микробиоты. Крайне редко, обычно только в экологических нишах с экстремальными условиями, обнаруживаются микроорганизмы лишь одного вида. Но для изучения отдельных представителей и работы с ними, в частности организации биотехнологических процессов, требуются **чистые культуры** микроорганизмов. Чтобы их получить, часто на начальном этапе выделяют микроорганизмы с желаемыми свойствами из окружающей среды. Это непростая задача даже в тех случаях, когда требуемые культуры преобладают в среде, и особенно сложная, когда желаемый микроорганизм составляет незначительную долю естественного сообщества. Добиться цели можно с использованием грамотно подобранных условий для получения **элективной культуры**, т. е. с помощью элективных методов культивирования.

Элективная (накопительная) культура представляет собой смешанную культуру микроорганизмов, включающую более чем один вид (штамм), но количественно преобладают в ней микроорганизмы с определенными свойствами – те, которые хотят выделить из окружающей среды. Иными словами, получение элективной культуры преследует цель повысить относительное содержание микроорганизмов нужного типа в составе сообщества.

Для получения элективной культуры следует обеспечить такие условия, которые бы способствовали более быстрому росту желаемых микроорганизмов и, по возможности, ограничивали развитие остальных. Пользуются химическими (состав питательной среды), физическими и биологическими факторами. О том, как составляют элективные питательные среды, уже говорилось в § 10.6.

К физическим факторам, которые применяют для создания элективных культур, можно отнести: температуру инкубирования, тепловую обработку, воздействие видимого или ультрафиолетового света, доступ O_2, активность воды, обработку ультразвуком, пропускание суспензий через фильтры с определенным диаметром пор и др. При этом используют отличительные особенности выделяемых микроорганизмов: способность расти при повышенной или пониженной температуре, образовывать термоустойчивые эндоспоры, содержать пигменты, защищающие от действия видимого света и УФ, способность к анаэробиозу, устойчивость к высушиванию, необычно малые размеры, подвижность и др. Следует стараться выбрать такие элективные факторы культивирования, которые являются редкими для микроорганизмов, присущими лишь некоторым видам.

Под биологическими факторами подразумевают обычно подбор определенных хозяев для желаемого микроорганизма: например, если хотят выделить из окружающей среды фаги *E. coli*, в качестве живой среды используют суспензию бактерий кишечной палочки.

Как правило, при создании элективных культур для увеличения вероятности получения нужного микроорганизма сочетают химические, физические и биологические факторы. В большинстве случаев инкубирование осуществляют в закрытых системах (без смены среды), т. е. в статической культуре. В этих условиях элективные методы культивирования имитируют процессы, происходящие в естественных местах обитания микроорганизмов.

Пробы субстратов, из которых хотят выделять микроорганизмы, следует отбирать в тех местах, где данный вид может присутствовать в большом количестве или с большой долей вероятности. Например,

микроорганизмы, утилизирующие парафины нефти, – из проб почвы или воды в районах нефтехранилищ, автозаправок; молочнокислые бактерии – из молока и молочных продуктов; литотрофные бактерии – из неокультуренных почв и т. п.

Если существует уверенность, что желаемый микроорганизм преобладает в отобранной пробе (например, по результатам предварительного микроскопирования), то можно воспользоваться высевом жидкой пробы или настоя (вытяжки) твердой пробы на плотную элективную среду. Если такой уверенности нет, следует создавать жидкую элективную среду, в которую можно внести достаточно большую порцию пробы в расчете на то, что присутствовавший в ней в меньшинстве микроорганизм размножится и станет преобладающим.

Приведем пример получения элективной культуры. Допустим, требуется выделить из окружающей среды бактерии рода *Clostridium*. Известно, что эти микроорганизмы отличаются способностью расти без доступа O_2, формируют эндоспоры, разлагают полисахариды и белки, не требовательны к составу среды. Это те факторы, которые отличают клостридий от большинства других микроорганизмов, и их следует положить в основу элективного метода культивирования. Необходимо приготовить полусинтетическую питательную среду, в которой бы единственным источником углерода и энергии являлся, например, крахмал или какой-либо белок. Пробы можно отбирать из богатых органикой почв (для выделения сахаролитических клостридий) или из испорченных белковых продуктов (для выделения пептолитических видов). После внесения пробы в среду полученную суспензию следует подвергнуть пастеризации, чтобы оставить жизнеспособными одни эндоспоры. Культивирование нужно осуществлять в анаэробных условиях, чтобы исключить доступ O_2.

§ 13.2. Получение чистых и смешанных культур

Чистой культурой считают потомство одной клетки (споры, вирусной частицы). Легче всего получить чистую культуру на плотной среде, где клетки могут быть разобщены, так что каждая из них сформирует отдельную (изолированную) колонию, или **клон**. Для тех микроорганизмов, которые не культивируются на плотных средах (водоросли, простейшие), чистые культуры получают методом предельных разведений в жидкой среде, стараясь так развести исходную суспензию,

чтобы в пробирку попала только одна клетка, которая при размножении даст чистую культуру.

В большинстве случаев чистые культуры микроорганизмов получают из элективных культур, которые, как отмечалось выше, являются смешанными. Чтобы обеспечить формирование колоний нужных микроорганизмов на плотной среде, первый высев делают также на элективную среду. Получив изолированные колонии, отбирают наиболее типичные из них (или руководствуются известными морфологическими характеристиками колоний) и подвергают троекратной «расчистке». Эта процедура необходима для того, чтобы избавиться от посторонних микроорганизмов, которые часто присутствуют в колониях, полученных при высеве из элективных сред.

«Расчистка» представляет собой последовательные пересевы изолированных колоний на плотные среды одним из выбранных методов. При этом хотя бы единожды в ходе трех пересевов следует поместить микроорганизмы на полноценную среду, обеспечивающую рост большинства микроорганизмов данной группы. На такой среде сопутствующие основному организму «примеси» сформируют колонии и станут заметными.

Полученные на последнем этапе «расчистки» изолированные колонии следует подвергнуть микроскопическому контролю, и лишь убедившись, что клетки в их составе однородны, можно считать каждый клон чистой культурой.

Смешанные культуры содержат более одного вида или штамма микроорганизмов. Уже подчеркивалось, что в природных экосистемах микроорганизмы обитают в смешанных культурах. Создавая определенные условия, их можно выделять и изучать, а в некоторых случаях – использовать продукты их жизнедеятельности. Наиболее типичным примером использования естественных смешанных культур является биологическая очистка сточных вод. Например, при аэробной очистке утилизацию органики осуществляет микробиота **активного ила**, в состав которой входят десятки видов бактерий, дрожжи и мицелиальные грибы, водоросли и простейшие, вирусы. Такой сложный состав активного ила определяется, в первую очередь, многокомпонентностью субстратов в сточных водах. Между микроорганизмами устанавливаются определенные взаимоотношения, которые на разных стадиях очистки могут переходить от партнерских к антагонистическим и наоборот.

Примером использования смешанных культур определенного состава (ассоциаций, или консорциумов микроорганизмов), которые,

будучи выделенными из внешней среды, сохраняют в определенных условиях свой состав, является производство кефира. Кефир – это продукт комбинированного брожения нескольких групп микроорганизмов, которые носят название «кефирные грибки» (ассоциативная культура, состоящая из дрожжей, молочнокислых и уксуснокислых бактерий). Сбалансированность роста дрожжей и молочнокислых бактерий обусловлена симбиотическим характером взаимоотношений между ними. Дрожжи обогащают среду факторами роста, в которых нуждаются полиауксотрофные молочнокислые бактерии. Сами бактерии, в частности *Lactobacillus brevis*, образуют капсульный полисахарид (кефиран), в который погружена микробная популяция, где создаются благоприятные условия для развития членов ассоциации. Росту дрожжей способствует кислая реакция среды, создаваемая бактериями, а также обогащение среды азотсодержащими веществами за счет протеолиза белков молока ферментами молочнокислых бактерий.

Смешанные культуры можно получить также путем объединения чистых культур. Так поступают, например, при составлении заквасок для производства большинства кисломолочных продуктов. Каждый компонент закваски выделяется и хранится в виде чистой культуры, которые при инокуляции молока смешиваются в определенных сочетаниях, чтобы обеспечить необходимые процессы: образование молочной кислоты, коагуляцию белков, развитие вкуса, аромата, текстуры и консистенции продукта.

§ 13.3. Методы периодического и непрерывного культивирования

Культивирование микроорганизмов в жидкой среде можно осуществлять в закрытой системе (пробирка, колба, ферментер), где постоянно изменяются условия, и культура проходит несколько фаз роста, а также в открытой системе, которая позволяет производить обмен среды. Первый способ культивирования называется периодическим и описан в § 11.2. Он позволяет поддерживать размножение клеток только в течение ограниченного времени – на протяжении экспоненциальной фазы роста.

Открытая система обеспечивает непрерывное (проточное) культивирование, при котором рост клеток происходит постоянно, в течение всего времени культивирования. Если скорость подачи свежей

среды уравновешивает скорость отбора культуральной жидкости (а вместе с ней продуктов метаболизма и части клеток) и суспензия хорошо перемешивается, то рост популяции поддерживается на одной и той же стадии логарифмической фазы роста. Такая система называется равновесной. В ней достигается состояние динамического равновесия между двумя экспоненциальными процессами: удельной скоростью роста культуры (μ) и скоростью вымывания клеток из сосуда (D), которая определяется отношением скорости подачи среды в сосуд (F) к объему жидкости в нем (V):

$$\mu = \frac{F}{V} = D.$$

Существует два основных, принципиально различающихся, способа непрерывного культивирования, подчиняющихся автоматическому регулированию: с использованием хемостата и турбидостата.

Хемостат. В этом устройстве состояние равновесия достигается путем регулирования концентраций поступающих субстратов (субстратное лимитирование). В основу работы хемостата положена следующая закономерность: скорость роста логарифмической культуры в любой момент времени определяется концентрацией одного какого-либо субстрата. Зависимость скорости роста от концентрации субстрата описывается кривой насыщения и выражается уравнением Моно, где K_s – константа насыщения для субстрата, представляющая собой концентрацию лимитирующего вещества при скорости роста, достигающей половины максимального значения (μ_{max} / 2) (рис. 13.1).

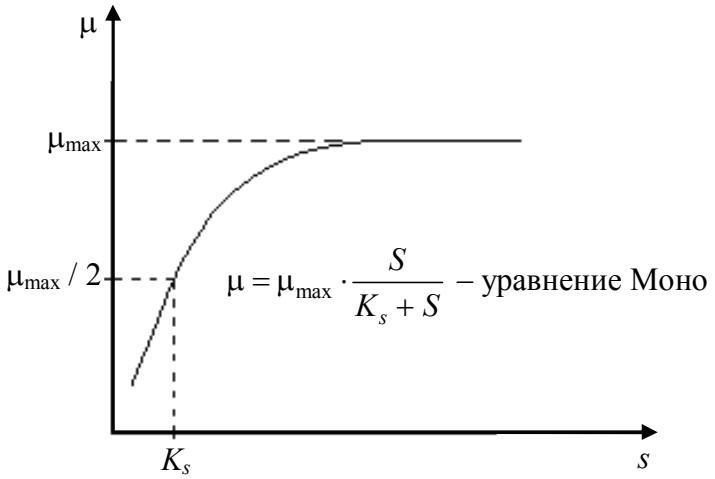


Рис. 13.1. Зависимость скорости роста культуры (μ) от концентрации субстрата (S)

Стабильность динамического равновесия культуры в хемостате обусловлена тем, что ее рост лимитирует концентрация какого-либо субстрата (источника углерода, азота, серы или фосфора, донора или акцептора электронов). Скорость роста поддерживается на низком уровне. В этом случае реактор приобретает свойства саморегулирующейся системы: как только скорость разбавления и вымывания клеток становится выше скорости их роста, увеличивается концентрация лимитирующего фактора, что влечет за собой увеличение скорости роста. И наоборот: если μ превышает D, концентрация лимитирующего фактора снижается, а вместе с ней уменьшается и скорость роста.

Хемостат состоит из сосуда-культиватора, снабженного перемешивающим устройством и системой подачи кислорода, а также двумя выводными отверстиями. Через одно из них подается свежая питательная среда, а через другое отводится культуральная жидкость.

Хемостаты используются не только для культивирования микроорганизмов, но также для изучения их физиологии и для выделения из окружающей среды: увеличивая постепенно скорость разбавления смешанной культуры элективной средой, можно получить микроорганизм желаемого типа. Именно так были выделены бактерии с максимальной скоростью роста, чье время удвоения составляет всего 6 мин!

Турбидостат. Представляет собой похожее на хемостат устройство, в котором, однако, состояние равновесия достигается путем удаления биомассы и замещения ее свежей средой со скоростью, приближающейся к максимальной скорости роста культуры. В сосуде-культиваторе все питательные вещества содержатся в избытке, а плотность клеток поддерживается на постоянном уровне с помощью фотоэлектрических датчиков. Сигнал от датчика управляет скоростью протока жидкости.

§ 13.4. Синхронизация клеточных культур

Микроорганизмы имеют слишком малую величину для того, чтобы можно было изучать их физиологию и биохимию по отношению к одной особи (клетке). Поэтому в подавляющем большинстве случаев исследуют поведение клеточных популяций, насчитывающих огромное число особей – до 10^9 в 1 мл для мелких клеток. Микроорганизмы в обычных (гетерогенных, асинхронных) культурах в каждый конкретный момент времени находятся на разных стадиях клеточного цикла: одни только что образовались в ходе деления, другие приступают

к делению, третьи пребывают в промежуточном состоянии и т. п., что объясняется неодинаковой продолжительностью клеточных циклов для разных членов популяции. Соответственно, и метаболические процессы в этих клетках будут различаться своими фазами. Таким образом, в асинхронной культуре экспериментатор определяет лишь усредненные характеристики популяции. В то же время существуют приемы **синхронизации** роста культур микроорганизмов, благодаря которым удается сделать популяцию гомогенной, содержащей клетки на одной стадии клеточного цикла.

Синхронный рост микроорганизмов достигается в том случае, когда все клетки делятся в одно и то же время. Для синхронизации роста культур используют разные подходы, среди которых общепринятыми являются методы физического выделения гомогенной фракции из гетерогенной популяции (**синхронизация путем селекции**). Распространены два принципиально различающихся метода синхронизации роста путем селекции:

− клеточную суспензию пропускают через мембранный фильтр, а затем смывают с него слабо прикрепленные клетки. Фильтр с прочно адсорбированными на нем клетками переворачивают и пропускают через него с небольшой скоростью питательную среду. Новые клетки, образующиеся в процессе деления прикрепленных к фильтру микроорганизмов, смываются в суспензию. В каждый конкретный момент времени в суспензию попадают клетки, находящиеся на одной стадии жизненного цикла, поскольку образовались они в одно время;

− суспензию клеток центрифугируют в градиенте плотности какого-либо вещества, благодаря чему находящиеся на разных стадиях клеточного цикла и различающиеся по размерам и плотности клетки разделяются. Каждая зона определенной плотности представляет собой гомогенную популяцию. Ее выделяют и помещают в питательную среду, получая синхронную культуру.

Синхронизация культуры может быть достигнута также путем периодического изменения условий культивирования, оказывающих на микроорганизмы существенное влияние. Например, быстрое изменение температуры, концентрации субстратов, кислорода и других параметров, вызывающих подавление, ускорение или задержку метаболических функций циклическим способом. Популяция вначале синхронизирует свой ответ на периодические колебания метаболической активности, а затем и показатели роста. Этот метод имеет ограниченное применение, поскольку связан с нарушением метаболизма микроорганизмов.

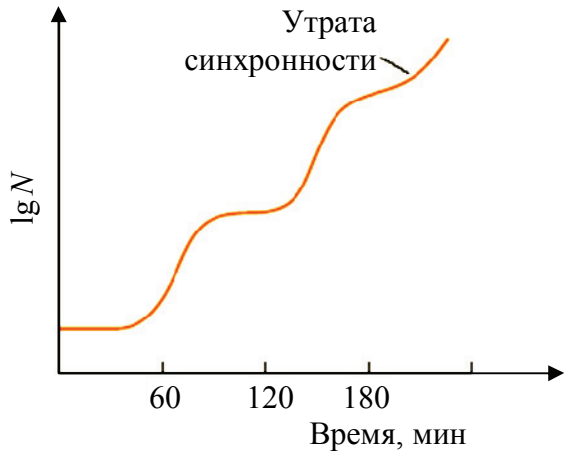


Рис. 13.2. Типичная кривая роста синхронизированной культуры бактерий

Синхронность роста культуры поддерживается недолго – обычно на протяжении двух или трех циклов деления клеток, после чего по мере роста популяции она исчезает. При этом первоначально ступенчатая зависимость, описывающая удвоение числа клеток в каждом клеточном цикле, сменяется более плавной кривой (рис. 13.2). По оси ординат отложен логарифм числа жизнеспособных клеток ($\lg N$). Каждый уступ на кривой отражает синхронный переход вновь образованных клеток к увеличению массы, за которым следует их синхронное деление.

§ 13.5. Культивирование в аэробных и анаэробных условиях

Микроорганизмы, как показано ранее в § 12.1, по-разному относятся к молекулярному кислороду: одни используют его в метаболизме и требуют постоянного притока O_2, другие не могут развиваться в его присутствии. Поэтому при выборе способов культивирования обязательно учитывают данный фактор и используют подходящий прием.

Приемы культивирования аэробных микроорганизмов. Трудности, возникающие при культивировании аэробных микроорганизмов, объясняются тем, что клетки способны использовать только растворенный O_2, а растворимость его в воде ограничена. Один литр воды, находящийся при 20°С в равновесии с атмосферным воздухом, содержит всего 0,28 ммоль O_2 – количество, достаточное для окисления лишь $^1/_{1000}$ запасов глюкозы, присутствующих обычно в

питательных средах. Таким образом, следует обеспечивать постоянное растворение кислорода во всем объеме культуральной жидкости. Этого можно добиться, увеличив поверхность раздела между газовой и жидкой фазами или повысив парциальное давление O_2 в газовой фазе.

Поверхность раздела увеличивают такими способами:

1) культивируют микроорганизмы в тонком слое жидкости (большое отношение поверхности к объему);

2) перемешивают жидкость путем встряхивания. Это один из основных приемов культивирования аэробов в лабораториях, когда применяются специальные встряхиватели или качалки;

3) пропускают воздух или кислород через культуральную жидкость под давлением (барботирование);

4) медленно пропускают через насадку с закрепленными на ней клетками тонкий слой питательной среды, в которой успевает раствориться кислород (перколяция);

5) интенсивно перемешивают жидкость с помощью механической мешалки, создавая турбулентные потоки.

Отсутствие аэрации при культивировании аэробных и многих факультативно-анаэробных микроорганизмов ведет к сильному замедлению роста, поскольку в придонных областях кислород расходуется гораздо быстрее, чем растворяется. При этом способные к переключению метаболизма микроорганизмы (дрожжи, кишечная палочка) переходят на брожение, некоторые бактерии, например *Pseudomonas denitrificans*, начинают реализовывать анаэробное дыхание. Это следует учитывать при переводе культур аэробов в логарифмическую фазу роста и культивировать их с аэрацией.

Культивирование анаэробных микроорганизмов. Особые трудности возникают при культивировании облигатно-анаэробных микроорганизмов, для которых молекулярный кислород токсичен. В этом случае пользуются специальными боксами, заполненными инертными газами, где производят и пересев, и инкубирование культур, а также анаэробными камерами (**анаэростатами**).

Общим правилом при культивировании анаэробов является использование восстановленных питательных сред, характеризующихся низким значением окислительно-восстановительного потенциала (обычно не выше –100 мВ). Чтобы уменьшить окислительно-восстановительный потенциал, в среды добавляют восстанавливающие агенты, к числу которых относятся: цистеин, дитиотреитол, тиогликолат натрия, аскорбиновая кислота и др.

Для культивирования нестрогих анаэробов пользуются следующими приемами:

– среду вносят в сосуды, где отношение площади поверхности к объему достаточно мало;

– среду кипятят для удаления кислорода;

– стараются использовать полужидкую среду (0,05–0,10% агар-агара), чтобы уменьшить конвекционные потоки;

– на поверхность инокулированной среды наслаивают толстый слой минерального масла или смеси равных объемов вазелина и парафина;

– среды не хранят в холодильнике (по мере понижения температуры растворимость кислорода растет);

– сосуды-культиваторы герметично закрывают или помещают в эксикаторы, содержащие адсорбенты O_2 (например, хлорид одновалентной меди);

– при выращивании на плотной среде можно часть ее засеять аэробной культурой, а часть – анаэробной и исключить доступ воздуха путем парафинирования краев чашки Петри. В этом случае вначале будут развиваться аэробы, использующие O_2, после чего их сменят анаэробы.

Можно контролировать состояние инокулятов с анаэробными микроорганизмами с помощью индикаторов. К их числу относится, например, резазурин (0,1 мг на 100 мл), который имеет синюю окраску в среде с высоким значением окислительно-восстановительного потенциала, где много O_2, и обесцвечивается в анаэробных условиях. Используют также щелочные растворы глюкозы с метиленовым синим: в анаэробных условиях они бесцветны.

§ 13.6. Способы хранения микроорганизмов

Для поддержания чистых культур в жизнеспособном состоянии применяют разнообразные методы хранения, основанные на способности микроорганизмов переносить неблагоприятные условия в состоянии анабиоза. Для микроорганизмов различных групп пригодны разные методы хранения, но ко всем из них предъявляется ряд требований, которые следует неукоснительно соблюдать: при хранении микроорганизмы не должны утрачивать свои свойства, не должны погибать, недопустимо загрязнение хранящихся культур посторонней микробиотой, в геномах хранящихся микроорганизмов не должны накапливаться мутации.

При помещении на хранение штаммы микроорганизмов следует особым образом маркировать. Маркировка должна сочетать буквенные и цифровые обозначения штамма (чтобы исключить одинаковое обозначение разных штаммов в одной лаборатории), ссылку на журнал, в котором описаны особенности микроорганизма, дату засева на хранение. В лабораторном журнале должны быть отражены: родовое и видовое название микроорганизма, источник выделения, состав пригодной для него питательной среды, особенности роста, генотип, дата последнего пересева.

Методы хранения микроорганизмов можно разделить на непродолжительные и долгосрочные.

Методы непродолжительного хранения. Наиболее часто в лабораториях и на производствах для непродолжительного хранения микроорганизмов используют **субкультивирование**. Это периодический пересев микроорганизмов на свежие питательные среды. Периодичность таких пересевов зависит от особенностей микроорганизма: для одних требуется ежедневный пересев, другие можно пересевать раз в несколько недель. Для субкультивирования обычно выбирают синтетические среды, поскольку на них микроорганизмы демонстрируют пониженную интенсивность метаболизма, и интервалы между пересевами удлиняются. Лучше использовать комнатные температуры, в холодильниках среда скорее подсыхает, и клетки быстрее погибают. Недостатками этого метода являются: трудоемкость (метод неприменим для больших коллекций); опасность утраты штаммов (при частых пересевах увеличивается вероятность гибели клеток, контаминации посевов, путаницы при маркировке и т. п.).

Еще одним распространенным методом хранения музейных культур является **хранение под слоем минерального масла**. Срок этого метода исчисляется месяцами или даже годами. Минеральное масло наносят на выросшую культуру толстым слоем. Оно защищает среду от высыхания, а кроме того, снижает метаболическую активность аэробов и за счет этого замедляет рост и старение клеток.

Менее часто используется высушивание. Этот метод больше подходит для хранения дрожжей, а также спорообразующих микроорганизмов.

Методы длительного хранения. Наиболее надежным и чаще других применяемым является метод **лиофилизации** – высушивание из замороженного состояния. Процедура заключается в удалении воды из замороженных клеток путем сублимации при низком давлении. Обезвоженные таким образом клетки вместе с защитной средой хранятся в запаянных ампулах десятки лет.

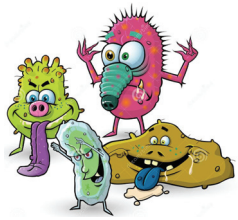
Еще одним методом длительного хранения культур является **криоконсервация**. Используется температура жидкого азота (–196°С) или его паров (–150°С). В таких условиях клетки могут сохранять жизнеспособность более десятка лет. Кроме того, возможно применение специальных морозильных камер, поддерживающих температуру на уровне –70°С. Наконец, допускается и обычное замораживание при температуре –20°С в морозильных камерах бытовых холодильников. Оно позволяет сохранять микроорганизмы в жизнеспособном состоянии до нескольких лет, хотя этот метод применим далеко не ко всем видам: некоторые быстро погибают из-за образования кристаллов льда. Если замораживать культуры в присутствии глицерола или диметилсульфоксида (ДМСО), точка замерзания понижается, кроме того, данные растворы проникают в клетки, предотвращая формирование в цитозоле кристаллов льда. Поэтому подобные вещества называют криопротекторами. Обычно для хранения культур микроорганизмов их суспендируют в питательной среде с 10% глицерола или ДМСО и быстро замораживают до −70 или −196°С.

Часть III

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Глава 14

САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ



В середине XX в. в медицинской литературе появились описания многочисленных случаев так называемой «лекарственной» инфекции, возникающей при заражении больных в ходе приема препаратов, содержащих патогенные микроорганизмы. В этой связи были проведены крупномасштабные исследования микробной обсемененности лекарственных средств, источников и путей проникновения микроорганизмов в фармацевтическое производство, были разработаны методы, предупреждающие микробную контаминацию лекарственных средств, и созданы системы микробиологического контроля на всех этапах технологического процесса.

Основными источниками попадания микроорганизмов в сферу производства и конечный продукт являются: сырье и вспомогательные материалы, вода, воздух, персонал, занятый в производственном процессе, технологическое оборудование. Знание экологии микроорганизмов позволяет оценить вероятность их попадания в фармацевтическую продукцию и в ряде случаев определить возможный источник контаминации, что необходимо для организации производства микробиологически безопасных лекарственных средств.

§ 14.1. Нормальная микробиота человека

Организм каждого здорового человека играет роль хозяина для особого микробного сообщества, называемого **нормальной микробиотой**. В условиях физиологической нормы организм человека содержит сотни видов микроорганизмов. Главным компонентом этой микробиоты являются бактерии, которых в теле взрослого человека содержится порядка 10^{13}, что превышает число его собственных клеток. Вирусы и простейшие представлены значительно меньшим числом видов.

Основным типом взаимодействия нормальной микробиоты с организмом человека является мутуализм, хотя встречаются и примеры комменсализма. Например, большинство непатогенных бактерий, заселяющих ротовую полость, используют остатки пищи, которую мы едим, не причиняя нам вреда и не принося какой-либо пользы.

На состав микробиоты влияет состояние гормональной, иммунной, нервной и других систем человека. Значительную роль в изменении состава микробных сообществ играют особенности питания, нерациональная лекарственная терапия, наличие соматических (неинфекционных) заболеваний и условия труда.

Органы и ткани, не соприкасающиеся с внешней средой, свободны от микроорганизмов. В норме стерильными являются сердце, кровь, лимфа, мозг, спинномозговая и синовиальная жидкости, мочевой пузырь, матка, а также глубокие ткани. Основные отделы организма, заселяемые бактериями, включают кожные покровы, верхние дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и мочеполовую систему.

Постоянная (резидентная, или автохтонная) **микробиота** представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме. Часть нормальной микробиоты является **оппортунистической** – способной вызвать заболевание при снижении или нарушении защитных сил организма (например, при терапии, подавляющей иммунную систему, диабете, СПИДе). Различают также **транзитную** (аллохтонную) **микробиоту** – микроорганизмы, которые попадают в тело человека (животного), но не задерживаются там долго.

До рождения плод человека фактически не содержит микроорганизмов, но быстро заселяется ими в момент рождения и в первые часы жизни. Обычно микроорганизмы, которые станут нормальной микробиотой, попадают из окружающей среды в ротовую полость, на кожу, в дыхательную, мочеполовую и пищеварительную системы новорожденного и колонизируют эти отделы.

В состав нормальной микробиоты входят представители около 400 видов микроорганизмов, которые характеризуются специфичностью по отношению к разным отделам организма.

Микробиота кожных покровов. Кожа человека заселена резидентной микробиотой, относящейся, прежде всего, к родам бактерий: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*. Место постоянного обитания – роговой слой кожи, протоки сальных желез, волосяные мешочки. Их клетки питаются секретами сальных и потовых желез, в составе которых присутствуют липиды, свободные жирные кислоты, высшие спирты, глицерол, углеводороды, молочная кислота, мочевина, аминокислоты, соли, лизоцим. Молочная кислота способствует снижению pH кожных покровов до значений 3–5, лизоцим препятствует синтезу клеточных стенок, мочевина ингибирует рост бактерий. Все эти факторы способствуют уменьшению степени колонизации кожи микроорганизмами. Но даже при этих обстоятельствах концентрация бактерий на 1 $см^2$ кожи достигает 10^6 на влажных (богатых железами) участках и 10^2–10^4 – на сухих.

Наибольшее число микроорганизмов обитает в складках кожи, здесь встречаются дрожжи рода *Candida*. На коже волосистой части головы часто присутствуют виды родов *Pityrosporum*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*.

Микробиота полости рта. Ротовая полость – удобная экологическая ниша для микроорганизмов, поскольку здесь поддерживается постоянная температура и pH, присутствует влага и обилие органики. Поэтому микробиота здесь особенно разнообразна. Наличие в полости рта слюны с ее бактерицидными компонентами, лизоцимом, иммуноглобулинами, некоторыми литическими ферментами ограничивает возможности оральных микроорганизмов как возбудителей заболеваний.

В слюне содержится до 10^8 клеток бактерий в 1 мл, представленных, в основном, стрептококками. Особенностью этих бактерий является способность синтезировать полисахариды, с помощью которых клетки агрегируют между собой и прикрепляются к зубам, языку, миндалинам. Развиваясь в матриксе, бактерии *Streptococcus sangius* и анаэробные актиномицеты выделяют лактат и другие органические кислоты, обусловливая кариес зубов.

Грамотрицательные анаэробные кокки представлены родом *Veilonella*, они не утилизируют дисахариды, но разлагают пируват, лактат, ацетат до CO_2 и воды, способствуя повышению pH и сдерживая рост возбудителей кариеса, образующих молочную кислоту.

Спирохеты полости рта представлены родами *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, простейшие – родами *Entamoeba* и *Trichomonas*.

Микробиота верхних дыхательных путей. Верхние отделы дыхательных путей несут особенно высокую микробную нагрузку, так как они анатомически приспособлены для осаждения бактерий из вдыхаемого воздуха. На слизистых носа преобладает микробиота, сходная с кожной, а носоглотку колонизируют авирулентные штаммы *Streptococcus pneumoniae* и *Neisseria meningitidis*, виды рода *Moraxella*, факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки рода *Haemophilus*. В гортани присутствуют стрептококки, в тканях миндалин – микоплазмы и аденовирусы. В нижних дыхательных путях (трахее, бронхах и легких) у здоровых людей практически отсутствуют микроорганизмы. Большинство вдыхаемых с воздухом клеток вместе с пылью оседает на слизистых верхних дыхательных путей, а те немногие, которые достигают нижних отделов, удаляются из них при участии специального слизевыделительного механизма.

Микробиота желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Микробиота ЖКТ различается качественным и количественным составом в зависимости от его отдела. В желудке выживают очень немногие микроорганизмы (обычно не более 10 на 1 мл содержимого) из-за присутствия соляной кислоты и различных пищеварительных ферментов. Сохраняют жизнеспособность чаще всего ацидотолерантные лактобациллы и дрожжи, а также бактерии *Helicobacter pylori*, обусловливающие гастрит и язву желудка. При патологии в результате повышения pH их количество возрастает.

Тонкий кишечник заселен микроорганизмами очень неравномерно. В его верхней трети, где много кислоты и желчи, находится до 10^3 клеток грамположительных кокков и бацилл в 1 мл. В центральной части количество и разнообразие микроорганизмов увеличивается: здесь присутствуют энтерококки, лактобациллы, коринебактерии, дрожжи *Candida albicans*. В нижней трети тонкого кишечника резко увеличивается содержание анаэробных бактерий рода *Bacteroides* и уменьшается концентрация факультативно-анаэробных представителей, типа кишечной палочки.

Микробиота толстого кишечника наиболее богата и разнообразна: здесь в 1 г массы содержится 10^{10}–10^{11} бактерий, представленных более 350 видами. Содержание строго анаэробных представителей в несколько сотен раз превышает количество факультативно-анаэробных, а облигатных аэробов вообще нет. Осуществляющие процессы ферментации бактерии толстого кишечника составляют 25–35% фекальных

масс. Кишечная микробиота снабжает организм человека и животных рядом витаминов, таких как рибофлавин, биотин, B_{12}, K. Она же осуществляет процессы расщепления клетчатки и других веществ, не поддающихся перевариванию ферментами человеческого организма. В толстом кишечнике преобладают грамотрицательные бактерии родов *Bacteroides* и *Fusobacterium*. Из грамположительных бактерий здесь доминируют роды *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*. Менее 1% видов представлено кишечной палочкой и энтеробактериями родов *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*. Встречаются безобидные простейшие *Trichomonas hominis*.

Микробиота мочеполовой системы. Микробиота нижних отделов мочевыделительных и половых путей представлена бактериями родов *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, отдельными видами спирохет, дрожжами, включая представителей рода *Candida*. Микробиота влагалища формируется с наступлением половой зрелости. Это молочнокислые бактерии, коринебактерии, дрожжеподобные грибы и простейшие, для которых благоприятна кислая среда (pH 4,0–4,2).

Почки, мочеточники, моча в мочевом пузыре не содержат микроорганизмов.

Значение нормальной микробиоты. Нормальная микробиота является одним из факторов неспецифической резистентности организма и необходима для его нормального функционирования. Большинство микроорганизмов разных отделов организма обладает антагонистическими свойствами по отношению к другим патогенным бактериям и вирусам.

Нормальная микробиота кишечника способствует пищеварению, расщепляя сложные органические вещества и оказывая влияние на морфологию слизистой и ее адсорбционную способность, а также участвует в образовании витаминов K и группы B.

Тепло, которое выделяется в процессе метаболизма обитателями кишечника, способствует поддержанию постоянной температуры тела теплокровных животных.

Микроорганизмы принимают участие в детоксикации ксенобиотиков и образующихся токсичных продуктов.

Нормальная микробиота способствует созреванию и поддержанию иммунной системы. При нормальной колонизации слизистых оболочек бактерии, являясь антигенами, индуцируют образование антител, составляя основу местного иммунитета и не позволяя возбудителям проникнуть в ткани, а также способствуя поддержанию гомеостаза самих слизистых оболочек.

Продукты метаболизма нормальной микробиоты постоянно попадают в кровь, оказывая влияние на метаболизм макроорганизма. Нарушение симбиоза микро- и макроорганизма приводит к нарушению обменных процессов, аллергическим, кожным, онкологическим заболеваниям.

Нормальная микробиота способна вызывать развитие инфекционных заболеваний, большая часть которых носит оппортунистический (сопровождающий) характер. Например, основными возбудителями постгриппозных пневмоний считают микроорганизмы, обитающие в носоглотке человека. Ведущую роль в развитии подобных поражений играет не вирулентность самого возбудителя, а ослабление защитных систем макроорганизма (иммунодефицит).

Длительное применение антибиотиков и антисептиков способствует развитию дисбактериозов, проявляющихся в нарушении качественного и количественного состава микробиоты. Важным фактором является снижение местного и общего иммунитета в результате гормонотерапии, применения иммунодепрессантов, лучевой терапии, инфекционных и аллергических заболеваний, воспалительных процессов. Одной из важных причин развития дисбактериоза считается стресс. Общее ухудшение экологической обстановки, низкое качество воды, неполноценное и несбалансированное питание также могут стать причиной дисбактериоза. Наиболее часто встречается дисбактериоз кишечника.

§ 14.2. Санитарно-показательные микроорганизмы

В биосфере Земли повсеместно присутствуют микроорганизмы, жизнедеятельность которых вносит важнейший вклад в круговорот углерода, азота, серы, фосфора и других элементов, а также поддерживает динамическое равновесие в биосфере. Естественными средами обитания микроорганизмов являются вода, почва, организмы растений, животных и человека. Микробиоту окружающей среды, включая свободноживущие и паразитические микроорганизмы, а также влияние микробиоты на экологическую ситуацию и здоровье человека изучает санитарная микробиология. Основными источниками распространения возбудителей инфекционных заболеваний являются человек и теплокровные животные. Наибольшее их количество поступает в окружающую среду воздушно-капельным и фекальным путями.

Отрицательный результат обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды еще не говорит с достоверностью об их отсутствии. В санитарной микробиологии оценку состояния различных объектов проводят непрямым путем, устанавливая факт их загрязнения выделениями человека и животных, и чем обильнее это загрязнение, тем более вероятно попадание в объект патогенных микроорганизмов.

Состав нормальной микробиоты разных отделов организма человека довольно постоянен и мало меняется при инфекционных заболеваниях. Для многих видов кишечник, полость рта, верхние дыхательные пути являются единственной средой обитания. Обнаружение таких микроорганизмов в каком-либо объекте свидетельствует о его загрязнении соответствующими выделениями. Например, обнаруживая нормальных обитателей кишечника, можно сделать заключение о наличии фекального загрязнения и возможной опасности присутствия брюшнотифозных, дизентерийных палочек, возбудителей других кишечных инфекций.

Выделяемые в таких случаях **микроорганизмы** служат показателями санитарного неблагополучия, потенциальной опасности исследуемых объектов и поэтому названы **санитарно-показательными (СПМ)**. Однако не все микроорганизмы, входящие в состав нормальной микробиоты человека, могут быть признаны санитарно-показательными.

Основные требования, предъявляемые к санитарно-показательным микроорганизмам:

1) такие микроорганизмы должны постоянно содержаться в выделениях человека и теплокровных животных и поступать в окружающую среду в больших количествах;

2) они не должны иметь другого природного резервуара, кроме организма человека и животных;

3) после выделения в окружающую среду они должны сохранять жизнеспособность в течение сроков, близких к срокам выживания патогенных микроорганизмов, поступающих в окружающую среду тем же путем;

4) они не должны размножаться в окружающей среде;

5) у микроорганизмов не должно быть во внешней среде «двойников» или аналогов, с которыми их можно перепутать;

6) они не должны изменять свои биологические свойства во внешней среде;

7) они должны быть достаточно типичными, чтобы их диагностика осуществлялась без особого труда;

8) методы идентификации СПМ должны быть простыми, доступными и экономичными.

Принципы и методы проведения санитарно-микробиологических исследований. При проведении санитарно-микробиологических исследований необходимо выполнять следующие требования:

– правильный отбор проб. Его проводят с соблюдением всех необходимых правил асептики; при хранении и транспортировке следует исключить возможность гибели и дополнительного размножения микроорганизмов. При невозможности немедленно сделать анализ материал хранят не более 6–8 ч;

– серийность проводимых анализов. Микроорганизмы в объектах окружающей среды распределены крайне неравномерно. Для получения адекватных результатов проводят отбор серии проб из разных участков объекта. При проведении анализов все образцы смешивают и отбирают среднюю пробу;

– повторность отбора проб. Для получения сопоставимых результатов осуществляют повторный отбор проб в связи с тем, что в исследуемых образцах состав микробиоты меняется достаточно быстро;

– применение стандартных методов исследования. Использование методик, утвержденных ГОСТ, позволяет получать в разных лабораториях сопоставимые результаты;

– использование комплекса тестов. Это необходимо для получения адекватной информации при сочетании прямых и косвенных методов выявления микроорганизмов с учетом влияния факторов внешней среды и собственной микробиоты объекта.

Современная санитарная микробиология стремится использовать простые, точные и надежные методы. Они направлены на определение общей микробной загрязненности и выявление СПМ и включают:

1) прямой подсчет при микроскопии микроорганизмов в объекте;

2) методы выделения и идентификации микроорганизмов;

3) биологические методы с использованием лабораторных животных.

Прямой подсчет применяют в экстренных случаях при необходимости срочного ответа о количественном содержании бактерий. Основной недостаток – невозможность получить точный ответ из-за образования бактериями агломератов или прикрепления к частицам среды. Этот метод позволяет подсчитывать только общее (и живых, и мертвых) число клеток.

Посев на плотные питательные среды осуществляют с целью подсчета числа выросших колоний, исходя из предположения, что одна клетка формирует одну колонию. Этот метод позволяет выявлять

только микроорганизмы, растущие на плотных питательных средах. К тому же не существует универсальных питательных сред, удовлетворяющих росту всех микроорганизмов. Содержание жизнеспособных клеток в объекте выражают в так называемых **колониеобразующих единицах (КОЕ)**.

Методы, применяемые в санитарной микробиологии, позволяют определять в основном мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (МАФАМ). Этот показатель также используют для оценки микробной контаминации объекта.

Характеристика основных групп санитарно-показательных микроорганизмов. СПМ условно делят на три группы.

Первая группа включает обитателей кишечника человека, их считают индикаторами фекального загрязнения. В нее входят бактерии группы кишечной палочки (колиформные бактерии), энтерококки, сульфитвосстанавливающие клостридии (включая *Clostridium perfringens*), колифаги.

Ко **второй группе** относятся обитатели верхних дыхательных путей и носоглотки, которые являются индикаторами воздушно-капельного загрязнения среды. В нее входят стафилококки.

Третья группа включает сапротрофные микроорганизмы, обитающие во внешней среде. Это индикаторы процессов самоочищения. В нее входят бактерии-аммонификаторы и нитрификаторы, некоторые спорообразующие бактерии, актиномицеты, цианобактерии и грибы.

Бактерии группы кишечной палочки (БГКП, колиформные бактерии). Преимущество этих бактерий как СПМ связано с тем, что они являются постоянными обитателями кишечника и постоянно выделяются с фекалиями в окружающую среду в больших количествах, их число намного выше, чем других представителей кишечной микробиоты.

В настоящее время к этой группе относят грамотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие глюкозу, лактозу и маннит, не обладающие оксидазной активностью. Колиформные бактерии подразделяют на две подгруппы:

– общие колиформные бактерии, расщепляющие глюкозу и лактозу до молочной кислоты и CO_2 при 37°С в течение 24 ч;

– термотолерантные колиформные бактерии, расщепляющие глюкозу и лактозу до молочной кислоты и CO_2 при температуре 43,0–44,5°С.

Энтерококки. К роду *Enterococcus* относят грамположительные, неспорообразующие овальные бактерии, образующие скопления в виде пар или цепочек клеток. Ранее их относили к роду *Streptococcus*.

Все виды энтерококков отвечают ряду требований, предъявляемых к СПМ:

1) это постоянные обитатели кишечника несмотря на то, что их количество меньше, чем БГКП;

2) во внешней среде они могут размножаться только при высоком содержании органических веществ и температуре не ниже 20°С;

3) не обладают выраженной изменчивостью во внешней среде, что облегчает их распознавание;

4) не имеют аналогов во внешней среде;

5) отмирают во внешней среде значительно раньше, чем БГКП, поэтому их присутствие свидетельствует о свежем фекальном загрязнении.

Главным достоинством энтерококков является их устойчивость к неблагоприятным внешним факторам. Они устойчивы к нагреванию до 65°С в течение 30 мин, что делает их показателем качества режима пастеризации. Энтерококки устойчивы к высоким концентрациям NaCl (6,5–17,0%), что позволяет применять их при анализе морской воды. Они устойчивы в диапазоне pH 3–12, что можно использовать при анализе сточных вод кислого и щелочного характера.

Клостридии. Клостридии выделяются в окружающую среду с фекалиями, но их количество меньше, чем БГКП и энтерококков и составляет 10^5–10^6 клеток в 1 г. К СПМ относят *Clostridium perfringens* и *Clostridium sporogenes*. Это крупные, полиморфные, грамположительные, спорообразующие палочки. Основным биохимическим признаком для идентификации клостридий служит способность формировать черные колонии на железосульфитной среде за счет образования FeS. Эта среда позволяет дифференцировать клостридии фекального загрязнения от клостридий, обитающих во внешней среде. Кишечные клостридии восстанавливают сульфиты и вызывают почернение среды, а свободноживущие не имеют сульфитредуктазы и не изменяют цвет среды. Следует отметить, что почернение среды могут вызывать другие бактерии, например *E. coli*. Для подавления роста сопутствующей микробиоты посевы выращивают при 43,0–44,5°С или прогревают при 80°С в течение 15–20 мин.

Бактерии *C. perfringens* размножаются во внешней среде, но при температуре не менее 18–20°С и при достаточном количестве питательных веществ, например в гумусных почвах южных широт.

О давности фекального загрязнения принято судить, сопоставляя содержание споровых и вегетативных форм. Для прорастания спор необходимо нагревание при 70°С на протяжении 15–30 мин.

Определяют количество клостридий в непрогретых и прогретых пробах. В прогретых пробах присутствуют только споровые формы, что подтверждает давность фекального загрязнения. В непрогретых пробах выявляют вегетативные и споровые формы. Большое число вегетативных клеток свидетельствует о свежем фекальном загрязнении.

В отечественной практике о давности фекального загрязнения судят, сопоставляя индексы БГКП и *C. perfringens*. Если оба показателя имеют высокое значение, то делают заключение о наличии свежего фекального загрязнения. Высокое значение индекса БГКП и низкое значение индекса клостридий указывает на давнее загрязнение.

Стафилококки. Стафилококки попадают в воздух с поверхности кожи, а также при разговоре и кашле с выделениями слизистых оболочек верхних дыхательных путей. Для воды бассейнов количество стафилококков является важным показателем санитарного состояния воды. Стафилококки в воде выживают дольше, чем БГКП и энтерококки. Однако используют стафилококки в основном как СПМ воздуха закрытых помещений.

Бактериофаги. В качестве СПМ предложено использовать бактериофаги кишечных бактерий (эшерихий, сальмонелл и шигелл). Кишечные фаги постоянно обнаруживают там, где есть бактерии, для которых они специфичны. Однако как показатели возможного присутствия патогенных бактерий они имеют определенные недостатки:

– бактериофаги выживают в окружающей среде дольше (8–9 мес.), чем соответствующие бактерии (4–5 мес.);

– они способны существовать и на других видах бактерий.

Однако как показатели фекального загрязнения они имеют важное значение, поскольку выделяются из сточных вод с той же частотой, что и многие вирусы (гепатита А, полиомиелита). Их устойчивость к дезинфектантам сопоставима с устойчивостью энтеропатогенных вирусов.

§ 14.3. Санитарная микробиология воды

Вода является естественной средой обитания разнообразных микроорганизмов. В пресных и соленых водах выявляют представителей всех таксономических групп бактерий, многих водорослей, простейших и грибов. На качественный состав микробиоты существенно влияет происхождение воды как среды обитания. Различают поверхностные (озера, пруды, реки, моря и океаны) и подземные (почвенные,

грунтовые, артезианские) водоемы. Водные микроорганизмы участвуют в круговороте веществ в водоеме.

Микробиота водных экосистем непостоянна по видовому составу, но в нем можно выделить собственно население, присущее данному водоему (**автохтонные обитатели**), и те микроорганизмы, которые попали в водоем с источниками загрязнения (**аллохтонные виды**). Загрязнение водоемов может происходить при попадании промышленных (особенно пищевых и сельскохозяйственных предприятий), хозяйственно-фекальных, талых, ливневых сточных вод.

В результате микробного загрязнения при попадании неочищенных сточных вод в водоем могут проникать возбудители инфекционных заболеваний: холеры, брюшного тифа, лептоспирозов, полиомиелита, гепатита и др.

Вода не является благоприятной средой обитания патогенных микроорганизмов, приспособленных к организму человека и животных. Поэтому происходит их постепенное отмирание и освобождение воды от этих микроорганизмов.

Для естественных водоемов характерно явление самоочищения, которое состоит в их способности через определенное время (при отсутствии дальнейшего загрязнения) восстанавливать свое исходное состояние. Эта способность основана на биогеохимических циклах и процессах взаимодействия популяций автохтонной микробиоты. Органические субстраты в водоемах метаболизируются и подвергаются минерализации в клетках гетеротрофных микроорганизмов. Аллохтонные популяции, среди которых могут быть кишечные и другие патогены, постепенно сокращают свою численность, не выдерживая конкуренции и антагонизма со стороны сообществ автохтонных гидробионтов. Наиболее выраженной способностью к самоочищению обладают проточные водоемы с большой зеркальной поверхностью и глубиной.

В составе гидробионтов, заселяющих водоем, выявляют определенные виды, которые представляют собой индикаторные организмы. Поскольку степень загрязненности воды оказывает очень существенное влияние на состав микробиоты, ее можно оценивать по наличию индикаторных организмов. К числу таких организмов относятся автохтонные обитатели с определенной степенью чувствительности к загрязнениям, иными словами, приспособленные к той или иной зоне сапробности. Под **сапробностью** понимают комплекс физиологических свойств организма, обусловливающих его способность развиваться в воде с определенным содержанием органических веществ (с определенной степенью загрязненности).

Согласно одной из распространенных систем оценки степени загрязненности природных водоемов по системе сапробности, выделяют четыре зоны сапробности:

1) **полисапробная зона** (p) – самая высокая степень загрязненности, соответствующая большому содержанию неустойчивых органических веществ и продуктов их анаэробного разложения. Практически отсутствует O_2, не осуществляется фотосинтез. В воде содержатся метан и сероводород. Микробное число приближается к 10^6 клеткам в 1 мл. Коли-титр составляет 0,001 мл. Микробиота представлена различными бактериями, в том числе нитчатыми (*Sphaerotilus*), серными (*Beggiatoa*), зооглеями (*Zoogloea*), простейшими, среди которых преобладают инфузории, жгутиковые;

2) **α-мезосапробная зона** (α-m) – средняя степень загрязненности, характеризующаяся началом аэробного разложения органики с выделением CO_2, NH_3. Кислорода немного. Микробное число ~10^4–10^5 клеток в 1 мл. Коли-титр составляет 0,05–0,001 мл. Микробиота представлена нитчатыми бактериями, зооглеями; появляются грибы, цианобактерии (*Oscillatoria*), водоросли (*Stigeoclonium*); среди простейших преобладают сидячие инфузории, много жгутиковых;

3) **β-мезосапробная зона** (β-m) – средняя степень загрязненности, характерная для водоемов, почти не содержащих неустойчивых органических веществ. Концентрация O_2 и CO_2 сильно меняется на протяжении суток: днем O_2 достигает насыщения (за счет фотосинтеза), CO_2 практически нет; ночью наблюдается дефицит O_2 (расходуется на дыхание). Микробное число ~10^2–10^3 клеток в 1 мл. Коли-титр составляет 10–0,05 мл. В составе микробиоты наблюдается большое разнообразие водорослей и простейших, много фотоавтотрофов, обусловливающих цветение воды, в составе обрастаний присутствуют зеленые, нитчатые и диатомовые водоросли;

4) **олигосапробная зона** (o) – практически чистая вода с небольшим содержанием органики и продуктов ее разложения. Концентрация O_2 и CO_2 не меняется значительно в течение суток. Не наблюдается цветения воды. Микробное число ~10^1 клеток в 1 мл. Коли-титр составляет 100–10 мл. Индикаторами высокой степени чистоты воды являются некоторые красные водоросли, в первую очередь *Batrachospermum*, а также отдельные виды диатомей (*Cyclotella bodanica*, *Synedra acus*), зеленых (*Micrasterias truncate*), золотистых водорослей (*Mallomonas caudata*), некоторых простейших (*Vorticella nebulifera*).

Микробное число – это количество бактерий, способных формировать колонии на мясопептонном агаре (универсальная питательная среда, обеспечивающая рост большинства культивируемых в лабораторных условиях гетеротрофных бактерий) за 24 ч при 37°С в 1 мл жидкости или в 1 г плотного субстрата.

Коли-титр – это наименьший объем воды (мл), в котором содержится одна клетка бактерий группы кишечной палочки. Обратным показателем, который также часто используется для определения степени фекального загрязнения воды, служит коли-индекс – количество клеток бактерий группы кишечной палочки, содержащихся в 1 л воды.

При санитарно-микробиологическом анализе воды определяют количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 л воды и количество санитарно-показательных микроорганизмов.

СПМ для воды являются общие и термотолерантные колиформные бактерии, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes* и бактериофаги. При необходимости определяют фекальные энтерококки (*Enterococcus faecalis*).

В соответствии с Санитарными нормами и правилами к воде центрального водоснабжения предъявляются следующие требования: общее микробное число – не более 50 клеток в 1 мл; не разрешается присутствие в 100 мл общих колиформных и термотолерантных бактерий, колифагов; не допускается присутствия в 20 мл сульфитредуцирующих клостридий и в 50 мл цист лямблий.

§ 14.4. Санитарная микробиология почвы

Почва является главным резервуаром и естественной средой обитания микроорганизмов, принимающих участие в процессах формирования и самоочищения почвы и в круговороте веществ. Почвенные экосистемы наиболее богаты микроорганизмами, чему способствует наличие в них органических и неорганических субстратов, влаги, защищенность от фотодинамического действия солнечного света. Самое большое число видов микроорганизмов выделено из почвы. Качественный состав микробиоты почвы очень разнообразен и включает преимущественно спорообразующие бактерии, актиномицеты, спирохеты, простейшие, цианобактерии, микоплазмы, грибы, вирусы. Состав микробиоты сильно зависит от типа почвы, способов ее обработки, содержания органических веществ, влажности, климатических условий и других факторов.

Основным фактором, регулирующим численность микроорганизмов в почве, является содержание органики. Так, в 1 г черноземной почвы может присутствовать до $5 \cdot 10^7$ клеток, а в песке пустынь – только до 10^5. Бóльшая часть микроорганизмов обитает в верхних горизонтах почвы (до глубины 5–10 см), где присутствует наибольшее количество органических веществ. Особенно много микроорганизмов в прикорневой зоне растений (**ризосфере**), здесь между растением и микроорганизмами обычно устанавливаются симбиотические взаимоотношения.

В почву, как и в воду, вместе со сточными водами могут попадать представители нормальной микробиоты человека и животных, а также патогенные микроорганизмы. Как правило, они длительно не выживают в условиях окружающей среды. Однако многие бактерии, входящие в состав нормальной микробиоты человека, могут включаться в биоценоз почвы, а отдельные виды остаются постоянными ее обитателями. В связи с этим бывает трудно разделить микробиоту почвы на автохтонную и временно существующую.

Для оценки роли почвы в возникновении инфекционных заболеваний необходимо знать возможную продолжительность сохранения и размножения патогенных микроорганизмов в почве. В зависимости от срока жизни микроорганизмы, попадающие от человека, можно разделить на три группы:

– патогенные микроорганизмы, постоянно обитающие в почве, например, *Clostridium botulinum*. Попадая с фекалиями, они могут неопределенно долго сохраняться в почве;

– спорообразующие патогенные микроорганизмы, для которых почва является вторичным резервуаром. Попадают с фекалиями человека и животных, а также с трупами животных. При благоприятных условиях могут размножаться и сохраняться в виде спор длительное время;

– патогенные микроорганизмы, попадающие с выделениями человека и животных и сохраняющиеся несколько недель или месяцев. В эту группу входят неспорообразующие бактерии, на сроки их сохранения влияет антагонистическая активность микробиоты почвы.

Санитарно-микробиологический контроль почвы проводят по двум показателям: общему микробному числу (число жизнеспособных клеток в 1 г почвы) и наличию СПМ (БГКП, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *Enterococcus faecalis*). Высокая численность сапротрофной микробиоты свидетельствует об органическом загрязнении, а при микробной контаминации выделениями человека и животных преобладают СПМ.

§ 14.5. Санитарная микробиология воздуха

Воздух, в отличие от воды и почвы, не является средой обитания микроорганизмов. Это лишь среда их распространения, поскольку в воздухе отсутствуют источники питания и, кроме того, велика интенсивность солнечного света, который губителен для большинства хемотрофных микроорганизмов. Тем не менее в воздухе может присутствовать достаточно большое количество микроорганизмов – до $5 \cdot 10^4$ в 1 м^3. Их содержание в очень сильной степени зависит от концентрации взвешенных частиц, на которых способны адсорбироваться вирусы, бактериальные и дрожжевые клетки, эндоспоры и митоспоры грибов. Наиболее частым загрязнителем воздуха является пыль, и можно с уверенностью утверждать, что существует прямая зависимость между количеством пыли в воздухе и концентрацией микроорганизмов. Кроме пыли во взвешенном состоянии микробные клетки и частицы удерживают дым, копоть, выхлопные газы, некоторые органические взвеси и др.

Наибольшее содержание микроорганизмов регистрируется в нижних слоях тропосферы, в непосредственной близости от земли. По мере удаления от ее поверхности содержание микроорганизмов в воздухе падает.

Самый чистый воздух, как известно, находится в горах, а также над морями и океанами: здесь в 1 м^3 может не содержаться ни одной клетки (споры, вирусной частицы). Относительно чистый воздух находится над лесными массивами. Показано, что даже в крупных городах в воздухе парковых зон микроорганизмов в 2,5–3 раза меньше, чем в обычных кварталах, а в пригородных зеленых зонах их количество может уменьшаться в 6 и более раз.

Наиболее загрязнен микроорганизмами воздух в мегаполисах и крупных промышленных центрах, чему способствует, как отмечалось выше, содержание в нем большого количества взвешенных частиц, на которых сорбируются микроорганизмы.

Условно микробиоту наружного воздуха разделяют на резидентную (наиболее часто обнаруживаемую) и временную, менее стойкую к воздействию внешних факторов.

В составе постоянной микробиоты воздуха чаще всего обнаруживают пигментированные виды бактерий (*Micrococcus* spp., *Sarcina* spp.) и дрожжей, споры *Bacillus* spp., актиномицетов и мицелиальных грибов, а также вирусные частицы.

Временная микробиота формируется за счет микроорганизмов, поступающих из почвы и с поверхности водоемов.

Часто в воздухе присутствуют патогенные виды микроорганизмов, которые способны передаваться воздушно-капельным путем, т. е. при вдыхании воздуха. Мы вдыхаем в день 10–20 $м^3$ воздуха, и он обычно содержит от 10^4 до 10^6 микроорганизмов, среди которых есть и потенциально патогенные для человека формы. Считается, что инфицирование организма через дыхательный тракт – самый распространенный способ передачи инфекции. Таким путем передается большинство вирусных респираторных инфекций (в том числе грипп), туберкулез, корь, коклюш, скарлатина, оспа. Возбудители этих заболеваний попадают в воздух в больших количествах при кашле и чихании: при одном акте чихания человек выделяет $4{,}5 \cdot 10^3$–$1{,}5 \cdot 10^5$ живых форм патогенных микроорганизмов, которые распространяются в радиусе 1,0–1,5 м.

Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений существенно различаются по качественному и количественному составу микробиоты. Бактериальная обсемененность жилых и некоторых типов производственных помещений всегда превышает таковую атмосферного воздуха. Контаминация воздуха закрытых помещений происходит воздушно-капельным путем в составе аэрозоля при разговоре, кашле, чихании. Кроме того, микроорганизмы попадают со слущивающимся эпителием кожных покровов, с пылинками одежды и частицами почвы.

Аэрозоль представляет собой коллоидную систему из капелек влаги и твердых частиц, на которых адсорбированы микроорганизмы. Размеры частиц аэрозоля – от 10–100 до 2000 нм. В зависимости от размера капель, их электрического заряда и скорости движения в воздухе различают следующие фазы.

Капельная фаза представлена мелкими каплями, длительно сохраняющимися в воздухе и испаряющимися до оседания.

Пылевая фаза представлена крупными, быстро оседающими и испаряющимися каплями. В результате образуется пыль, способная подниматься в воздушную среду.

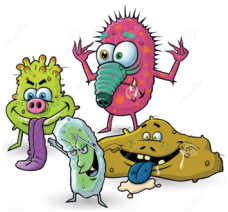
Капельные ядрышки. Мелкие капельки аэрозоля (до 100 нм), высыхая, остаются в воздухе во взвешенном состоянии и образуют устойчивую аэродисперсную систему. В них частично сохраняется влага, поддерживающая жизнеспособность микроорганизмов.

Санитарно-микробиологическому контролю подлежит воздух закрытых помещений. В нем определяют общее микробное число (число жизнеспособных микроорганизмов в 1 $м^3$ воздуха). В лечебных учреждениях дополнительно оценивают СПМ (стафилококки и стрептококки).

Допустимый уровень содержания микроорганизмов в воздухе производственных помещений определяется классами чистоты помещений, необходимыми для выполнения конкретных технологических операций.

Глава 15

ИСТОЧНИКИ И ПУТИ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ



К числу основных производств биологически активных веществ (БАВ) относят производство лекарственных субстанций, готовых лекарственных средств и иммунобиологических препаратов для медицины и ветеринарии, а также производство различных нелекарственных веществ, используемых в народном хозяйстве.

Биотехнологическое производство представляет собой сложный многоступенчатый технологический процесс, включающий получение полупродукта, субстанции БАВ и готовой продукции.

Сырье – лекарственные субстанции, лекарственные растения или их части, полупродукты, вспомогательные вещества, используемые в производстве лекарственных средств, за исключением упаковочных и маркировочных материалов.

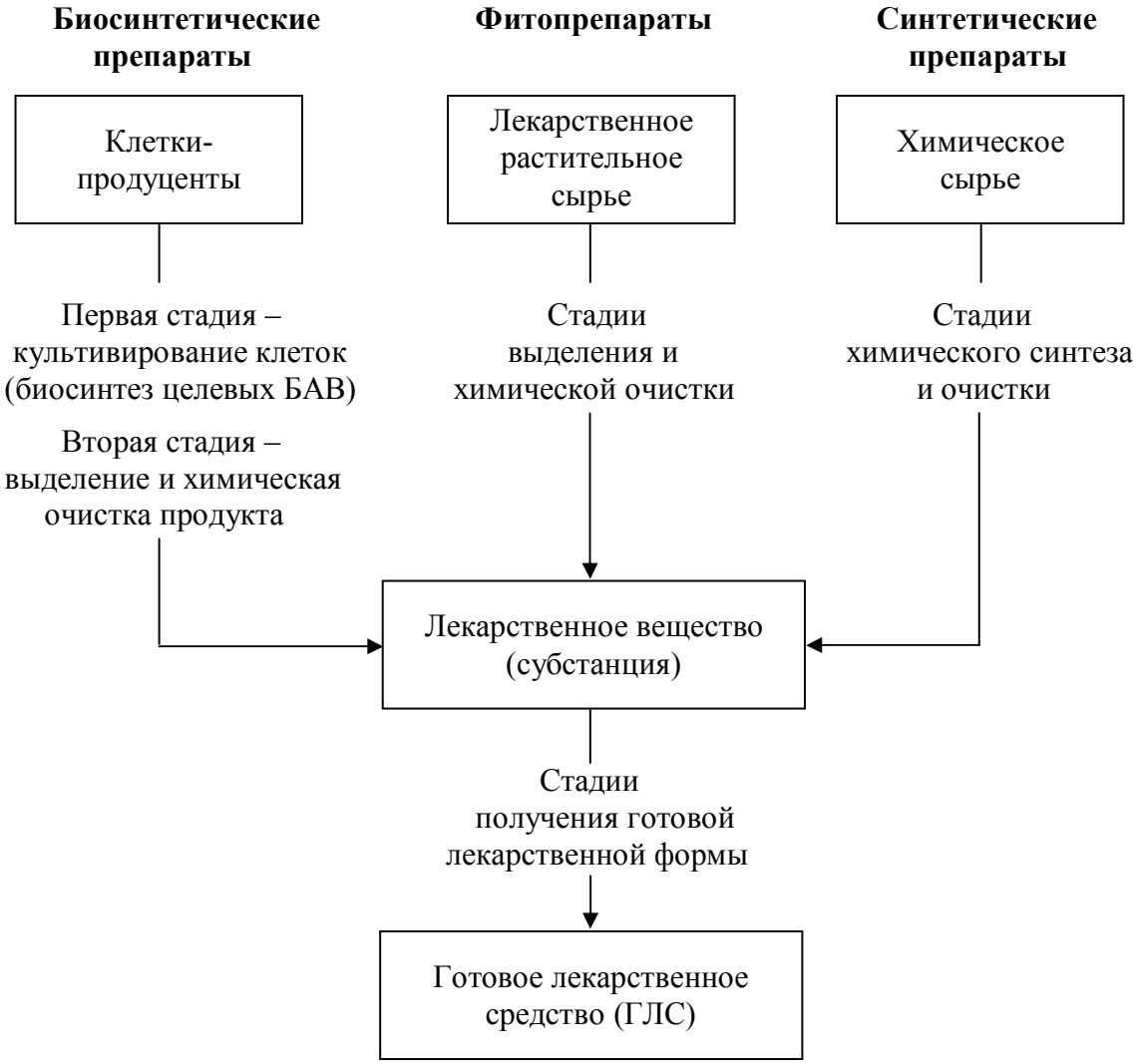
Полупродуктом называется частично обработанное сырье или лекарственные вещества, которые должны пройти дальнейшие стадии производственного процесса прежде, чем они станут лекарственным продуктом.

Лекарственным веществом, или **субстанцией**, называют стандартизованное химическое соединение (вещество), обладающее лечебными или профилактическими свойствами, разрешенное к применению и предназначенное для изготовления лекарственных средств.

Готовое лекарственное средство (ГЛС) – это лекарственное средство, предназначенное для отпуска индивидуальному потребителю в удобной для применения (дозированной) форме. В готовой лекарственной форме лекарственное вещество проявляет максимальное терапевтическое действие, обладает минимальным побочным эффектом, является удобным для применения и хранения.

Лекарственные вещества (субстанции) получают химическим синтезом, путем выделения и химической очистки из растительного

сырья или с использованием клеток-продуцентов (бактерий, грибов, растений и животных) (см. рисунок). Особенности организации технологических процессов влияют на микробную контаминацию субстанции и в конечном итоге – готовой продукции.



Основные технологические процессы получения готовых лекарственных средств (ГЛС)

При всем многообразии технологических схем получения разных по происхождению лекарственных веществ основными источниками попадания микроорганизмов в сферу биотехнологических производств являются:

1) технологическое оборудование;

2) сырье и вспомогательные вещества на всех стадиях производства, хранения и транспортировки продукции;

3) вода, используемая в производстве;

4) технологический и вентиляционный воздух;

5) тара и упаковочные материалы;

6) персонал, занятый в производстве.

Для производства с использованием клеток-продуцентов в дополнение к перечисленным особое значение как источники микробной контаминации имеют питательная среда и добавки, пеногасители, посевной материал.

В зависимости от характера производства и технологической стадии удельный вес вышеуказанных факторов в контаминации может существенно изменяться.

Технологическое оборудование. Значение оборудования и коммуникаций в возможной контаминации продуктов биосинтеза особенно велико при культивировании клеток-продуцентов. Процесс должен осуществляться в асептических условиях.

Комплекс оборудования для процесса ферментации включает аппарат для культивирования организмов (ферментатор) и совокупность примыкающих к нему коммуникаций, арматуры, контрольно-измерительных приборов и др. Трубопроводы для подачи стерильного воздуха, пара, питательной среды и добавок достигают десятков километров. Вся эта система должна обеспечить стерильность внутреннего объема ферментатора. Разгерметизация оборудования во время работы является одной из причин микробной контаминации.

Конструкционные особенности оборудования и коммуникаций не всегда обеспечивают стерилизуемость всех точек внутренних полостей. Например, особого внимания требует придонная часть ферментатора, где скапливается конденсат, а также трубные окончания для отбора проб из аппарата и штуцеры для внесения посевного материала. При стерилизации температура в этих зонах будет ниже, чем во всем объеме ферментатора, что может стать причиной нестерильности. Важен правильный подбор материала, из которого изготавливают оборудование. Необходимо использовать такие материалы, внутренние поверхности которых не подвергаются биоповреждению и биообрастанию. Одним из условий, исключающих опасность биообрастания, является высокое качество обработки (полирования) внутренних поверхностей оборудования.

Целесообразным является замена природных фильтрующих материалов на синтетические, менее благоприятные для размножения микроорганизмов.

Причинами загрязнения объектов производства через технологическое оборудование являются также неудовлетворительная подготовка его к работе (некачественная мойка и дезинфекция, неэффективная стерилизация) и нарушение правил его эксплуатации.

Сырье и вспомогательные материалы. Сырье для производства лекарственных веществ может быть по происхождению минеральным, растительным, животным и синтетическим. Наиболее загрязненным микроорганизмами является сырье животного и растительного происхождения.

Сырье животного происхождения используют в качестве основного при производстве органопрепаратов. Например, из поджелудочной железы свиней получают панкреатин, из щитовидной железы крупного рогатого скота – тиреоидин, из сердечной мышцы – цитохром С и др. Органы убойных животных служат основой для многих питательных сред. В производстве вирусных вакцин используют культуры клеток почек обезьян, собак, а также куриные эмбрионы и др.

Органы и ткани животных могут содержать большое количество микроорганизмов, включающих представителей нормальной микробиоты животного, и микроорганизмов, попавших в соответствующий орган при жизни животного в результате снижения его иммунитета при длительном голодании и т. п. Микроорганизмы могут попадать в ткани после гибели животных, а также в процессе обработки инструментов, рук, одежды рабочих при первичной разделке туши, при хранении и транспортировке.

По качественному составу микробиота животного сырья может включать сапротрофные, патогенные и условно-патогенные, преимущественно аэробные и факультативно-анаэробные бактерии, бактерии группы кишечной палочки, представителей родов *Proteus*, *Aeromonas*, *Salmonella*, а также *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*. Их количество может достигать 10^3–10^5 клеток на 1 см^2 поверхности. Многие микроорганизмы длительно сохраняются в сырье при замораживании. Например, сальмонеллы сохраняют жизнеспособность в замороженном мясе в течение 13 мес. Животное сырье может содержать различные вирусы. Так, в культурах клеток обезьян, используемых для производства многих вакцин, обнаруживали аденовирусы, энтеровирусы, вирус герпеса, вызывающие заболевания у человека. Поэтому предусмотрено проведение дополнительного вирусологического контроля животного сырья.

Недопустимо использование животного сырья, полученного с территорий, где имелись случаи прионных заболеваний. В производстве

нельзя применять клетки нервной ткани как потенциально опасный источник прионов.

Лекарственным растительным сырьем (ЛРС) называют высушенные части лекарственных растений, не подвергавшиеся химической обработке. К ним относят корни, корневища, кору, цветы, листья, плоды, почки и др. В настоящее время используют около 250 видов растений для получения на их основе лекарственных препаратов.

Лекарственные растения, как и все другие, являются естественной средой обитания микроорганизмов. Их микробиоту подразделяют на эпифитную (греч. epi – на, phyton – растение) и фитопатогенную. К эпифитным относят микроорганизмы, развивающиеся в норме на поверхности растения и не наносящие ему вреда. Такие микроорганизмы не проникают внутрь тканей, растут за счет обычных выделений и органических загрязнений поверхности растения. Они устойчивы к фитонцидам, высушиванию и УФ-облучению, препятствуют проникновению фитопатогенных микроорганизмов в растительные ткани. Наибольшее количество эпифитной микробиоты составляет *Erwinia herbicola* – антагонист возбудителей мягкой гнили овощей. В норме обнаруживают *Pseudomonas fluorescens*, *Phytomonas* spp., *Chromobacterium* spp., *Bacillus mesentericus*, небольшое количество грибов. Состав микробиоты зависит от вида растения, возраста, высоты стебля, типа почвы, условий произрастания. При повышении влажности численность эпифитных микроорганизмов возрастает, и наоборот.

К фитопатогенным микроорганизмам относят бактерии, грибы, вирусы. Заболевания растений, вызываемые бактериями, называются бактериозами, а грибами – микозами. Среди бактерий – представители родов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, вызывающие некрозы, пятнистость, сосудистые заболевания, рак корней и корнеплодов и др. Значительно шире спектр фитопатогенных грибов, которые представлены различными видами высших и низших микромицетов, вызывающих мучнистую росу, ржавчину, паршу, спорынью, рак, различные виды гнили, головни и пятнистости.

Вирусы, вызывающие болезни растений (вирозы), являются причиной появления мозаики (пятнистой расцветки листьев и плодов) и желтухи, которая проявляется в карликовости растения и появлении измененных боковых побегов и цветков.

У пораженного растения происходят изменения клеточных структур и химического состава тканей, содержание биологически активных веществ снижается, использование такого сырья невозможно.

Кроме представителей эпифитной и фитопатогенной микробиоты в ЛРС могут попадать посторонние микроорганизмы на всех стадиях его переработки, т. е. в процессе сбора, высушивания, измельчения, формования, упаковки, транспортировки и хранения.

При хранении повышенная влажность (>60%) и температура (>20°С) способствуют дополнительному размножению микроорганизмов. Это может привести к порче ЛРС вследствие развития грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium* и других широко распространенных микроорганизмов-космополитов. В таких условиях резко снижается содержание действующих веществ.

При использовании контаминированного ЛРС микроорганизмы попадают в субстанцию и готовую лекарственную форму. Отрицательными последствиями этого могут быть снижение или полная утрата терапевтической активности, развитие аллергических реакций, возникновение инфекционных заболеваний, попадание токсических веществ, среди которых особенно опасны токсины грибов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, вызывающие микотоксикозы.

Чтобы исключить такие последствия, введены требования к микробиологической чистоте этих объектов фармацевтического производства, указанные в Государственной Фармакопее Республики Беларусь. Санитарно-микробиологическому контролю подлежат субстанции для производства стерильных и нестерильных лекарственных средств, субстанции синтетического и природного (растительного, животного или минерального) происхождения для производства нестерильных лекарственных средств, а также вспомогательные вещества. В них определяют общее число аэробных бактерий (в 1 г или в 1 мл), общее число грибов, наличие *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий.

Вспомогательные вещества используют при получении ГЛС для проявления максимальной биологической активности препарата в организме человека. Их применяют в качестве наполнителей для получения необходимой массы таблетки, для коррекции вкуса, для пролонгирования действия препарата, для получения необходимой лекарственной формы. Многие из них могут содержать значительное количество микроорганизмов.

Вода. Воду в производстве лекарственных веществ используют в качестве основного и вспомогательного материала. Вода является компонентом питательных сред и ГЛС. Ее применяют в технологии выделения и очистки БАВ, для санитарной подготовки помещений и

оборудования, а также для приготовления растворов дезинфектантов и антисептиков. В технологических процессах используют **питьевую воду** из центральных систем хозяйственно-питьевого водоснабжения и **очищенную воду**, получаемую на производстве методами дистилляции, ионного обмена, обратного осмоса, электродиализа. В производстве стерильных лекарственных средств применяют **воду для инъекций**, которую получают из очищенной воды.

Качество воды и систем ее подготовки, распределения и хранения является критической точкой контроля при рассмотрении факторов, влияющих на безопасность фармацевтической продукции.

Качество воды регламентирует нормативно-техническая документация: ГОСТ, санитарные правила и нормы, фармакопейные статьи на воду очищенную и воду для инъекций. В воде очищенной не допускается присутствие более 100 клеток микроорганизмов в 1 мл воды, исключая представителей семейства Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Вода для инъекций должна быть апирогенной и содержать не более 10 КОЕ в 100 мл.

В процессе хранения в промышленных резервуарах количество микроорганизмов быстро увеличивается и может достигать 10^5–10^6 клеток бактерий в 1 л. Арматура и аппаратура, которая используется для хранения и распределения воды (насосы, трубопроводы, клапаны, счетчики воды и т. д.), могут быть колонизированы микроорганизмами, образующими биопленку на их внутренних поверхностях, устойчивыми к действию биоцидов и представляющими опасность как источник микробной контаминации. Поэтому уделяют особое внимание организации системы водоподготовки. Трубопроводы могут быть изготовлены из нержавеющей стали, полимерных материалов или стекла. Их соединение и расположение должно обеспечивать возможность стерилизации путем пропускания чистящих и стерилизующих растворов со скоростью не менее 1,5 м/с в трубах наибольшего диаметра системы. Вода должна храниться при температуре не ниже 80°С и циркулировать в распределительной системе со скоростью 1–2 м/с для предотвращения образования биопленки. Для предупреждения биообрастания стенок сосудов используют режим рециклинга.

Воздух. Воздух производственных помещений может быть атмосферным, поступающим без предварительной очистки, и вентиляционным, подаваемым через системы воздухоподготовки. Технологический воздух используют для аэрирования при культивировании клеток-продуцентов, для транспортировки технологических жидкостей и

сыпучих материалов из одних аппаратов в другие и для сухожаровой стерилизации материалов первичной упаковки.

Причинами попадания микроорганизмов в производство с воздухом могут быть первичная высокая контаминация атмосферного воздуха, особенно если он поступает без предварительной очистки, и неэффективная работа системы воздухоподготовки. В зависимости от уровня требований, предъявляемых к микробиологической чистоте воздуха, уже на стадии проектирования выбирают необходимое число ступеней очистки.

Тара и упаковочные материалы. Различают **первичную** или индивидуальную упаковку, которая непосредственно контактирует с препаратом; **вторичную**, объединяющую некоторое количество первичных упаковок, и **транспортную**, в которой продукцию доставляют к месту хранения или реализации.

Первичная упаковка ГЛС представляет собой контейнер или емкость, обеспечивающие длительную защиту препарата от воздействия окружающей среды, в том числе экзогенной контаминации и влаги. К материалам первичной упаковки относят флаконы, ампулы из стекла, тюбики-капельницы из полиэтилена, контурные ячейковые упаковки из поливинилхлорида, пленки, алюминиевую фольгу. Обсемененность зависит от природы материала, его микробостойкости и влажности. Не рекомендуется использовать упаковочные материалы, неустойчивые к биодеградации (бумагу, картон, корковые пробки).

Упаковочные материалы с гладкой непроницаемой поверхностью обычно имеют низкий уровень микробного загрязнения, но в условиях неправильного хранения их могут активно колонизировать микроорганизмы.

Одной из основных причин, по которой упаковочный материал может стать источником микробной контаминации, является адаптивная способность микроорганизмов использовать их как субстраты в метаболических процессах.

Предупредить возможность распространения микроорганизмов из загрязненного источника позволяет присвоение партиям сырья, вспомогательных, упаковочных, маркировочных материалов, полупродуктов и готового продукта статуса **карантина**, который предполагает их хранение отдельно или каким-либо иным способом, исключает их применение или реализацию до тех пор, пока не будет принято решение о выдаче разрешения на их использование.

Персонал. Люди являются активным источником контаминации микробными и пылевыми частицами. Основными причинами этого могут быть:

– наличие различной и многочисленной микробиоты тела человека (постоянной и случайной);

– выполнение технологических операций людьми, страдающими заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), кожи, дыхательных путей, являющимися микробоносителями и имеющими индивидуальную повышенную потливость или сухость кожи;

– отсутствие или плохое состояние технологической одежды;

– несоблюдение персоналом требований к личной и производственной гигиене, а также правил поведения в ходе выполнения технологического процесса;

– неправильный подбор персонала без учета характера производства и индивидуальных особенностей работающего.

Попадание микроорганизмов в сферу производства от персонала может происходить следующими путями:

1) воздушно-капельным путем с выделениями полости рта и верхних дыхательных путей;

2) воздушно-пылевым и контактным путями с участков кожи, не защищенных одеждой (лица, шеи, рук, волосяного покрова);

3) воздушно-пылевым и контактным путями с индивидуальной технологической одежды.

Из верхних дыхательных путей человека в окружающее пространство выделяется значительное количество микроорганизмов: при чихании на расстояние 10 м и более распространяется до 10^5 жизнеспособных клеток бактерий и вирусных частиц, со слюной – до 10^8 клеток в 1 мл, с секретом полости носа – до 10^7 клеток в 1 мл.

Наиболее обсемененными участками кожи являются открытые участки кожи – кисти рук, кожа под ногтями, лицо (у крыльев носа), шея. Количество механических и микробных частиц зависит от характера выполняемых в процессе производства движений. В течение 1 мин человек, не двигаясь, выделяет в окружающую среду до 10^4 механических и микробных частиц; в положении сидя с легкими движениями рукой и головой – до $5 \cdot 10^5$ частиц, а при интенсивной работе – до 10^6 частиц.

Постоянная нормальная микробиота не может быть удалена механическим путем при обмывании. В процессе работы она быстро восстанавливается вследствие обильного потоотделения, которое способствует выходу микроорганизмов из пор сальных и потовых желез. Наиболее обсемененными являются руки, особенно первые фаланги трех рабочих пальцев, ладонная впадина, кожа у запястья, межпальцевые пространства. Другие участки кожи отличаются по содержанию

микроорганизмов. Количество аэробных бактерий, содержащихся на 1 см^2 кожи головы, составляет $1{,}5 \cdot 10^6$, в подмышечной области – $2{,}4 \cdot 10^6$, на коже спины – $3{,}4 \cdot 10^4$, на лбу – $0{,}2 \cdot 10^6$.

Человек является источником выделения большого количества частиц, в том числе кожи, перхоти, косметики, частиц технологической одежды. Структура и физиология кожи такова, что постоянно происходит естественный процесс обновления поверхностного слоя эпидермальных клеток, которые полностью обновляются каждые 4 дня. При этом в процессе слущивания с поверхности кожи отделяется в день 6–14 г чешуек. Интересно, что с поверхности кожи мужчин выделяется больше микроорганизмов, в том числе эпидермальных стафилококков, а с кожи женщин выделяется большее количество частиц, чем с кожи рук мужчин. В результате этого в 1 м^3 воздуха может содержаться до $4 \cdot 10^5$ частиц рогового слоя эпидермиса. Размер отделяемых частиц составляет 0,3 мкм.

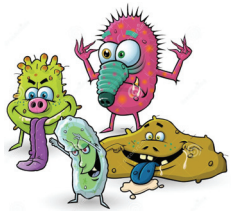
Количество частиц, выделяемых технологической одеждой, зависит от вида ткани, способа обработки швов и края, а также от степени изношенности. Чем выше изношенность ткани, тем активнее отделяются с ее поверхности ворсинки.

Вышеупомянутые данные определяют правила поведения при выполнении технологических операций, особенно проводимых в асептических условиях.

Посевной материал. В качестве посевного материала используют клетки продуцентов БАВ – микроорганизмов (эу- и прокариотических), растений и животных. Посевной материал может стать источником микробного загрязнения на стадии культивирования клеток продуцента. Причиной этого может быть загрязнение посторонними микроорганизмами (бактериями, грибами), а также вирусами и фагами.

Глава 16

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К КАЧЕСТВУ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



§ 16.1. Микробиота нестерильных лекарственных средств

Одним из показателей качества лекарственного средства (ЛС) является уровень его микробиологической чистоты. По этому показателю все ЛС делят на две категории: стерильные и нестерильные. **Стерильными** называют препараты, в которых в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи не допускается содержание жизнеспособных клеток микроорганизмов. Их доля составляет около 20% от общего количества ЛС. **Нестерильными** называют такие ЛС, в которых допускается содержание живых микроорганизмов, количество и качественный состав которых зависит от вида и назначения продукции и нормируется соответствующей документацией. На долю нестерильных приходится около 80% от общего числа выпускаемых ЛС. Микробиологические требования к качеству нестерильных ЛС вырабатывались в связи с выявлением случаев заболевания людей в результате применения загрязненных микроорганизмами препаратов.

Контаминация лекарственных препаратов может происходить как в процессе производства, так и в период использования, особенно часто в условиях клиники, где они загрязняются госпитальными штаммами микроорганизмов, например *Pseudomonas aeruginosa*.

Под воздействием ферментов микроорганизмов при несоблюдении условий производства и хранения лекарственных препаратов может происходить их биодеградация, скорость которой определяется химическим составом ЛС, присутствием в нем веществ, легко усвояемых микроорганизмами или обладающих биоцидной активностью, количеством и видовым составом контаминантов, условиями среды (влажность, температура). Некоторые компоненты лекарственных

препаратов (крахмал, желатин, каолин, ПАВ) могут защищать микробные клетки от консервантов.

На возможность развития процессов биодеградации влияет форма упаковки, которая должна предотвращать доступ контаминантов и контролировать влажность.

Основными отрицательными последствиями для больных при использовании ЛС, содержащих микроорганизмы, могут быть снижение или отсутствие терапевтического действия препарата, возникновение заболеваний, неблагоприятных побочных реакций, а также передача и распространение лекарственно-устойчивых бактерий. Заболевания могут иметь инфекционную или неинфекционную природу. Заболевания **неинфекционной природы** могут быть обусловлены продуктами биоразрушения БАВ и микробными токсинами. Последние могут вызывать токсикоинфекции и интоксикации (токсикозы). Токсикоинфекции – это обширная группа острых кишечных заболеваний, которые развиваются после приема через рот лекарственных препаратов, обильно контаминированных патогенными и условно-патогенными бактериями, содержащими эндотоксины. Токсикоинфекции являются полиэтиологическими, их могут вызывать различные микроорганизмы: энтеротоксигенные варианты кишечной палочки, протей, энтерококки, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, реже – бактерии родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. Токсикозы обусловлены попаданием экзотоксинов некоторых бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*), грибов, а также токсичных продуктов микробной деградации БАВ.

Инфекционные заболевания, возникающие в результате использования контаминированных ЛС, могут иметь разную локализацию и клиническую форму:

– гнойно-септические инфекции (местные или генерализованные);

– грибковые поражения кожи, слизистых, глаз и других органов;

– заболевания вирусной природы (например, в результате применения контаминированных препаратов крови);

– кишечные инфекции (эшерихиозы, сальмонеллезы).

Возникновение, развитие и исход заболевания зависят от уровня микробной контаминации, биологических особенностей микроорганизма-возбудителя (его вирулентности), резистентности пациента и способа введения препарата. Наибольшую опасность представляет введение контаминированного препарата в кровоток глаза, в полости тела, в норме свободные от микроорганизмов. При местном применении препаратов вероятность развития инфекционного процесса резко

возрастает при обширных повреждениях тканей в результате травмы, ожога, хирургического вмешательства. Например, *Staphylococcus aureus* при попадании с ЛС на поврежденную кожу и слизистые может вызывать гнойно-воспалительные процессы; при ингаляционном введении – стафилококковую пневмонию; при пероральном – токсикоинфекцию или интоксикацию; при попадании в кровяное русло – генерализованную инфекцию (сепсис).

Определение микроорганизмов в лекарственных препаратах впервые стали проводить по указанию Всемирной организации здравоохранения. В бывшем СССР такая инструкция впервые появилась в 1971 г. Современные требования к микробиологической чистоте лекарственных средств изложены в Государственной Фармакопее (ГФ) Республики Беларусь.

§ 16.2. Микроорганизмы, контролируемые в нестерильных лекарственных средствах

Выбор микроорганизмов, нормирование которых предусмотрено ГФ, определяется их опасностью для здоровья населения и способностью служить критерием оценки гигиенического состояния производства, предусмотренного GMP (Good Manufacturing Practice – надлежащая производственная практика). В настоящее время этот выбор признан достаточным для получения результатов, адекватно отражающих качество продукции по микробиологическим показателям, и со временем может быть расширен.

Согласно ГФ, микробиологическому контролю подлежат:

1) готовые лекарственные средства, к которым предъявляется требование «стерильность» (должны быть стерильными);

2) готовые лекарственные средства для местного применения;

3) готовые лекарственные средства для орального применения и ректального введения;

4) готовые лекарственные средства для орального применения природного (животного, растительного или минерального) происхождения;

5) лекарственные средства, состоящие только из растительных компонентов.

В нестерильных ЛС определяют общее число аэробных бактерий (в 1 г или в 1 мл), общее число грибов, наличие *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий.

Ниже будут приведены морфолого-биохимические признаки микроорганизмов, содержание которых регламентировано для продукции фармацевтической промышленности, в связи с существующими методами их выделения и идентификации, а также их значение в патологии человека.

Грамотрицательные аэробные и факультативно-анаэробные палочки.

1. Род *Pseudomonas*. Прямые или слегка изогнутые, но не спиральные палочки размером 0,5–1,0×1,5–5,0 мкм. Подвижны (полярные жгутики). Аэробы. Способны к анаэробному дыханию с использованием нитрата в качестве акцептора электронов. Некоторые виды – факультативные автотрофы. Род включает более 70 видов. Они широко распространены в природе. Некоторые виды патогенны для человека, животных и растений, могут загрязнять фармацевтические препараты, размножаться в растворах антисептиков. На основании гомологии ДНК некоторые виды, относившиеся к роду *Pseudomonas*, выделены в род *Burkholderia* (*B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. cepacia*), род *Brevundimonas* (*B. diminuta*).

Pseudomonas aeruginosa – основной возбудитель гнойно-воспалительных процессов, особенно в условиях стационаров. Вызывает общие и местные нагноительные процессы: отиты, пиелиты, циститы, кератиты, менингоэнцефалиты, инфицирует поверхности ран и ожогов. Устойчив к действию антибиотиков. Описаны вспышки токсикоинфекций вследствие употребления пищевых продуктов (мясо, рыба), контаминированных этими бактериями. Образует биопленку на оборудовании системы водоснабжения. Способен разрушать многие химические вещества, в том числе биоциды.

Растет на простых питательных средах в широком диапазоне температур (4–42°С), оптимальная температура 37°С. Строгий аэроб. На жидких средах (пептонная вода, МПБ) образует характерную серовато-серебристую пленку, по мере старения культуры возникает помутнение. На плотных средах (МПА, кровяной агар, среды Эндо, Левина, Плоскирова) вид колоний зависит от состава среды. На специальных средах образует синевато-зеленоватые пигменты (пиоцианин, флюоресцеин и др.), выделяющиеся в питательную среду. Имеются также непигментированные штаммы. Образует токсины и другие факторы вирулентности.

Pseudomonas (Burkholderia) cepacia – повсеместно распространенный микроорганизм. Часто контаминирует растворы для местной анестезии, лекарственные препараты, косметические средства.

Эпидемиология имеет много общего с таковой для *P. aeruginosa*. Подвижные полиморфные палочки, характеризующиеся температурным оптимумом 30°С. Выделение требует специальных сред. На кровяном агаре с полимиксином образует мутные маслянистые беловато-серые колонии. Возможно образование желтого или зеленоватого нефлюоресцирующего феназинового пигмента, растворимого в хлороформе.

2. Семейство Enterobacteriaceae. Оно включает более 115 видов, принадлежащих к 30 родам. Это прямые палочки размером 0,3–1,8 мкм. Подвижные (перитрихи) или неподвижные. Присутствуют повсеместно: в почве, воде, на растениях, у животных. Некоторые из них патогенны и вызывают заболевания ЖКТ, дыхательных и мочевыводящих путей, менингиты и раневые инфекции. Около 50% внутрибольничных инфекций вызываются видами этого семейства. Наиболее часто встречаются *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* и виды родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Shigella*, *Providencia*.

Род *Escherichia*. Прямые палочки размером 1,1–1,5×2,0–6,0 мкм, одиночные или в парах. Для многих штаммов характерны капсулы или микрокапсулы. Виды рода *Escherichia* различаются по подвижности и биохимической активности.

Escherichia coli – постоянный обитатель нормальной микробиоты кишечника человека и теплокровных животных. Большая часть штаммов *E. coli* не считается патогенной, однако вид включает условно-патогенные и патогенные штаммы. Последние различаются по факторам вирулентности, которыми они обладают (энтеротоксигенные, энтеропатогенные, энтерогеморратические и др.).

По фенотипическим признакам *E. coli* имеет много общего с другими представителями семейства Enterobacteriaceae (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*), поэтому было предложено эту группу бактерий называть колиформными. Этот термин не является таксономическим, но служит рабочим определением группы грамотрицательных факультативно-анаэробных палочковидных бактерий, которые ферментируют лактозу с образованием кислоты и газа за 48 ч культивирования при 35°С.

Некоторые колиформные бактерии способны обитать во внешней среде, поэтому группу санитарно-показательных колиформных бактерий было предложено называть фекальными колиформами. Их рассматривают как представителей общих и термотолерантных колиформ, ферментирующих лактозу. Эта группа включает в основном *E. coli*, однако виды *Klebsiella* также способны ферментировать лактозу при повышенной температуре (44–45°С). Для дифференциации *E. coli* и *Klebsiella* spp. служат специальные методы.

Показатель общего числа колиформ используют в качестве индикатора санитарного состояния воды или как основной индикатор санитарного состояния производства в пищевой и фармацевтической промышленности; показатель термотолерантных колиформ – для характеристики санитарного состояния воды; присутствие *E. coli* – для оценки степени фекального загрязнения.

Род *Citrobacter*. Прямые палочки размером 1,0×2,0–6,0 мкм, одиночные и в парах, обычно подвижные. Факультативные анаэробы. Обнаружены в почве, воде и пищевых продуктах, входят в состав нормальной микробиоты кишечника человека и животных. Штаммы определенных серогрупп вызывают гастроэнтериты и пищевые токсикоинфекции, оппортунистические и госпитальные инфекции.

Род *Enterobacter*. Прямые палочки размером 0,6–1,0×1,2–3,0 мкм, подвижные. Оптимальный диапазон температуры 30–37°С. Вызывает внутрибольничные и оппортунистические инфекции.

Род *Klebsiella*. Прямые палочки размером 0,3–1,0×0,6–6,0 мкм, одиночные, в парах или коротких цепочках. Неподвижные. Для *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* характерна массивная полисахаридная капсула, определяющая образование крупных мукоидных колоний. Известно более 80 капсульных антигенов, используемых для серотипирования клебсиелл. Широко распространены, встречаются в почве, воде, на фруктах и овощах.

Температурные границы роста 12–43°С, оптимум pH 7,2.

Вызывают внутрибольничные и оппортунистические инфекции.

K. pneumoniae образует экзотоксин, является возбудителем пневмонии, иногда – менингита, у детей может вызывать септицемию, циститы и другие заболевания.

Род *Morganella*. Прямые палочки размером 0,6–0,7×1,0–1,7 мкм, подвижные (перитрихи). Выделяются из фекалий млекопитающих. Вызывают оппортунистические инфекции.

Род *Proteus*. Прямые палочки размером 0,4–0,8×1,0–3,0 мкм, подвижные (перитрихи). У большинства штаммов имеет место образование концентрических зон или распространение в виде однородной пленки по влажной поверхности среды. Встречаются в кишечнике позвоночных, в почве, навозе, загрязненных водах. Вызывают инфекции мочевых путей, вторичные поражения часто при ожогах.

Род *Providencia*. Прямые палочки размером 0,6–0,8×1,5–2,5 мкм, подвижные (перитрихи). Вызывают желудочно-кишечные расстройства, инфекции мочевых путей, вторичные поражения при ранах и ожогах.

Род *Salmonella*. Прямые палочки размером 0,7–1,5×2,0–5,0 мкм, подвижные (перитрихи). Встречаются у человека и животных, в пищевых продуктах и природной среде. Вызывают брюшной тиф, кишечные инфекции, токсикоинфекции, септицемию. Образуют эндотоксины.

Температурный оптимум 35–37°С, диапазон pH 4,1–9,0, оптимум pH 7,2–7,4. Рост подавляют или ограничивают высокие концентрации соли и сахара. Биохимические свойства могут различаться даже в пределах одного серовара.

Род *Serratia*. Прямые палочки размером 0,5–0,8×0,9–2,0 мкм, обычно подвижные (перитрихи). Некоторые виды образуют розово-красный водонерастворимый пигмент продигнозин. Распространены повсеместно (вода, почва, растения). *S. marcescens* вызывает оппортунистические инфекции – септицемию, инфекции мочевых путей, мастит у коров.

Род *Shigella*. Прямые палочки, неподвижны. По морфологии не отличаются от других представителей семейства. Вызывают дизентерию и другие шигеллезы – заболевания, передающиеся с водой и пищей, распространенные среди приматов, включая человека. По биохимическим признакам шигеллы трудно дифференцировать от *E. coli*. На основании гомологии ДНК их можно отнести к одному виду. *S. dysenteriae* продуцирует экзотоксин, обладающий выраженным тропизмом к нервной системе и слизистой оболочке кишечника. Другие виды шигелл образуют эндотоксины, вызывают дизентерию.

Род *Yersinia*. Прямые палочки размером 0,5–0,8×1,0–3,0 мкм, приобретающие иногда сферическую форму. Подвижные (перитрихи) или неподвижные. Подвижность и метаболизм зависят от температуры. Температурные границы роста 0–45°С, оптимум роста 28–30°С. Оптимум pH 6,9–7,2. Широко распространены в природе, паразиты животных и человека, йерсиниозы – опасные инфекционные заболевания.

***Грамположительные кокки*.** У большинства организмов этой группы клетки сферические, иногда овальные, всегда четко грамположительные, неподвижные.

Род *Enterococcus*. Род представлен видами, ранее относившимися к роду *Streptococcus* (*S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, *S. gallinarum* и др.).

Клетки сферические или овальные размером 0,6–2,0×0,6–2,5 мкм в парах или коротких цепочках (в жидкой среде). Факультативные анаэробы. Сбраживают разнообразные углеводы с образованием лактата. Нуждаются в сложных питательных средах. Каталазоотрицательные. Температурные границы роста 10–45°С, оптимум роста 37°С. Растут при pH 9,6, концентрации NaCl 6,5%, желчи – 40%. Широко

распространены в природе, обитают в кишечнике позвоночных, иногда вызывают пиогенные инфекции.

Все виды и варианты энтерококков признаны санитарно-показательными микроорганизмами и отвечают предъявляемым к ним требованиям (см. § 14.2).

В настоящее время в соответствии с международными стандартами количественное определение энтерококков в воде служит дополнительным показателем фекального загрязнения, а при выявлении атипичных *E. coli* – главным методом определения фекального загрязнения.

Род *Staphylococcus*. Повсеместно распространенные микроорганизмы, чувствительны к нагреванию и действию биоцидов. Поэтому их присутствие в воздухе закрытых помещений свидетельствует о плохом санитарном состоянии.

Стафилококки образуют клетки диаметром 0,5–1,5 мкм, располагаются одиночно, парами или гроздьями. Факультативные анаэробы, каталазоположительные, оксидазоотрицательные, чувствительны к действию лизостафина (но не лизоцима), растут на средах с 5–10% NaCl. На плотных средах образуют мутные круглые колонии желтого, кремового или оранжевого цвета. В жидких средах вызывают помутнение и рыхлый осадок. Разжижают желатин, образуют H_2S. Восстанавливают нитраты до нитритов.

Staphylococcus aureus вызывает различные гнойно-септические инфекции и пищевые отравления. *S. aureus* коагулирует плазму, что является критерием для идентификации этого вида.

Дрожжи и плесневые грибы. Грибы – многочисленная группа эукариотических микроорганизмов, различающихся своей морфологией и физиологией. В основном сапротрофы, некоторые виды вызывают заболевания человека и животных (микозы). Поселяясь на разнообразных продуктах – пищевом и лекарственном сырье, пищевых продуктах, кормах, лекарственных препаратах, они вызывают их порчу и могут выделять в среду опасные микотоксины. Контакт с материалом, инфицированным грибами, может привести к развитию заболеваний, в том числе аллергических.

По морфологии различают дрожжи (одноклеточные грибы), клетки которых имеют округлую или овальную форму и размножаются почкованием, и плесневые (мицелиальные) грибы, которые растут в виде длинных ветвящихся нитей.

Для выявления и идентификации грибов используют методы микроскопии и выделения культуры на питательных средах, с помощью которых определяют их морфологические и биохимические признаки.

§ 16.3. Принципы микробиологического контроля нестерильных лекарственных средств

Контроль осуществляют на всех предприятиях, выпускающих лекарственные препараты, с целью оценки качества готовой продукции по показателю «микробиологическая чистота». Исследования проводят в микробиологических лабораториях, аккредитованных в соответствии с установленными требованиями.

Схема анализа должна отвечать следующим требованиям:

– предельная краткость по времени и числу использованных тестов;

– использование методов, обеспечивающих точность количественного подсчета и достоверную идентификацию нормируемых микроорганизмов.

Микробиологический контроль ЛС отличается от традиционного контроля пищевых продуктов или патологического материала. Отличие состоит в использовании сред обогащения при анализе лекарственных препаратов на возможное присутствие условно-патогенных микроорганизмов, которые могут находиться в препарате в небольшом количестве. Прямой посев контаминированного препарата на плотные дифференциально-диагностические среды, как это делают при анализе пищевых продуктов, в большинстве случаев не приводит к обнаружению данной группы бактерий, за исключением случаев высокой контаминации.

В средах обогащения (селективных) существуют условия для преимущественного роста и размножения условно-патогенных микроорганизмов, иногда за счет добавления ингибиторов роста других бактерий. В благоприятных условиях начинает количественно преобладать данный вид (группа) микроорганизмов, хотя посторонние микроорганизмы могут присутствовать в незначительном количестве. Далее микроорганизмы идентифицируют на основании их морфологических и биохимических свойств.

Еще одной особенностью контроля лекарственных препаратов является определение их антимикробной активности и устранение ее перед проведением анализа. Без этого возможно выявление только устойчивых к данному препарату микроорганизмов, что искажает реально существующую ситуацию и не позволяет получать достоверные результаты.

Факторы, обеспечивающие достоверность результатов анализа. Для исключения попадания в объекты анализа посторонних

микроорганизмов исследования проводят в асептических условиях в специальном помещении, полностью изолированном от производства.

Первый фактор – масса образца, т. е. количество препарата, взятого для анализа. Чем больше масса образца, тем выше статистическая достоверность вывода об отсутствии патогенных микроорганизмов.

Вторым фактором является качество питательных сред. Питательные среды должны быть изготовлены в строгом соответствии с указаниями ГФ из компонентов, отвечающих по качеству требованиям ГОСТ. Они должны храниться в условиях, исключающих их высыхание или увлажнение, и быть проверены на ростовые свойства и стерильность. Под ростовыми свойствами понимают способность питательной среды обеспечивать эффективный рост специальных штаммов тест-культур микроорганизмов. На ростовые свойства проверяют каждую новую партию среды. Стерильность контролируют путем термостатирования образца приготовленной среды после ее стерилизации.

Третий фактор – это отсутствие антимикробной активности препарата. Если лекарственное средство само по себе не обладает антимикробной активностью, в его состав могут быть введены антимикробные консерванты для предотвращения размножения или ограничения контаминации микроорганизмами, которая может произойти с ГЛС при нормальных условиях хранения и использования и представлять опасность для пациента.

Питательные среды для определения антимикробной активности лекарственных препаратов не отличаются от сред, используемых для определения общего числа микроорганизмов. В эти питательные среды для нейтрализации антимикробных агентов включают вещества, специфично взаимодействующие с биоцидами разных химических групп.

Схема проведения анализа нестерильных ЛС, не обладающих антимикробным действием. В соответствии с требованиями ГФ в нестерильных ЛС определяют общее число бактерий и грибов, а также возможное присутствие условно-патогенных микроорганизмов. Для этого используют 15 различных питательных сред, каждая из которых имеет определенный номер. Схема и методы анализа являются одинаковыми для всех видов нестерильных ЛС, независимо от их лекарственной формы (твердой, мягкой, жидкой).

Схема проведения анализа включает следующие этапы:

1) обогащение культур;

2) первичная дифференциация (разделение по группам) на дифференциально-диагностических средах;

3) выделение чистых культур микроорганизмов;

4) изучение морфологических и биохимических свойств выделенных культур;

5) заключение о присутствии (отсутствии) конкретных микроорганизмов на основании совокупности признаков.

Общий принцип микробиологического контроля состоит в анализе так называемой выборочной пробы и в перенесении результатов контроля на всю серию или партию препарата.

Выборочная проба – это образцы, отбираемые из всей массы исследуемого объекта при соблюдении принципа случайности выборки. Серией (или партией) препарата называют определенное количество продукта, изготавливаемого в условиях, которые считаются постоянными. Основным требованием к серии (партии) является ее однородность по показателям качества. Для анализа ГЛС от каждой серии (независимо от объема) отбирают среднюю пробу не менее 50 г (мл), состоящую из равных разовых проб, взятых как минимум из 10 разных упаковок.

Всего для проведения одного анализа по схеме используют 30 г лекарственного средства:

– 10 г (мл) – для определения общего количества бактерий и грибов – мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАМ);

– 10 г (мл) – для определения микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae (или *Escherichia coli* и *Salmonella* spp.);

– 10 г (мл) – для определения *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

В том случае, когда необходимо подтвердить результат, проводят повторный анализ, используя при этом образец 10 г (мл) из оставшегося от средней пробы.

При проведении анализа методом мембранной фильтрации от каждой серии препарата отбирают среднюю пробу не менее 6 г (мл), если нет других указаний в частных фармакопейных статьях.

В зависимости от физических свойств лекарственной формы образец для анализа готовят в виде раствора, суспензии или эмульсии:

1) твердые лекарственные формы, которые плохо растворимы, предварительно измельчают с использованием оборудования, исключающего дополнительное загрязнение микроорганизмами, и суспендируют в фосфатном буферном растворе (pH 7) или соответствующей жидкой питательной среде в соотношении 1 : 20;

2) жидкие лекарственные формы, а также твердые формы, которые хорошо растворимы, готовят в виде растворов в фосфатном буферном растворе (pH 7) в соотношении 1 : 10;

3) мягкие лекарственные формы, нерастворимые в воде, предварительно эмульгируют в фосфатном буферном растворе (pH 7) с добавлением эмульгатора.

При подготовке образца используют механическое встряхивание и нагревание пробы до температуры не более 45°С.

Количественное определение микроорганизмов. Для определения числа МАФАМ используют двухслойный агаровый метод. Общее количество бактерий определяют при высеве образца на среду № 1, общее количество грибов – при высеве на среду № 2.

Количество микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae устанавливают, инкубируя пробу в накопительной среде № 11, затем в селективной среде № 3, после чего при наличии роста делают высев на среду № 4 (среда Эндо) и отмечают появление типичных колоний. В случае их наличия определяют количество энтеробактерий в 1 г (мл) образца.

Присутствие *Escherichia coli* определяют так же, используя среды № 11, 3 и 4. Подозрительные на принадлежность к *E. coli* колонии микроскопируют. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек их отсевают на среду № 1, затем делают пересевы на среды № 14 и 15, а также проводят оксидазный тест. Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, не утилизирующие цитрат натрия и образующие индол, считают, что лекарственное средство контаминировано *E. coli*.

Присутствие *Salmonella* spp. устанавливают, инкубируя пробу в накопительной среде № 11, затем в селективной среде № 3, после чего при наличии роста делают высев на среду № 12, далее на среду № 5 и отмечают появление типичных колоний. Подозрительные на принадлежность к *Salmonella* колонии микроскопируют. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек их отсевают на среду № 1, затем делают пересев на среду № 13, а также проводят оксидазный тест. Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что лекарственное средство контаминировано *Salmonella*.

Присутствие *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* устанавливают, инкубируя пробу в накопительной среде № 8, после

чего при наличии роста делают высев на среду № 9 (для *P. aeruginosa*) и № 10 (для *S. aureus*) и отмечают появление типичных колоний. Подозрительные на принадлежность к *P. aeruginosa* и *S. aureus* колонии пересевают на среду № 1. Выросшие колонии микроскопируют и при выявлении грамотрицательных палочек (для *P. aeruginosa*) проводят тест на наличие цитохромоксидазы. Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают положительную оксидазную реакцию и образуют сине-зеленый пигмент, лекарственное средство контаминировано *P. aeruginosa*. При выявлении грамположительных кокков (для *S. aureus*), расположенных гроздьями, проводят тест на наличие фермента плазмокоагулаза. Если в образце обнаружены грамположительные кокки, которые ферментируют маннит и дают положительную реакцию плазмокоагуляции, лекарственное средство контаминировано *S. aureus*.

Определение антимикробной активности лекарственных средств. Определение антимикробной активности проводят однократно для всей номенклатуры препаратов, выпускаемых на предприятии. Некоторые лекарственные препараты обладают выраженным антимикробным действием в связи с их целевым назначением. К ним относят препараты для лечения инфекционных заболеваний – антибиотики и химиотерапевтические агенты. Кроме того, существует ряд ЛС, способных оказывать неспецифическое антимикробное действие: органические кислоты, щелочи, спирты, окислители, фитонциды, эфирные масла, анальгетики и др.

В основе метода определения антимикробного действия ЛС лежит сравнение интенсивности роста тест-культур микроорганизмов в присутствии и в отсутствие препарата. В качестве тест-культур микроорганизмов используют определенные штаммы *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Заключение об отсутствии антимикробного действия ЛС делают при наблюдении одинаковой интенсивности роста всех тест-культур в опытном и контрольном (без ЛС) посевах.

Как указывалось выше, для получения достоверных результатов микробиологического контроля ЛС перед проведением анализа его антимикробного действия необходима нейтрализация активности антимикробных компонентов. Для нестерильных ЛС используют следующие методы:

– увеличение рабочего разбавления препарата;

– добавление специфических инактиваторов (например, пенициллиназы для β-лактамных антибиотиков) или веществ, замещающих

антиметаболит (например, парааминобензойной кислоты для сульфаниламидов);

– использование неспецифических инактиваторов-нейтрализаторов, особенно для препаратов с консервантами (например, раствора твина 80 для фенолов, сорбиновой и бензойной кислот), которые предварительно вносят в питательную среду.

§ 16.4. Контроль стерильности лекарственных препаратов

Испытание на стерильность применяется для лекарственных средств, которые в соответствии с ГФ должны быть стерильными. Целью испытания на стерильность является подтверждение полного отсутствия жизнеспособных бактерий и грибов в объекте. В некоторых случаях, например в производстве вакцин, проводят испытания на полное отсутствие вирусов в объекте.

Анализу подлежит каждая партия препарата. За партию (серию) принимают количество препарата, для которого вероятность нарушения или недостижения стерильности одинакова.

Достоверность испытания на стерильность зависит от нескольких факторов:

1) объема (массы) образца для анализа;

2) состава и качества питательных сред;

3) используемого метода исследования;

4) соблюдения асептических условий проведения анализа.

Объем образца. В связи с тем, что метод испытания является разрушающим, отбирать для анализа большое количество образцов невыгодно. Вместе с тем, если проводить испытание на малом числе образцов из серий большого объема, существует риск получить неадекватный ответ. Размер выборочной пробы устанавливают в зависимости от вида стерилизации и числа единиц в серии. Если ЛС стерилизуют паром при давлении (0,11 ± 0,02) МПа и температуре 121°С, то образец состоит из 10 единиц независимо от числа образцов в серии. При других видах стерилизации минимальное количество образцов определяют по формуле

$$n = 0,4 \cdot \sqrt{N},$$

где n – число единиц для анализа (должно быть в диапазоне 3–40); N – число единиц в исследуемой серии.

Качество питательных сред. Питательные среды должны быть максимально пригодны для контроля микроорганизмов, т. е. учитывать питательные потребности микроорганизмов. Согласно ГФ, применяют питательные среды, наиболее благоприятные для роста многочисленных представителей МАФАМ: жидкую тиогликолевую среду (для культивирования анаэробных и аэробных бактерий), среду на основе гидролизатов соевых бобов и казеина или среду Сабуро (для культивирования грибов и аэробных бактерий).

Контроль качества питательных сред проводят путем проверки стерильности и ростовых свойств для доказательства отсутствия торможения роста. Для проверки ростовых свойств в качестве тест-микроорганизмов для тиогликолевой среды используют определенные штаммы *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, для среды на основе гидролизатов соевых бобов и казеина (или среды Сабуро) – штаммы *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*.

Для контроля стерильности проверяют 5% от партии приготовленной питательной среды путем инкубирования при температуре 30–35°С на протяжении 48 ч для тиогликолевой среды и при 20–25°С в течение 72 ч для среды на основе гидролизатов соевых бобов и казеина (или среды Сабуро).

Метод анализа. Контроль стерильности ЛС можно проводить двумя методами: прямым посевом образца в питательные среды и мембранной фильтрацией.

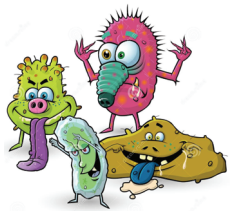
При прямом посеве испытуемый препарат помещают непосредственно в питательную среду в определенном количестве, зависящем от объема (массы) содержимого одной единицы (ампулы, флакона и др.). Если исследуемый препарат обладает антимикробной активностью, испытания выполняют после нейтрализации подходящим нейтрализующим агентом или путем разбавления в достаточном количестве питательной среды. Инокулированную среду инкубируют на протяжении 14 сут. Посевы просматривают ежедневно и по окончании культивирования. Наличие роста микроорганизмов оценивают визуально по появлению мутности, пленки, осадка и других признаков микробного роста. Препарат считают стерильным при отсутствии роста микроорганизмов. При обнаружении роста хотя бы в одной пробирке испытание повторяют с таким же количеством образцов. При отсутствии роста исследуемый препарат считают удовлетворяющим требованиям. В случае наличия роста микроорганизмов при повторном посеве препарат считают нестерильным.

При мембранной фильтрации используют мембранные фильтры с номинальным размером пор, не превышающим 0,45 мкм, с установленной способностью к удерживанию бактерий. Целесообразно использовать мембранные фильтры из инертных полимерных материалов. Если исследуемый раствор обладает антимикробными свойствами, мембрану не менее трех раз промывают путем пропускания через нее определенного объема стерильного растворителя для полного удаления антимикробного вещества. Исследуемый раствор фильтруют, после чего мембрану целиком переносят в питательную среду или в асептических условиях делят ее на две равные части, каждую из которых помещают в две вышеуказанные среды с последующим инкубированием в течение 14 сут. Посевы анализируют аналогичным образом.

Метод мембранной фильтрации имеет преимущество, касающееся высокой эффективности выявления микробной контаминации ЛС при низкой концентрации клеток в образце в результате удержания на мембране даже единичных клеток при пропускании большого объема препарата.

Глава 17

ГИГИЕНА НА ПРОИЗВОДСТВЕ. ПРИНЦИПЫ GMP



§ 17.1. Правила GMP в обеспечении качества лекарственных средств

Каждый производитель лекарственных средств (ЛС) несет огромную ответственность перед потребителями, т. е. больными: ЛС должны строго соответствовать назначению, а пациенты не должны подвергаться риску из-за нарушения требований их безопасности, качества и эффективности. Для этого на предприятии должна быть организована система обеспечения качества. Обеспечение качества – это широкая концепция, охватывающая все параметры, которые по отдельности или совместно влияют на качество продукции.

Система обеспечения качества в производстве ЛС гарантирует:

– проведение разработки препаратов с учетом требований правил производства и лабораторной практики;

– составление четкой документации на все производственные и контрольные операции;

– обеспечение производства, поставки и использования соответствующих исходных и упаковочных материалов;

– изготовление и проверку готовой продукции в соответствии с принятыми инструкциями;

– хранение готовой продукции таким способом, который не влияет на уровень качества;

– проведение самоинспекции и/или аудита (контроля сторонней организацией) качества, которые повышают эффективность системы обеспечения качества.

Фармакопея устанавливает требования к составу и методам контроля ЛС, а правила GMP (Good Manufacturing Practice – надлежащая производственная практика) – порядок производства, гарантирующий выполнение требований фармакопеи.

Правила GMP являются частью системы обеспечения качества, гарантирующей, что продукция производится и контролируется в соответствии со стандартами качества.

Один из основных показателей качества фармацевтической продукции – безопасность для больного, которая обеспечивается на всех этапах разработки, испытания, производства и реализации ЛС (см. рисунок).

Система обеспечения и контроля качества в фармацевтическом производстве:
GLP – Good Laboratory Practice; GCP – Good Clinical Practice;
GMP – Good Manufacturing Practice; GDP – Good Distribution Practice;
GPP – Good Pharmacy Practice

Правила GMP ориентированы на решение двуединой задачи: они являются гарантами качества производимой продукции и направлены на уменьшение риска, свойственного любой фармацевтической продукции, который не может быть полностью исключен при проверке на соответствие стандартам качества.

Некачественные лекарства не только представляют опасность для здоровья людей, но и наносят материальный ущерб государству и индивидуальным потребителям. Некачественные ЛС могут содержать токсичные вещества, добавленные неумышленно. Препарат, не содержащий действующие вещества в достаточном количестве, не будет давать ожидаемый терапевтический эффект.

Правила GMP распространяются на все аспекты производства, начиная с исходных материалов, помещений и оборудования и заканчивая подготовкой персонала и его личной гигиеной. Для каждого процесса, способного влиять на качество готового продукта, должны быть в наличии детальные инструкции.

Правила GMP содействуют расширению возможностей экспорта медикаментов. Большинство стран согласно импортировать и направлять на реализацию только лекарства, произведенные с соблюдением стандартов GMP.

В настоящее время к системе правил GMP присоединились 140 государств, в том числе и Беларусь.

Основные положения GMP включают:

1) четкое описание всех производственных этапов, их систематическая проверка;

2) обоснование всех критических производственных этапов и существенных изменений процессов;

3) соблюдение требований к персоналу, условиям производства и помещениям, оборудованию, материалам, емкостям и этикеткам;

4) составление указаний и описание действий должны быть даны в ясной и однозначной письменной форме и относиться специально к имеющимся установкам;

5) составление протоколов ведется с указанием всех производственных ступеней, записью и проверкой любых отклонений;

6) сбыт продукции осуществляется таким образом, чтобы любую угрозу качеству свести к минимуму;

7) наличие системы отзыва продукции;

8) проверка претензий и причин нарушения качества для принятия соответствующих мер.

Преимуществами GMP являются:

– комплексный и системный подход;

– профилактический подход к проблеме обеспечения качества;

– улучшение имиджа производителя (повышение конкурентоспособности продукции, инвестиционной привлекательности и т. п.);

– долгосрочная экономическая выгода.

Изготовление некачественных препаратов не ведет к экономии средств. В долгосрочной перспективе поиск и исправление ошибок требуют бóльших затрат, чем их предотвращение.

Цель GMP – избежать ошибок. Внедрение GMP является инвестицией в высококачественные медикаменты. Изготовление и распространение низкокачественных лекарств приводит к утрате доверия ко всем участникам лекарственного обеспечения, в том числе и к производителю.

В мировой практике Правила производства лекарственных средств (Good Manufacturing Practice for Medicinal Products (GMP)) являются основополагающим документом, на базе которого производится сертификация фармацевтических производств.

В 2015 г. опубликованы Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза. Сертификация фармацевтического производства по стандарту GMP в международной системе обеспечивает выпуск качественной продукции, соответствующей как национальным, так и международным стандартам.

Для поставок в страны Европейского союза необходимо получить сертификат GMP международного образца, а для поставок в США следует пройти соответствие стандарту FDA.

Российские правила GMP изложены в ГОСТ Р 52249–2009 «Правила производства и контроль качества лекарственных средств», являющемся аналогом международного GMP и действующем на территории Российской Федерации.

На сегодняшний день в Республике Беларусь действуют Национальные правила надлежащей производственной практики (GMP). Они гармонизированы с Правилами производства лекарственных средств Европейского союза и устанавливают требования к системе управления качеством, контролю качества, персоналу, помещениям и оборудованию, документации, производству продукции, проведению испытаний по контрактам, работе с рекламациями.

Требования белорусских правил GMP разработаны на основе руководства по GMP Европейского союза, Конвенции по фармацевтическим инспекциям ВОЗ, а также в них учтены правила GMP Украины, России и США.

В Республике Беларусь правила GMP установлены в техническом кодексе установившейся практики ТКП 030-2017 «Надлежащая производственная практика», которые утверждены постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 64 от 19 июня 2017 г. и введены в действие с 1 сентября 2017 г. Правила

GMP Республики Беларусь практически идентичны правилам GMP Европейского союза.

Впервые на законодательном уровне в Законе Республики Беларусь от 20 июля 2006 г. «О лекарственных средствах» дано определение **надлежащей производственной практики** как совокупности правил по организации промышленного производства и контролю за качеством лекарственных средств.

Соблюдение этих правил является обязательным условием для получения субъектом лицензии Министерства здравоохранения Республики Беларусь на фармацевтическую деятельность, на работы и услуги по промышленному производству лекарственных средств. Инспектирование на подтверждение соответствия осуществляется отделом фармацевтической инспекции Управления фармацевтической инспекции и организации лекарственного обеспечения Министерства здравоохранения Республики Беларусь и подтверждается Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь.

§ 17.2. Гарантия качества и контроль биологического риска в фармацевтическом производстве

Гарантия качества включает в себя схему менеджмента, которая охватывает все процессы, необходимые для обеспечения наиболее высокой вероятности того, что лекарственные средства будут постоянно соответствовать описанию качества, т. е. отвечать своему назначению. Она включает описание состава ЛС, процессов обработки, правила GMP, контроль качества и послемаркетинговый надзор.

Поскольку многие микроорганизмы могут представлять опасность как патогены или биодеструкторы, необходима оценка риска контаминации для каждого продукта, начиная от исходного сырья и заканчивая введением ЛС пациенту. Кроме того, должна быть разработана стратегия уменьшения общего риска до приемлемого уровня.

Оценка риска осложняется неопределенностью количественного и качественного состава контаминантов данного объекта и их поведения в комплексной системе. Поэтому производитель должен выбирать стратегию оценки риска, соответствующую худшему из возможных вариантов, т. е. предположить, что все присутствующие микроорганизмы потенциально патогенны. Следует также допустить вероятность ошибок при испытании микробной контаминации препаратов.

Дизайн лекарственной формы и ее состав должен обеспечивать максимальную защиту от микробной контаминации и биодеградации. Физико-химические параметры лекарственного препарата должны отвечать требованиям их максимальной биостойкости.

Биологическая стабильность препарата может быть определена в лабораторных условиях путем искусственного заражения разрабатываемой лекарственной формы специально подобранной смесью микроорганизмов с учетом времени развития и степени повреждающего эффекта. При этом следует учитывать, что лабораторные штаммы тест-культур могут обладать значительно меньшей агрессивностью, чем штаммы, существующие в природных условиях.

Традиционная оценка гарантии качества предусматривает исследование конечного продукта, что экономически невыгодно в связи с необходимостью уничтожения или переработки некачественной партии продукции. Кроме того, методы оценки качества по микробиологическим показателям могут давать недостоверные результаты. Методы валидации могут быть сложными и также давать ошибочные результаты. Поэтому в настоящее время принимают, что гарантия качества может быть обеспечена только путем детальной спецификации, контроля и мониторинга всех стадий производства и всех параметров технологического процесса. Особое внимание следует уделять контролю сырья, требуя от поставщика гарантии его качества.

Принципы системы анализа риска в критических контрольных точках (HACCP). Система HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) является одним из современных методов управления качеством продукции, она включает систематическую оценку всех этапов производственного процесса и выявление таких этапов, которые являются критическими в отношении качества продукта. На основе анализа условий производственного процесса составляется перечень критических контрольных точек (ККТ) с указанием проводимых в них операций, методов мониторинга и корректирующих действий для каждой точки.

Основные этапы HACCP:

1) анализ критических зон, оценка вероятности риска, определение превентивных мер;

2) определение ККТ, контроль которых позволяет исключить или минимизировать вероятность риска;

3) установление пределов уровня тревоги и уровня действия;

4) установление системы мониторинга, обеспечивающего плановый контроль ККТ;

5) установление корректирующих действий, которые должны быть приняты в случае превышения уровня тревоги или уровня действия;

6) установление процедуры валидации HACCP;

7) разработка системы документации, относящейся ко всем вопросам, касающимся перечисленных принципов.

Первоначально методы HACCP были разработаны для определения риска микробиологического загрязнения пищевых продуктов и применялись в основном в пищевых производствах. Позднее определили, что эти методы применимы для контроля безопасности продукта, связанной не только с микробиологическим, но и химическим и физическим риском, и могут оказаться полезными в системе производственного контроля в фармацевтической промышленности. Эксперты ВОЗ рассматривают систему HACCP в качестве перспективного подхода к комплексному управлению качеством продукции, который мог бы использоваться при производстве лекарств параллельно с внедрением правил GMP. Система HACCP является научным методом управления, гарантирующим выпуск безопасной продукции. Она способна сделать более эффективным переход отечественной фармацевтической промышленности к работе по правилам GMP.

§ 17.3. Микробиологические требования к организации производства фармацевтической продукции

Всю фармацевтическую продукцию по показателю микробиологической чистоты подразделяют на стерильную и нестерильную.

Стерильные препараты производят в асептических условиях, которые должны исключать их загрязнение микроорганизмами, пирогенными веществами и механическими частицами.

Технологические процессы в производстве стерильных препаратов могут предусматривать проведение стерилизации продукции в первичной упаковке на завершающей стадии производства (финишная стерилизация) или стерилизацию на промежуточных стадиях до операций наполнения. К последней группе относят:

– термолабильные препараты, стерилизуемые методом мембранного фильтрования с последующим дозированием;

– глазные мази, не стерилизуемые в конечной упаковке (алюминиевых тубах);

– глазные капли с последующим заполнением стерильного раствора в тюбики-капельницы (предварительно простерилизованные ионизирующим излучением или химическим методом).

К производству стерильных препаратов предъявляют особые требования по созданию асептических условий.

Нестерильные препараты производят в условиях, приближенных к асептическим. Требуемый уровень микробиологической чистоты обеспечивается проведением соответствующих мероприятий, включающих организацию производственных помещений, выбор и эксплуатацию оборудования, а также микробиологический контроль производства и готовой продукции.

Организация производственных помещений определенных классов чистоты. Каждый производственный процесс требует определенного уровня чистоты окружающей среды в оснащенном и эксплуатируемом состоянии, чтобы минимизировать риск загрязнения продукта или используемых материалов частицами и микроорганизмами.

Чистое помещение – это специально спроектированное, построенное и используемое помещение для изготовления ЛС, в котором концентрацию аэрозольных частиц и микроорганизмов в воздушной среде постоянно контролируют и поддерживают в заданных пределах в соответствии с определенным классом чистоты (табл. 17.1), чтобы свести к минимуму поступление, выделение и удержание частиц внутри помещения.

Таблица 17.1

Классификация чистых зон по аэрозольному загрязнению воздуха частицами (по GMP Европейского союза)

Тип зоны	Максимально допустимое число частиц в 1 $м^3$ воздуха при размере частиц, равном или большем			
	0,5 мкм	5 мкм	0,5 мкм	5 мкм
	в оснащенном состоянии		в эксплуатируемом состоянии	
A	3 500	1	3 500	1
B	3 500	1	350 000	2 000
C	350 000	2 000	3 500 000	20 000
D	3 500 000	20 000	Не регламентируется	

Класс чистоты помещения (или тип зоны) устанавливает пределы содержания частиц:

1) микробных в производстве нестерильных ЛС;

2) микробных и механических определенных размеров в производстве стерильной продукции.

Класс чистоты (тип зоны) зависит от характера технологических процессов, т. е. от возможности и опасности загрязнения механическими частицами и микроорганизмами полупродукта или готового продукта, полученного в том или ином помещении (табл. 17.2).

Производство нестерильных препаратов должно осуществляться в помещениях классов чистоты C и D. При этом предусматривается нормирование содержания жизнеспособных микроорганизмов в воздухе, а содержание механических частиц, как правило, не определяют.

Таблица 17.2

Типы зон для различных операций стерильного производства (по GMP Европейского союза)

Операции	Тип зоны		
	финишная стерилизация	асептическое производство	изолирующая технология
Мойка флаконов, пробок, ампул, загрузка в стерилизатор	D	D	Не рассматривается
Приготовление продукта: – предусматривается стерилизация, фильтрация до наполнения	C (D)	D	Не рассматривается
– не предусматривается фильтрация до наполнения	C	A в окружении B	Изолятор в окружении не хуже D
Наполнение и герметизация	A в окружении C	A в окружении B	Изолятор в окружении не хуже D
Транспортирование негерметично закрытых упаковок и загрузка в лиофильную сушилку	Не рассматривается	A в окружении B или в герметичных контейнерах в окружении B	Изолятор в окружении не хуже D
Выгрузка из лиофильной сушилки и транспортирование до завершения укупорки (закатки): – негерметично закрытых флаконов (ампул)	Не рассматривается	A в окружении B или в герметичных контейнерах в окружении B	Изолятор в окружении не хуже D
– укупоренных пробками флаконов внутри лиофильной сушилки (до закатки)	Не рассматривается	C	Не рассматривается

При производстве стерильных препаратов в помещениях класса чистоты D допускается содержание не более 200 жизнеспособных микроорганизмов в 1 $м^3$ воздуха, а при производстве нестерильных препаратов – не более 500.

Мероприятия по созданию помещений нормируемых классов чистоты.

А. Строительно-планировочные мероприятия предусматривают правильное размещение помещений того или иного класса чистоты в производственном здании. Помещения классов чистоты А, В и С нельзя размещать в цокольном этаже, подвале. Необходимо исключить любую возможность скапливания пыли как источника механических и микробных частиц. Поэтому не должно быть труднодоступных мест, не поддающихся очистке, следует избегать установки полок, планок, шкафов, стеллажей и др. В помещениях должны быть гладкие поверхности стен, пола, потолка, без шероховатостей и трещин. Запрещено применение деревянных поверхностей. Покрытия выбирают с учетом их устойчивости к действию моющих и дезинфицирующих средств, а для пола – и к механическим воздействиям. Используют закругленные сопряжения между полом, потолком и стенами. Должна быть предусмотрена тщательная герметизация подвесных потолков с целью предотвращения загрязнения из пространства над ними. В зонах А и В запрещается устанавливать раковины, сточные трубы, открытые коммуникации.

Б. Подготовка вентиляционного воздуха. При подготовке и подаче воздуха в производственные помещения необходимо правильно расположить воздухозаборные устройства по высоте и направлению ветра: не менее 2 м над крышей с подветренной стороны. Очистка приточного воздуха должна быть ступенчатой. Количество ступеней обусловливается требуемой чистотой воздуха в помещениях (табл. 17.3).

Таблица 17.3

Принцип ступенчатой системы подготовки воздуха

Класс помещений	Количество ступеней очистки	Уровень очистки от микробных клеток и механических частиц, %
D	1	40–60
C	2	До 80
A и **B**	3	90

В помещениях класса А создают горизонтальные или вертикальные ламинарные потоки стерильного воздуха, который поступает со скоростью 0,3–0,6 м/с. На каждой ступени очистки следует предусмотреть штуцеры для отбора проб воздуха и определения концентраций механических частиц до и после фильтра. Производительность системы вытяжной вентиляции должна составлять 80–90% от производительности системы приточной вентиляции для обеспечения подпора воздуха в чистых помещениях.

Необходимо соблюдать кратность воздухообмена, которая пропорциональна удельному тепловыделению и обратно пропорциональна высоте помещения.

В. Санитарная подготовка оборудования и помещения к работе. До и после технологического процесса проводится мойка и стерилизация съемных частей или обработка внутренних и наружных поверхностей моющими и дезинфицирующими средствами.

В качестве моющих средств применяют вещества из группы ПАВ – «Сульфонол», «Катамин-АБ», «Прогресс», а в качестве дезинфицирующих – пероксид водорода, трикрезол, этиловый спирт, «Гибитан». Съемные части (узлы) оборудования, непосредственно соприкасающегося с лекарственными веществами, тщательно моют в растворе моющего средства, затем споласкивают водой очищенной и водой для инъекций, профильтрованной через мембранный фильтр с порами диаметром не менее 5 мкм. Вымытые узлы заворачивают в два слоя пергаментной бумаги и передают на стерилизацию, которую проводят при избыточном давлении 0,11 МПа и при температуре (120 ± 1)°С в течение 45 мин с последующей подсушкой при остаточном давлении 0,07 МПа не менее 10 мин. Стерилизацию неразборных участков технологического оборудования рекомендуется осуществлять острым паром при температуре (120 ± 1)°С на протяжении 60 мин. Наружные поверхности обрабатываются дезинфицирующими растворами.

Подготовка чистых помещений к работе в соответствии с письменной инструкцией подразумевает комплекс мероприятий, состоящий из влажной уборки и дезинфекции стен, полов и различных поверхностей, направленный на достижение соответствующего класса чистоты. Следует использовать разные дезинфицирующие вещества и проводить регулярный контроль окружающей среды с целью обнаружения устойчивых штаммов бактерий. Обязательно необходимо проверять микробное загрязнение дезинфицирующих растворов. Все моющие и дезинфицирующие средства, применяемые в производстве стерильных препаратов, должны быть стерильными.

Г. Подбор и гигиеническая подготовка персонала. Персонал фармацевтических предприятий является одним из основных источников контаминации ГЛС и полупродуктов механическими частицами и микроорганизмами.

Весь персонал, работающий на предприятии, должен иметь знания и опыт, необходимые для выполнения соответствующих обязанностей, а также должен быть ознакомлен с правилами GMP.

Состояние здоровья персонала является важным фактором в системе обеспечения качества ГЛС, поскольку человек может быть источником инфекции или способствовать ее переносу. Весь персонал, занятый на производстве, должен проходить регулярные медицинские осмотры. К работе в помещениях классов чистоты А, В и С не должны допускаться люди, страдающие аллергическими и кожными заболеваниями, повышенным отделением перхоти, а также курящие. Временно (до нормализации состояния здоровья) к работе не допускаются больные инфекционными заболеваниями и сотрудники, имеющие загар или различные повреждения кожи. Персонал должен ставить в известность руководителей о любых недомоганиях (острых респираторных, кожных), способных оказать нежелательное воздействие на качество ЛС.

Персонал, который работает в производстве стерильных лекарственных средств, должен строго соблюдать правила личной гигиены: регулярно принимать душ, мыть голову не реже 2 раз в неделю. Подготовка персонала к работе должна осуществляться в определенном порядке. В процессе работы необходимо носить технологическую одежду, соответствующую выполняемым производственным операциям. Во время работы запрещается использовать косметику, носить часы и ювелирные изделия, вносить в производственные помещения личные вещи, принимать пищу и хранить еду, личные лекарства.

В производстве стерильных лекарственных средств необходимо строго ограничивать число работающих до минимально необходимого уровня. Персонал в производственные помещения классов чистоты А и В должен входить через воздушный шлюз. Перемещения персонала внутри помещений должны осуществляться в определенном порядке в зависимости от выполняемых операций. Запрещается бесцельное хождение во время работы. Все движения должны быть медленными и плавными. Не разрешаются разговоры на посторонние темы, устное общение с людьми, находящимися вне производственных помещений, осуществляется через телефон или селектор. Возбраняется смех и

крики, так как при этом увеличивается число выделяемых изо рта микроорганизмов. Нельзя поднимать и использовать упавшие на пол во время работы предметы. Запрещается использование карандашей, перьевых ручек, разрешается применение шариковых ручек или фломастеров, которые один раз в смену протирают салфеткой из специальной ткани, смоченной этиловым спиртом.

Обо всех нарушениях и неблагоприятных изменениях санитарного режима персонал должен сообщать руководителю.

Неправильная подготовка и поведение персонала приводят к резкому снижению показателей микробиологической чистоты и могут превратить помещения класса чистоты А в класс С.

Изолирующая технология. Одним из способов создания асептических условий производства является изолирующая технология. Она предусматривает физическую изоляцию рабочей зоны от окружающего пространства за счет применения герметичного изолятора. **Изолятор** – это локальное контролируемое пространство, ограниченное оболочкой, с целью изоляции внутренней среды от наружной таким образом, чтобы перенос потенциальных загрязнений из одной среды в другую был сведен до минимума или исключен.

Изолятор может использоваться для защиты процесса от риска проникновения загрязнений извне, например от людей, а также для защиты операторов от риска здоровью, вызываемого вредными или токсичными продуктами, используемыми внутри изолятора, обеспечивая высокую степень безопасности. Изоляторы приходят на смену традиционной технике чистых помещений в асептическом производстве лекарственных средств и при работе с цитостатическими субстанциями, подавляющими рост клеток, которые используются при лечении онкологических заболеваний или трансплантации.

Изолятор обеспечивает:

– разделение процесса и оператора;

– разделение циркуляции воздуха внутри и снаружи изолятора;

– возможность эффективной биологической деконтаминации внутреннего пространства изолятора;

– стерильную передачу материалов в изолятор и из него.

Правилами GMP установлено, что для асептического производства пространство, окружающее изолятор, должно, по крайней мере, соответствовать зоне D. Это существенно более простое условие, чем требование к чистоте в обычной технологии чистых помещений. Оно позволяет значительно снизить затраты на строительство и эксплуатацию чистых помещений.

Микробиологический контроль эффективности подготовительных мероприятий до и в процессе работы. В помещениях высоких классов чистоты показатели микробиологической загрязненности обычно очень низкие, поэтому путем взятия единичной пробы трудно получить статистически значимые результаты. Для получения достоверной информации используют программу текущего мониторинга производственной среды по всем контролируемым параметрам (влажность, температура, скорость воздушных потоков, уровень перепада давления между помещениями, уровень контаминации бактериальными и механическими частицами), предусматривающую мероприятия, проводимые при нарушении нормируемых показателей.

Программа микробиологического мониторинга включает:

1) определение микробной контаминации воздуха (КОЕ/м^3);

2) контроль критических поверхностей (непосредственно контактирующих со стерильным материалом), рук и одежды персонала, работающего в асептических производственных зонах;

3) оценку эффективности дезинфекции;

4) проверку активности дезинфектантов;

5) контроль эффективности работы стерилизующих воздушных фильтров;

6) валидацию методов микробиологического контроля (состав питательных сред, способ их стерилизации, контроль стерильности, температура и время инкубации и т. п.).

Расположение точек отбора проб воздуха и смывов с поверхностей устанавливают в процессе аттестации чистого помещения.

Ключевыми точками при текущем мониторинге являются:

– зоны наиболее высокой вероятности контаминации продукта;

– зоны наибольшего скопления микроорганизмов;

– зоны, труднодоступные для уборки и дезинфекции;

– точки смежных зон (помещений классов А и В);

– зоны возмущения воздушных потоков рельефом поверхности.

Микробиологическому мониторингу подлежат: воздух помещений, технологическое оборудование, рабочие поверхности, руки оператора в перчатках, одежда персонала, контейнеры, в которых хранится продукт, вода, сжатый воздух. Реже контролируют стены, потолок и пол помещения, двери, транспортные тележки, контейнеры для сбора отходов, приборы для тестирования.

Частота отбора проб зависит от класса чистоты помещения и характера технологического процесса. Зоны класса А проверяют

каждую рабочую смену, зоны класса B – каждую смену или ежедневно, класса C – 2 раза в неделю, класса D – еженедельно.

Отбор проб проводят в одно и то же фиксированное время. Обязательными являются:

1) контроль воздуха во время работы;

2) контроль поверхности перед работой;

3) руки оператора перед выполнением асептических манипуляций.

Периодичность проведения микробиологического мониторинга может значительно варьировать в зависимости от конкретных показателей:

– типа производимого продукта;

– степени вмешательства человека в процесс;

– использования финишной стерилизации;

– данных предшествующего контроля.

Объем пробы воздуха должен быть достаточным как для обнаружения микроорганизмов в заданном объеме воздуха, так и для роста дискретных и пригодных к подсчету колоний на фильтрующей мембране или агаровой пластине.

Для снятия смывов с плоских поверхностей рекомендуемой является площадь 24–30 $см^2$. При контроле поверхностей, предварительно обработанных дезинфицирующими растворами, для их инактивации необходимо добавлять в питательные среды нейтрализаторы.

При контроле рук оператора делают отпечатки пальцев на агаре, осуществляют смыв тампоном с одежды.

Все выявленные в процессе мониторинга окружающей среды микроорганизмы подлежат обязательной идентификации, которая позволяет предположить источник контаминации на основании преимущественного распространения микроорганизмов во внешней среде. При обнаружении спорообразующих бактерий или грибов необходимо проводить дополнительную дезинфекцию помещений.

Данные табл. 17.4 конкретизируют требования к классам чистоты помещений и регламентируют содержание неспорообразующих микроорганизмов. Присутствие спорообразующих бактерий и грибов недопустимо.

Приведенные уровни микробной контаминации одежды и рук персонала устанавливаются на конец рабочей смены, а в начале смены перчатки и одежда должны быть стерильными.

Валидация. Валидация заключается в документированном подтверждении соответствия оборудования, условий производства, технологического процесса, методов контроля, качества сырья, полупродукта

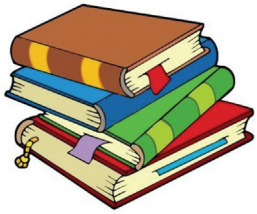
и готовой продукции действующим регламентам и требованиям нормативной документации. Цель валидации – доказать в соответствии с принципами GMP, что определенная методика, процесс, оборудование, сырье, деятельность или система действительно приводят к ожидаемым результатам, а технологический процесс в пределах установленных параметров является стабильно повторяемым.

Таблица 17.4

Рекомендуемые пределы допустимого микробиологического загрязнения чистых зон в эксплуатируемом состоянии

Тип зоны	Рекомендуемые пределы микробного загрязнения			
	в воздухе, КОЕ/м^3	седиментация на чашку диаметром 90 мм за 4 ч, КОЕ	контактные пластины диаметром 55 мм, КОЕ/пластина	отпечаток перчаток (5 пальцев), КОЕ/перчатка
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	–
D	200	100	50	–

Валидация считается неотъемлемой частью обеспечения качества лекарственных средств, в том числе и по микробиологическим показателям. Валидационные исследования – это существенная часть GMP, они должны проводиться в соответствии со специально разработанными программами. Результаты исследований должны быть надлежащим образом документированы. Процессы и методики должны устанавливаться на основании валидационного исследования и подвергаться периодической ревалидации для гарантии того, что они сохранили возможность достижения ожидаемых результатов. Особое внимание должно уделяться валидации технологических процессов, методов испытаний и способов очистки. Существенные изменения производственного процесса, которые могут оказать влияние на качество продукции и/или воспроизводимость процесса, должны быть валидированы.



ЛИТЕРАТУРА

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.

2. Грин, Н. Биология: в 3 т. / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. – М.: Мир, 2004. – Т. 1. – 454 с.; Т. 2. – 436 с.; Т. 3. – 451 с.

3. Квасников, Е. И. Дрожжи. Биология. Пути использования / Е. И. Квасников, И. Ф. Щелокова. – Киев: Навук. думка, 1991. – 328 с.

4. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.; Т. 2. – 368 с.

5. Молекулярная биология клетки: в 3 т. / Б. Албертс [и др.]. – М.: Мир, 1994. – Т. 1. – 517 с.; Т. 2. – 539 с.; Т. 3. – 504 с.

6. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

7. Елинов, Н. П. Химическая микробиология / Н. П. Елинов. – М.: Высш. шк., 1989. – 448 с.

8. Бери, Д. Биология дрожжей / Д. Бери. – М.: Мир, 1985. – 96 с.

9. Воробьева, Л. И. Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.

10. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М.: Академия, 2007. – 462 с.

11. Протисты: руководство по зоологии: в 3 ч. / под ред. А. Ф. Алимова. – СПб.: Наука, 2000. – Ч. 1. – 679 с.

12. Введение в фармацевтическую микробиологию / В. И. Кочеровец [и др.]. – СПб.: Проспект Науки, 2014. – 240 с.

13. Основы фармацевтической микробиологии / В. А. Галынкин [и др.]. – СПб.: Проспект Науки, 2008. – 304 с.

14. Санитарно-микробиологический контроль в пищевой и фармацевтической промышленности / В. А. Галынкин [и др.]. – СПб.: СПХФА, 2004. – 248 с.

15. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов: справочник / В. А. Галынкин [и др.]. – СПб.: Проспект Науки, 2006. – 336 с.

16. Чистые помещения / под ред. А. Е. Федотова. – М.: Асинком, 2003. – 576 с.

17. Федотов, А. Е. Производство стерильных лекарственных средств / А. Е. Федотов. – М.: Асинком, 2012. – 400 с.

18. Федотов, А. Е. Основы GMP. Производство лекарственных средств / А. Е. Федотов. – М.: Асинком, 2012. – 576 с.

19. Государственная Фармакопея Республики Беларусь. В 3 т. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно: Победа, 2012. – 1220 с.

20. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: in 5 vol. / ed. by Chief G. M. Garrity. – New York: Springer, 2001–2012. – 1–5 vol.

21. Manual of Environmental Microbiology / C. J. Hurst [et al.]. – Washington: American Society for Microbiology, 2001. – 235 p.

22. The yeasts, a taxonomic study / ed. by C. P. Kurtman, J. W. Fell. – Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1998. – 1055 p.

23. Cann, A. J. Principles of Molecular Virology / A. J. Cann. – New York: Acad. Press, 1997. – 344 p.

24. The Mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research: in 9 vol. / ed. by K. Esser and P. A. Lemke. – New York: Acad. Press, 1997. – Vol. 3. – 137 p.

25. Atlas, R. M. Principles of Microbiology / R. M. Atlas. – New York: Mosby-Year Book, Inc., 1995. – 888 p.

26. Oren, A. Molecular Phylogeny of Microorganisms / A. Oren, R. T. Papke. – New York: Acad. Press, 2010. – 212 p.

Интернет-источники

1. Bergey's Manual Trust: Информация о современной классификации эубактерий и архебактерий [Электронный ресурс]. – 2002. – Режим доступа: http://www.cme.msu.edu/Bergeys. – Дата доступа: 11.01.2018.

2. Коллективный интернет-проект, содержащий информацию о филогении и биоразнообразии прокариот и эукариот [Электронный ресурс]. – 2001. – Режим доступа: http://tolweb.org/tree/phylogeny.html. – Дата доступа: 12.01.2018.

3. Информация об организации, морфологии, физиологии, систематике, распространении в окружающей среде грибов [Электронный ресурс]. – 2003. – Режим доступа: http://www.mycolog.com/index.html. – Дата доступа: 13.01.2018.

4. Классификация и характеристика представителей всех царств микроорганизмов [Электронный ресурс]. – 2004. – Режим доступа: http://www.ucmp.berkeley.edu/index.html. – Дата доступа: 14.01.2018.

5. Все разделы бактериологии [Электронный ресурс]. – 2003. – Режим доступа: http://www.bact.wisc.edu/Bact303/Bact303mainpage. – Дата доступа: 14.01.2018.

6. Биологический словарь [Электронный ресурс]. – 2005. – Режим доступа: http://www.bioword.narod.ru/V/V109.htm. – Дата доступа: 14.01.2018.

7. Характеристика микроорганизмов различных групп [Электронный ресурс]. – 2002. – Режим доступа: http://www.microbeworld.org/home.htm. – Дата доступа: 15.01.2018.

8. Вся вирусология [Электронный ресурс]. – 2003. – Режим доступа: http://www.virology.net/garryfavweb.html. – Дата доступа: 15.01.2018.

9. The ig Picture Book of Viruses [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: http://www.virology.net/Big_Virology/BVHomePage.html. – Date of access: 15.01.2018.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ *(лекция 1)* 3
Предмет и задачи микробиологии 3
История развития науки 8

Часть I. МОРФОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ *(лекции 2–17)* 15

Глава 1. ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК 15
§ 1.1. Структура эукариотической клетки 16
§ 1.2. Различия в организации клеток прокариот и эукариот 26
§ 1.3. Структура прокариотической клетки 28

Глава 2. ОСНОВЫ СИСТЕМАТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ 49
§ 2.1. Принципы систематики 49
§ 2.2. Генетические критерии систематики 51
§ 2.3. Филогенетические критерии систематики 52
§ 2.4. Фенотипические критерии систематики 54
§ 2.5. Серологические критерии систематики 56
§ 2.6. Иерархическая структура систем классификации 56
§ 2.7. Филогения микроорганизмов 58
§ 2.8. Современная классификация клеточных организмов и положение микроорганизмов в ней 59

Глава 3. МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, ОСОБЕННОСТИ КЛАССИФИКАЦИИ ПРОКАРИОТ 63
§ 3.1. Морфология клеток прокариот 63
§ 3.2. Характеристика способов размножения прокариот 66
§ 3.3. Особенности классификации прокариот 68

Глава 4. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ДОМЕНА BACTERIA 70
§ 4.1. Протеобактерии 71
§ 4.2. Грамотрицательные эубактерии других филогенетических ветвей 81
§ 4.3. Грамположительные эубактерии 84

Глава 5. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ДОМЕНА ARCHAEA 88
§ 5.1. Физиолого-биохимические особенности архебактерий 89
§ 5.2. Euryarchaeota 90
§ 5.3. Crenarchaeota 94
§ 5.4. Способы адаптации архебактерий к высокой температуре 95

Глава 6. ФИЛОГЕНИЯ ДОМЕНА EUCARYA 98

Глава 7. МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ ГРИБОВ 101
§ 7.1. Особенности организации и филогения грибов 101
§ 7.2. Физиология грибов 104
§ 7.3. Хитридиомицеты (Chytridiomycetes) 110
§ 7.4. Зигомицеты (Zygomycetes) 111
§ 7.5. Гломеромицеты (Glomeromycetes) 113
§ 7.6. Аскомицеты (Ascomycetes) 113
§ 7.7. Базидиомицеты (Basidiomycetes) 116
§ 7.8. Особенности морфологии и физиологии дрожжей 117

Глава 8. МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТЕЙШИХ И ВОДОРОСЛЕЙ 123
§ 8.1. Эвгленозои (Euglenozoans) 124
§ 8.2. Альвеоляты (Alveolates) 126
§ 8.3. Страменофилы (Stramenophiles) 129
§ 8.4. Амебозои (Amoebozoa) 130
§ 8.5. Красные и зеленые водоросли 132

Глава 9. НЕКЛЕТОЧНЫЕ ФОРМЫ ЖИЗНИ 136
§ 9.1. Вирусы 136
§ 9.2. Вироиды 152
§ 9.3. Сателлиты 153
§ 9.4. Прионы 154

Часть II. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ *(лекции 18–27)*.....157

Глава 10. ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ..... 157
§ 10.1. Химический состав микробной клетки 158
§ 10.2. Источники биогенных элементов для микроорганизмов..... 160
§ 10.3. Факторы роста 164
§ 10.4. Типы питания микроорганизмов 166
§ 10.5. Способы поступления питательных веществ в клетку..... 169
§ 10.6. Питательные среды 173

Глава 11. ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБНОГО РОСТА..... 178
§ 11.1. Рост микробной клетки 178
§ 11.2. Рост микробной популяции 179
§ 11.3. Параметры роста клеточной популяции 184

Глава 12. ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ 188
§ 12.1. Физические факторы 189
§ 12.2. Химические факторы 201
§ 12.3. Методы стерилизации 207

Глава 13. ОСНОВЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ 211
§ 13.1. Элективные методы культивирования 211
§ 13.2. Получение чистых и смешанных культур..... 213
§ 13.3. Методы периодического и непрерывного культивирования 215
§ 13.4. Синхронизация клеточных культур 217
§ 13.5. Культивирование в аэробных и анаэробных условиях 219
§ 13.6. Способы хранения микроорганизмов..... 221

Часть III. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА *(лекции 28–41)*.....224

Глава 14. САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ..... 224
§ 14.1. Нормальная микробиота человека..... 225
§ 14.2. Санитарно-показательные микроорганизмы 229
§ 14.3. Санитарная микробиология воды..... 234
§ 14.4. Санитарная микробиология почвы..... 237
§ 14.5. Санитарная микробиология воздуха 239

Глава 15. ИСТОЧНИКИ И ПУТИ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ 241

Глава 16. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К КАЧЕСТВУ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ 251
§ 16.1. Микробиота нестерильных лекарственных средств..... 251
§ 16.2. Микроорганизмы, контролируемые в нестерильных лекарственных средствах..... 253
§ 16.3. Принципы микробиологического контроля нестерильных лекарственных средств 259
§ 16.4. Контроль стерильности лекарственных препаратов 264

Глава 17. ГИГИЕНА НА ПРОИЗВОДСТВЕ. ПРИНЦИПЫ GMP 267
§ 17.1. Правила GMP в обеспечении качества лекарственных средств 267
§ 17.2. Гарантия качества и контроль биологического риска в фармацевтическом производстве 271
§ 17.3. Микробиологические требования к организации производства фармацевтической продукции 273

ЛИТЕРАТУРА 283

Учебное издание

Белясова Наталья Александровна
Ахрамович Татьяна Игоревна

МИКРОБИОЛОГИЯ

Электронный курс лекций

Редактор *Е. С. Ватеичкина*
Компьютерная верстка *Е. С. Ватеичкина*
Корректор *Е. С. Ватеичкина*

Издатель:
УО «Белорусский государственный технологический университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/227 от 20.03.2014.
Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.