

МИКРОБИОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ ВИРУСОЛОГИИ

Учебная программа дисциплины

Конспект лекций

➤ Лабораторный практикум

Методические указания по самостоятельной работе

Банк тестовых заданий в системе UniTest



УДК 579
ББК 28.4
М59

Авторы:

**С. В. Прудникова, Н. Д. Сорокин, Н. И. Сарматова, Н. Н. Реммель,
Г. А. Выдрякова**

Электронный учебно-методический комплекс по дисциплине «Микробиология с основами вирусологии» подготовлен в рамках реализации в 2007 г. программы развития ФГОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» на 2007–2010 гг. по разделу «Модернизация образовательного процесса».

Рецензенты:

Красноярский краевой фонд науки;

Экспертная комиссия СФУ по подготовке учебно-методических комплексов дисциплин

М59 Микробиология с основами вирусологии: методы микрoэкологического исследования наземных, водных и воздушных экосистем. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: лаб. практикум / С. В. Прудникова, Н. Д. Сорокин, Н. И. Сарматова и др. – Электрон. дан. (5 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – (Микробиология с основами вирусологии: УМКД № 142-2007 / рук. творч. коллектива Н. Д. Сорокин). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования: *Intel Pentium* (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц; 512 Мб оперативной памяти; 5 Мб свободного дискового пространства; привод *DVD*; операционная система *Microsoft Windows 2000 SP 4 / XP SP 2 / Vista* (32 бит); *Adobe Reader 7.0* (или аналогичный продукт для чтения файлов формата *pdf*).

ISBN 978-5-7638-1274-9 (комплекса)

ISBN 978-5-7638-1483-5 (лабораторного практикума)

Номер гос. регистрации в ФГУП ИТЦ «Информрегистр» 0320802766 от 23.12.2008 г. (комплекса)

Настоящее издание является частью электронного учебно-методического комплекса по дисциплине «Микробиология с основами вирусологии», включающего учебную программу, конспект лекций, методические указания по самостоятельной работе «Микробиология с основами вирусологии: методы микрoэкологического исследования наземных, водных и воздушных экосистем», контрольно-измерительные материалы «Микробиология с основами вирусологии. Банк тестовых заданий», наглядное пособие «Микробиология с основами вирусологии. Презентационные материалы».

В лабораторном практикуме даны сведения о микроорганизмах, их морфологии и физиологии. Представлены микроскопические методы изучения морфологии и цитологии прокариотных и эукариотных микроорганизмов, а также некоторые методы культивирования основных эколого-трофических групп.

Предназначен для студентов направления подготовки бакалавров 020200.62 «Биология» укрупненной группы 020000 «Естественные науки».

© Сибирский федеральный университет, 2008

Рекомендовано Инновационно-методическим управлением СФУ
в качестве учебного пособия

Редактор Т. М. Пыжик

Разработка и оформление электронного образовательного ресурса: Центр технологий электронного обучения информационно-аналитического департамента СФУ; лаборатория по разработке мультимедийных электронных образовательных ресурсов при КрЦНИТ

Содержимое ресурса охраняется законом об авторском праве. Несанкционированное копирование и использование данного продукта запрещается. Встречающиеся названия программного обеспечения, изделий, устройств или систем могут являться зарегистрированными товарными знаками тех или иных фирм.

Подп. к использованию 01.09.2008

Объем 5 Мб

Красноярск: СФУ, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ПРАВИЛА ПОВЕДЕНИЯ И РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	8
ЗАНЯТИЕ 1 ТЕМА: МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	10
Световая микроскопия	10
Люминесцентная микроскопия	18
Электронная микроскопия	20
ЗАНЯТИЕ 2 ТЕМА: ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРООРГАНИЗМАМИ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРИЖИЗНЕННЫХ И ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ	25
ЗАНЯТИЕ 3 ТЕМА: МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ.....	30
ЗАНЯТИЕ 4 ТЕМА: СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ МИКРООРГАНИЗМОВ. ОКРАСКА ПО ГРАМУ	34
ЗАНЯТИЕ 5 ТЕМА: ОТДЕЛ <i>GRACILICUTES</i>. СПИРОХЕТЫ	37
ЗАНЯТИЕ 6 ТЕМА: ОТДЕЛ <i>GRACILICUTES</i>. ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ, АЭРОБНЫЕ МИКРОАЭРОФИЛЬНЫЕ ПАЛОЧКИ И КОККИ. СЕМЕЙСТВА <i>PSEUDOMONODACEAE</i> И <i>АСЕТОВАСТЕРИАСЕАЕ</i>	40
ЗАНЯТИЕ 7 ТЕМА: ОТДЕЛ <i>FIRMICUTES</i>. ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ КОККИ	45
ЗАНЯТИЕ 8 ТЕМА: ОТДЕЛ <i>FIRMICUTES</i>. ПАЛОЧКИ И КОККИ, ОБРАЗУЮЩИЕ ЭНДОСПОРЫ. РОД <i>BACILLUS</i>. МЕТОДЫ ОКРАСКИ СПОР	52
ЗАНЯТИЕ 9 ТЕМА: ОТДЕЛ <i>FIRMICUTES</i>. АКТИНОМИЦЕТЫ И РОДСТВЕННЫЕ ОРГАНИЗМЫ.....	59

Группа 20. Грамположительные, не образующие спор палочки неправильной формы.....	60
Группа 21. Микобактерии.....	63
Группа 22. Нокардиоформы	63
Группа 23. Актиномицеты с многоклеточными спорангиями	64
Группа 24. Актинопланы.....	64
Группа 25. Стрептомицеты и родственные формы	65
Группа 26. Мадуромицеты.....	66
Группа 27. Термомоноспоры и родственные формы.....	67
Группа 28. Термоактиномицеты.....	68
Группа 29. Другие формы актиномицетов.....	68
ЗАНЯТИЕ 10 ТЕМА: ХАРАКТЕРИСТИКА	
ЭУКАРИОТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.	
МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ.....	70
Общая характеристика грибов	70
Морфология и физиология грибов	72
Систематика грибов.....	73
Техника микроскопирования мицелиальных грибов.....	90
ЗАНЯТИЕ 11 ТЕМА: ХАРАКТЕРИСТИКА	
ЭУКАРИОТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.	
ДРОЖЖЕВЫЕ ГРИБЫ	92
Мицелиально-дрожжевой диморфизм	92
Морфология и физиология дрожжевых грибов	93
Систематика дрожжевых грибов	95
Техника микроскопирования дрожжевых грибов.....	98
ЗАНЯТИЕ 12 ТЕМА: МЕТАБОЛИЗМ АЗОТА.	
СВОБОДНОЖИВУЩИЕ И СИМБИОТИЧЕСКИЕ	
АЗОТФИКСАТОРЫ. СЕМЕЙСТВА	
<i>AZOTOBACTERIACEAE</i> И <i>RHIZOBIACEAE</i>	101
Семейство Azotobacteriaceae.....	102
Семейство Rhizobiaceae	103
Получение накопительной культуры азотфиксаторов.....	105
ЗАНЯТИЕ 13 ТЕМА: МЕТАБОЛИЗМ АЗОТА.	
ХЕМОЛИТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ.	
ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА	
<i>NITROBACTERIACEAE</i>	107

Бесцветные сероокисляющие бактерии	107
Железо- и марганцеокисляющие и/или осаждающие бактерии	107
Нитрифицирующие бактерии	108
Особенности метаболизма хемолитоавтотрофов	111
Получение накопительной культуры нитрифицирующих бактерий	112
ЗАНЯТИЕ 14 ТЕМА: МИКРООРГАНИЗМЫ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ МАСЛЯНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ. БАКТЕРИИ РОДА <i>CLOSTRIDIUM</i>	114
Маслянокислое брожение	114
Маслянокислые бактерии	115
Получение накопительной культуры маслянокислых клостридий.	117
ЗАНЯТИЕ 15 ТЕМА: МИКРООРГАНИЗМЫ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ БРОЖЕНИЕ. МОЛОЧНОКИСЛЫЕ ПАЛОЧКИ И КОККИ.....	120
ЗАНЯТИЕ 16	123
ТЕМА: ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ ПРОКАРИОТЫ..	123
Пурпурные бактерии	123
Зеленые бактерии	124
Гелиобактерии	125
Цианобактерии.....	126
Прохлорофиты	128
ЗАНЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МИКРОФЛОРЫ ПОЧВЫ, ВОДЫ И ВОЗДУХА.....	130
Микрофлора почвы	130
Выделение почвенных микроорганизмов на питательных средах.	132
Экологические методы исследования почвенных микроорганизмов	138
Санитарно-микробиологический анализ почвы.....	139
Микрофлора воды	141
Санитарно-микробиологическое исследование воды.....	143
Микрофлора воздуха	144
Санитарно-микробиологический анализ воздуха	144
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	148
ССЫЛКИ НА ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ	151

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы составляют основную, жизненно важную для эволюции часть живого на Земле. В качестве основных компонентов пищевых цепей они играют уникальную, решающую роль в биогеохимических циклах планеты. Круговороты серы и азота иллюстрируют ключевую роль в них микроорганизмов. Процессы разложения отмерших растений и животных, осуществляемые гетеротрофными микроорганизмами совершенно необходимы для жизни, поскольку в результате высвобождаются биогенные элементы, без которых невозможно ее продолжение. Они являются не только первичными продуцентами, но и доминируют в биогеохимических циклах во всех экстремальных условиях обитания, адаптируясь к ним. Микроорганизмы могут служить не только в качестве ранних систем предупреждения в биомониторинге, но и для оценки изменений климата и воздействия загрязнений на экосистемы и их компоненты. Понимание роли и функций популяций микроорганизмов в экосистемах очень важно, так как они реагируют на любые нарушения естественной среды обитания уменьшением или увеличением численности той или иной группы, изменением структуры популяции. Микроорганизмы имеют огромное функциональное разнообразие и составляют главный генетический источник для нейтрализации изменений и стрессовых воздействий в экосистемах. Быстро приспосабливаясь к изменяющимся условиям, они обеспечивают стабильность природных экосистем. Роль микроорганизмов для функционирования и сохранения экосистем и биосферы Земли исключительно важна. Кроме того, микроорганизмы являются главным источником биологически активных веществ, которые могут быть полезны и используются человеком.

Пособие по практическим занятиям предназначено для студентов направления и специальности «Биология» и составлено в соответствии с действующей программой курса «Микробиология с основами вирусологии», читаемого на биологическом факультете Сибирского федерального университета. Лабораторные занятия практикума дополняют теоретический курс, позволяют лучше усвоить его, знакомят с фактическим материалом.

Задачами пособия по практическим занятиям являются:

- ознакомление студентов с устройством микробиологической лаборатории, порядком проведения работы в соответствии с требованиями безопасности и охраны труда;
- овладение микроскопическими методами наблюдения и изучения морфологических признаков микроорганизмов, необходимых для их

идентификации;

- формирование представлений о разнообразии микроорганизмов, их роли в становлении биосферы и ее стабильности;

- формирование представлений об основах экологии микроорганизмов, их взаимоотношениях между собой, с представителями растительного и животного мира, а также с человеческим организмом.

Для каждого занятия даны теоретические пояснения по изучаемой теме, предложены задания и план проведения работы. Каждое занятие рассчитано на 2 часа, приведен список литературы, рекомендуемой при подготовке к занятиям малого практикума.

ПРАВИЛА ПОВЕДЕНИЯ И РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

В состав микробиологической лаборатории входят:

- 1) лабораторная комната для проведения занятий;
- 2) стерилизационная, где установлены автоклав и другие стерилизационные аппараты;
- 3) моечная;
- 4) препараторская, приспособленная для хранения сред и культур, в ней находится холодильник;
- 5) застекленный бокс для проведения работ, требующих абсолютной стерильности (для пересева чистых культур, посевов), в нем устанавливают бактерицидную лампу (БУФ-15, БУФ-30) на высоте 2 м от пола.

За студентом в лаборатории закрепляют постоянное место и оборудование. На рабочем месте не должно быть ничего лишнего. Оборудование, которое требуется по тематике занятия, устанавливают на длительное время. Таким оборудованием являются: микроскоп, покрытый полиэтиленовым чехлом, осветитель, набор красителей, бактериологические петли и иглы, шпатели, градуированные и неградуированные (пастеровские) пипетки, предметные стекла, покровные стекла, стеклянный мостик в ванночке для окраски препаратов, промывалка с водой, дезинфицирующая жидкость, вата, фланелевая салфетка, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, фильтровальная бумага, спички.

Исправность оборудования проверяет лаборант перед каждым занятием, добавляет все необходимое, что требуется для проведения опытов.

При работе в микробиологической лаборатории необходимо соблюдать правила, которые обеспечивают стерильность и предупреждают возможность возникновения внутрилабораторных заражений.

Перед началом работы

Наденьте халат и косынку или колпак, сменную обувь, вымойте руки.

Проверьте рабочее место, комплектность оборудования и его исправность, наличие этикеток на флаконах с жидкостями.

О недостатках, обнаруженных на рабочем месте, сообщите преподавателю.

Во время работы

Работая с накопительными культурами гетеротрофных микроорганизмов, помните, что в них может содержаться примесь патогенных форм.

Перед тем как открыть пробирку, колбу, чашку с культурой, фламбируйте в пламени спиртовки пробирку (край чашки).

Прежде чем зажечь спиртовку, подтяните фитиль и выпустите скопившиеся пары спирта. При гашении спиртовки не дуйте на пламя, а накройте его колпачком. Категорически запрещается зажигать спиртовку от пламени другой спиртовки.

В случае взрыва паров спирта в спиртовке и выброса фитиля спиртовку (если она опрокинута) накройте колпачком, пламя погасите специальной

салфеткой или краем клеенки, покрывающей стол.

Содержите в порядке рабочее место, уберите лишнюю посуду и другие предметы, которыми в данный момент не пользуетесь.

Бактериологическую петлю, скальпель, пинцет после каждого соприкосновения с культурами прожигают в пламени спиртовки. Запрещается в процессе работы класть в карман халата или на стол пробирки с культурами, их нужно оставлять в стакане или ставить в штатив.

При расплавлении агаризованных питательных сред пользуйтесь водяной баней, предварительно ослабив пробки в колбах. Кипячение растворов на электроплитке производите на асбестовых прокладках в термостойких колбах. Нагревание жидкостей в пробирках на спиртовке производится с помощью держателя. Держать пробирку необходимо под углом 45° горлышком в сторону от себя.

При работе с электроприборами не отключать прибор мокрыми руками. В случае неисправности прибора (нагревание, искрение, замыкание) его необходимо тотчас же обесточить и сообщить о случившемся преподавателю.

По окончании микробиологических работ руки дезинфицируют 70 % раствором этанола и моют с мылом.

По окончании работы:

- убрать с рабочего стола все предметы кроме комплекса;
- отработанный микробный материал сложить в дезинфицирующую жидкость;
- обесточить приборы.

В лаборатории запрещается:

- принимать пищу, курить, хранить продукты питания;
- протирать сырой тряпкой включенные приборы;
- работать с потрескавшейся стеклянной посудой;
- в студенческих лабораториях университетов не разрешается работать с живыми патогенными для человека микроорганизмами.

ЗАНЯТИЕ 1

ТЕМА: МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроскопические исследования проводить относительно легко и интересно, а их результаты отличаются четкостью. Для решения основных научно-практических вопросов микробиологическая лаборатория должна быть оснащена микроскопами, по крайней мере, четырех различных типов: обычным световым микроскопом; микроскопом, приспособленным для микрофотографирования; фазово-контрастным и люминесцентным.

Микроскоп – оптический прибор для получения сильно увеличенных изображений объектов (или деталей их структуры), невидимых невооружённым глазом. Человеческий глаз представляет собой естественную оптическую систему, характеризующуюся определённым разрешением, т. е. наименьшим расстоянием между элементами наблюдаемого объекта (воспринимаемыми как точки или линии), при котором они ещё могут быть отличены один от другого. Для нормального глаза при удалении от объекта на расстояние наилучшего видения ($D = 250$ мм) минимальное разрешение составляет примерно 0,08 мм (а у многих людей – около 0,20 мм). Размеры микроорганизмов значительно меньше этой величины. Микроскоп даёт возможность различать структуры с расстоянием между элементами до 0,20 мкм.

Для микробиологических исследований используют несколько типов микроскопов (биологический, люминесцентный, электронный) и специальные методы микроскопии (фазово-контрастный и темнопольный).

Световая микроскопия

Световой микроскоп – сложный оптический прибор, предназначенный для изучения в сильно увеличенном изображении мельчайших предметов, организмов и структур тканей, невидимых невооруженным глазом. Современный микроскоп называется световым, так как он обеспечивает возможность изучать объект в проходящем свете в светлом и темном поле зрения, проводить фазово-контрастную, люминесцентную и другие виды микроскопии.

Конструкции микроскопов, выпускаемых в настоящее время, различны, но принцип их устройства одинаков. В микроскопе различают две основные части: механическую часть, обеспечивающую перемещение оптической системы и наблюдаемого предмета, и оптическую систему с осветительным устройством, создающую изображение.

Механическими частями прибора являются:

- 1) штатив;
- 2) тубусодержатель;

- 3) устройство для макро- и микронаводки;
- 4) тубус;
- 5) револьвер объектива;
- 6) предметный столик и прочее.

Оптическая часть микроскопа включает:

- 1) объектив;
- 2) окуляры;
- 3) осветительное устройство.

Объективы. Основная оптическая часть любого микроскопа – объектив. Он состоит из сложной центрированной системы линз, дающей возможность получить правильное, увеличенное обратное изображение предмета. Передняя линза объектива (сферическая или полусферическая), производящая увеличение изображения, называется фронтальной. Лежащие за ней линзы – коррекционные – исправляют изображение, устраняя недостатки – артефакты (абберации), создаваемые фронтальной линзой.

Фокусное расстояние линзы для лучей разной длины волны различно. Поэтому при использовании немонохроматического света формируемое линзой изображение предмета имеет окрашенные края. Подобный феномен известен как хроматическая абберация; ее устраняют ахроматические и апохроматические объективы. Различие оптических свойств центральной и периферической частей сферической линзы обуславливает сферические абберации; их устраняют апохроматические объективы. В настоящее время для устранения этого недостатка применяют специальные объективы – планахроматы и планапохроматы. В бактериологической практике наиболее широко применяются объективы: апохроматы, ахроматы и планахроматы. Такое подразделение объективов проведено по характеру исправления аббераций, т. е. дефектов изображения оптических систем. Наилучшим объективом считают планапохромат с высокой числовой апертурой.

При использовании апохроматических объективов почти полностью отсутствует хроматическая абберация, т. е. разложение белого цвета на составные части спектра. Следовательно, создаются условия для наиболее правильной передачи окраски объекта. Это свойство обеспечивается за счет усложнения оптики (до 10–12 линз) и применения особых стекол различного химического состава.

Более распространенными являются ахроматы, в которых хроматическая абберация устранена частично. Эти объективы содержат до шести линз и дают изображение, наиболее резкое в центре. При микроскопировании цветных объектов с помощью ахроматов вокруг изображения может получиться желтоватый или зеленоватый фон. При микрофотографировании целесообразно применять планахроматы. Планахроматы полностью устраняют искривление поля зрения вплоть до краёв ([рис. 1](#)).



Рис. 1. Типы объективов микроскопа
1 – планахромат малого увеличения; 2 и 3 – планапохроматы;
4 – апохромат иммерсионный

Каждый объектив характеризуется следующими основными константами: фокусное расстояние, увеличение, разрешающая способность, числовая апертура, действующее отверстие. Собственное увеличение объективов указано на оправе (8, 10, 20, 40, 60, 90, 100). На некоторых объективах вместо увеличения обозначена величина фокусного расстояния в миллиметрах (16; 8; 5; 1,5 мм и т. д.). Чем короче фокусное расстояние объектива (передней линзы, обращенной к препарату), тем больше его увеличение. По величине фокусного расстояния объективы подразделяются на сильные ($F = 5\text{--}1,5\text{ мм}$), средние ($F = 5\text{--}12\text{ мм}$) и слабые ($F = 25\text{--}30\text{--}50\text{ мм}$). Разрешающая способность объектива, т. е. свойство изображать мельчайшие детали препарата, характеризуется наименьшим расстоянием, при котором различают две тесно расположенные точки. Разрешающая способность определяется формулой:

$$E = \lambda / A,$$

где E – разрешающая способность объектива;

λ – длина световой волны;

A – числовая апертура.

Числовая апертура («охват» линзы) – произведение показателя преломления среды, отделяющей объект от передней линзы объектива микроскопа, на синус апертурного угла.

По способу использования объективы бывают сухими и иммерсионными, т. е. погружёнными. Сухими объективами называют такие, у которых между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. Эти объективы

характеризуются слабым увеличением и относительно большим фокусным расстоянием.

Некоторые характеристики объективов выгравированы на их оправе. К ним относятся (рис. 2 и 3):

- увеличение (4, 10, 40, 100, и др.),
- апертура (0,12; 0,30; 0,65; 1,25),
- длина тубуса (160 и др.),
- толщина покровного стекла (0,17),
- тип иммерсии (МИ – масляная иммерсия – черный ободок, ВИ – водная иммерсия – белый ободок).



Рис. 2. Характеристики объективов

1 – сухой объектив; 2 – водная иммерсия; 3 – масляная иммерсия

При микроскопировании с сильными объективами, фокусное расстояние которых незначительно, необходимо создать однородную оптическую среду между фронтальной линзой объектива и стеклом препарата. Это достигается путем погружения линзы в каплю кедрового масла на препарате. Кедровое масло обладает показателем преломления $n = 1,510$, близким к показателю преломления стекла. В связи с этим световой пучок, вышедший из предметного стекла, не рассеивается и, не меняя своего направления, попадает в объектив, обеспечивая хорошую освещенность. В качестве заменителей кедрового масла можно использовать персиковое масло ($n = 1,471–1,498$), смесь касторового и укропного масел ($n = 1,474–1,498$) и др.

Окуляры, обычно применяемые с ахроматическими объективами, состоят из двух линз: собирающей, обращенной к объективу, и глазной, обращенной к глазу. При работе с сильными ахроматами и апохроматами следует пользоваться компенсационными окулярами, которые компенсируют хроматическую аберрацию ахромата. Увеличение обычных окуляров обозначено на оправе цифрами $5\times$, $7\times$, $10\times$, $15\times$. Увеличение сильных компенсационных

окуляр достигают 20 и более раз. Окуляры различаются по конструкции и собственному увеличению. В настоящее время в биологических микроскопах чаще используются окуляры Гюйгенса и компенсационные. Тип окуляра и кратность увеличения обозначаются на оправе глазной линзы (рис. 3).



Рис. 3. Типы окуляров

1 и 4 – компенсационные окуляры; 2 – окуляр Гюйгенса;
3 – компенсационный фотоокуляр

Окуляры Гюйгенса используются с объективами-ахроматами малого увеличения, компенсационные – с ахроматами большого увеличения и апохроматами. Окуляры Гюйгенса состоят из двух линз: верхней – глазной и нижней – полевой.

В фокусе глазной линзы расположена диафрагма поля. Компенсационные окуляры устраняют остаточную абберацию объективов. Для проецирования изображения применяются фотоокуляры и гомали (отрицательные системы, исправляющие некоторые оптические дефекты полученного объективом изображения). Гомали не пригодны для визуального наблюдения.

Осветительное устройство состоит из зеркала, ирис-диафрагмы и конденсора.

Зеркало служит для отражения идущих от источника лучей по направлению к объективу и через него внутрь микроскопа. Одна сторона зеркала плоская, другая – вогнутая. При работе с конденсором следует пользоваться только плоскими зеркалами. Вогнутое зеркало может применяться при работе без конденсора с объективами малых увеличений. Конденсор – система линз, собирающих лучи, отраженные зеркалом. При микроскопировании с дневным светом конденсор должен быть поднят до уровня предметного стекла. При искусственном освещении конденсор опускается до появления

при малом увеличении изображения источника света в плоскости препарата. Интенсивность света, подаваемого в микроскоп, правильнее всего регулировать вращением ручки трансформатора. Ирисовая диафрагма расположена под линзами конденсора и состоит из ряда стальных сегментов. Ирис-диафрагма обеспечивает нужную контрастность изображения. Окрашенные препараты лучше просматривать при открытой почти полностью диафрагме. Неокрашенные объекты следует изучать при суженном отверстии диафрагмы, причем необходимо тем сильнее уменьшать отверстие, чем нежнее структура изучаемого объекта.

Осветители бывают в виде отдельного устройства, накладные, а также встроенные в штатив микроскопа. Осветитель ОИ-19 (ЛОМО) с низковольтной лампой накаливания (8В, 20Вт) предназначен для работы со всеми типами микроскопов, снабженных поворотным зеркалом. Осветитель накладной упрощенный ОИ-31 (ЛОМО) устанавливается на микроскопе БИОЛАМ, предназначен для работы с малыми и средними увеличениями, не позволяет проводить настройку света по Кёлеру (рис. 4). Встроенный осветитель позволяет проводить микроскопию как в проходящем, так и в отраженном свете (рис. 5).



Рис. 4. Типы осветителей
ОИ-19 – слева, ОИ-31 – справа



Рис. 5. Микроскоп Биолам со встроенным осветителем

Основная характеристика микроскопа – его увеличение. Линейным увеличением любой оптической системы называется отношение величины изображения, даваемого этой системой, к величине рассматриваемого предмета, выражается оно отношением

$$B = \frac{f}{l},$$

где B – линейное увеличение,
 f – величина изображения;
 l – величина предмета.

Увеличение микроскопа при данной длине тубуса равно произведению увеличений объектива и окуляра. Для более полного использования разрешающей способности объектива и лучшего просмотра структуры препарата необходимо применять полезное увеличение. Установлено, что полезное увеличение микроскопа не может превышать числовую характеристику объектива более чем в 1000 раз. Допустим, имеется объектив с увеличением $\times 90$ и апертурой 1,25, полезное увеличение $1000 \times 1,25 = 1250$. Исходя из полезного увеличения, подбирают оптимально подходящий данному объективу окуляр. Разделив найденную величину полезного увеличения на увеличение используемого объектива, находят величину максимального увеличения окуляра, нужного для работы: $1250/90 = \times 14$. В данном случае лучше использовать окуляр с увеличением $\times 10$. При большем увеличении (например, $\times 15$) освещенность станет меньшей, а детали структуры окажутся расплывчатыми.

Темнопольная микроскопия позволяет наблюдать живые бактерии (рис. 6). При микроскопии этим методом лучи, освещающие объект, не попадают в объектив микроскопа, поле зрения остается темным, а объект на его фоне кажется светящимся. Эффект темного поля создается при помощи специального конденсора (параболоид или кардиоид).

Для наблюдения в темном поле свет устанавливают и центрируют как для светлого поля, и, заменив конденсор на специальный, прибавляют свет до максимума. Препараты для исследования в темном поле готовят на очень чистых предметных и покровных стеклах определенной толщины: предметные – не более 1,2 мм, покровные – 0,17 мм.

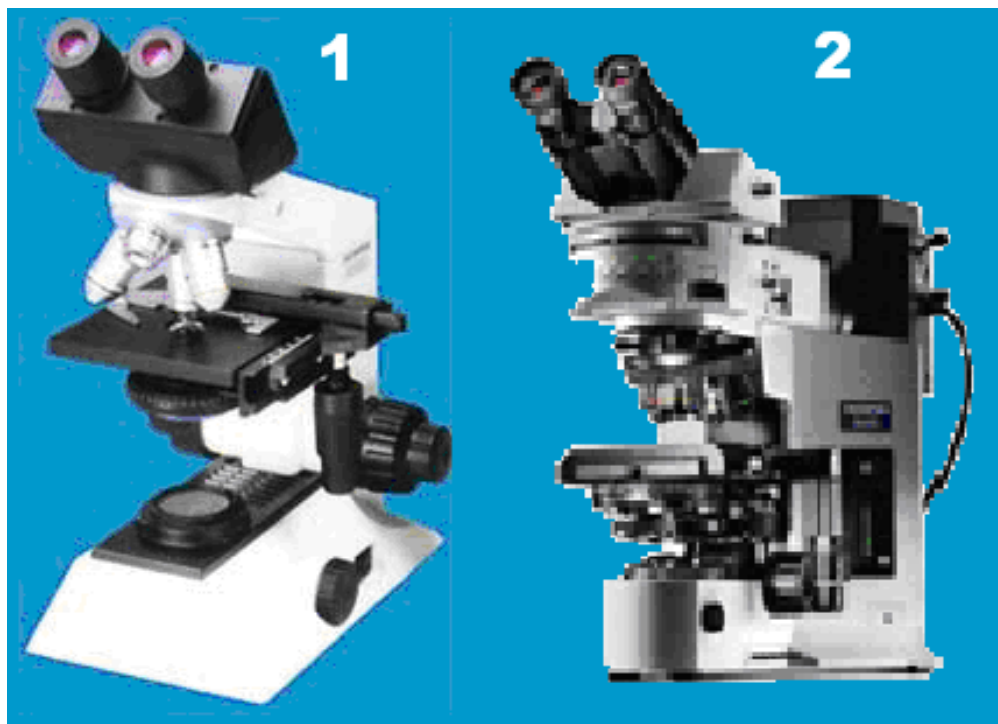


Рис. 6. Темнопольный (1) и фазово-контрастный (2) микроскопы

Фазово-контрастная микроскопия позволяет изучать живые и неокрашенные объекты за счет повышения их контрастности. Распространение световых волн в прозрачных однородных объектах не сопровождается потерей интенсивности света.

При прохождении света через неокрашенные объекты изменяется фаза световой волны, что и используется в фазово-контрастной и интерференционной микроскопии. Меняется скорость прохождения света через объект по сравнению со скоростью света в окружающей среде. Она будет большей или меньшей в зависимости от того, будет ли показатель преломления объекта соответственно больше или меньше, чем в окружающей среде. Эти колебания называются фазовыми, так как при них меняется только фаза колебаний прошедшего света. Такие колебания характерны для большинства биологических объектов ([рис. 6](#)).

Глаз человека не способен воспринимать фазовые изменения света. Поэтому неконтрастные (фазовые) объекты при обычном микроскопическом исследовании остаются невидимыми. Zernike предложил специальное устройство конденсора и объектива, которые регулируют изменения фазы све-

товых волн и превращают разность фаз в разность интенсивностей, благодаря чему детали строения объекта становятся доступными для глаз.

Для работы по методу фазового контраста нужно, кроме обычного биологического микроскопа, иметь еще специальное устройство. Установку устройства производят следующим образом. Кондерсор и объектив заменяют фазовыми. Основным условием является оптимальная освещенность, которая достигается установкой света по Келлеру. Фазовый конденсор поворотом револьверного диска устанавливают на 0. Это положение соответствует обычному светлопольному конденсору. Только после этого устанавливают револьверный диск на то число, которое соответствует выбранному объективу. Используют объективы апохроматы. Окуляр обычного светового микроскопа заменяется на вспомогательный, который настраивают на изображение двух колец (кольцевая диафрагма конденсора и фазовая пластинка). Для повышения контрастности фазовые кольца покрывают металлом, поглощающим прямой свет, не влияя на сдвиг фазы. Центрировочным устройством конденсора добиваются совмещения колец. Заменяв вспомогательный окуляр на обычный, можно производить исследование препарата.

Поляризационная микроскопия позволяет получить изображение неокрашенных анизотропных структур; интерференционная микроскопия, объединяющая принципы фазово-контрастной и поляризационной микроскопии, применяется для получения контрастного трехмерного изображения неокрашенных объектов. Специальная интерференционная оптика (оптика Номарковского) нашла применение в микроскопах с дифференциальным интерференционным контрастом.

Люминесцентная микроскопия

Этот метод применяется для наблюдения флюоресцирующих (люминесцирующих) объектов. Люминесценция (или флюоресценция) – это явление, когда некоторые вещества под влиянием падающего на них света испускают лучи с другой (обычно большей) длиной волны.

Различают собственную (первичную) и наведенную (вторичную) флюоресценцию. При первичной флюоресценции исследуемый объект содержит вещества, способные флюоресцировать при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Большая часть объектов не обладает собственной флюоресценцией, поэтому при люминесцентной микроскопии их обрабатывают красителями (флюорохромами), способными флюоресцировать. Кроме того, вещества, имеющие определенный цвет при обычном освещении, при освещении ультрафиолетовыми лучами приобретают совершенно другой цвет. Объект, невидимый в ультрафиолетовом свете, может приобрести яркий блеск после обработки его флюорохромом. Флюорохромы связываются с нуклеиновыми кислотами или белками и образуют прочные комплексы, которые светятся в люминесцентном микроскопе желто-зеленым, оранжево-красным, коричнево-красным цветом. Сила их света бывает различной, но

чаще всего она невелика, поэтому люминесцентную микроскопию следует проводить в затемненном помещении. В качестве флюорохромов используют аурамин, акридин желтый, корифосфин, флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ).

Препарат для люминесцентной микроскопии готовят обычным способом, фиксируют в ацетоне или этаноле 5–10 мин и наносят на него флюорохром на 20–30 мин. После этого препарат промывают проточной водой 15–20 мин, покрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Установка для люминесцентной микроскопии в видимых лучах состоит из яркого источника света и биологического микроскопа ([рис. 7](#)).



Рис. 7. Люминесцентный микроскоп

В люминесцентном микроскопе свет от мощного источника проходит через два светофильтра: первый задерживает свет перед образцом и пропускает свет длины волны, возбуждающей флюоресценцию образца, обработанного флюорохромом; второй пропускает свет длины волны, излучаемой флюоресцирующим объектом и воспринимаемый глазом. Таким образом, флюоресцирующие объекты поглощают свет одной длины волны и излучают в другой области спектра.

Люминесцентная микроскопия нашла широкое применение для визуализации результатов иммунохимических реакций, основанных на специфическом взаимодействии меченных флюоресцирующими красителями антител с антигенами изучаемого объекта. Антитела метят различными способами: флюорохромами (флюоресцеин, родамин и др.), при помощи ферментной реакции (пероксидаза хрена) или электронно-плотными частицами (ферритин, коллоидное золото).

Электронная микроскопия

Возможности оптических микроскопов ограничиваются не числом линз, а слишком большой длиной волны видимого света (600 нм). Объекты, диаметр которых меньше этой величины, или линии, разделенные расстоянием менее 200 нм, находятся за пределами разрешающей способности микроскопа. Применение вместо световых волн потока движущихся электронов позволило создать электронный микроскоп (рис. 8).



Рис. 8. Электронный микроскоп

Электронный поток вызывает свечение флюоресцирующего экрана. Если на пути электронов поместить какой-то объект, то в зависимости от его плотности электроны будут больше или меньше задерживаться, соответствующие места на экране или фотопластинке окажутся более или менее затемненными. Этот простой принцип в современном электронном микроскопе дополнен принципом отклонения электронных лучей в магнитном поле подобно тому, как световые лучи отклоняются стеклянными линзами.

Источником электронного потока служит катодная лампа с вольфрамовой нитью, которая разогревается до 25 000 °С.

Освобождающиеся при этом электроны летят в вакууме с большей или меньшей быстротой по направлению к аноду. В этом движении скорость определяет напряжение (30–100 кВ), существующее между анодом и катодом. Чем больше напряжение, тем выше разрешающая способность электронного микроскопа. Анод имеет в центре отверстие, через которое электроны летят по направлению к конденсору. Возле катода располагает-

ся отрицательно заряженный цилиндр, как бы суживающий пучок электронов, которые, будучи отрицательно заряжены, отталкиваются от стенок цилиндра в середину.

Это устройство в электронных микроскопах большинства систем располагается наверху, и пучок электронов направляется вниз. Объект исследования находится на их пути и отклоняет электронный луч тем сильнее, чем плотнее его структура. За конденсорной линзой, которая собирает электроны на исследуемом объекте, следует объективная, промежуточная и проекционная. Затем электроны попадают на экран, покрытый светящимися под их воздействием веществами – катодолюминофорами, здесь изображение из невидимого становится видимым.

Необходимый рабочий вакуум в колонне микроскопа должен быть 10^{-4} – 10^{-5} мм рт. ст. Изображение на флюоресцирующем экране электронного микроскопа создается тогда, когда соответствующие участки экрана будут обладать различной яркостью. При напряжении 200 000 В, если препарат тонкий, можно обнаружить внутриклеточные структуры, получить увеличение до 200 000 раз и увидеть объекты размером 0,002 мкм. Качество изображения в электронном микроскопе определяется его контрастом. Поскольку в состав биологических материалов входят в основном атомы с небольшой массой, контрастность таких материалов невелика, ее можно значительно повысить, обрабатывая препарат солями тяжелых металлов (свинца, вольфрама, урана), которые могут быть фиксированы на самом объекте (позитивное контрастирование) или использованы для повышения электронной плотности окружающего поля (негативное контрастирование). Разрешающая способность электронного микроскопа составляет 0,1–0,2 нм, а полезное увеличение – до 1–2 млн раз.

Биологические объекты исследуются в электронном микроскопе помещенными на специальные сетки, предварительно покрытые пленками. Для их приготовления используют растворы коллодия или формвара. Основные требования к пленкам – прочность, бесструктурность и незначительная толщина. Они должны быть легко проницаемы для электронов. Для повышения контраста биологических объектов применяют в качестве фиксатора четырехокись осмия (OsO_4). Обычно используют 1 % раствор OsO_4 , забуференный фосфатными буферами или метод альдегидной фиксации – глутаральдегид, акролеин. Наиболее распространенным является контрастирование уранилацетатом.

Различают два типа электронных микроскопов: трансмиссионный (просвечивающий) электронный микроскоп и сканирующий (растровый) электронный микроскоп ([рис. 9](#)).



Рис. 9. Трансмиссионный и сканирующий электронные микроскопы

Трансмиссионный (просвечивающий) электронный микроскоп дает двумерное (плоское) изображение. При сканирующей (растровой) электронной микроскопии пучок электронов быстро сканирует поверхность образца, вызывая излучение, которое посредством катодно-лучевой трубки формирует трехмерное изображение на светящемся экране; этот процесс сходен с формированием телевизионного изображения. Разрешающая способность сканирующего микроскопа достигает 3 нм, увеличение – 300 000. Кроме того, существуют комбинированные электронные микроскопы, которые могут работать в просвечивающем, сканирующем, либо в двух режимах одновременно. Электронная микроскопия позволяет изучить структуру микроорганизмов на макромолекулярном и субклеточном уровнях.

Задание

Научиться настраивать микроскоп и микроскопировать с иммерсионным объективом. В процессе работы с микроскопом следует учитывать наиболее распространенные ошибки:

1) использование предметных стекол большой толщины (более 1,1–1,2 мм) не позволяет установить свет по Кёлеру (их толщина больше рабочего расстояния конденсора);

2) применение нестандартных покровных стекол (более 0,17 мм толщины) при использовании иммерсионных объективов может привести к повреждению фронтальной линзы, при использовании сильных сухих систем ($\times 40$) не позволяет получить изображение высокого качества;

3) недопустимо использование суррогатов иммерсионного масла, так как их оптические характеристики могут отличаться от стандартных, что приведет к ухудшению качества изображения; кроме того, они могут содержать агрессивные вещества, повреждающие линзы и растворяющие клей, ко-

торым эти линзы склеены;

4) абсолютно недопустимо произвольное раскрытие апертурной ирис-диафрагмы конденсора; полностью открытая диафрагма конденсора приводит к потере контраста, полностью закрытая – к ухудшению качества изображения (появление дифракционных ободков).

План выполнения работы

1. Настройка по Кёлеру

Правильное освещение препарата является одним из основных условий успешной микроскопии. Лучший способ освещения основан на системе Кёлера и осуществляется в определенной последовательности.

1. Провести предварительную подготовку:
 - а) поставить осветитель на расстоянии 20–25 см от зеркала микроскопа;
 - б) положить препарат на предметный столик;
 - в) установить объектив $\times 8$;
 - г) поднять конденсор максимально вверх;
 - д) убрать матовое стекло;
 - е) открыть полностью диафрагму конденсора;
 - ж) установить плоское зеркало под углом 45° к лучу света и конденсору микроскопа;
 - з) закрыть диафрагму осветителя, оставив маленький “зрачок”.
2. Включить осветитель и направить луч света в центр зеркала.
3. Закрыть зеркало белым экраном и, передвигая патрон лампы осветителя вдоль его корпуса, добиться четкого изображения на экране спирали лампы накаливания.
4. Убрать экран и перевести луч света в поле зрения, получив в его центре изображение светлого пятна.
5. Найти изображение объекта.
6. Меняя положение конденсора, добиться четкого изображения контура светлого пятна в поле зрения.
7. Открыть полностью диафрагму осветителя.
8. Микроскоп настроен, и регулировать освещение теперь можно только с помощью трансформатора.
9. Недопустимо произвольное опускание и поднятие конденсора для регулирования освещенности препарата. После установки света по Кёлеру, положение конденсора изменять нельзя!

2. Работа с иммерсионным объективом

1. Поставить объектив с увеличением $\times 90$ или $\times 100$.
2. На мазок нанести каплю иммерсионного масла.
3. Под контролем глаза (смотрите на препарат сбоку) медленно погрузить фронтальную линзу в каплю масла. Глядя в окуляр, вращая макровинт, найти изображение объекта.
4. После работы немедленно убрать салфеткой масло с объектива. Если

необходимо сохранить препарат, иммерсионное масло осторожно снимают ваткой, смоченной в ксилоле. Ксилол удаляют, накладывая на препарат полосу фильтровальной бумаги.

5. Просмотреть постоянный препарат предложенного микроорганизма с объективами $\times 40$ и $\times 90$.

6. Сделать зарисовку.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Как организована учебная микробиологическая лаборатория и рабочее место в ней?

2. Как обеспечивается безопасность работы в микробиологической лаборатории?

3. Какие действия запрещаются в микробиологической лаборатории?

4. Какие типы микроскопов используют в микробиологических исследованиях?

5. Из каких частей состоит микроскоп и каково их назначение?

6. Какими показателями характеризуются объективы?

7. Как определить оптимальную величину увеличения окуляра?

8. Что такое разрешающая способность микроскопа?

9. Как проводится настройка освещения по Кёлеру?

10. Для чего используется иммерсионная микроскопия?

ЗАНЯТИЕ 2

ТЕМА: ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРООРГАНИЗМАМИ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРИЖИЗНЕННЫХ И ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Основное требование при работе с микроорганизмами – соблюдение асептики, т. е. таких условий, при которых в пробирку с изучаемой культурой не смогли бы попасть другие микроорганизмы (например, из воздуха, с предметов, используемых в процессе выполнения работы). Кроме того, нужно иметь в виду, что среди микроорганизмов многие условно патогенны, что требует повышенного внимания и аккуратности в работе.

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические петли, иглы, шпатели. Бактериологические петли изготавливают из проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях или впаивают в стеклянные палочки. Толщина игл и петель не должна превышать 0,5 мм ([рис. 10](#)).

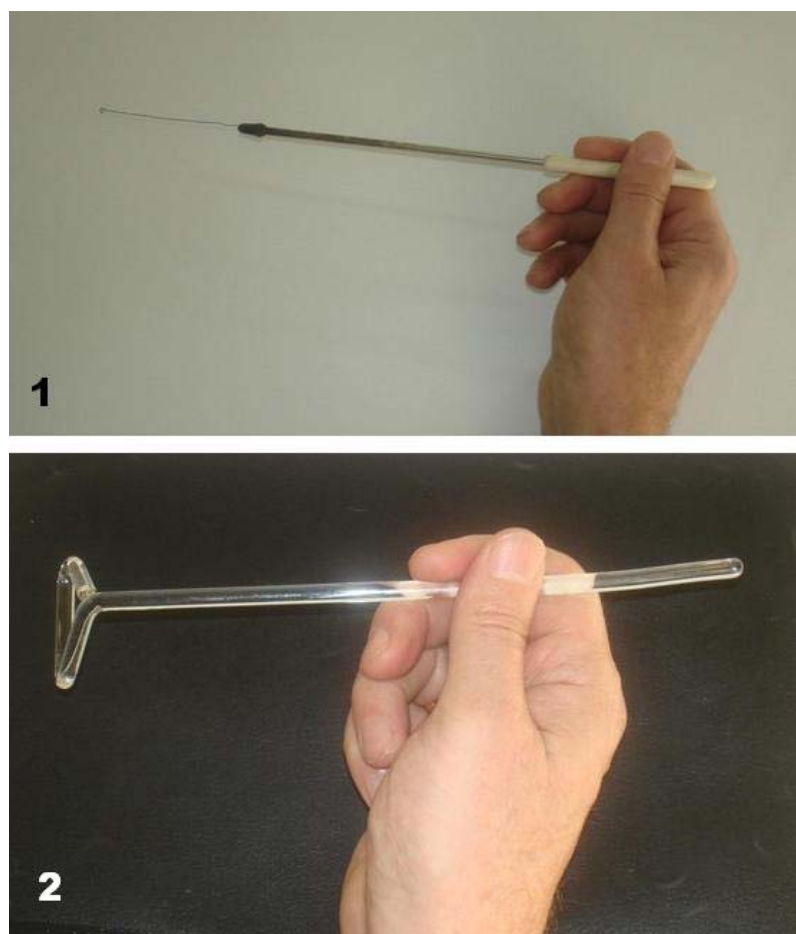


Рис. 10. Бактериологическая петля (1) и шпатель Дригальского (2)

Выращивают микроорганизмы в стеклянной посуде: пробирках, колбах или чашках Петри. В пробирках микроорганизмы культивируют как в жид-

ких, так и на плотных средах. Пробирки со средами и культурами при работе следует устанавливать на штативах.

Бактериологическая петля прокаливается, пробки и край пробирки фламбируются. Если в работе используются суспензии микроорганизмов или культуры, выращенные на жидких средах, они берутся предварительно простерилизованной пипеткой, у которой широкий конец закрыт ватой. Такие пипетки стерилизуются и хранятся завернутыми в бумагу (каждая отдельно).

Изучают микроорганизмы, изготавливая препараты из них. Для этого применяют чистые, хорошо обезжиренные стекла, на поверхности которых капля воды свободно растекается. С этой целью промытые и высушенные стекла натирают хозяйственным мылом, увлажняют дыханием и протирают салфеткой.

При микроскопировании можно использовать культуры, выращенные в жидких средах. Культуры, выращенные на твердых средах, можно суспендировать (развести) с помощью стерильной петли или иглы в капле стерильной жидкой среды или какого-нибудь раствора, но не водопроводной воды, до слабого помутнения. В зависимости от цели исследования готовят прижизненные или фиксированные препараты.

Для прижизненных наблюдений наиболее часто готовят препараты «раздавленная капля» или «висячая капля». Работу проводят в следующем порядке:

- 1) приготовить предметное и покровное стекла;
- 2) зажечь спиртовку;
- 3) взять пробирку со стерильной водой в левую руку и поместить её наклонно между большим и указательным пальцем на расстоянии 3–5 см от пламени;
- 4) в правую руку взять петлю, простерилизовать её в пламени спиртовки, включая часть петледержателя, которая при работе помещается в пробирку;
- 5) мизинцем правой руки зажать пробку пробирки, повернуть, вынуть её и держать, не касаясь окружающих предметов;
- 6) обжечь края пробирки и взять петлей каплю воды, поместить её на предметное стекло;
- 7) обжечь края пробирки и пробку, закрыть пробирку и поставить в штатив;
- 8) прожечь петлю;
- 9) открыть пробирку с культурой так же, как в п. 5;
- 10) стерильную петлю ввести в пробирку с культурой, охладить, прикоснувшись к внутренней поверхности пробирки, а затем взять ею небольшое количество микроорганизмов;
- 11) петлей с микроорганизмами сделать штрих на стекле внутри капли воды. После этого петлю прожечь и охладить, прикоснувшись к стеклу;
- 12) растереть штрих петлей круговыми движениями, чтобы получилась слегка опалесцирующая суспензия;

13) петлю прожечь;

14) полученную суспензию микроорганизмов накрыть покровным стеклом и микроскопировать.

Чтобы в поле зрения не было пузырьков воздуха, нужно, расположив покровное стекло под углом 40–45°, прикоснуться им к краю капли и, когда она распределится вдоль грани, осторожно накрыть каплю.

Препарат можно подкрасить метиленовым синим (в концентрации 0,01–0,001), капнув непосредственно в препарат или поместив каплю красителя у края покровного стекла, с противоположной стороны – полоску фильтровальной бумаги.

При изготовлении препарата нужно учитывать размер капли, который должен быть равен приблизительно объему двух рисовых зерен. Маленькая капля быстро высыхает, при большой покровное стекло плавает на поверхности капли, что мешает качественному изображению объекта при микроскопировании.

Висячая капля. На середину необезжиренного покровного стекла наносят очень маленькую, с четкими краями каплю суспензии микроорганизмов, как описано выше. Каплю материала покрывают предметным стеклом с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином. Предметное стекло с прилипшим к нему покровным стеклом переворачивают. Капля оказывается висячей в герметически закрытой влажной камере, из которой жидкость испаряется очень медленно, и поэтому препарат долгое время остается пригодным для наблюдения. Висячую каплю микроскопируют с плоским зеркалом и суженной диафрагмой.

Фиксированный (постоянный) препарат готовят следующим образом:

1) приготовить суспензию микроорганизмов методом, аналогичным вышеописанному;

2) с помощью стерильной бактериологической петли распределить суспензию тонким слоем на поверхности предметного стекла в виде пятна диаметром около 1 см;

3) высушить мазок на воздухе;

4) фиксировать мазок в пламени спиртовки. Для этого препарат три раза проводят в средней части пламени спиртовки. При этом микроорганизмы погибают, хорошо прикрепляются к стеклу, становятся более восприимчивыми к красителю. Можно вместо термической проводить химическую фиксацию, предусматривающую применение средств, вызывающих коагуляцию белков. В этом случае она осуществляется с помощью определенных химических веществ (например, метиловый, этиловый спирты, формалин) или различных смесей (например, уксусная кислота, абсолютный этиловый спирт и хлороформ – фиксирующая смесь Карнуа).

Для микроскопического исследования приготовленные мазки, высушенные и зафиксированные, подвергают окраске. Окраска бывает простая и сложная. Простая окраска заключается в нанесении на мазок какой-либо одной краски на определенное время. Чаще всего для простой окраски приме-

няют водно-спиртовой 1:10 фуксин, метиленовую синьку и сафранин.

При простой окраске микробные тела воспринимают цвет применяемой краски так же интенсивно, как и ядра клеток; в то же время цитоплазма и весь фон мазка (если это не мазок из чистой культуры) окрашиваются в тот же цвет, но несколько бледнее. Обычно фуксином 1:10 красят 10–30 с., а метиленовой синькой – 2–10 мин. Фуксин и генцианвиолет окрашивает мазки более интенсивно. А при окраске метиленовой синькой получаются нежные, более изящные препараты.

Восприятие окраски зависит не только от свойств красок, но и от свойств подвергаемых окраске микробов.

Для окраски мазков пользуются растворами красок или красящей бумагой. Простота приготовления, удобство применения, а также возможность хранения красящих бумаг в течение неограниченно долгого времени явились основанием для широкого их использования при различных способах окраски.

Окраска мазков растворами красителей. На высушенный и фиксированный препарат пипеткой наносят краситель в таком количестве, чтобы он покрывал весь мазок. При окраске мазков концентрированными растворами красителей (карболовый фуксин Циля, карболовый генциановый или кристаллический фиолетовый) окрашивание производят через фильтровальную бумагу, задерживающую частицы красителя: на фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают раствор красителя.

Окраска мазков красящей бумагой. На высушенный и фиксированный препарат наносят несколько капель воды, кладут окрашенные бумажки величиной 2×2 см. В течение всего времени прокрашивания бумага должна оставаться влажной и плотно прилегать к поверхности стекла. При подсыхании бумагу дополнительно смачивают водой. Продолжительность окрашивания мазка определяется методом окраски. По окончании окраски бумагу осторожно снимают пинцетом, а мазок промывают водопроводной водой и подсушивают на воздухе или фильтровальной бумагой.

Мазок после обсушивания фильтровальной бумагой должен быть совершенно сухим, в противном случае при соприкосновении оставшейся влаги с кедровым маслом образуется эмульсия и при микроскопии получится неясное изображение.

Задание

Освоить методику приготовления прижизненных и постоянных препаратов, окрашенных простыми красителями.

План выполнения работы

1. Приготовить и просмотреть с иммерсионным объективом прижизненные препараты культуры бактерий, окрашенные метиленовым синим.

2. Приготовить и просмотреть с иммерсионным объективом постоянный препарат культуры бактерий, окрашенный фуксином.
3. Сделать зарисовки.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Что такое «асептика»? Почему нужно ее соблюдать при работе с микроорганизмами?
2. Какая посуда используется для выращивания микроорганизмов?
3. Как правильно держать пробирку с микроорганизмами и петлю?
4. Какие свойства микроорганизмов исследуются на прижизненных и постоянных препаратах?
5. Как приготовить препарат «раздавленная капля»?
6. Какими методами проводится фиксация микроорганизмов на предметном стекле?
7. Какие красители используют для окраски микроорганизмов? Для каких целей используют сложные методы окраски?
8. Сколько времени требуется для окрашивания мазка фуксином или метиленовым синим?
9. Как приготовить и зафиксировать мазок из культуры микроорганизмов?
10. Почему необходимо хорошо просушить мазок для иммерсионной микроскопии?

ЗАНЯТИЕ 3

ТЕМА: МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Традиционно считают, что по форме большинство микроорганизмов бывают шаровидными (сферическими), палочковидными (цилиндрическими) и извитыми (рис. 11). Однако между основными формами имеются и переходные (коккобактерии и др.). Кроме того, существуют нитчатые формы бактерий, а также бактерии необычной формы: звездчатые, кольцевидные, треугольные, амебоидные, пластинчатые и др.

Шаровидные бактерии, или кокки (гр. *kokkos* – зерно), по форме сферические, но бывают овальные, плоские, односторонне вогнутые или слегка вытянутые. Диаметр кокков 0,5–1,2 мкм. Шаровидные формы образуются в результате деления клеток в одной, двух, трех взаимно перпендикулярных или разных плоскостях.

Моно- или микрококки (род *Micrococcus*). Их клетки делятся в любой плоскости и сразу после деления обособляются, располагаясь одиночно.

При делении клеток в одной плоскости клетки могут располагаться парно, в связи с чем такие формы получили название диплококков (род *Diplococcus*).

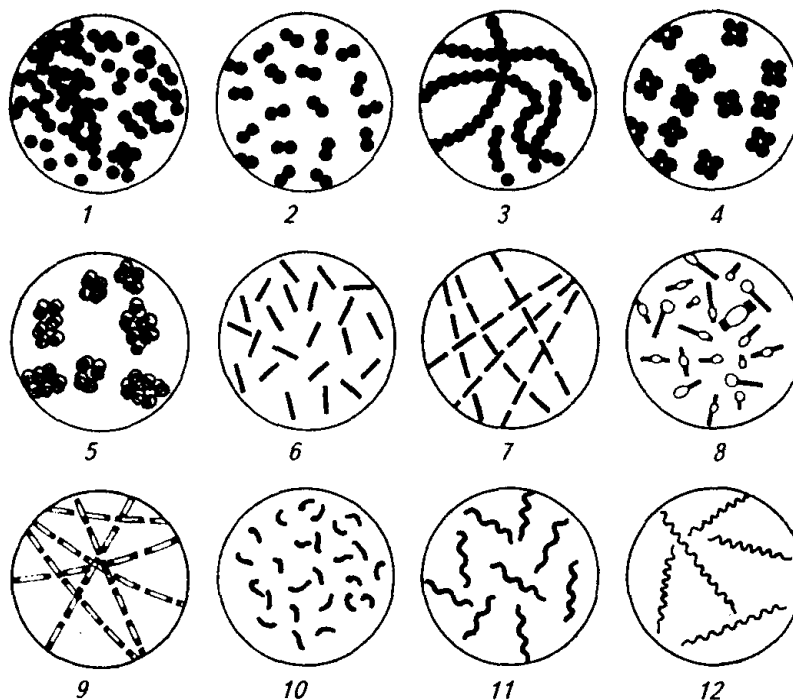


Рис. 11. Основные формы микроорганизмов (по Асонову, 1997)

Шаровидные: 1 – стафилококки, 2 – диплококки, 3 – стрептококки, 4 – тетракокки, 5 – сарцины. Палочковидные: 6 – бактерии, 7 – стрептобактерии, 8 – бациллы, 9 – стрептобациллы. Извитые: 10 – вибрионы, 11 – спириллы, 12 – спирохеты

Если деление происходит последовательно в одной плоскости и клетки соединены в виде цепочки, – это стрептококки (род *Streptococcus*).

Деление кокка в двух взаимно перпендикулярных плоскостях ведет к

образованию четырех клеток, или тетракокка (род *Tetracoccus*).

Пакетообразные кокки, или сарцины (род *Sarcina*), – результат деления кокков в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. При этом образуются пакеты из 8–16 клеток и более.

Беспорядочное расположение клеток или образование скоплений, напоминающих гроздь винограда, происходит при делении кокков в разных плоскостях; такие формы называются стафилококками (род *Staphylococcus*).

Помимо правильной шаровидной формы, клетки могут иметь овальную или ланцетовидную форму (пневмококки) или бобовидную форму кофейного зерна (гонококки, менингококки). Шаровидные бактерии, как правило, не имеют жгутиков, неподвижны и спор не образуют. Исключение составляет мочевиная сарцина (*Sporosarcina ureae*).

Палочковидные, или цилиндрические, формы – это самая многочисленная и разнообразная группа бактерий. Их различают по величине клеток, расположению, очертанию концов клетки, по наличию или отсутствию жгутиков. Длина клетки палочковидных бактерий колеблется от десятых долей микрометра до 10–15 мкм и более, диаметр клетки от 0,5 до 1,0 мкм. Размер клеток зависит от условий выращивания культуры (состава среды, значения pH, аэрации, температуры) и возраста культуры.

Большинство палочковидных микроорганизмов неспорообразующие, они получили название бактерий (гр. *bacteria* – палочка). Палочковидные бактерии, способные при неблагоприятных условиях формировать споры, принято называть бациллами (лат. *bacillum* – палочка).

У мелких бактерий разница между длиной и шириной невелика; по внешнему виду они напоминают кокки, в связи с чем такие формы получили название коккобактерии (возбудитель бруцеллеза).

Среди палочковидных форм, образующих споры, различают бациллы (род *Bacillus*) и клостридии (род *Clostridium*). Бациллы – аэробы, у них споры не превышают толщины вегетативной клетки. Клостридии – анаэробы, их споры толще вегетативной клетки. Такие формы напоминают веретено, ракетку, лимон, барабанную палочку. Клостридии принимают участие во многих процессах в природе. Являются возбудителями анаэробных инфекций. Вызывают аммонификацию белковых веществ, мочевины. Разлагают фосфорорганические соединения. Фиксируют молекулярный азот и др.

Палочки, как и кокки, могут располагаться попарно или цепочкой. При соединении бактерий попарно образуются диплобактерии, при таком же соединении бацилл – диплобациллы. Соответственно образуются стрептобактерии и стрептобациллы, если клетки располагаются цепочкой. Тетрад и пакетов палочковидные формы не образуют, так как они делятся в одной плоскости, перпендикулярной продольной оси.

Извитые формы микробов определяют не только по длине и диаметру, но и по количеству завитков. Их делят на три типа клеток.

Вибрионы (лат. *vibrare* – колебаться, дрожать) имеют вид изогнутой

палочки или запятой. Клетки вибрионов изогнуты на $1/3$ – $1/4$ оборота. Длина клетки составляет 1–3 мкм. К вибрионам относится, например, *Vibrio cholerae* – возбудитель холеры.

Спириллы (лат. *spiro* – изгиб) – это спирально изогнутые клетки с малым числом завитков (3–5), имеют форму латинской буквы S. Размеры клетки по сравнению с вибрионами значительно крупнее – 15–20 мкм. Среди спирилл встречаются патогенные и сапротрофные представители. *Spirillum volutans* – типовой вид, встречается в стоячей пресной воде. *S. minus* – патогенная спирилла, у человека вызывает лихорадку от укуса крыс.

Спирохеты (лат. *spiro* – изгиб, гр. *chaite* – хохол, грива) представлены очень тонкими длинными клетками штопорообразной формы с большим числом мелких витков. Длина клетки превосходит ширину в 5–200 раз. Число витков спирали является одним из систематических признаков при определении вида. Бактерии рода *Spirochaeta* – непатогенные, встречаются в пресных и морских водах, а также могут обнаруживаться в зубном налете. Среди патогенных для человека спирохет известны представители родов *Borrelia* (вызывают возвратный тиф) и *Treponema* (возбудители сифилиса).

Нитчатые формы бактерий, или трихомные (гр. *trichoma* – волосы), – это в большинстве случаев палочковидные клетки, которые соединяются в длинные цепочки, объединяемые либо слизью, либо чехлами-влагалищами, либо плазмодесмами (мостиками) либо общей оболочкой. Обычно снаружи трихом покрыт дополнительными оболочками, которые не участвуют в образовании перегородок между клетками. В большинстве случаев клетки трихом палочковидны, но у цианобактерий в тонких нитях – цилиндрические клетки, в толстых – дисковидные. Нити трихомных бактерий могут быть свободноплавающими или прикрепленными к субстрату. Примером таких бактерий являются представители родов *Beggiatoa*, *Thioploca* (свободноплавающие), *Thiothrix*, *Sphaerotilus* (прикреплены к субстрату).

Задание

Ознакомиться с морфологией различных представителей бактерий.

План выполнения работы

1. Рассмотреть постоянные препараты микроорганизмов различной формы (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), пользуясь объективом МИ-90. Зарисовать.
2. Приготовить прижизненный препарат из зубного налета в капле воды. Промикроскопировать с объективом МИ-90.
3. Приготовить прижизненный и фиксированный препараты из настоя

какого-либо естественного субстрата (мяса, рыбы, сена, овощей, фруктов). Прижизненный препарат промикроскопировать, пользуясь объективом ВИ-40; мазок – с объективом МИ-90.

4. Просматривая препараты, сделать зарисовки микроорганизмов, обращая внимание на форму, подвижность, взаимное расположение клеток и на соотношение размеров бактерий.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие формы имеют микроорганизмы?
2. От чего может зависеть размер и форма бактерий?
3. Какая структура клетки поддерживает форму бактерий?
4. Как располагаются клетки микроорганизмов после деления?
5. Что такое «сарцины»?
6. Какие микроорганизмы называют бациллами?
7. Отличается ли морфология вегетативной клетки от спорулирующей?
8. Чем отличаются спириллы от спирохет?
9. Как образуются нитчатые формы бактерий?
10. Какие формы получили название *коккобактерий*?

ЗАНЯТИЕ 4

ТЕМА: СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ МИКРООРГАНИЗМОВ. ОКРАСКА ПО ГРАМУ

Существуют простые и сложные методы окраски, которые применяются в зависимости от целей исследования.

Сложные методы окраски основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Сущность этих методов заключается в том, что один и тот же препарат обрабатывают несколькими красителями. После воздействия первой краской мазок обесцвечивают и только после этого подвергают дополнительной окраске. В качестве обесцвечивающих веществ может быть применен целый ряд химических реагентов (кислоты, щелочи, спирт, ацетон и др.). Обмывание мазка простой водой также является чисто механическим процессом обесцвечивания, но для этого необходимо продолжительное время; кроме того, обесцвечивание получается неполное. По отношению к обесцвечивающим веществам можно разбить микробов на группы легко и трудно обесцвечиваемых. Не все виды микробов одинаково относятся к обесцвечивающим реагентам; некоторые кислото- и спиртоустойчивы, другие только кислотоустойчивы. Наконец, некоторые, например споры, энергично противостоящие воздействию всех обесцвечивающих веществ, относятся к группе краскоустойчивых.

Сложные методы окраски имеют дифференциально-диагностическое значение для характеристики изучаемого микроба. К сложным методам окраски относятся: окраска по методу Грама, окраска спор и т. д.

Все бактерии в зависимости от способности окрашиваться по Граму разделяются на две нетаксономические группы – грамположительные и грамотрицательные формы. Окраска предложена в 1884г. датским ученым Х. Грамом и позволяет дифференцировать бактерии, принадлежащие к различным видам, но сходные по форме и размерам.

При обработке мазков микроорганизмов генцианвиолетом, а затем йодом препарат, окрашенный в черный цвет, обладает свойством обесцвечиваться под действием спирта. При этом одни бактерии также обесцвечиваются, а другие окрашиваются в фиолетовый цвет. При дополнительной окраске (в частности, разведенным фуксином 1:10) обесцвеченные спиртом бактерии окрашиваются в красный цвет (граммотрицательные). Другие же, прочно удерживающие фиолетовую окраску (соединение йод + генцианвиолет), т. е. не обесцвечивающиеся спиртом, относятся к группе грамположительных бактерий.

Различие в окраске объясняется особенностями химического строения бактерий и ультраструктурой клеточных стенок, которые постоянны для определенного вида. Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит

многослойный муреин со сравнительно часто расположенными сшивками. Белки грамположительных бактерий имеют более кислый характер и лучше окрашиваются основными красителями, чем у грамотрицательных бактерий. Кроме того, грамположительные бактерии содержат рибонуклеат магния, который взаимодействует с образующимся в процессе окраски комплексом и препятствует вымыванию его спиртом. На результат окрашивания оказывают влияние небольшие отклонения в условиях культивирования или в методе окраски, возраст культуры, кислотность среды (в кислой среде, как правило, все бактерии грамотрицательны).

Окраска по Граму производится следующим образом:

- 1) приготовить на предметном стекле три мазка из бактериальных культур: заведомо известной грамположительной, исследуемой и заведомо известной грамотрицательной;
- 2) все мазки одновременно высушить;
- 3) зафиксировать мазки в пламени спиртовки;
- 4) окрасить 1 %-м раствором генцианового фиолетового в течение 1 минуты;
- 5) краситель слить и, не промывая мазки, залить их раствором Люголя на 1–2 минуты;
- 6) промыть препарат обильно водой;
- 7) одновременно погрузить все три мазка в стакан с 96 % этиловым спиртом;
- 8) обесцвечивание считается законченным, когда стекающие с мазка капли спирта сравниваются по цвету со спиртом в стакане; обычно для этого требуется 10–30 секунд, в зависимости от толщины мазка;
- 9) промыть препараты водой (при микроскопировании таких препаратов грамотрицательные бактерии бесцветны);
- 10) окрасить препараты фуксином течение 1 минуты;
- 11) препараты высушить и микроскопировать.

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

При окраске по Граму необходимо точно соблюдать указанные сроки. Модификацией окраски по Граму является способ Синева, при котором вместо жидкой краски генцианового фиолетового используют полоски фильтровальной бумаги, заранее пропитанные этой краской и высушенные. На фиксированный мазок наносят 2–3 капли воды, на них помещают полоски окрашенной фильтровальной бумаги. Остальные этапы окраски аналогичны классическому методу Грама.

Для определения принадлежности бактерий к таксономической группе используют также экспресс-метод Грезерсона (1979). На предметном стекле в капле 3 %-го раствора КОН готовится суспензия изучаемой культуры. При этом грамположительные бактерии коагулируют, а грамотрицательные образуют вязкую тянущуюся массу.

Задание

Выяснить отношение к окраске по Граму исследуемых культур методами Грама и Грезерсона.

План выполнения работы

1. Приготовить смешанную суспензию культур и окрасить методом Грама.
2. Выяснить принадлежность данных культур к группе грамположительных или грамотрицательных бактерий методом Грезерсона.
3. Сделать зарисовки.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие методы окраски микроорганизмов называют сложными? Для чего они используются?
2. В чем сущность метода окрашивания бактерий по Граму?
3. Почему бактерии окрашиваются по-разному методом Грама?
4. Какие факторы оказывают влияние на результат окрашивания по Граму?
5. Какова последовательность действий при окрашивании бактерий методом Грама?
6. Какие существуют модификации метода окрашивания по Граму?
7. В чем отличия грамположительных и грамотрицательных бактерий?
8. Какой компонент клеточной стенки является обязательным для грамположительных и грамотрицательных бактерий?
9. В чем сущность экспресс-метода Грезерсона?
10. Что значит «грамвариабельный»?

ЗАНЯТИЕ 5

ТЕМА: ОТДЕЛ *GRACILICUTES*. СПИРОХЕТЫ

В девятом издании определителя бактерий Берджи (1997) все бактерии объединены в царство *Procariotae*, которое разделено на четыре отдела по основному признаку – характеру пограничного слоя клеток.

Отдел *Gracilicutes* – бактерии с грамотрицательной клеточной стенкой.

Отдел *Firmicutes* – бактерии с грамположительной клеточной стенкой.

Отдел *Tenericutes* – бактерии без клеточных стенок.

Отдел *Mendosicutes* – бактерии с ригидной клеточной стенкой, не содержащей пептидогликана.

Отдел *Gracilicutes* включает грамотрицательные организмы, с тонкой (толщиной 10–15 нм) клеточной стенкой, имеющей сложное строение и состоящей из наружной мембраны, тонкого внутреннего слоя пептидогликана и различных других компонентов снаружи или между этими слоями. Клетки различной формы (сферические, овальные, прямые или изогнутые палочки, спирали либо нити), некоторые окружены чехлом или капсулой. Размножаются бинарным делением, почкованием, редко наблюдается множественное деление, эндоспор не образуют. Миксобактерии могут образовывать плодовые тела и микроспоры. Встречаются все типы движений – жгутиковое, изгибание, скольжение и всплывание с помощью аэросом. У многих имеются ворсинки. В отдел входят фототрофные и нефототрофные (литотрофы и гетеротрофы) аэробные, анаэробные, факультативно анаэробные и микроаэрофильные бактерии. Некоторые представители – облигатные внутриклеточные паразиты.

Отдел *Gracilicutes* подразделяется на три класса: *Scotobacteria* (группы 1–16), *Anoxyphotobacteria* (группа 10), *Oxyphotobacteria* (группа 11).

Семейство *Spirochaetaceae* (группа 1 определителя Берджи) состоит из восьми родов: *Borrelia*, *Brachyspira*, *Cristispira*, *Leptonema*, *Leptospira*, *Serpulina*, *Spirochaeta*, *Treponema*.

Спирохеты широко распространены в природе ([рис. 12](#)).

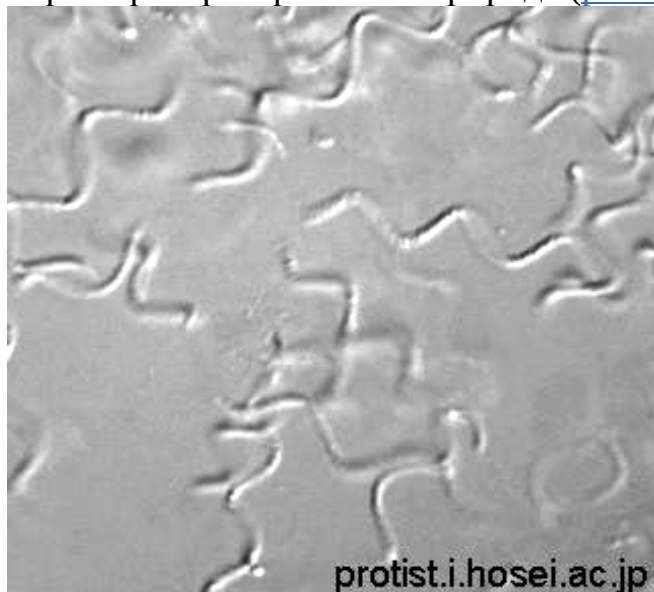


Рис. 12. Спирохеты

Многие из них существуют как свободноживущие организмы в осадках, илах, болотах, в поверхностных водах прудов, озер, источников, соленых водоемов, встречаются даже в районах глубоководных подводных гидротерм (роды *Leptonema*, *Spirochaeta*). Многие спирохеты, как известно, патогенны для человека (роды *Borrelia*, *Brachyspira*, *Leptospira*, *Treponema*) и животных разных таксономических групп от простейших и термитов до моллюсков и млекопитающих (роды *Borrelia*, *Cristispira*, *Leptospira*, *Serpulina*).

Среди представителей этого семейства есть роды, обитающие в полости рта – *Borrelia*, *Leptospira*, *Treponema*. Трепонемы полости рта представлены видами *T. macrodentium*, *T. denticola*, *T. orale*. Боррелии полости рта представлены *B. bucalis*, основным местом их обитания являются десневые карманы.

В физиологическом отношении спирохеты чрезвычайно разнообразны. Среди них есть аэробы, факультативные и строгие анаэробы. Одни получают энергию исключительно за счет сбраживания растительных полимеров, другие используют только углеводы или длинноцепочечные жирные кислоты. Одни виды растут в минеральной среде с добавкой единственного источника углерода и энергии, другие обладают сложными потребностями в питании и факторах роста. Многие патогенные виды не удается культивировать.

Группа спирохет гетерогенна и в генетическом отношении. Содержание G + C в ДНК варьирует от 25 до 65 мол. %. Филогенетическая неоднородность этой группы подтверждается и исследованиями олигонуклеотидной последовательности 16S РНК.

Задание

Ознакомиться с представителями семейства *Spirochaetaceae*.

План выполнения работы

1. Приготовить прижизненный препарат «раздавленная капля» из зубного налета, промикроскопировать с использованием метода темнопольной микроскопии.
2. Приготовить препарат по Бури. На середину предметного стекла наносится капля туши и смешивается бактериологической петлей с каплей зубного налета (зубной налет снимают стерильной зубочисткой). Делают мазок ребром покровного стекла, высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой. На темном фоне препарата становятся видимыми светлые извитые нити спирохет. Сделать зарисовку.
3. Приготовить препарат из зубного налета, окрасить по методу Грама.
4. Сделать зарисовки.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. На какие отделы делится царство *Procariotae*? Какой признак лежит в основе этого деления?

2. Какие классы микроорганизмов включает отдел *Gracilicutes*?
3. Какие типы морфологии встречаются у представителей отдела *Gracilicutes*?
4. Какие типы метаболизма встречаются у грамотрицательных бактерий?
5. Какие типы движения осуществляют грамотрицательные бактерии?
6. По какому признаку бактерии относят к группе спирохет?
7. Где обитают сапротрофные спирохеты? Какие представители к ним относятся?
8. Какова экологическая роль спирохет в природе?
9. Где можно обнаружить патогенные спирохеты? Какие заболевания они вызывают?
10. Как приготовить препарат для микроскопирования спирохет по методу Бури?

ЗАНЯТИЕ 6

ТЕМА: ОТДЕЛ *GRACILICUTES*. ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ, АЭРОБНЫЕ МИКРОАЭРОФИЛЬНЫЕ ПАЛОЧКИ И КОККИ. СЕМЕЙСТВА *PSEUDOMONADACEAE* И *ACETOBACTERIACEAE*

Семейство *Pseudomonadaceae*

Представители семейства (группа 4 определителя Берджи) – подвижные прямые или изогнутые палочки, никогда не образующие спор. Большинство – строгие аэробы, хемоорганотрофы, для которых характерны процессы окисления и никогда – брожения. Встречаются факультативно анаэробные и факультативно хемолитотрофные формы.

Среди представителей этого семейства есть ацидофильные бактерии (при pH = 3,6 – представители рода *Frateria*), фитопатогенные бактерии (род *Xanthomonas*) и патогенные для человека и животных (*Pseudomonas aeruginosa*). Имеются виды бактерий, обладающие энтомопатогенными свойствами, антибиотической активностью.

Типичные представители объединены в род *Pseudomonas* ([рис. 13](#)).



Рис. 13. Бактерии рода *Pseudomonas*

Род *Pseudomonas* объединяет большое количество микроорганизмов, из которых описано 29 видов. Впервые название было дано в 1900 г. немецким исследователем Мигуля, который отнес к этой группе микроорганизмы, обладающие жгутиком или пучком жгутиков.

Позднее они были описаны как мелкие, палочковидные, подвижные клетки, несущие от 1 до 7, чаще 2–3 жгутика. Жгутики всегда располагаются полярно.

Размножаются клетки в основном делением. Встречаются пигментные и бесцветные формы.

Очень неприхотливые, большинство из них не нуждаются в ростовых факторах и растут на простых минеральных средах. В качестве источника углерода и энергии используют широкий спектр углеводов, аминокислоты, органические кислоты, спирты, углеводороды, различные циклические соединения, не используемые другими группами микроорганизмов. Температурные границы их распространения от 4 до 40 °С. Большинство – безобидные сапротрофы, но встречаются виды патогенные и условно патогенные для высших организмов.

P. suringae вызывает увядание растений. В процессе жизнедеятельности эта бактерия продуцирует полисахарид, который закупоривает сосуды в листьях растений.

P. aeruginosa (синоним *P. pyocyanea*) – синегнойная палочка – патогенный в отношении человека и животных микроорганизм. Обычно развивается на ослабленных организмах, вызывая пневмонию, менингоэнцефалит, отит, трудно заживающие раны. Этот микроорганизм имеет до 140 литических ферментов, что указывает на его высокую физиолого-биохимическую активность.

P. fluorescens – характерный представитель флюоресцирующих псевдомонад. Очень широко распространенная в природе бактерия играет важную роль в очистке окружающей среды от соединений, образующихся в процессе жизнедеятельности человека.

Семейство Acetobacteriaceae

Семейство объединяет бактерии родов *Acetobacter* и *Gluconobacter*. По форме клеток бактерии рода *Gluconobacter* очень близки к бактериям рода *Pseudomonas*. Это тоже мелкие подвижные палочки, имеющие 5–8 полярных жгутиков, редко встречаются формы с одним жгутиком или неподвижные. Клетки могут быть расположены одиночно, парами или цепочкой (рис. 14).

Это микроорганизмы, у которых очень слабая протеолитическая активность, поэтому они не растут на универсальных средах (МПА, РПА). Для них характерен окислительный тип метаболизма. Отличительной чертой этой группы бактерий является осуществление процессов неполного окисления, когда в среде накапливаются продукты, окисленные частично, – уксусная, глюконовая, фумаровая, молочная, различные кетокислоты. Бактерии рода *Gluconobacter* (единственный вид *G. oxydans*) не способны к последующим превращениям образовавшихся соединений. Они окисляют глюкозу до глюконовой кислоты, этанол – только до ацетата, который дальше не может ими окисляться из-за отсутствия «замкнутого» ЦТК.

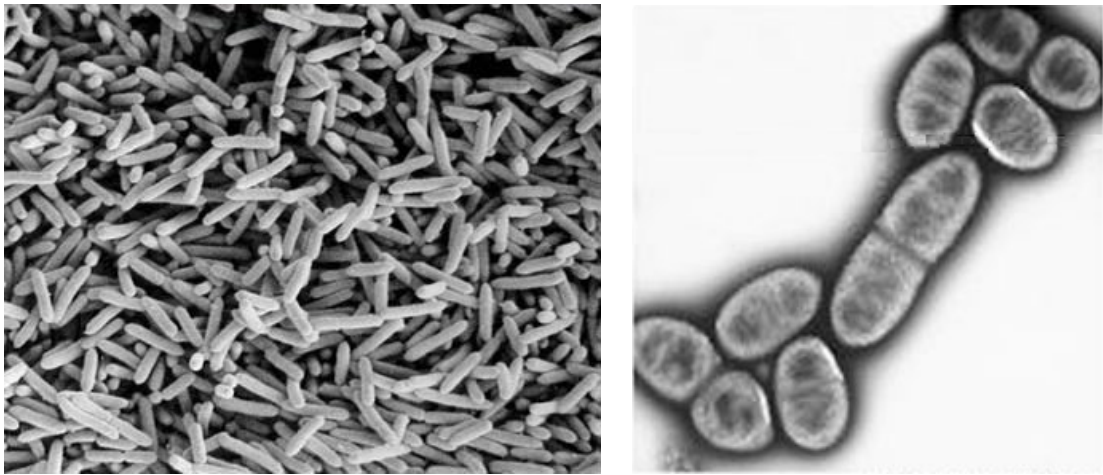


Рис. 14. Представители бактерий родов *Acetobacter* (слева) и *Gluconobacter* (справа)

Глюконовые бактерии требовательны к питательному субстрату. Почти все виды нуждаются в отдельных витаминах, в первую очередь в пантотеновой кислоте. В природе узко специализированы, распространены на растениях, богатых углеводами, в меде, на пчелах. Бактерии рода *Gluconobacter* имеют большое практическое значение в связи с тем, что используются в промышленности для получения полусинтетического витамина С (на этапе окисления сорбита в сорбозу). Они имеют также широкие возможности для использования в медицинской практике. Глюконовые кислоты, образуемые бактериями, обладают бактерицидным действием и используются в качестве препаратов для предотвращения послеоперационных осложнений. В парфюмерной промышленности применяется диоксиацетон – продукт неполного окисления глицерина, получаемый также с помощью глюконовых бактерий.

Вторая группа семейства *Acetobacteraceae* – бактерии, способные к полному окислению органических субстратов до CO_2 и H_2O . В этом случае образовавшаяся уксусная кислота представляет собой лишь промежуточный этап, и после исчерпания из среды исходного субстрата бактерии начинают медленно окислять уксусную кислоту, включая ее в механизм конечного окисления – ЦТК. Бактерии этой группы объединены в род *Acetobacter*, типичным представителем которого является *A. peroxydans*. Это палочковидные бактерии, имеющие резко удлинненную или нитевидную форму. Иногда встречаются разветвленные формы или клетки соединены в длинные извилистые цепочки.

Это облигатно аэробные организмы, устойчивые к повышенным концентрациям спирта и уксусной кислоты. Отдельные представители (*A. aceti*, *A. rancens*, *A. pasteurianum*) отличаются друг от друга морфологически и физиологически. Они менее требовательны к субстрату, чем бактерии рода *Gluconobacter*. Хозяйственное значение имеют при промышленном получении уксусной кислоты. *A. aceti* издавна применялся для получения фруктового уксуса путем окисления спирта. В основном это вредители бродильных производств; при развитии в пиве, вине, хлебном тесте вызывают скисание и

порчу продуктов. *A. xylinum* – это единственный прокариотический организм, который синтезирует растительную целлюлозу.

В природе ацетобактерии распространены широко. Их можно обнаружить в пыли, на ягодах, винограде. Специфическими переносчиками уксуснокислых бактерий служат маленькие красноватые мушки, в большом количестве встречающиеся там, где имеются плодовые отбросы.

Уксуснокислые бактерии часто развиваются вслед за дрожжами, используя продукт спиртового брожения как субстрат для роста. Чайный гриб представляет собой прочный пищевой союз бактерий *A. xylinum*, *G. oxydans* и дрожжевых грибов. Слоевище гриба образует *A. xylinum*. В нижней части, в темноватых пластах обитают дрожжи, а в верхней, покрытой целлюлозной оболочкой, – *G. oxydans*. Для культивирования необходима заварка чая с добавлением сахара. Чай – источник биологически активных веществ, сахароза – единственный источник углеродного питания. Левансахараза расщепляет сахарозу. Гексозы частично используются бактериями *G. oxydans*, а частично сбраживаются дрожжами, которые при этом накапливают витамины и этиловый спирт, потребляемый уксуснокислыми бактериями *A. xylinum*. Культуральная жидкость чайного гриба представляет целебный напиток, содержащий глюконовую, 2,5-оксиглюконовую кислоты. Его рекомендовала тибетская медицина при лечении заболеваний желудка, горла и других органов.

Задание

Ознакомиться с представителями семейств *Pseudomonadaceae* и *Acetobacteriaceae*.

План выполнения работы

1. Приготовить прижизненный препарат клеток бактерий рода *Pseudomonas*. Изучить особенности их морфологии и подвижность.
2. Приготовить прижизненный препарат микрофлоры чайного гриба и рассмотреть с иммерсионной системой. На предметное стекло поместить стерильной бактериологической петлей соскоб со стромы гриба и каплю суспензии. Подкрасить метиленовым синим и микроскопировать.
3. Приготовить прижизненный препарат микрофлоры чайного гриба в капле раствора Люголя. Сравнить окраску бактерий (бактерии рода *Acetobacter* окрашиваются в желтоватый цвет, а *Gluconobacter* – в фиолетовый).
4. Сделать зарисовки.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие бактерии относят к семейству *Pseudomonadaceae*?
2. Какие типы метаболизма встречаются у представителей семейства *Pseudomonadaceae*?

3. Какие признаки характеризуют род *Pseudomonas*?
4. Есть ли среди псевдомонад патогенные для человека и животных виды?
5. Где можно обнаружить псевдомонад?
6. Какие бактерии относят к семейству *Acetobacteriaceae*?
7. Чем отличается метаболизм бактерий родов *Gluconobacter* и *Acetobacter*?
8. Какие виды бактерий имеют хозяйственное значение при промышленном получении уксусной кислоты?
9. Где обитают уксуснокислые бактерии?
10. Что такое «чайный гриб»? Какие микроорганизмы входят в состав этой ассоциации?

ЗАНЯТИЕ 7

ТЕМА: ОТДЕЛ *FIRMICUTES*. ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ КОККИ

Отдел *Firmicutes* включает грамположительные бактерии с довольно толстой клеточной стенкой, содержащей до 90 % пептидогликана, соединенного с тейхоевыми кислотами. Форма клеток может быть сферической, палочковидной или нитевидной; палочки и нити могут быть неветвящимися, но у многих организмов имеется настоящее ветвление. Большинство неподвижные. Подвижные формы перемещаются с помощью перитрихальных жгутиков. Аэробные, анаэробные, факультативно анаэробные организмы. Размножаются в основном бинарным делением. Некоторые образуют эндоспоры. У других споры на гифах или в спорангиях. Бактерии чувствительны к пенициллину.

В зависимости от морфологии отдел делится на два класса: *Firmibacteria* и *Thallobacteria*.

Класс *Firmibacteria* объединяет неветвящиеся грамположительные кокки и палочки, в том числе образующие эндоспоры, включает группы 17, 18 и 19 определителя Берджи.

Класс *Thallobacteria* объединяет ветвящиеся формы бактерий, включает микобактерии, актиномицеты и родственные микроорганизмы.

Грамположительные кокки (группа 17 определителя Берджи) включает множество существенно различающихся родов, объединенных по двум общим признакам: сферическая форма клеток и положительная реакция при окрашивании по Граму. Бактерии не образуют эндоспор, подвижность не типична. Для них характерно явление полиморфизма, т. е. одновременно встречаются клетки мелкие и крупные, иногда вытянутые и уплощенные. Это хемоорганотрофы, осуществляют процессы сбраживания или полного окисления органического субстрата. Широко распространены в природе, многие из них патогенны для человека и животных. Размножаются кокки делением более чем в одной плоскости. После деления клетки могут разъединяться или располагаться в различных сочетаниях. Характер расположения клеток служит одним из систематических признаков для разделения родов.

По отношению к кислороду группа распадается на три отчетливые подгруппы: аэробные, факультативно анаэробные и облигатно анаэробные формы.

Подгруппа аэробов



Подгруппа представлена родами *Deinococcus*, *Marinococcus*, *Micrococcus*, *Planococcus*, *Salinicoccus*. Общие признаки родов – грамположительные, большей частью сапротрофные кокки с правильной сферической формой клеток. Располагаются одиночно, парами или тетрадами. Все растут в широком диапазоне температур (22–40 °С), в самых разнообразных условиях: в почве, пыли, воздухе, морской и речной воде, на поверхности растений, на коже млекопитающих, в молочных и мясных продуктах. Колонии часто окрашенные.

Род *Micrococcus*. Клетки сферические, диаметром 0,5–2,0 мкм, располагаются одиночно, в парах, тетрадах или скоплениях неправильной формы, но не в цепочках (рис. 15).

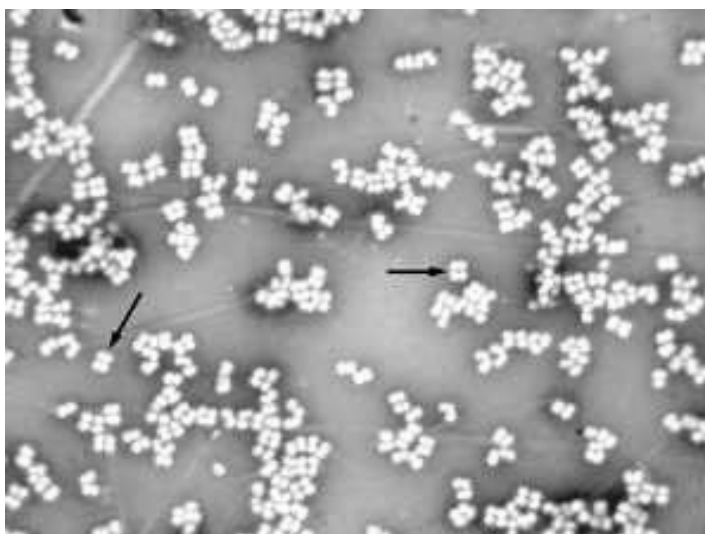


Рис. 15. Бактерии рода *Micrococcus*

Грамположительные, редко подвижные, неспорообразующие. Обязательные аэробы, осуществляют полное окисление. Метаболизм дыхательного типа. Имеют цитохромы. У многих – каротиноидные пигменты, колонии обычно желтые или красные. У большинства видов оптимум 25–37 °С. Микрококки устойчивы к высушиванию, нагреванию, некоторые виды галофильны, растут в присутствии 5 % NaCl.

Распространены повсеместно: на коже млекопитающих, в почве, выделяются в основном из пищевых продуктов и воздуха. Разлагая органические остатки, содержащие белки, с образованием аммония, микрококки выполняют тем самым роль “мусорщиков”. Типовой вид: *Micrococcus luteus*. Обычный обитатель почв и пресных вод. Часто встречается на коже человека и животных.

Род *Planococcus*. Клетки сферические, диаметром 1–1,2 мкм, одиночные или в парах и иногда в тетрадах. От грамположительных до грамвариабельных. Подвижные за счет одного или двух жгутиков. Аэробы. Колонии желто-оранжевые. Хемоорганотрофы, метаболизм дыхательного типа, углеводы используют редко. Галотолерантные, плохо растут на средах с содержанием NaCl менее 1 % или больше 15 %. Оптимальная температура 27–37 °С. Широко распространены в морских местообитаниях. Типовой вид: *Planococcus citreus*.

Представители родов *Marinococcus* и *Salinicoccus* относятся к умеренным галофилам, нуждаются в NaCl. Обнаруживаются в морских местообитаниях и засоленной почве.

Бактерии рода *Deinococcus* высокоустойчивы к γ -радиации (*D. radiodurans*). К этому роду очень близки палочковидные бактерии рода *Deinobacter* с единственным видом *D. grandis*.

Подгруппа факультативных анаэробов

Подгруппа включает 13 родов. Клетки располагаются одиночно, парами, в тетрадах или цепочкой различной длины, неподвижные. Хемоорганотрофы. Некоторые очень требовательны к питательному субстрату. Метаболизм бродильного типа, преимущественно с образованием молочной кислоты. Широко распространены в природе. Встречаются виды, патогенные для человека и животных. Подразделение на роды осуществляется по физиологическим признакам и продуктам брожения.

Род *Streptococcus*. Клетки сферические или овальные, диаметром 0,5–2,0 мкм, располагаются в парах или цепочках. Неподвижные, неспорообразующие. У некоторых видов клетка окружена капсулой. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, нуждаются в богатых питательных средах, иногда в 5 % CO₂.

Метаболизм бродильного типа, бактерии образуют в основном лактат. Обычно лизируют эритроциты, вызывая обесцвечивание и позеленение кровяной среды (α -гемолиз) либо ее полное просветление (β -гемолиз). Диапазон температуры для роста 25–45 °С (оптимум 37 °С).

Обычно присутствуют в ротовой полости и верхних дыхательных путях человека (*S. mutans*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. milleri* и др.); паразиты позвоночных, некоторые виды патогенны для человека и животных. Род включает в себя пиогенные (гноеродные) стрептококки – патогенные для человека и животных; стрептококки ротовой полости, анаэробные и другие стрептококки.

Пиогенные стрептококки адаптированы к паразитическому образу жизни. Их выращивают при 37 °С в бульоне с сывороткой и кровью в атмосфере, содержащей 5–10 % CO₂. Типичный представитель группы – *S. pyogenes*. Он служит возбудителем скарлатины, ангины, послеродового сеп-

сиса и других тяжелых эпидемических инфекций человека. *S. agalacticae* вызывает в основном инфекции у крупного рогатого скота.

Ранее к этому роду были отнесены также молочные стрептококки и фекальные стрептококки (рис. 16).

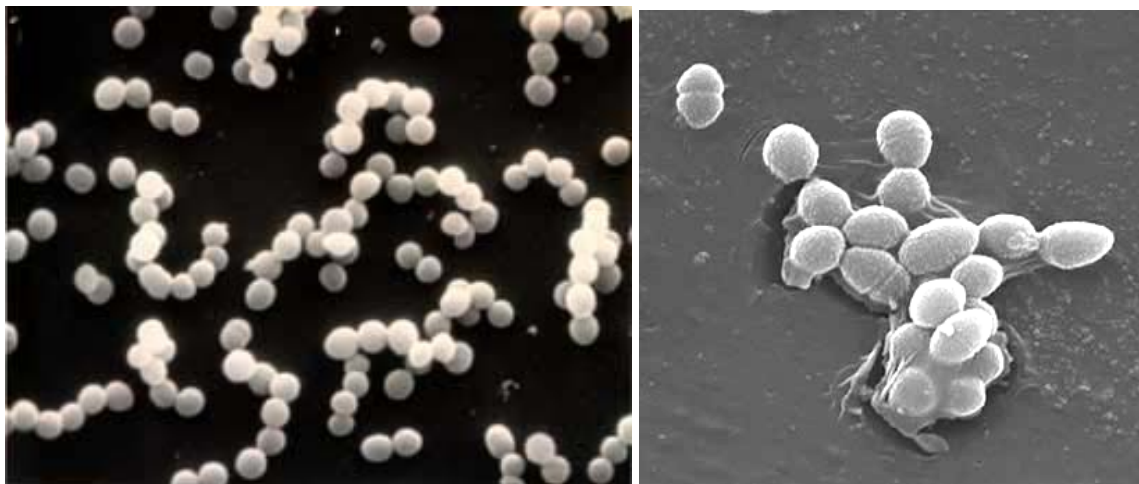


Рис. 16. Молочные (слева) и фекальные (справа) стрептококки

Стрептококки молочной группы – род *Lactococcus* – вызывают скисание молока и играют важную роль в молочной и пищевой промышленности. Они быстро растут в молоке при 28 °С, вызывая его свертывание. Типичные представители – *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. thermophilus*. Последний выдерживает температуру до 63 °С и используется для получения сыров.

Фекальные стрептококки – род *Enterococcus* – обнаруживаются в испражнениях человека и животных. Некоторые из них постоянно живут в полости рта, откуда и попадают в кишечник. Типичные представители определены как *E. faecalis* и *E. faecium*. Все энтерококки хорошо растут при температуре 22–40 °С на обычных мясных средах. Поскольку фекальные стрептококки постоянно присутствуют в кишечнике человека, сохраняют жизнеспособность во внешней среде, легко культивируются и идентифицируются, их принято считать индикаторами фекального загрязнения.

Род *Staphylococcus*. Клетки сферические, диаметром 0,5–1,5 мкм, одиночные, в парах и в группах неправильной формы. В результате деления в различных плоскостях располагаются скоплениями, похожими на гроздь винограда (рис. 17). Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладающие и дыхательным, и бродильным типами метаболизма. Эти микроорганизмы не требовательны к субстрату, растут на обычных питательных средах. Выдерживают 10 % NaCl. Оптимальная температура 30–37 °С. Колонии обычно непрозрачные, белые или кремовые, иногда от желтых до оранжевых. Микроорганизмы широко распространены в природе, очень устойчивы к воздействию различных физических и химических факторов. Образуют экзо- и эндотоксины.

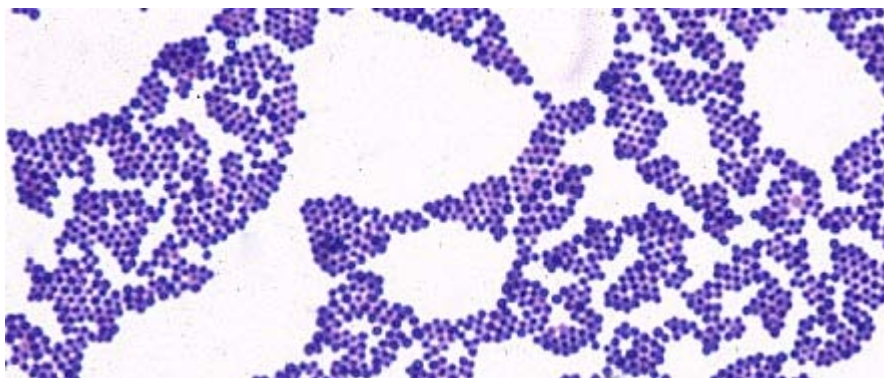


Рис. 17. Бактерии рода *Staphylococcus*

В основном ассоциированы с кожными покровами и слизистыми оболочками теплокровных позвоночных, но часто могут быть выделены из пищевых продуктов, пыли и воды. Многие виды стафилококков патогенны, вызывают карбункулы, фурункулы, воспалительные процессы различных органов и тканей (ангина, холецистит и т. п.).

Типовой вид: *Staphylococcus aureus*. Возбудитель гнойных инфекций, может вызывать маститы, абсцессы внутренних органов. *S. epidermidis* – менее вирулентный возбудитель тех же инфекций. Встречается чаще всего на коже и слизистых теплокровных животных, в различных пищевых продуктах, воздухе.

Род *Pediococcus*. Клетки сферические, диаметром 1–2 мкм. Делятся попеременно под прямым углом в двух плоскостях с образованием тетрад. Одиночные клетки встречаются редко. Факультативные анаэробы, микроаэрофилы, рост некоторых штаммов подавляется на воздухе. Хемоорганотрофы, нуждаются в богатых питательных средах и сброживаемых углеводах (в основном моно- и дисахариды). Педиококки развиваются в бродящих растительных продуктах, главным образом в пиве и пивном сусле, редко – в молоке и молочных продуктах. Пиво скисает и мутнеет, приобретает неприятный вкус и запах. Типовой вид: *Pediococcus damnosus*.

Род *Aerococcus*. Клетки сферические, диаметром 1–2 мкм. Образуют тетрады при росте в жидких средах. Неподвижные, факультативные анаэробы, но лучше растут при пониженном содержании кислорода и слабо – на воздухе или в анаэробных условиях. При росте на кровяном агаре наблюдается заметное позеленение. Хемоорганотрофы, метаболизм дыхательного типа. Оптимальная температура 30 °С, выдерживают нагревание до 60 °С в течение 30 минут. Растут при pH = 9,6; в присутствии 10 % NaCl, а также 40 % желчи. Обычно встречаются в больничном воздухе, распространены в мясных рассолах, на овощах. Типовой (и единственный) вид: *Aerococcus viridans*.

Род *Gemella*. Клетки сферические или продолговатые, 0,5–1,4 мкм. Часто располагаются в парах, где соприкасающиеся стороны клеток уплощены. Клеточная стенка грамположительная, но окраска по Граму вариабель-

ная. Аэробы или факультативные анаэробы. Метаболизм бродильного типа. Колонии на кровяном агаре мелкие, часто вызывают α - или β -гемолиз. Облигатные паразиты ротовой полости, а также дыхательного и кишечного тракта человека. Типовой вид: *Gemella haemolysans*.

Род *Leuconostoc*. Клетки сферические или несколько вытянутой формы, расположены парами или в цепочках, 0,5–1,2 мкм. Хемоорганотрофы с облигатной потребностью в сбраживаемом углеводе, нуждающиеся в богатых питательных средах, часто – в комплексе факторов роста и аминокислот; факультативные анаэробы; не гемолитические. Растут довольно медленно, образуя слизистые колонии. Оптимальная температура 20–30 °С. Не патогенные. Распространены на растениях, молочных и других пищевых продуктах. *L. mesenteroides* и *L. dextranicum* сбраживают квашеную капусту, силос и соки в процессе производства сахара. Они наносят ущерб сахарной промышленности, образуют слизи и камеди, засоряя трубопроводы и чаны. *L. citrovorum* в сочетании с молочными стрептококками добавляют к молоку и сливкам, идущим на производство масла и сыра, так как этот организм расщепляет лимонную кислоту с образованием диацетила, придающего приятный вкус молочным продуктам. Типовой вид: *L. mesenteroides* (рис. 18).

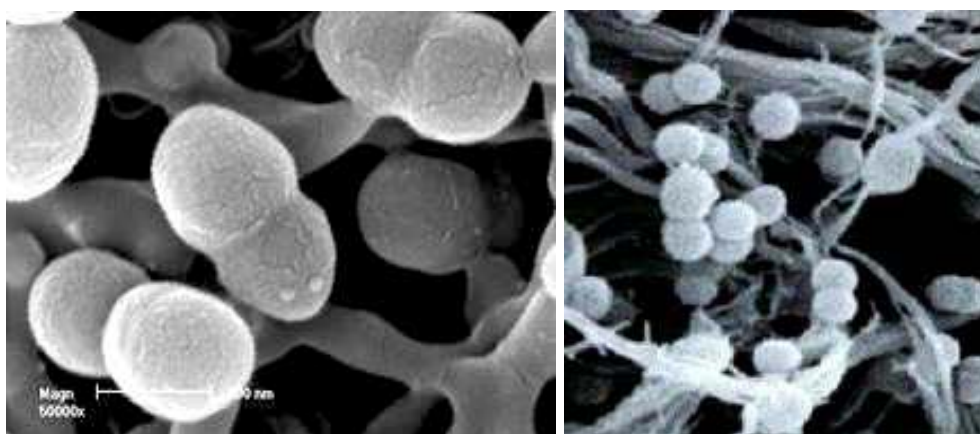


Рис. 18. Бактерии рода *Leuconostoc* (слева) и *Ruminococcus* (справа)

Подгруппа облигатных анаэробов

Облигатные анаэробы объединяют роды *Coprococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Sarcina*. Это различные по величине кокки, встречаются одиночно, в парах или тетрадах. Некоторые могут образовывать кубические пакеты или цепочки. Хемоорганотрофы со сложными пищевыми потребностями, осуществляют гетероферментативное брожение. Образуют низшие жирные кислоты, иногда бутират, ацетат, сукцинат или этанол, редко – лактат. Оптимальная температура – 30–37 °С. Встречаются в ротовой полости, кишечнике, дыхательных путях человека и животных. Формы, образующие пакеты, найдены в почве, на поверхности растений (род *Sarcina*). Встречаются патогенные виды, которые могут играть роль в развитии гной-

ных инфекций, в основном представители родов *Peptococcus* и *Peptostreptococcus*. Местообитание рода *Ruminococcus* – рубец, толстая кишка и слепая кишка млекопитающих ([рис. 18](#)); рода *Coprococcus* – кишечник человека и фекалии.

Задание

Ознакомиться с морфологией и характером расположения грамположительных кокков.

План выполнения работы

1. Просмотреть постоянные препараты культур бактерий *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*. Зарисовать.

2. Приготовить прижизненный препарат микрофлоры молока. Подкрасить метиленовым синим. Рассмотреть представителей рода *Lactococcus*.

3. Приготовить прижизненный препарат микрофлоры рассола квашеной капусты, рассмотреть представителей рода *Leuconostoc*. Зарисовать.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие признаки характеризуют отдел грамположительных бактерий? По какому признаку отдел делится на классы?

2. Какие основные признаки объединяют бактерии 17 группы определителя Берджи?

3. На какие подгруппы делят грамположительные кокки? По какому признаку?

4. Где обитают бактерии рода *Micrococcus*? Какова их экологическая роль?

5. Какие грамположительные кокки присутствуют в ротовой полости и верхних дыхательных путях человека?

6. Что такое α - и β -гемолиз? Какие грамположительные кокки его осуществляют?

7. Какие признаки характеризуют род *Lactococcus*?

8. Какие виды кокков являются показателями фекального загрязнения?

9. Есть ли среди грамположительных кокков патогенные для человека и животных виды? Какие заболевания они вызывают?

10. Чем характеризуется подгруппа облигатно анаэробных кокков?

ЗАНЯТИЕ 8

ТЕМА: ОТДЕЛ *FIRMICUTES*. ПАЛОЧКИ И КОККИ, ОБРАЗУЮЩИЕ ЭНДОСПОРЫ. РОД *BACILLUS*. МЕТОДЫ ОКРАСКИ СПОР

Группа 18 определителя Берджи представлена десятью родами и включает семейство *Bacillaceae*. Данная группа создана для удобства; ее таксономические связи в настоящее время неясны. Большинство имеет палочковидную форму (за исключением представителей рода *Sporosarcina*), молодые культуры в основном грамположительные, подвижные за счет перитрихального расположения жгутиков. Хемоорганотрофы, способны осуществлять аэробное, анаэробное дыхание и брожение. Метаболизм и экология представителей группы сильно варьируют. К облигатным аэробам относятся *Sporosarcina*, *Sulfobacillus*, *Syntrophospira*. Аэробные и факультативно-анаэробные палочки сведены в роды *Amphibacillus*, *Bacillus* и *Sporolactobacillus*, а анаэробные – в роды *Clostridium*, *Oscillospira*, *Sporohalobacter* и *Desulfotomaculum*.

Отличительная особенность бактерий – способность к образованию эндоспор, характеризующихся высокой термоустойчивостью, непроницаемостью для многих красителей и дезинфицирующих веществ, устойчивостью к УФ-лучам, ионизирующей радиации, обладающих высокой светопреломляющей способностью.

Внутри каждой вегетативной клетки образуется одна эндоспора, которая после созревания освобождается при лизисе клетки. Свободные эндоспоры метаболически не активны. В течение десятков лет они могут находиться в состоянии криптобиоза (полного покоя). В эндоспорах содержатся ферментные системы, обеспечивающие рост и развитие, генетический материал, благодаря чему сохраняется потенциальная способность к прорастанию и развитию вегетативных форм. Образование эндоспор часто сопровождается недостатком в среде питательных веществ, накоплением продуктов метаболизма и т. п., но это не ответ на неблагоприятные условия, поскольку эндоспоры часто прорастают в той же среде, где и образовались. Это одна из форм существования вида. Наиболее интенсивно спорообразование осуществляют биологически полноценные зрелые клетки, выросшие в благоприятных условиях.

Эндоспоры различных видов бактерий отличаются по размеру, форме, локализации в материнской клетке. В зависимости от этих признаков различают следующие типы спорообразования.

Бацилярный тип. Споры овальные или цилиндрические, не толще

материнской клетки. Расположены центрально, эксцентрично или терминально. Клетка имеет форму палочки. Таковы споры большинства бацилл (рис. 19)

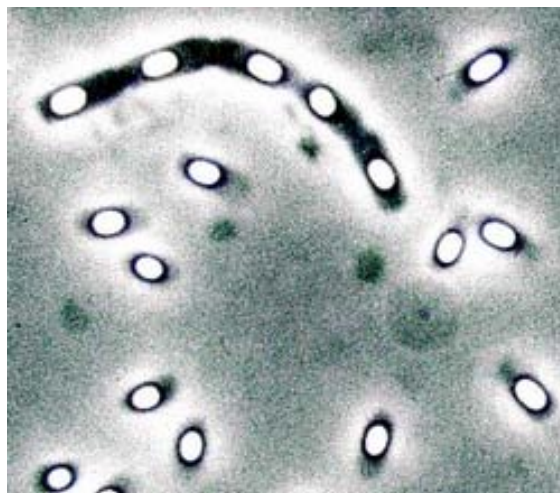


Рис. 19. Спорообразование у бактерий рода *Bacillus*

Клостридиальный тип. Овальные споры шире материнской клетки; они «раздувают» клетку изнутри в ходе споруляции, клетка имеет лимонovidную форму.

Плектридиальный тип. Почти круглая спора в набухшем конце материнской клетки. Споры шире материнской клетки, поэтому она приобретает форму барабанной палочки.

Клостридиальный и плектридиальный типы присущи в основном бактериям рода *Clostridium* и могут одновременно встречаться в культуре одного вида Род *Bacillus*. Прямые палочки $0,5\text{--}2,5 \times 1\text{--}10$ мкм, с закругленными или обрубленными концами, часто в парах или цепочках. Подвижные за счет перитрихальных жгутиков. Эндоспоры овальные, иногда сферические или цилиндрические. Аэробы или факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы с дыхательным и бродильным типом метаболизма. Хорошо растут на простых средах с добавлением растительного или дрожжевого экстракта, на пептонных средах. Они активно продуцируют различные гидролитические ферменты и поэтому способны использовать в качестве субстрата широкий круг органических соединений: белки, углеводы, жиры, гликозиды, спирты, органические кислоты. Могут сбраживать углеводы. Обнаруживаются в разных местообитаниях, некоторые виды патогенны для позвоночных или беспозвоночных.

Основная масса бактерий рода *Bacillus* является мезофилами с оптимумом $30\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$, но отдельные виды термофильные, растут при температуре до $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. По строению спор и типу спорообразования мезофильные виды бацилл разделены на три группы.

В первую группу объединены бактерии с бациллярным типом спорообразования. В большинстве это аэробные и факультативно анаэробные формы, способные осуществлять брожение с образованием в качестве основных про-

дуктов 2,3-бутандиола и глицерина, а также в небольших количествах молочную кислоту и этанол. В этой группе выделено две подгруппы: *B. subtilis* (представители *B. subtilis* и *B. licheniformis*) и *B. cereus* (рис. 20).

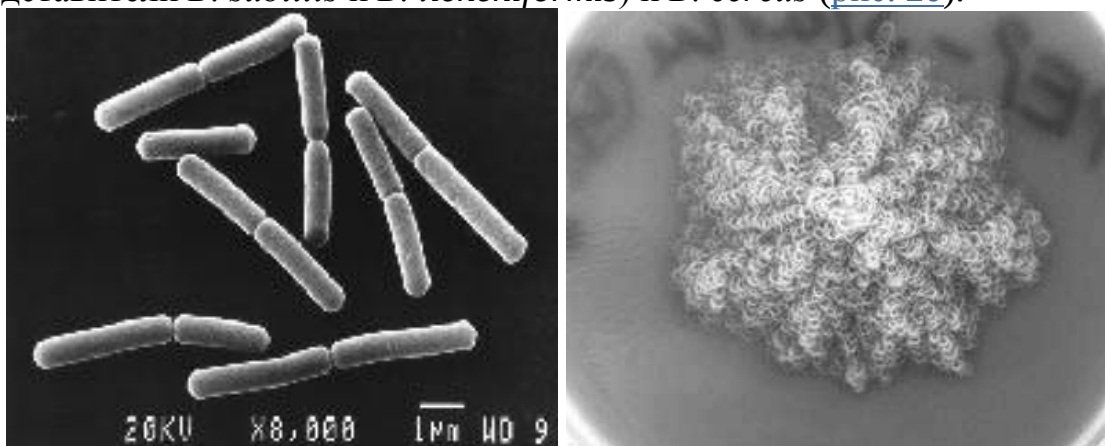


Рис. 20. Вегетативные клетки *Bacillus subtilis* и грибовидный рост *Bacillus cereus* на агаре

B. subtilis – типичный представитель рода – обнаруживается повсюду в осевшей пыли. На питательных средах образует длинные цепочки, расположенные рядами. На жидких средах растет в виде пленки. Активно расщепляет органические азотистые соединения (культура пахнет аммиаком). Глюкозу использует только в аэробных условиях с образованием больших количеств 2,3-бутандиола. Пышно растет на ломтиках картофеля в виде бородавчатой или пузырчатой пленки желтого или розового цвета. Споры выдерживают кипячение до 30 минут, что используется при выделении культуры.

B. licheniformis – единственный вид бацилл, который может осуществлять процесс денитрификации.

Бактерии подгруппы *B. subtilis* имеют большое значение как продуценты антибиотиков субтилина и бацитрацина.

Для бактерий подгруппы *B. cereus* отличительным признаком является способность использовать глюкозу аэробно, а также сбраживать ее при отсутствии кислорода воздуха. В качестве запасного вещества эти организмы образуют поли-β-оксималяную кислоту. Свойства бактерий подгруппы представлены в табл. 1.

Таблица 1

Свойства бактерий подгруппы *Bacillus cereus*

Вид	Подвижность	Анаэробный рост за счет использования сахаров	Потребность в факторах роста	Патогенность
<i>B. cereus</i>	+	+	+	–
<i>B. anthracis</i>	–	+	+	Для млекопитающих
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	+	Для членистоногих
<i>B. megaterium</i>	+	–	–	–

B. megaterium среди истинных бактерий наиболее крупный по размерам организм (до 5 мкм). Несколько меньше *B. cereus*; к этому виду теперь причисляют также вариант, получивший название «*mycoides*» за грибовидный рост на поверхности агар (*B. cereus* var. *mycoides*). Существуют право- и левозакрученные штаммы, но общий вид колоний очень типичен (см. рис. 20). В близком родстве с *B. cereus* находятся возбудитель сибирской язвы *B. anthracis*, который не имеет жгутиков и окружен капсулой из глутаминовой кислоты, и патогенная для насекомых бактерия *B. thuringiensis*.

Для *B. thuringiensis* характерно образование продуктов, проявляющих энтомоцидную активность. Это три вида экзотоксинов и эндотоксин.

В соответствии с правилом называть токсины по порядку их открытия фосфолипаза *C* (лецитиназа *C*) была названа α -экзотоксином. Этот фермент вызывает распад незаменимых фосфолипидов в тканях насекомых, приводя их к гибели.

Второй токсин – β -экзотоксин, или термостабильный экзотоксин, получил свое название за сравнительно хорошую стабильность при высокой температуре: активность сохраняется при автоклавировании в течение 15 минут при 121 °С. В состав токсина входят аденин, рибоза и фосфор в соотношении 1:1:1. Действие β -экзотоксина обусловлено ингибированием синтеза РНК.

Третий токсин – γ -экзотоксин – изучен мало. Это пока неидентифицированный фермент (или группа ферментов). Предполагают, что он относится к фосфолипидам.

Четвертый токсин σ -эндотоксин, или параспоральный кристаллический эндотоксин, образуется одновременно со спорой в противоположной части бактерии. Вначале он выглядит бесформенным комочком, постепенно превращаясь в правильный восьмигранник. У большинства разновидностей *B. thuringiensis* образование споры и кристалла сопровождается распадом стенки клетки, в результате споры и кристаллы освобождаются и поступают в культуральную среду. Кристаллы по своему химическому строению представляют белковое соединение. Это самый активный энтомоцидный токсин. Ядовитые свойства кристаллов сказываются только в том случае, если они попадают в пищеварительный тракт насекомого.

Ферменты насекомого превращают протоксин кристалла в непосредственно действующий настоящий токсин. Разница в восприимчивости различных видов насекомых к действию кристалла связана со специфичностью кишечных протеаз, контролирующих гидролиз кристаллов *in vivo*. Этими протеазами обладают не все насекомые, с чем и связана избирательность действия токсина. В ЖКТ человека pH низкая, поэтому они не растворяются и не являются токсичными.

Штаммы *B. thuringiensis* вызывают гибель насекомых вредителей леса (в частности, сибирского шелкопряда), многих вредителей сада и сельскохозяйственных культур (капустной белянки, хлопковой совки и т. д.), а также некоторых видов мух. Механизм действия на организм насекомого

может иметь различный характер: при развитии в организме патогенной бациллы возникает заболевание септицемия, а последствие кристалла вызывает токсикоз.

В настоящее время различные варианты культуры *B. thuringiensis* широко используются для изготовления энтомоцидных препаратов (энтобактерин, инсектин, лепидоцид, битоксибациллин и др.). Их применение позволяет в короткие сроки уничтожить вредителей на значительных площадях без ущерба для окружающей среды.

Типичные представители бактерий второй группы – *B. polymyxa* и *B. macerans* – образуют овальные споры шире материнской клетки, которые вызывают ее раздувание. *B. polymyxa* (ранее называвшаяся *B. asterosporus*) получила нынешнее свое название из-за того, что образует большое количество слизи, а также боченкообразные, в поперечном сечении звездчатые споры. При росте в анаэробных условиях культуры обладают способностью фиксировать азот. Подобно бактериям первой группы, они способны сбраживать углеводы, но в качестве основного конечного продукта образуют водород в больших количествах и никогда не синтезируют глицерин.

Представители третьей группы – *B. sphaericus* и *B. pasteurii*. Это микроорганизмы с дыхательным типом метаболизма, спорообразование плектридиальное. Они не способны использовать углеводы, не растут на универсальных средах без добавления мочевины. Вид *B. pasteurii* известен как классический пример бациллы, разлагающей мочевины; он конститутивно синтезирует уреазу, гидролизует мочевины до CO_2 и аммиака и приспособлен к высоким значениям pH. По своей физиологии с ним сходна *Sporosarcina ureae*, которая морфологически относится к сарцинам, но по основным физиологическим признакам должна быть отнесена к бациллам (аэроб; образует терморезистентные споры, содержащие дипиколиновую кислоту). Близкий нуклеотидный состав доказывает их родственность и в генетическом отношении.

Бактерии рода *Bacillus* имеют большое практическое значение. Среди них имеются виды, нашедшие широкое применение в текстильной промышленности, при получении шелка, бумаги, кофе, при выделке кож. Продуценты антибиотических веществ используются в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве. Ряд бактерий вызывают порчу продуктов, в том числе консервированных (бактерии группы сенной и картофельной палочек), молочных и кулинарных изделий (*B. cereus*). Спороносным бактериям (особенно их термофильным формам) отводится значительная роль в процессах самосогревания зерна. Многие виды обладают фитопатогенными свойствами (в основном бактерии группы картофельной палочки).

Используют терморезистентность спор для получения накопительной культуры бактерий рода *Bacillus*

В колбу помещают 10 г измельченного сена, заливают водой (100 г), закрыть пробкой и кипятят в течение 10 минут. Затем культивируют в термостате при 20–30 °C в течение 2–3 дней. На поверхности суспензии вырастает серо-белая

пленка, почти полностью состоящая из палочек *B. subtilis*.

Для получения накопительной культуры картофельной палочки истертый в кашу картофель помещают в пробирку или колбу, прогревают на водяной бане при 100 °С в течение 30 минут и оставляют при комнатной температуре. На картофеле образуется плотная морщинистая пленка, состоящая из палочек *B. mesentericus*.

Задание

Ознакомиться с особенностями морфологии бактерий рода *Bacillus* и сложными методами окраски спор.

План выполнения работы

1. Приготовить и просмотреть прижизненный препарат бактерий рода *Bacillus* с окраской фуксином или метиленовым синим. При исследовании живых неокрашенных препаратов, изготовленных из старых, главным образом агаровых, культур. Споры чаще всего обнаруживаются в виде овальных или круглых образований, резко преломляющих свет. Зрелые споры обычными растворами красок не окрашиваются. При расположении внутри клеток они видны на фоне окрашенной цитоплазмы. У спор, вышедших из клетки, окрашена только оболочка.

2. Окрасить споры по методу Ожешко или по методу Пешкова. Споры имеют очень плотную оболочку, состоящую из наружного и внутреннего слоев. Все специальные методы окраски спор основаны на действии различных протрав, изменяющих структуру оболочки и тем самым облегчающих проникновение в споры красящего вещества. После протравливания препараты окрашивают обычно карболовыми растворами красок с подогреванием мазка, последующим обесцвечиванием и дополнительной окраской. Эндоспоры очень устойчивы к простому окрашиванию, но, будучи однажды окрашенными, они довольно устойчивы и к обесцвечиванию.

Способ Пешкова (1924) наиболее простой и демонстративный; он не требует химических протрав и дифференцировки.

1. Приготовить тонкий мазок.
2. Зафиксировать на пламени горелки.
3. Окрасить кипящей леффлеровской метиленовой синькой (над пламенем спиртовки) в течение 15–20 секунд.
4. Промыть водой.
5. Докрасить 0,5 %-м водным раствором нейтрального красного в течение 30 секунд.
6. Промыть водой и высушить.

Микроскопическая картина: споры голубого или синего цвета, молодые споры черно-синие, цитоплазма вегетативных форм розовая.

Способ Ожешко.

1. Приготовить тонкий мазок, высушить на воздухе. Не фиксировать!
 2. Обработать мазок 0,5 %-м раствором соляной кислоты, которую наливают в избытке и подогревают в течение 2 минут на спиртовке. Стекло держат высоко над пламенем до появления паров.
 3. Остудить стекло и слить кислоту. Промыть препарат водой.
 4. Окрасить мазок карболовым фуксином Циля, подогревая на небольшом пламени до появления паров в течение 5 минут. Затем остудить и промыть водой.
 5. Обработать мазок 1 %-м раствором серной кислоты в течение 2 минут. Быстро промыть водой. После такой процедуры клетки бактерий обесцвечиваются.
 6. Провести дополнительную окраску спиртовым раствором метиленового синего в течение 5 минут, после чего обильно промыть водой и просушить.
- Микроскопическая картина: споры окрашиваются в красно-розовый цвет, а вегетативные клетки бактерий – в сине-голубой.
7. Сделать зарисовки.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какими признаками характеризуется семейство *Bacillaceae*? В чем отличительная особенность его представителей?
2. Какие типы спорообразования обнаружены у бактерий родов *Bacillus* и *Clostridium*?
3. Сколько спор формируется внутри материнской клетки? Чем споры отличаются от вегетативных клеток бактерий?
4. Какими признаками характеризуется типичный представитель рода *Bacillus* – сенная палочка?
5. Какие биологически активные вещества синтезируют бактерии рода *Bacillus*?
6. В чем заключается практическое значение бактерий рода *Bacillus*? Какова их экологическая роль в природе?
7. Какие представители рода *Bacillus* являются патогенными для человека?
8. Как действуют энтомопатогенные бациллы на насекомых?
9. Как можно получить накопительную культуру спорообразующих бактерий?

ЗАНЯТИЕ 9

ТЕМА: ОТДЕЛ *FIRMICUTES*. АКТИНОМИЦЕТЫ И РОДСТВЕННЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Актиномицеты и родственные микроорганизмы – это особая группа бактерий. Их клетки неправильной формы, имеют тенденцию к ветвлению вплоть до формирования развитого мицелия. В последнем случае при выращивании актиномицетов на твердых питательных средах различают субстратный и воздушный мицелий. Субстратный мицелий развивается в толще агаризованной среды, над поверхностью которой разрастаются гифы воздушного мицелия. Актиномицеты характеризуются разными способами размножения. Большинство размножаются с помощью спор, образующихся в специальных органах спороношения – спорангиях. Последние различаются строением (длинные или короткие, прямые или спиралевидные с разным числом завитков) и расположением (последовательное, супротивное, мутовчатое и др.).

Актиномицеты – это свободноживущие гетеротрофные микроорганизмы, распространенные повсеместно. Природными субстратами, из которых актиномицеты выделяются в наибольшем числе и разнообразии, являются почвы. В зависимости от типа почвы и экологических условий содержание актиномицетов колеблется от 5 до 70 %, составляя около 30 % общей численности микроорганизмов в почве. В значительном количестве обнаруживаются актиномицеты в пресных и морских водоемах, а также в их донных отложениях. В воздухе они присутствуют чаще всего в виде спор.

Некоторые представители обитают в организме человека и животных и могут вызывать заболевания.

Большинство актиномицетов – аэробы, встречаются микроаэрофильные и анаэробные формы. В основном это мезофильные микроорганизмы, оптимум размножения которых 23–30 °С. Термофилы встречаются редко.

Они различны в своих требованиях к субстрату. Одни растут на сложных органических средах, другие – на простых соединениях. Наилучшие источники азота для актиномицетов – протеины, пептоны и аминокислоты. Из неорганических источников азота лучше всего они усваивают азот нитратов, но могут использовать аммонийные соли, а некоторые виды – нитриты. Аммоний сульфатов – более подходящий источник азота, чем хлористый аммоний. Актиномицеты разлагают белки, мочевины и более простые соединения. Лучшим источником углеродного питания служит глюкоза, мальтоза, крахмал, глицерин, маннит. Из органических кислот хорошо усваиваются уксусная, лимонная, яблочная, плохо – щавелевая, муравьиная, из спиртов – этанол, эритрин и дульцит.

Большинство известных актиномицетов являются нейтрофилами (оптимальные для роста значения pH среды – 6,8–7,5). Но некоторые обнаруживают слабый рост при pH = 11,5. Оптимальные значения pH для роста алка-

лофильных форм – 9,7–9,5. В сравнении с другими бактериями почвенные актиномицеты более устойчивы к высушиванию и могут хорошо развиваться при низкой влажности питательного субстрата (8–10 %). За исключением термофилов, актиномицеты характеризуются сравнительно небольшой скоростью роста даже в условиях лабораторных культур и достаточного снабжения легкоусвояемыми питательными веществами.

По систематике Берджи актиномицеты объединены в класс *Thallobacteria*, куда включено свыше 60 родов различной степени изученности. Видовая идентификация многих родов не разработана. Принадлежность актиномицетов к роду определяется в соответствии с морфологическими, культуральными и химическими признаками. Морфологические признаки исследуют микроскопически в культурах, выросших на плотных питательных средах. Характеризуют способ: ветвление, образование и расположение спор, присутствие и отсутствие спорангиев, наличие подвижных элементов, образование склероциев, эндоспор и т. п. В последнее время все больший удельный вес в таксономических целях занимают сведения о химическом составе и структуре отдельных клеточных компонентов: генетическом материале, клеточной стенке, мембранах и др.

Группа 20. Грамположительные, не образующие спор палочки неправильной формы

Группа разнообразна. Большинство – грамположительные палочки неправильной формы, растущие в присутствии воздуха и не образующие эндоспор, но есть в группе бактерии, имеющие форму кокков или палочек правильной формы, окрашивающиеся отрицательно по Граму и являющиеся строгими анаэробами.

К роду *Corynebacterium* (греч. *coryne* – булава) относятся палочковидные формы, склонные к морфологической изменчивости с образованием булавовидных, слабоветвящихся клеток, часто располагающихся под углом в виде букв V, Y. Помимо плеоморфизма для представителей этого рода характерно «защелкивание» клеток при их делении. Оно происходит из-за того, что соединяющая дочерние клетки перегородка расслаивается на разных сторонах с разной скоростью, так что клетки внезапно оказываются под углом друг к другу. Большинство из них неподвижны (рис. 21). Грамположительные, некислотоустойчивые, хемоорганогетеротрофы, энергию получают за счет процессов дыхания или брожения, преимущественно облигатные аэробы, но есть и факультативные анаэробы. Обитатели почвы, воды, воздуха, ряд видов является возбудителями болезней растений, человека и животных.

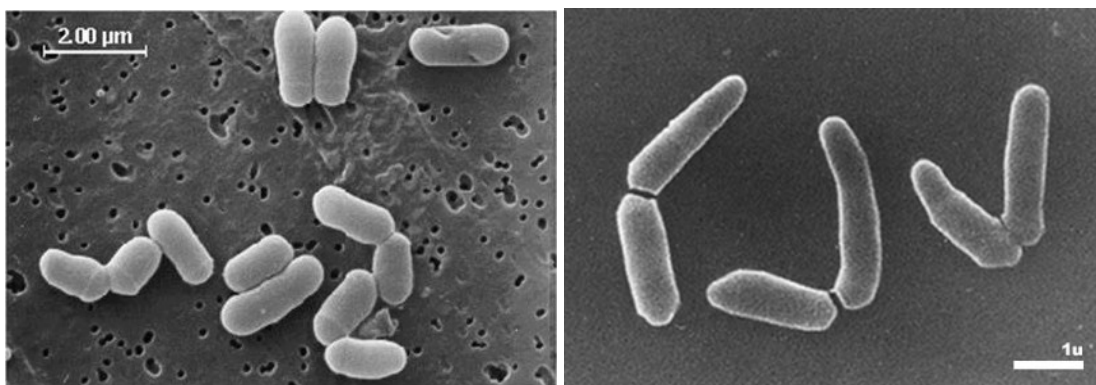


Рис. 21. Бактерии родов *Corynebacterium* (слева) и *Arthrobacter*

Corynebacterium diphtheriae – обитатель дыхательных путей, может вызывать заболевание дифтерией. В физиологическом отношении эта бактерия – нетипичный представитель группы: она живет в микроаэробных и анаэробных условиях, тогда как большинство коринебактерий – аэробы. Она поражает полость зева и миндалины; патогенность ее обусловлена выделением экзотоксина, циркулирующего в крови и воздействующего на сердечную мышцу, почки и нервы («постдифтерийные параличи»). Большинство штаммов непатогенны, но приобретают способность к образованию токсинов после заражения фагом (лизогенные штаммы).

К роду *Arthrobacter* отнесены бактерии, для которых характерна большая по сравнению с предыдущим родом тенденция к ветвлению и образованию кокковидных клеток. Им присущ цикл развития кокк – палочка – кокк. Культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, неправильной палочковидной формы; культуры же, перешедшие в стационарную фазу, состоят в основном или исключительно из кокковидных форм. При перенесении на свежую питательную среду происходит «удлинение» кокковидных клеток путем образования выпячиваний; у одной клетки может быть от двух до четырех таких выпячиваний, приводящих к появлению палочек неправильной формы или клеток с рудиментарным ветвлением (см. рис. 21).

Виды в молодой культуре (на стадии палочек) неподвижны или подвижны, окраска по Граму в этот период может быть нечеткой, но у кокковых форм она положительна. Все виды – облигатно аэробные хемоорганогетеротрофы. Бактерии рода *Arthrobacter* – основные представители автохтонной микрофлоры почвы, особенно легко выделяются из сухих почв, так как переживают многомесячное хранение почвы в сухом виде. Активно участвуют в разложении органических веществ, осуществляют процессы аммонификации, нитрификации, фиксации атмосферного азота, разлагают пластмассы, гербициды, фунгициды, инсектициды, ртутьсодержащие соединения.

Род *Bifidobacterium* – чрезвычайно вариабельны по форме: изогнутые, булабовидные, разветвленные (лат. *bifidus* – раздвоенный) (рис. 21). Неподвижные. Анаэробы. Напоминают молочнокислые бактерии. Они каталазоотрицательные и имеют сложные пищевые потребности. Активно сбраживают

углеводы с образованием уксусной и молочной кислот. Как правило, нуждаются в витаминах. Оптимальная температура 37–41 °С. Обитают в кишечнике, составляя основную часть кишечной микрофлоры, встречаются в ротовой полости позвоночных, насекомых; в сточных водах.

К почвенным бактериям относятся также некоторые виды рода *Cellulomonas*, использующие целлюлозу.

Пропионовые бактерии – *Propionibacterium* – неподвижны, микроаэротолерантны, сбраживают углеводы с образованием смеси органических кислот, особенно пропионовой (рис. 22). Это неспорообразующие, грамположительные бактерии. Обнаруживаются в сыре, на кожных покровах и в пищеварительном тракте человека и животных.

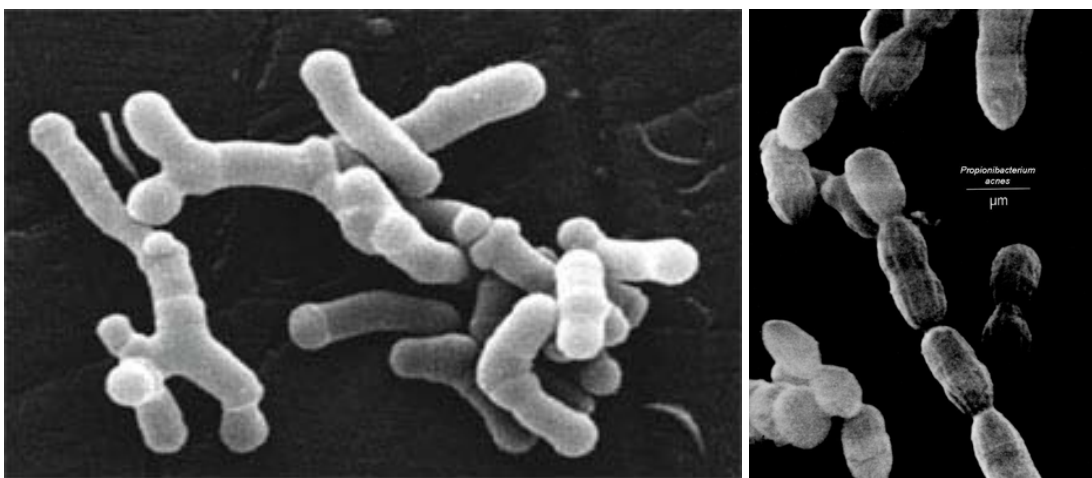


Рис. 22. Бактерии родов *Bifidobacterium* (слева) и *Propionibacterium*

Используются в производстве швейцарского сыра: сычужный фермент добавляют в виде водного экстракта из телячьих желудков (*P.freudenreichii* подвид *shermanii*). *P.acnes* – возбудители воспаления волосяных фолликулов (угревой сыпи).

Род *Actinomyces*. Свое название актиномицеты получили от первого из описанных видов – анаэроба *Actinomyces bovis* – «лучистого грибка», который вызывает болезнь крупного рогатого скота – актиномикоз, образует в тканях и челюстных костях большие друзы, имеющие лучистую структуру. Эти бактерии образуют ветвящиеся гифы, некоторые формируют мицелий субстратный и воздушный, размножаются конидиями, появляющимися на конидиеносцах разного строения. Грамположительные ветвящиеся формы, не образующие ни спор, ни воздушного мицелия, некислотоустойчивые, неподвижные формы. Почти все они аэробы. Обычные обитатели почвы, разрушают многие органические соединения, некоторые виды *Actinomyces* патогенны для человека и животных.

Группа 21. Микобактерии

Микобактерии объединены в семейство *Mycobacteriaceae* с одним родом *Mycobacterium*. Грамположительные, аэробные, неподвижные палочки, прямые или неправильных очертаний. В процессе развития палочковидные формы превращаются в кокковидные. Характерным морфологическим признаком микобактерий является образование ветвящихся форм. Ветвление можно наблюдать только в молодых, активно размножающихся культурах. У микобактерий мицелий не образуется. Многие микобактерии синтезируют желтые или оранжевые каротиноидные пигменты.

На некоторых стадиях роста характерна повышенная устойчивость к кислотам и спиртам – «кислотоустойчивость», которая обусловлена высоким содержанием в клеточных стенках миколовых кислот, делающих поверхность микобактерий воскообразной и сильно гидрофобной. Поэтому колонии имеют сухую, шероховатую, морщинистую поверхность, а в жидких культурах клетки слипаются с образованием плотной пленки.

Большинство микобактерий – сапротрофы, живущие в почве и использующие различные органические соединения. Некоторые виды патогенны, например, *M. tuberculosis* – возбудитель туберкулеза, *M. leprae* – возбудитель проказы.

Группа 22. Нокардиоформы

Представители группы объединены в семейство *Nocardiaceae*. Это аэробные актиномицеты, в цикле развития которых существует мицелиальная стадия. В старых культурах мицелий распадается на палочковидные или кокковидные элементы. Группа разнообразна по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам, типовой род *Nocardia* ([рис. 23](#)).

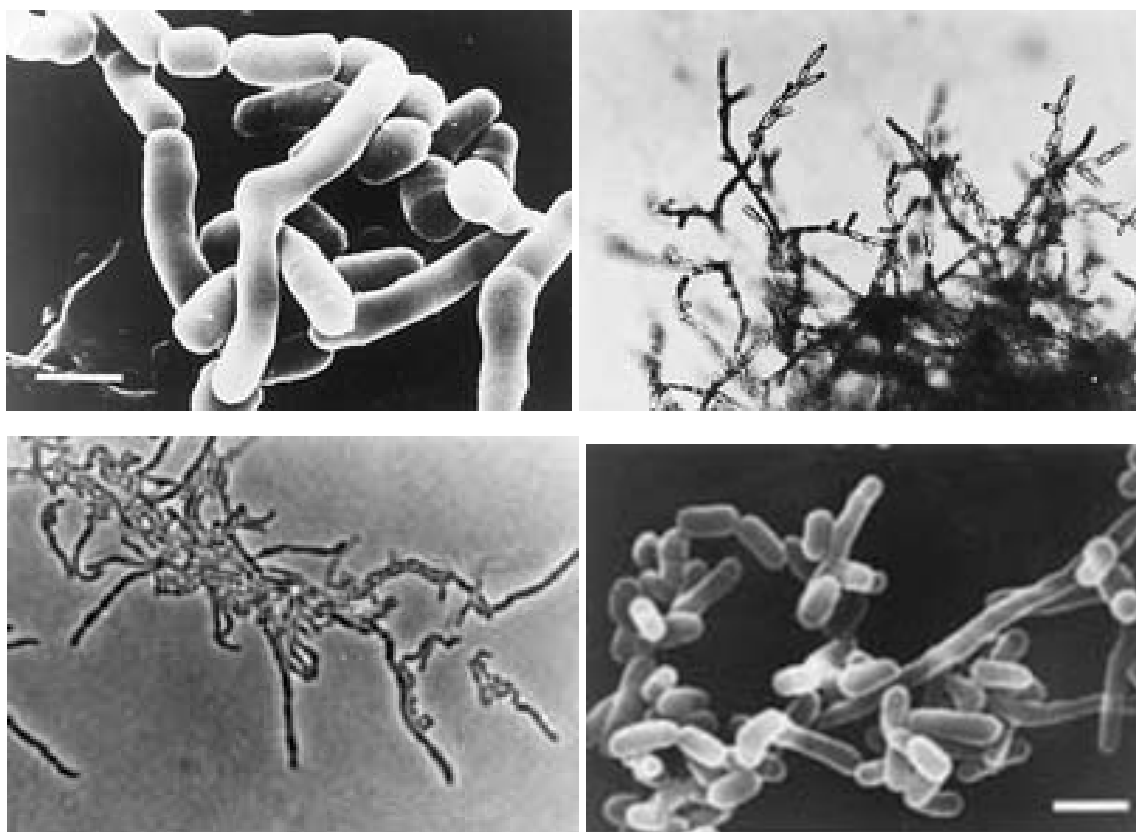


Рис. 23. Представители нокардиоформных актиномицетов

Нокардии – продуценты антибиотиков, ферментов, витаминов, аминокислот, органических кислот, пигментов, липидов, стероидов. Они могут разрушать асфальтовые покрытия дорог, битумы, смазочные масла, лекарственные препараты, приготовленные на парафиновой основе, пестициды, пищевые продукты, художественные росписи. Участвуют в очистке сточных вод, в детоксикации почв. Обитатели почвы, воды. Имеются патогенные для человека и животных виды, обуславливающие нокардиоз (*N. asteroides*, *N. brasiliensis*).

Группа 23. Актиномицеты с многоклеточными спорангиями

В эту группу выделены актиномицеты, характеризующиеся своеобразным строением: мицелиальные нити делятся в продольном и поперечном направлениях, в результате чего образуется паренхиматозная масса клеток, представляющая собой спорангии. Все представители группы – хемоорганогетеротрофы с высокими пищевыми потребностями, аэробы (главным образом микроаэрофилы), мезофилы. Распространены в почве, воде, обитают на кожных покровах млекопитающих.

Представители рода *Frankia* – эндосимбионты, обитатели корневых клубеньков небобовых растений (ольха, облепиха, лох), клубеньки которых характеризуются азотфиксирующей способностью. В почве они могут находиться в стадии свободноживущих форм. У представителей родов *Geodermatophilus* и *Dermatophilus* стадия в виде нитевидного мицелия в цикле развития отсутствует или рудиментарна. *Dermatophilus congolensis* – возбудитель распространенного у овец и лошадей дерматоза, поражающего кожу спины.

Группа 24. Актинопланы

В группу объединены актиномицеты, характеризующиеся приспособленностью к обитанию в водной среде, имеющие подвижную стадию в течение жизненного цикла. В процессе роста образуют развитый субстратный мицелий, иногда также и воздушный. Для представителей этой группы (*Actinoplanes*, *Dactylosporangium*) характерно формирование спорангиев, внутри которых образуются подвижные споры. У представителей рода *Micromonospora* спорангии отсутствуют. Неподвижные одиночные споры располагаются непосредственно на гифах мицелия или на очень коротких спороносных гифах (рис. 24).

Все актиномицеты, входящие в состав группы, – аэробные хемоорганогетеротрофы, сапрофиты или факультативные паразиты. Основные места обитания: пресная вода, почва, мертвые растительные и животные остатки.

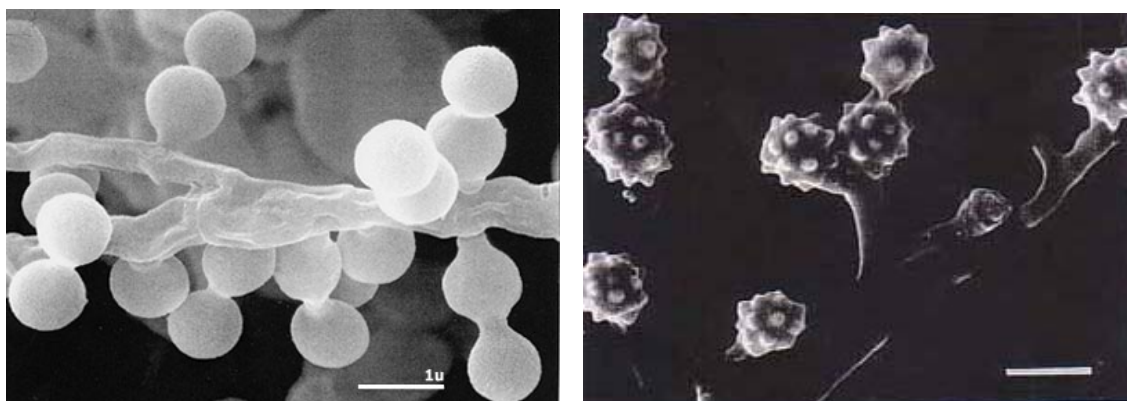


Рис. 24. Представители актинопланов

Группа 25. Стрептомицеты и родственные формы

Характерный признак группы – хорошо развитый воздушный мицелий, который в процессе последующего цикла развития не распадается на фрагменты. Колонии стрептомицетов часто бывают окрашены, а иногда наблюдается выделение пигмента в питательную среду. Цвет воздушного мицелия может быть голубым, серым, розовым, желтым, коричневым, белым.

Стрептомицеты размножаются спорами, формирующимися в цепочках на концах гиф воздушного мицелия (рис. 25), или кусочками вегетативного мицелия. Отличительный признак различных видов – характер поверхностной структуры спор. У одних видов споры имеют гладкую поверхность, у других – несут выросты различной формы.

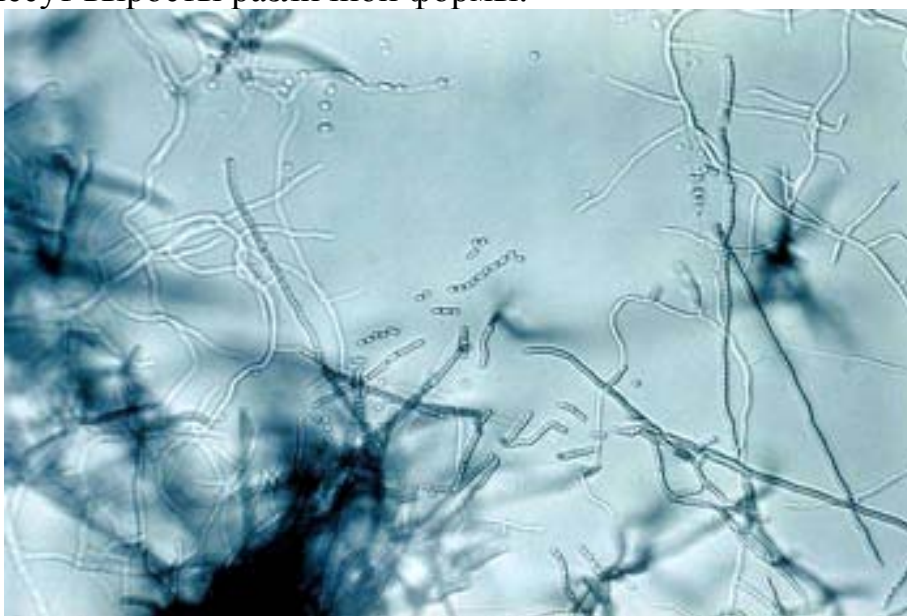


Рис. 25. Мицелий и споры бактерий рода *Streptomyces*

Актиномицеты, объединяемые в эту группу, – облигатно аэробные хемо-органогетеротрофы. Они растут на простых питательных средах и не нуждаются в факторах роста. Стрептомицеты в изобилии встречаются в почве, и харак-

терный запах сырой земли обусловлен летучим веществом, которое они выделяют.

Основной род *Streptomyces* насчитывает около 500 видов, для которых характерно образование на воздушном мицелии прямых или спиральных цепочек, состоящих из трех или более неподвижных спор (рис. 26).

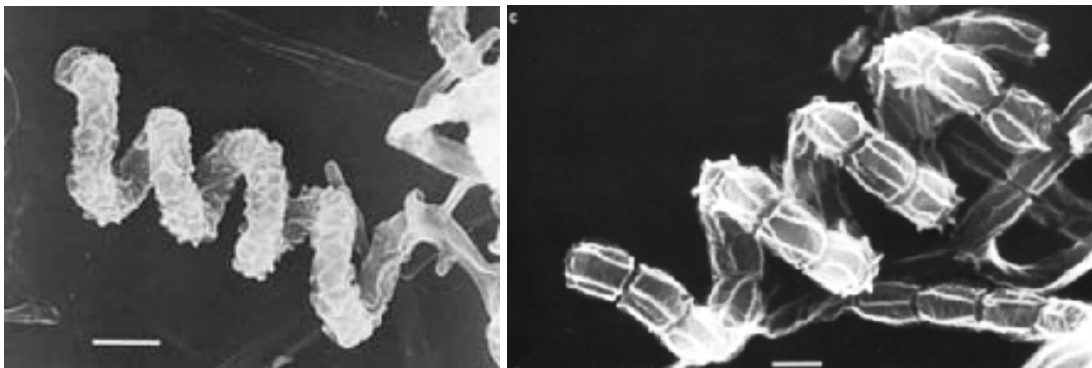


Рис. 26. Формирование спор у стрептомицетов

Представители рода образуют большое число антибиотиков и вторичных метаболитов. Из сотен выделенных антибиотиков наиболее эффективными оказались стрептомицин (продукт *S. griseus*), ауреомицин и тетрациклины (*S. aureofaciens*). Многие стрептомицеты синтезируют антибиотики, активные против бактерий, грибов, водорослей, простейших, фагов, обладающие также противоопухолевым действием.

Для представителей рода *Streptoverticillium* характерно мутовчатое расположение цепочек спор, сами цепочки могут быть прямыми, изогнутыми, спиральными и т. д. (рис. 27).

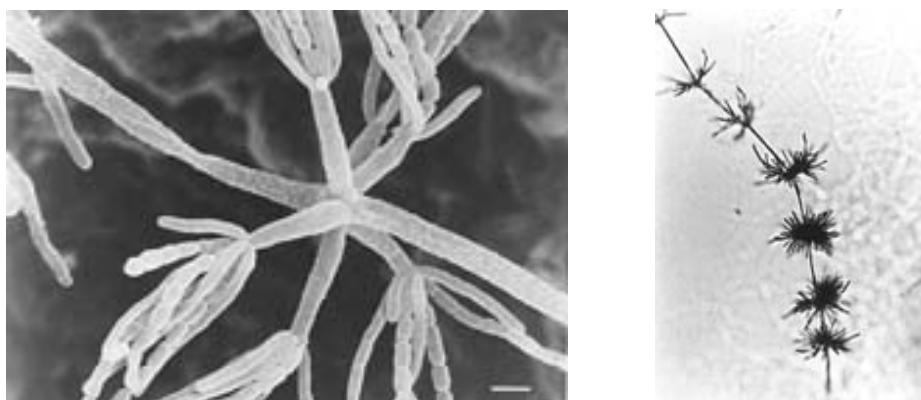


Рис. 27. Спороношение актиномицетов рода Streptoverticillium

Группа 26. Мадуромицеты

Madura – название провинции в Индии, где впервые был описан один из представителей этой группы. Группа недостаточно изучена и, по мнению специалистов, нуждается в значительной ревизии. Представители рода *Actinomadura* имеют стерильный субстратный мицелий, на котором споры

никогда не формируются. Они образуются в виде коротких цепочек на воздушных гифах. Представители родов *Microbispora*, и *Microtetraspora* морфологически подобны актиномадурам, на воздушном мицелии образуют пары спор либо цепочки из четырех спор. Образуются они последовательно одна от другой путем отчленения. Первая спора (дистальная) – самая старая и крупная, последняя – самая молодая и меньшая по размерам. Спороносцы очень короткие, расположены моноподиально без всякого порядка ([рис. 28](#)).

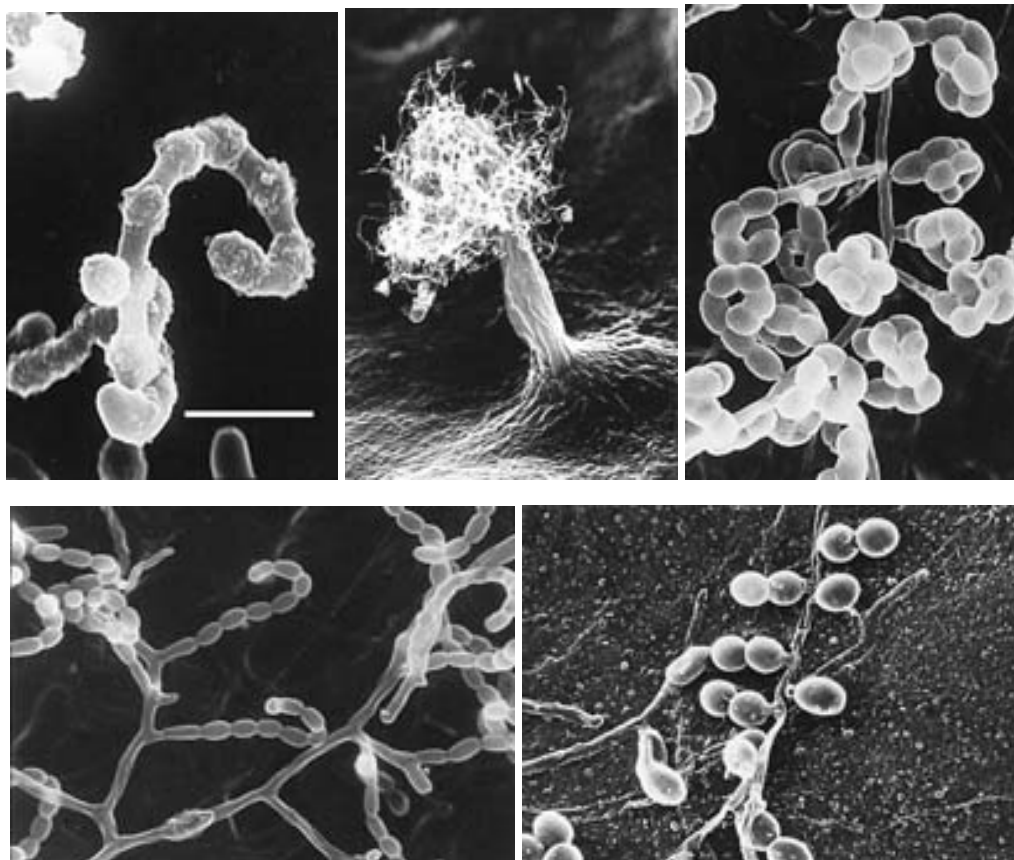


Рис. 28. Спороношение мадурамицетов

Группа 27. Термомоноспоры и родственные формы

Представители этой группы формируют воздушный мицелий, на гифах которого образуются подвижные или неподвижные споры, одиночные или в виде цепочек. Спорангии у большинства представителей отсутствуют. Мицелий не фрагментируется.

Для актиномицетов типового рода *Thermomonospora* характерна способность расти в температурном диапазоне от 40 до 48 °С. Их выделяют из почвы, саморазогревающихся субстратах, богатых растительными остатками (навоза, компостов). Культуры образуют на питательной среде палевые или желто-коричневые колонии с белым, голубоватым или сероватым воздушным мицелием. Единичные споры формируются на коротких спороносцах на ветках воздушного, редко субстратного мицелия ([рис. 29](#)).

Группа 28. Термоактиномицеты

Объединяет один род термофильных актиномицетов – *Thermoactinomyces*. Формируют хорошо развитый субстратный и воздушный мицелий, не распадающийся на фрагменты. Споры образуются на воздушном и субстратном мицелии (рис. 29). Аэробные хемоорганогетеротрофы. Основное место обитания – почвы, воды, разлагающиеся растительные остатки.

Недавние исследования обнаружили, что споры *Thermoactinomyces* относятся к типичным эндоспорам. По этому признаку и по данным анализа 16S рРНК организм следует отнести к бациллам. Однако подобно актиномицетам бактерии этой группы образуют хорошо развитый мицелий и по морфологии напоминают представителей рода *Thermomonospora*, что в данное время позволяет рассматривать их вместе с другими актиномицетами.

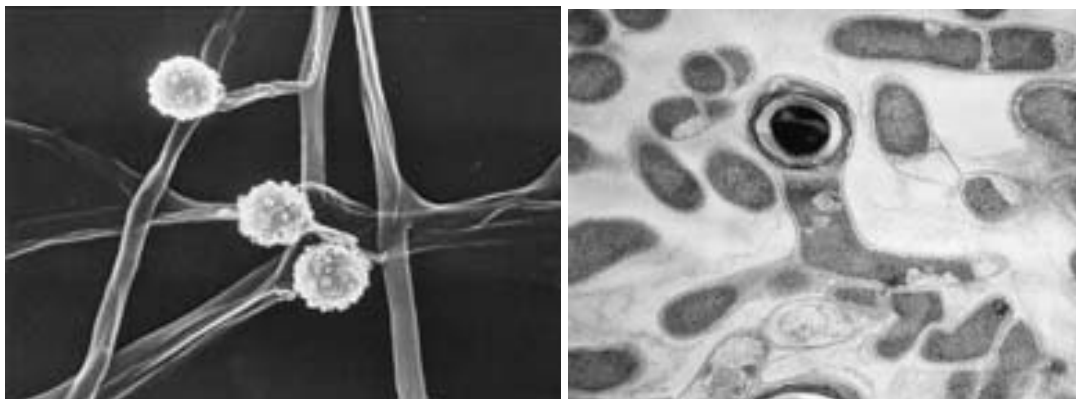


Рис. 29. Спороношение актиномицетов родов *Thermomonospora* (слева) и *Thermoactinomyces* (справа)

Группа 29. Другие формы актиномицетов

В последние годы описано несколько новых актиномицетов, выделенных в отдельные роды, которые помещены в эту группу, так как еще недостаточно изучены и отсутствует информация, необходимая для выявления степени их сходства с другими актиномицетами.

Задание

Ознакомиться с внешним видом колоний и морфологическими особенностями актиномицетов.

План выполнения работы

1. Изучить внешний вид колоний актиномицетов на плотной питательной среде на чашке Петри. Отметить цвет колоний, выделение пигмента в среду, наличие характерного запаха.

2. Приготовить фиксированный препарат методом отпечатка. Так как большинство актиномицетов формируют субстратный мицелий, то их колонии «врастают» в питательную среду и не отделяются петлей. Для приготовления препарата чистое предметное стекло прикладывают к поверхности питательной среды, засеянной актиномицетами, осторожно прижимая, чтобы получить чёткий отпечаток колонии. Затем отпечаток фиксируют в пламени спиртовки и окрашивают раствором фуксина.

3. Полученный препарат промикроскопировать, ознакомиться с морфологией клеток, описать и зарисовать. При описании обратить внимание на наличие мицелия, его фрагментацию; наличие спорангиев и спороносов, их форму; характер расположения спор.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие морфологические и физиологические признаки характеризуют класс *Thallobacteria*?
2. Какова экологическая роль актиномицетов в почвенных экосистемах?
3. Имеются ли патогенные для человека представители среди актиномицетов? Какие заболевания они вызывают?
4. Какие представители 20-й группы относятся к нормальной микрофлоре кишечника человека?
5. Чем обусловлена кислотоустойчивость микобактерий?
6. Какие функции выполняет воздушный и субстратный мицелий актиномицетов?
7. Какие биологически активные вещества синтезируют актиномицеты? Каково их практическое значение?
8. Есть ли среди актиномицетов термоустойчивые виды и где они обнаруживаются?
9. Какие бактерии используются в производстве сыров?
10. Как приготовить и окрасить мазок-отпечаток культуры актиномицетов?

ЗАНЯТИЕ 10

ТЕМА: ХАРАКТЕРИСТИКА ЭУКАРИОТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ

Общая характеристика грибов

Царство грибов (*Fungi*, *Mycetes*) сочетает свойства как растений, так и животных. Общие признаки грибов и растений: неподвижность, верхушечный рост и размножение с помощью спор. Вместе с тем у грибов, как и у животных, отсутствует фотосинтез, в продуктах обмена присутствует мочевины, а в плотных оболочках клеток имеется хитин.

Грибы являются гетеротрофами: сапротрофами, паразитами, редко хищниками. Благодаря тому, что мицелий представляет систему ветвящихся гифов, обеспечивается большая поверхность для осмотрофного типа питания. При этом происходит выделение ферментов и осмотическое всасывание органических веществ. Осмотрофный способ питания ставит грибы в совершенно определенный разряд организмов в пищевой цепи превращения веществ и энергии. Наряду с бактериями, грибы – редуценты, разлагающие сложные органические вещества до более простых. По способу питания они делятся на сапротрофов, т. е. мертвоедов, которые усваивают сложные органические соединения из мертвых субстратов, и паразитов, поглощающих питательные вещества из живых организмов. И сапротрофы, и паразиты питаются в основном растительными тканями. Связь грибов с растениями сложилась очень давно, вероятно, на ранних этапах их эволюции. Наличие набора ферментов, разрушающих основные растительные полимеры – целлюлозу и лигнин, в форме которого запасена большая часть углерода, поставило грибы (особенно дереворазрушающие) в исключительное положение в пищевой цепи организмов: на грибы приходится утилизация 2/3 связанного углерода. В этом заключается глобальная экологическая роль грибов.

Всего в природе насчитывается свыше 250–300 тыс. видов грибов, ареал которых охватывает всю Землю. Имеется несколько экологических групп грибов.

Почвенные грибы. Грибы – главные компоненты биоценозов многих почв как по числу видов, так и по биомассе. Протяженность грибных гиф в почве – от сотен метров до десятков километров в 1 г, а биомасса может составлять свыше 90 % от биомассы всех почвообитающих организмов. Почвенные грибы участвуют в разложении органического вещества, образовании гумуса, разрушении лесной подстилки и т. п., способствуют очищению почвы от патогенных микроорганизмов. В почве обитают многие виды паразитов растений. Особым типом существования считается симбиоз почвенных грибов с корнями высших растений – так называемая микориза.

Ксилотрофы – разрушители древесины. В отличие от почвенных грибов их ферментный состав более специализирован: они выделяют активные ферменты, разлагающие клетчатку и лигнин, – основные компоненты одревесневших клеточных стенок растений. Большой вред они наносят лесному хозяйству, поражая как растущие деревья, так и деловую древесину, разрушают деревянные постройки, деревянные части других строений (домовые грибы), шпалы, фанеру.

Водные грибы. В воде обитают многие виды грибов, которые разделяют на две группы. Первичноводные – древнейшая группа грибов, размножающихся подвижными зооспорами. Среди них известны паразиты водных организмов – водорослей, беспозвоночных животных и рыб. Вторичноводные грибы приспособились к разложению мертвого растительного субстрата, попадающего в воду. Они не имеют подвижных зооспор, однако адаптация к водному образу жизни проявилась у них в своеобразной форме крупных многоклеточных конидий, имеющих выросты, лучи. Такая форма позволяет конидиям цепляться в токе воды за находящиеся там предметы и поселяться на них.

Фитопатогенные грибы – вызывают заболевания растений: спорынья, пыльная головня, ржавчина, корневые гнили. Энтомопатогенные грибы – вызывают заболевания насекомых и клещей. Многие грибы (микофилы) паразитируют на других грибах, плодовых телах шляпочных грибов, мицелии микромицетов.

Зоопатогенные грибы – возбудители грибковых заболеваний человека и животных. Известны грибы, специализированные на питании белком кератином, из которого построены покровы млекопитающих (кожа, волосы, ногти), и вызывающие дерматомикозы.

Лихенизированные грибы. Особую экологическую группу составляют грибы, входящие в состав лишайников – симбиотических организмов, возникших в результате ассоциации гриба и водоросли. Такие грибы не встречаются в свободном состоянии и очень медленно растут на искусственных средах.

Микромицеты вызывают порчу пищевых продуктов. Портят смазочные масла и другие нефтепродукты, оптические изделия, лакокрасочные покрытия, вызывают коррозию металлов. Грибы разрушают книги, произведения искусства и т. п. Однако значительное число грибов – полезные. Около 150 видов грибов – съедобные и используются в питании. Грибы из рода *Penicillium* и *Aspergillus* являются источником получения большого количества антибиотиков (пенициллин, гризеофульвин). В медицине широко применяют препараты из склероциев спорыньи. Из грибов получают витамины, стероидные препараты, ферменты, используемые в текстильной, кожевенной, винодельческой и других видах промышленности.

Основная масса грибов – аэробы. Многие виды грибов вызывают различные типы брожения, например спиртовое, вызываемое дрожжевыми и некоторыми муковыми грибами, или брожение с образованием органиче-

ских кислот – лимонной, щавелевой и др.

Морфология и физиология грибов

Основой вегетативного тела большинства грибов является мицелий, или грибница. Обычно грибница бывает весьма обильна, с большой общей поверхностью. Через нее осмотическим путем происходит всасывание пищи. Некоторые грибы в вегетативной фазе представляют собой голый комок цитоплазмы (плазмодий).

Клетка грибов в большинстве покрыта твердой оболочкой – клеточной стенкой. Внутри от клеточной стенки расположена цитоплазматическая мембрана, окружающая протопласт.

Клеточная стенка на 80–90 % состоит из содержащих азот и безазотистых полисахаридов. Кроме того, в ее составе в небольшом количестве имеются белки, липиды и полифосфаты. У большинства грибов основным полисахаридом является хитин, а у оомицетов – целлюлоза.

В цитоплазме гриба содержатся белки, ферменты, аминокислоты, углеводы, липиды. В грибной клетке есть органеллы: митохондрии, лизосомы с протеолитическими ферментами, осуществляющими расщепление белков.

В клетке гриба есть вакуоли, содержащие запасные питательные вещества – волютин, липиды, гликоген, а также жиры, в основном ненасыщенные жирные кислоты. Грибы имеют своеобразный состав запасных углеводов, в частности, у них отсутствует крахмал, вместо которого в клетках запасается животный крахмал – гликоген. Широко представлены также многоатомные сахароспирты – полиолы (трехатомный глицерин, пятиатомный рибит, шестиатомный маннит и др.). Обнаружены у грибов и своеобразные сахара, такие как дисахарид трегалоза, который обычен только у грибов (его второе название – микоза).

В грибной клетке имеется от одного до нескольких ядер. У ядра двойная мембрана, ядрышко и хромосомы, содержащие ДНК.

Над поверхностью субстрата у большинства грибов находятся плодовые тела, имеющие различную консистенцию, окраску и форму. Они также состоят из гиф, только более плотно переплетенных между собой. У низших грибов гифы не имеют поперечных перегородок, и весь мицелий представляет одну гигантскую клетку с множеством ядер (неклеточный мицелий). У высших грибов гифы имеют поперечные перегородки, делящие их на отдельные клетки, в каждой из которых находится одно, два или больше ядер.

В связи с многоядерностью клеток и отсутствием препятствий на пути миграции ядер у грибов широкое развитие получило уникальное явление – гетерокариоз, т. е. ассоциация двух или более генетически различных ядер в одной клетке. Его обнаружил в 1932 г. американский миколог Х. Ханзен.

Многие грибы переносят неблагоприятные условия в форме покоящихся клеток: хламидоспор, артроспор, склероций.

Грибы имеют разные способы размножения – вегетативное, бесполое и

половое.

Вегетативное размножение осуществляется участками мицелия. Это свойство используется для поддержания роста грибов на искусственных питательных средах путем переноса кусочков мицелия с одной среды на другую. Вегетативным, кроме того, является размножение путём почкования клеток (у дрожжей), артросторами и хламидосторами.

Бесполое размножение происходит путём образования бесполовых спор. У мицелиальных грибов наиболее распространён бесполой способ размножения посредством воздушных спор (конидий), образующихся на конидиеносцах, в спорангиях и других органах. Споры некоторых низших грибов обладают органом движения – жгутиком и способны к передвижению в воде (зооспоры). Распространение спор происходит после разрыва оболочки конидиеносца (или спорангия). Многие виды грибов при бесполом размножении образуют огромное количество спор, вследствие чего указанный способ размножения играет важнейшую роль в их распространении.

Половое размножение грибов осуществляется путём слияния мужских и женских половых клеток (гамет) с последующим объединением ядер. В качестве органов размножения при половом процессе у грибов с несептированным мицелием образуются зигоспоры и ооспоры, а у грибов с септированным мицелием – базидии с базидиоспорами или сумки (аски) с аскоспорами.

Если в жизненном цикле грибов присутствуют стадии бесполого и полового размножения, то такие грибы называют совершенными. Если в жизненном цикле отсутствует (либо не обнаружена) половая стадия, то грибы относят к несовершенным. Эта группа грибов не имеет таксономического значения.

Систематика грибов

Во всех системах, вне зависимости от принимаемого их авторами числа царств, грибы выделяются в самостоятельное царство (*Fungi*). При определении систематического положения грибов учитывают тип полового процесса, число жгутиков у подвижных стадий, характер образования плодовых тел, их форму, морфологические особенности и т. д.

Общность способов питания вовсе не означает филогенетической общности грибов. В группу организмов, обозначаемых как грибы, входит большое число независимо возникших или очень давно разошедшихся эволюционных линий. Среди них имеются как амёбоподобные животные, так и потерявшие хлорофилл водоросли. Три главные эволюционные линии, которыми занимаются микологи, показаны на схеме (Дьяков, 2000) ([рис.30](#)).

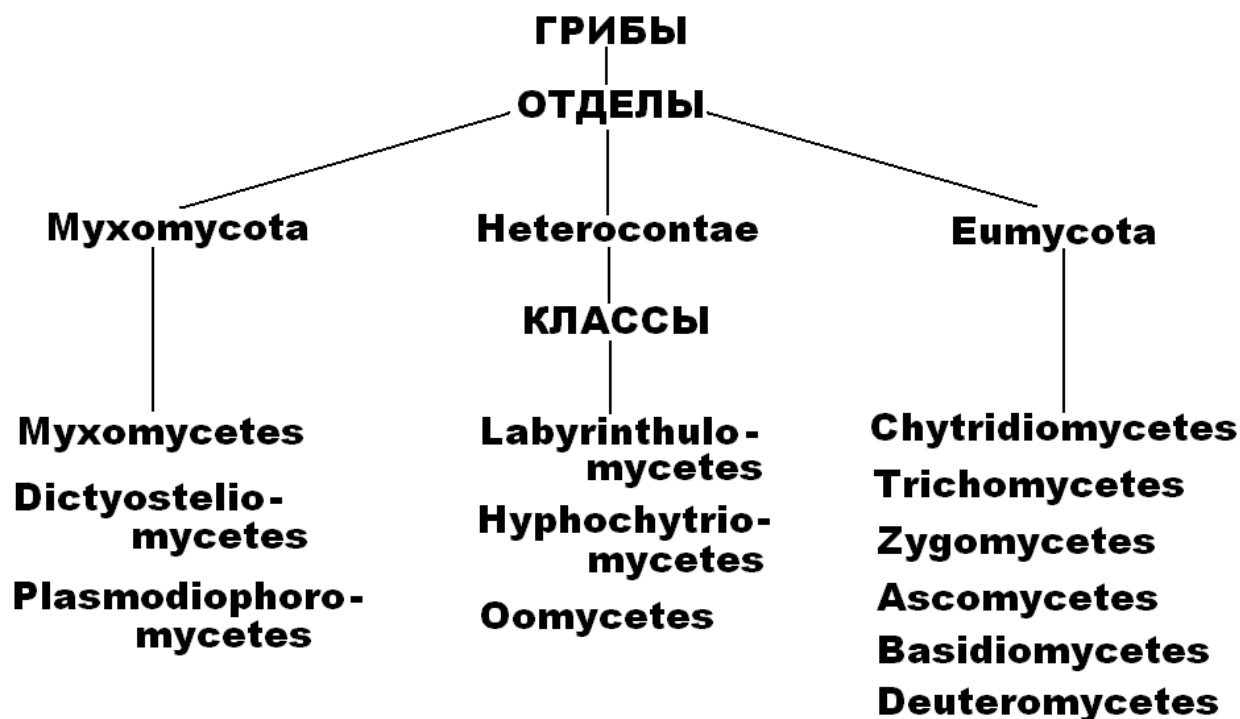


Рис. 30. Главные эволюционные линии

Отдел *Мухомycota*. Группа миксомицетов, или слизевиков, объединяет организмы, вегетативная фаза которых представлена плазмодием – голый цитоплазматической массой, окруженной перипластом и способной к амeboобразным перемещениям, или псевдоплазмодием – агрегацией амeboобразных клеток (миксамеб), также способных к синхронному движению. При спороношении плазмодий преобразуется в один или группу спорангиев, в которых формируются покоящиеся споры, покрытые целлюлозными (реже хитиновыми) оболочками. Следовательно, в вегетативной фазе миксомицеты сходны с животными, а в генеративной – с грибами. Первый серьезный исследователь миксомицетов – знаменитый немецкий ботаник Антон Де Бари – назвал их поэтому *Mycetozoa*, т. е. грибы-животные. Деление миксомицетов на классы основано на строении плазмодия, прорастании спор и других признаках.

Класс *Мухомycetes* (истинные миксомицеты). Сапротрофные организмы, живущие чаще всего в лесу и питающиеся осмотрoфным способом (мертвым растительным субстратом) или зоотрофным (клетками бактерий, дрожжей). Их плазмодии, содержащие большое число диплоидных ядер, погружены в субстраты (гниющую древесину, опавшую листву и др.). При переходе к плодоношению плазмодий «выползает» на поверхность субстрата и преобразуется в группу спорангиев, внутри которых ядра редуционно делятся, а участки цитоплазмы, содержащие по одному ядру, обособляются в споры, покрытые целлюлозными оболочками (рис. 31). Кроме спор спорангии содержат стерильные нити – капиллиций, образованные из вытянутых вакуолей, или псевдокапиллиций – из остатков оболочек сросшихся друг с

другом спорангиев. Обладая высокой гигроскопичностью, эти нити при изменении влажности изгибаются и разрыхляют споровую массу, а также участвуют в освобождении спор из спорангиев.

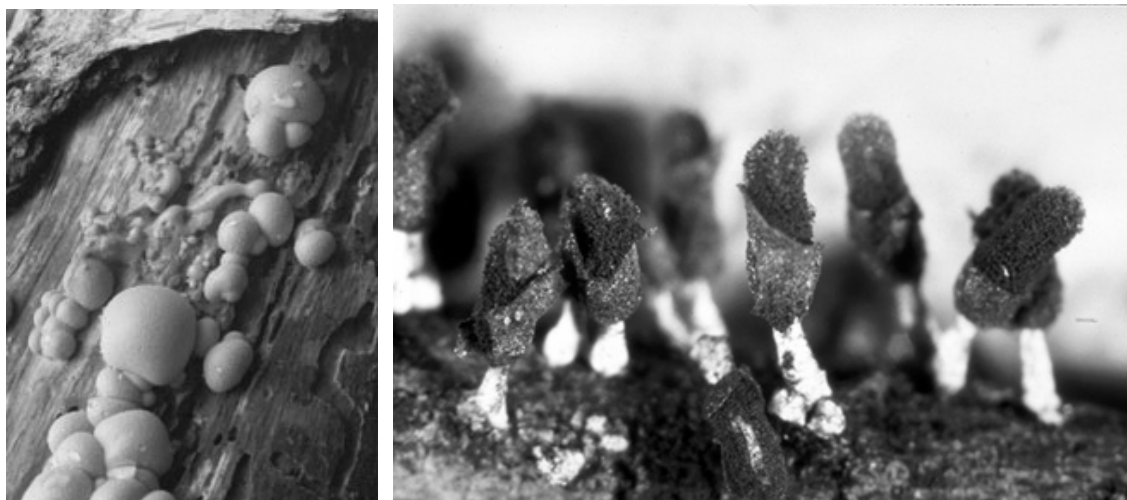


Рис. 31. Плазмодии и спорангии миксомицетов

В капле воды споры преобразуются в зооспоры (миксофлагелляты) с одним или двумя неравной длины жгутиками. Попарно сливаясь, зооспоры формируют диплоидные клетки, причем слияние у большинства видов может происходить только между зооспорами, имеющими различные типы спаривания (гетероталлизм). Диплоидная клетка теряет жгутики, погружается в субстрат и разрастается в плазмодий, количество ядер которого увеличивается вследствие митозов.

Деление на порядки основано на окраске плодовых тел и спор, типе капиллиция и других признаках.

Класс *Dictyosteliomycetes* (клеточные миксомицеты). Вегетативная фаза этих миксомицетов представлена отдельными клетками (миксамебами), которые живут в богатом органическими веществами субстрате (в навозе), питаются бактериями (зоотрофный тип питания) и размножаются делением клеток. При голодании они образуют агрегаты (псевдоплазмодии), в которых синхронные движения отдельных клеток направлены к определенным местам (центрам инициации). Наползая друг на друга, амёбы формируют столбик (колонку) с расширенным верхом (спорангием), покрытым целлюлозной оболочкой. Амёбы внутри спорангия превращаются в покоящиеся споры, из которых при наступлении благоприятных условий выходят амёбы.

Класс *Plasmodiophoromycetes* (паразитические миксомицеты) включает виды, развивающиеся как облигатные внутриклеточные паразиты высших растений. Таков возбудитель килы крестоцветных *Plasmodiophora brassicae*. Его плазмодии, находящиеся в клетках корней, вызывают усиление тока питательных веществ к корню, что приводит к увеличению размера зараженных клеток и образованию наростов (галлов) на корнях. Их поверхность трескивается, и гнилостные организмы, проникающие из почвы через тре-

щины, вызывают гниение корня. Плазмодии паразита после усиленного питания в клетках корня распадаются на одноядерные споры (в связи с паразитическим образом жизни спорангии не формируются), покрытые прочными хитиновыми оболочками. После разрушения корня споры попадают в почву, где могут сохраняться много лет. Под влиянием корневых выделений крестоцветных растений споры прорастают и образуют двужгутиковые зооспоры, которые прикрепляются к корневым волоскам, теряют жгутики и заражают корни.

Отдел *Heterocontae*. Некоторые группы грибоподобных организмов имеют много черт, сближающих их с разножгутиковыми водорослями – хромофитами. Их подвижные клетки гетероконтны или (вследствие вторичной утраты) имеют один перистый жгутик; половой процесс (там где он есть) – оогамия, морфологически сходная с половым процессом некоторых гетероконтных водорослей; синтез лизина проходит через диаминопимелиновую кислоту, как у растений, но не как у животных и большинства грибов; в клеточной стенке содержится много целлюлозы и очень мало хитина; запасной углевод – β -глюкан ламинарин, кристы митохондрий трубчатые (у истинных грибов кристы лентовидные). Все это наводит на предположение о том, что эти организмы произошли от потерявших хлоропласты и перешедших к гетеротрофному питанию золотистых или желто-зеленых водорослей. Прямые доказательства этому получены при сравнении нуклеотидного состава ядерных рибосомальных и митохондриальных генов этих организмов с другими грибами и гетероконтными водорослями. Многие таксономисты выделяют их в отдел *Oomycota*, но в данном руководстве они составляют три класса в отделе *Heterocontae*.

Класс *Labyrinthulomycetes* (сетчатые миксомицеты). Эта слабо изученная группа организмов открыта в 1867 г. Л. С. Ценковским. Они паразитируют на морских водорослях и морской траве zostере, вызывая иногда ее массовую гибель. Лабиринтуломицеты хорошо культивируются на искусственных средах, питаются клетками бактерий и дрожжей. Лабиринтуломицеты образуют веретеновидные одноядерные клетки, которые выделяют слизь, застывающую в виде трубочек; внутри этих трубочек клетки движутся, вызывая их удлинение, ветвление, слияние (анастомозы), вследствие чего образуются сетчатые колонии. По наличию таких колоний их объединяют с миксомицетами, однако у некоторых видов обнаружены гетероконтные зооспоры со стигмой, что указывает на их родство с золотистыми водорослями.

Класс *Hyphochytriomycetes* включает небольшое число преимущественно морских водных грибов, имеющих подвижные клетки с одним перистым жгутиком. Биология этих грибов и их жизненные циклы изучены недостаточно. Среди них преобладают паразиты водорослей, водных грибов и беспозвоночных.

Класс *Oomycetes* – важнейший в этой группе псевдогрибов. Он представлен видами, имеющими хорошо развитый мицелий без перегородок. Клеточная стенка содержит целлюлозу. Бесполое размножение происходит

зооспорами с двумя жгутиками (перистым и гладким). Половой процесс оогамный. В оогонии формируются оосферы, которые после оплодотворения содержимым антеридия производят покрытые плотными оболочками ооспоры (рис. 32). После длительного периода покоя ооспоры прорастают; при этом происходит редукционное деление. Цикл завершается образованием нового спорангия.

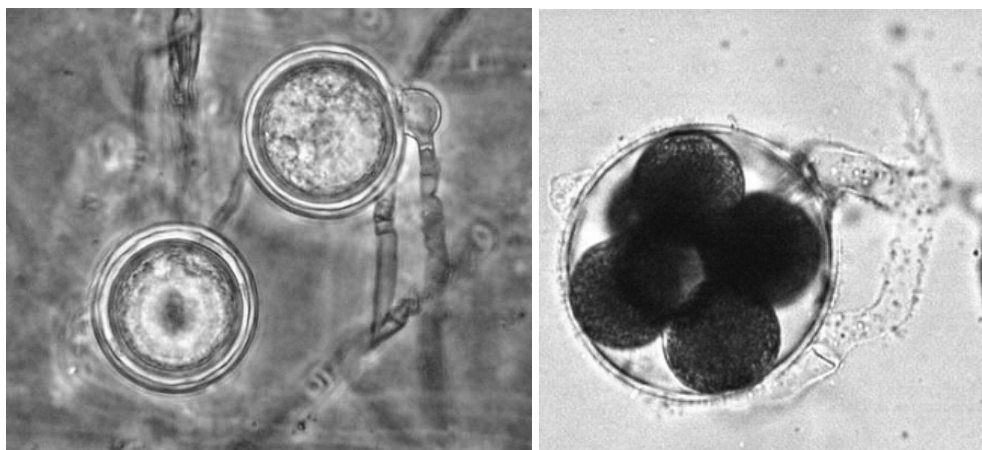


Рис. 32. Ооспоры

Среди нескольких порядков, в которые объединяют оомицеты, наиболее богаты видами порядки *Saprolegniales* и *Peronosporales*. Сапролегниевые – в основном водные грибы, предпочитающие белковые субстраты – трупы беспозвоночных и рыб, икру, ослабленных живых рыб и др. Пероноспоровые грибы наряду с водными включают большое число наземных видов, паразитирующих на высших растениях и причиняющих большой экономический ущерб сельскому хозяйству (рис. 33).



Рис. 33. Фитофтороз картофеля

Это облигатные паразиты, весь цикл развития которых проходит в организме высших растений. Они вызывают такие распространенные болезни, как гнили всходов сельскохозяйственных и лесных пород, фитофтороз картофеля и томатов, ложные мучнистые росы подсолнечника, винограда

(милдью), сахарной свеклы, табака, салата и др.

Отдел *Eumycota*. Группу организмов, относимых к настоящим грибам, объединяют следующие признаки: а) основные компоненты клеточной стенки хитин и глюкан (последний у некоторых организмов заменен маннаном); б) синтез лизина осуществляется через α -аминоадипиновую кислоту; в) кристы митохондрий плоские; г) питание исключительно осмотрфное.

Класс *Chytridiomycetes*. Вегетативное тело представляет собой плазмодий, зачаточный мицелий (ризимицелий) или хорошо развитый мицелий. Эти микроскопически малые грибы – самые простые по степени развития вегетативного тела. Клеточная стенка у них состоит в основном из хитина. В цикле развития есть жгутиковые стадии (зооспоры и гаметы, имеющие один гладкий, бичеобразный жгутик, прикрепленный на заднем конце и направленный назад). Им свойственно бесполое размножение зооспорами. Половой процесс разнообразен (изогамия, гетерогамия, оогамия, хологамия).

У многих хитридиомицетов половой процесс – изогамия. После слияния гамет образуется двужгутиковая планозигота, которая заражает клетки корня. В зараженных клетках она разрастается в плазмодий, который затем одевается толстой оболочкой, превращаясь в зимующую покоящуюся цисту. И все это время два ядра, полученные от гамет, не сливаются (дикарион). Перед тем как циста на следующий год превратится в зооспорангий, два ядра в ней сольются, после чего последует мейоз и несколько митотических делений, в результате которых формируются одноядерные гаплоидные зооспоры.

Большинство хитридиевых грибов – паразиты пресноводных и морских водорослей, водных грибов, высших водных растений и животных, обитающих в воде. Значительно меньшая часть развивается сапротрофно на растительных остатках и трупах животных. Многие представители паразитируют на высших наземных растениях, однако их успешное развитие происходит только при сильном и даже избыточном увлажнении почвы. Среди них хорошо изучены виды рода *Olpidium*, например *Olpidium brassicae*, вызывающий “черную ножку” капустной рассады. Другим важнейшим представителем этого класса служит *Synchytrium endobioticum* – возбудитель рака картофеля.

Класс *Zygomycetes*. Мицелий большей частью неклеточный, хорошо развитый. Бесполое размножение осуществляется неподвижными эндогенными спорангиоспорами, реже – экзогенными конидиями. Там, где гифы соприкасаются с субстратом, формируются ризоиды, которые проникают в субстрат. Непосредственно над этим местом появляются один или несколько спорангиеносцев, на которых формируются спорангии (рис. 34).

Половой процесс – зигогамия (рис. 34). Гаметангии муковых грибов содержат по несколько ядер, поэтому образующаяся зигота многоядерная. У большинства видов ядра длительное время не сливаются. Перед прорастанием зиготы происходят кариогамия, мейоз и многочисленные митозы, после чего формируется многоспоровый спорангий.

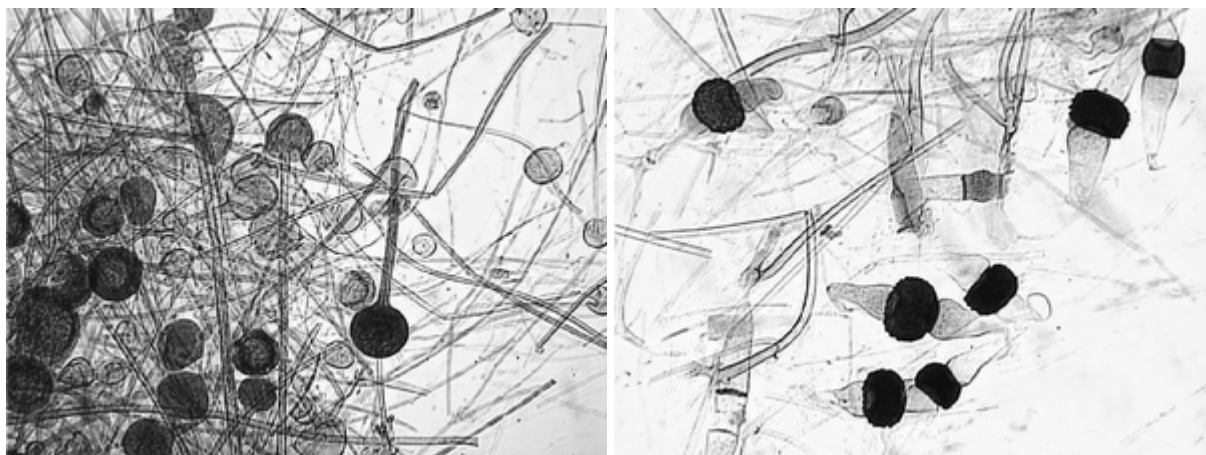


Рис. 34. Представители зигомицетов: бесполое спороношение (слева) и формирование зиготы (справа)

Зигомицеты – высокоразвитая, перешедшая к наземному образу жизни группа низших грибов. Наибольшее практическое значение имеют представители порядка *Mucorales* (муковровые). Они встречаются на гниющих органических материалах; некоторые из них – копрофилы. Широко известны такие грибы, как *Mucor mucedo* (обычная головчатая плесень), *Rhizopus nigricans* (вульгарная хлебная плесень). Ферменты, выделяемые из этих грибов, используют для получения ферментных препаратов, осветления соков, приготовления спиртных напитков. В анаэробных условиях грибы растут очень плохо, в отсутствие молекулярного кислорода они переходят к брожению; многие из них образуют в таких случаях молочную кислоту или этиловый спирт. Изменяется при этом и форма роста: *Mucor racemosus*, например, подобно дрожжам, образует в анаэробных условиях почкующийся мицелий. Распространение муковровых грибов происходит очень быстро как с помощью многочисленных спорангиоспор, так и благодаря быстрому росту гиф.

В классе зигомицетов выделяют отдельный порядок *Entomophthorales* – паразиты насекомых ([рис. 35](#)).



Рис. 35. Насекомое, пораженное энтомофторой

Некоторые из них вызывают гибель личинок комаров и мух, в связи с чем на их основе разрабатываются методы биологической борьбы с вредными насекомыми. Энтомофторовые грибы представляют наглядный пример

перехода низших водных грибов к наземному образу жизни; на смену подвижным спорам у них появились конидии.

Класс *Ascomycetes* – сумчатые грибы. Это один из крупнейших классов грибов. Входящие в этот класс грибы чрезвычайно разнообразны по строению. Вегетативное тело аскомицетов – разветвленный септированный мицелий с перегородками, имеющими центральную пору, через которую могут мигрировать из одной клетки в другую питательные вещества, вирусы и даже ядра. Клетки содержат нефиксированное число ядер, редко одно, чаще 2, 3 и даже больше двадцати. У некоторых аскомицетов мицелий может распадаться на отдельные клетки или почковаться, например у дрожжей (порядок *Endomycetales*).

Основной признак аскомицетов – образование в результате полового процесса сумок, или асков (рис. 36). В сумке происходит слияние ядер зиготы, а затем мейотическое деление диплоидного ядра и образование гаплоидных аскоспор. У высших аскомицетов сумка не только представляет место образования аскоспор, но и активно участвует в их распространении.

В цикле развития аскомицетов наряду с сумчатой стадией, представляющей телеоморфу, большую роль играет стадия бесполого размножения, или анаморфа. Споры бесполого размножения (конидии) образуются на гаплоидном мицелии на конидиеносцах различного строения. Морфология конидиальных спороношений аскомицетов очень разнообразна. Конидиальные спороношения развиваются в период вегетации грибов и служат для их массового расселения.

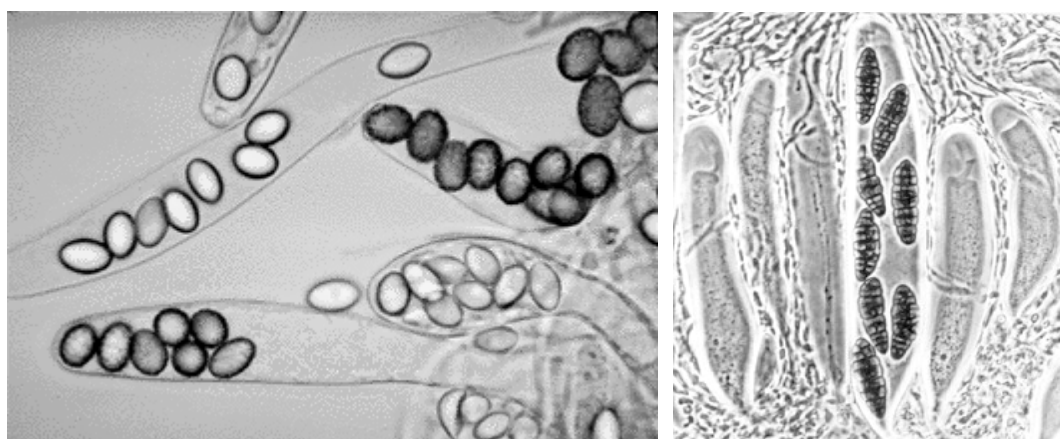


Рис. 36. Сумки с аскоспорами

Система аскомицетов основана на морфологии сумчатой стадии (наличие и строение плодовых тел, стромы, строении сумок). В зависимости от этого аскомицеты разделяют на три подкласса.

Подкласс *Hemiascomycetidae* (голосумчатые грибы) включает виды, у которых сумки формируются прямо на мицелии. Наиболее примитивные – голосумчатые грибы (порядок *Endomycetales*); многие из них (дрожжи) не

образуют даже мицелия, поэтому в сумки превращаются отдельные клетки. Тафриновые грибы (порядок *Taphrinales*) вызывают разрастание тканей пораженных древесных растений.

Подкласс *Euascomycetidae* (плодосумчатые грибы) включают виды, у которых сумки находятся внутри плодовых тел. Строение плодовых тел и расположение в них сумок легли в основу классификации плодосумчатых грибов.

Группа плодосумчатых грибов включает телеоморфы грибов *Eurotium*, *Emericella*, *Eupenicillium*, *Talaromyces*, анаморфы которых относятся к родам *Aspergillus* и *Penicillium*.

К аскомицетам относится паразит хлебных и кормовых злаков – спорынья (*Claviceps purpurea*). Род склеротиния (*Sclerotinia*) – распространенный и опасный возбудитель белой гнили плодов и овощей при хранении. Мицелий пронизывает пораженный орган, образуя на его поверхности белый хлопьевидный налет. Для грибов этого рода характерно в цикле развития образование склероциев на мицелии.

К плодосумчатым грибам принадлежат некоторые из более или менее известных лесных грибов, например пецица (*Peziza*), сморчки (*Morchella*) и трюфели (*Tuber*).

Подкласс *Loculoascomycetidae* (полостносумчатые грибы) отличаются тем, что сумки формируются не в плодовых телах, а непосредственно в сплетении гиф – строме, причем пучки созревающих сумок раздвигают гифы стромы, образуя полости, или локулы. Сумки локулоаскомицетов имеют двухслойную оболочку, и из них происходит активное разбрасывание спор. При созревании сумки наружный слой оболочки лопается, а внутренний под действием тургорного давления растягивается и разрывается. Большинство локулоаскомицетов развиваются на живых и мертвых листьях как паразиты или сапротрофы. Таковы, например, возбудители парши яблони и груши из рода *Venturia*, белых пятнистостей листьев земляники, томатов и других растений из рода *Mycosphaerella* и др.

Класс *Basidiomycetes*. Базидиомицеты считаются наиболее высокоразвитой группой грибов. Это высшие грибы с хорошо развитым многоклеточным мицелием. В перегородках большинства базидиальных грибов имеется отверстие, заканчивающееся с обеих сторон плоскими дисками – долипоровая септа, но оно затянуто перфорированной мембранной структурой – парентосомой. К базидиомицетам относятся и микроскопические грибы, и грибы с крупными плодовыми телами. Среди этих грибов есть паразиты растений (например, широко распространенные и очень опасные для сельскохозяйственных растений головневые и ржавчинные грибы), многочисленные почвенные сапротрофы – хорошо всем известные шляпочные грибы. К базидиомицетам относятся и микоризообразующие грибы, например белый, под-

березовик, подосиновик и многие другие лесные грибы. Есть среди базидиальных грибов и сапротрофы на древесине – это многочисленные трутовики, активные разрушители древесины и валежника.

У базидиальных грибов наблюдается дальнейшая эволюция полового процесса. Во-первых, происходит его морфологическое упрощение, потеря половых структур и замена их простым слиянием ядер в неспециализированных вегетативных клетках – соматогамией. Во-вторых, происходит дальнейшее расширение роли дикариона в жизненном цикле.

Гаплоидный мицелий у них слабо развит, недолговечен и носит название промицелия. У гомоталлических видов могут сливаться гифы одного и того же мицелия. У гетероталлических, к которым относится большинство базидиальных грибов, сливаются клетки гиф, берущих начало от спор противоположных половых знаков: + и –. Таким образом развивается вторичный дикариотический мицелий. Непосредственная миграция ядер невозможна из-за наличия парентосом, закрывающих долиповорые септы, поэтому миграция осуществляется обходным путем через боковые выросты, называемые пряжками. В дикариотичном мицелии базидиальных грибов клетки имеют хорошо заметные пряжки. Кариогамия и мейоз осуществляются в специальных клетках – базидиях, формирующихся на дикариотичном мицелии ([рис. 37](#)).

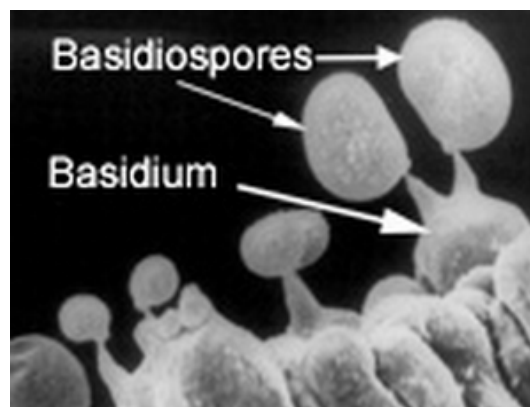


Рис. 37. Базидии и базидиоспоры

Базидия образуется в результате увеличения концевой клетки; два ядра этой клетки сливаются (кариогамия). Затем ядро зиготы претерпевает редукционное деление, возникают четыре гаплоидных ядра. Одновременно образуются четыре стеригмы с зачатками базидиоспор, в которые проникают ядра и формируются зрелые базидиоспоры. При массовом скоплении базидиоспор можно заметить, что они пигментированы. Их окраска – коричневая, фиолетовая, черная, цвета охры и т. д. – служит важным диагностическим признаком.

У одних грибов базидии одноклеточные (холобазидии), у других – многоклеточные (гетеро- и фрагмобазидии). Одноклеточные базидии цилиндрической или булабовидной формы несут на четырех стеригмах по одной

базидиоспоре. Многоклеточные базидии состоят из четырех клеток, на которых находится по одной базидиоспоре на стеригме (рис. 38).

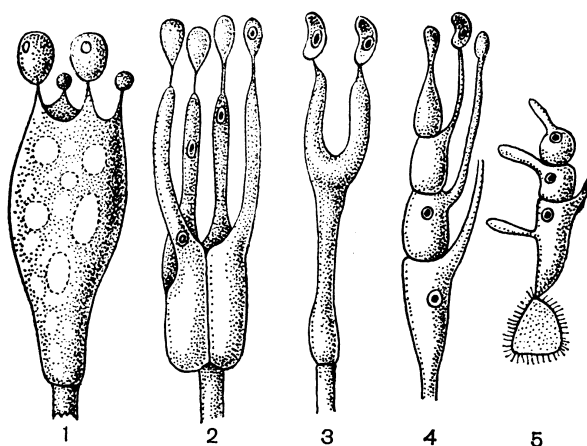


Рис. 38. Типы базидий:

1 – холобазидия; 2–4 – гетеробазидии;
5 – телиобазидия, или фрагмобазидия

Базидии с базидиоспорами могут возникать прямо на мицелии. Но у большинства базидиомицетов они образуются на плодовых телах или внутри них. Это хорошо известные шляпочные грибы, трутовики и т. п. Образование базидии происходит в специальном слое такого плодового тела – в так называемом гимении, который состоит из базидии и стерильных гиф (парафиз и цистид).

Поверхность плодового тела, несущую гимений, называют гименофором. У низших представителей он гладкий, а у более высокоорганизованных имеет форму зубцов, трубочек, пластинок. Плодовые тела базидиомицетов различны по форме и консистенции.

Гаплоидная фаза короткая: базидиоспоры и мицелий, выросший из нее, существует недолго. Конидиальные спороношения у базидиальных грибов встречаются редко. Плодовые тела сложены из дикариотичного мицелия. Следовательно, в цикле развития базидиальных грибов преобладает дикариотичный мицелий (рис. 39).

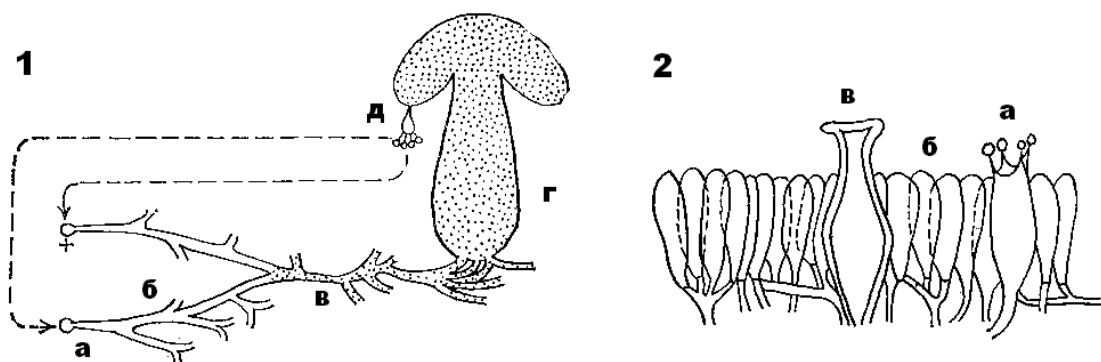


Рис. 39. Развитие базидиальных грибов

1 – Цикл развития шляпочного базидиального гриба:

а – базидиоспоры, б – гаплоидный мицелий, в – дикариотичный мицелий,
г – плодовое тело из дикариотичного мицелия, д – базидия с базидиоспорами.

2 – Гимении базидиального гриба: а – базидия с базидиоспорами, б – парафиза, в – цистиды

По строению базидии базидиомицеты разделяют на три подкласса.

Подкласс *Holobasidiomycetidae*, имеющий холобазидии, наиболее богат видами. Большинство формируют плодовые тела различного строения. У грибов из группы гименомицетов базидии располагаются на поверхности плодовых тел, покрывая сплошным слоем сплетение гиф – гименофор. Грибы гастеромицеты имеют замкнутые плодовые тела; базидии формируются внутри, и споры освобождаются после разрыва оболочки плодового тела. Большинство холобазидиомицетов – сапротрофы и развиваются на мертвой древесине или в почве.

К холобазидиальным относятся шляпочные и трутовые грибы. Шляпочные грибы имеют однолетнее плодовое тело. Среди представителей есть много известных съедобных и ядовитых грибов, в том числе лисички (*Cantharellus*), белый гриб (*Boletus*), масленок (*Suillus*), шампиньон (*Agaricus*), вешенка (*Pleurotus*), бледная поганка, мухомор (*Amanita*).

Трутовые грибы (*Polyporus*) – разрушители древесины. Мицелий живет в живой древесине (в стволах и корнях деревьев) или мертвой (заготовительной, обработанной в постройках), разрушая ее. Плодовые тела образуются на поверхности пораженной древесины, у многих грибов они многолетние. Наиболее вредоносным из трутовых грибов считается настоящий домовый гриб – *Serpula lacrymans*, который в природе не обнаруживается и встречается только в постройках.

Подкласс *Heterobasidiomycetidae* включает грибы, имеющие гетеробазидии, которые формируются на кожистых или студенистых (у дрожалковых грибов) плодовых телах, обычно развивающихся на мертвой древесине. Их гаплоидные базидиоспоры могут длительное время размножаться почкованием.

К подклассу *Teliobasidiomycetidae* относят грибы, у которых фрагмобазидия (реже холобазидия) вырастает из покоящейся дикариотичной клетки – телиоспоры. Это ржавчинные (порядок *Uredinales*) и головневые (порядок *Ustilaginales*) грибы – исключительно паразиты высших растений.

Головневые грибы насчитывают до 1000 видов, часто паразитируют на злаках и могут поражать растение во все периоды его развития. Особенно сильно разрастается мицелий в тканях цветочных органов (метелки или колоса), при этом мицелий превращается в пылящую массу темных спор, которые могут сохраняться жизнеспособными в течение многих лет.

Ржавчинные грибы отличаются сложным циклом развития, разнообразием форм спороношения, чередующихся в определенной последовательности. Свое название ржавчинные грибы получили в связи с появлением ржавых пятен или полос на пораженных частях растения. Цвет пятен обусловлен наличием в мицелии и спорах капель масла, содержащего оранжевый пигмент. Поражение растений ржавчиной приводит к их недоразвитию, задержке образования колосков, гибели.

Применение методов анализа ДНК к систематике базидиомицетов при-

вело к существенной коррекции их классификации, основанной на морфологических признаках. По данным геносистематики выделены также три подкласса, но с иными границами: *Urediniomycetidae* (ржавчинные), *Ustilagomycetidae* (головневые) и *Hymenomycetidae* (гименомицеты). В последнюю группу входят представители морфологических подклассов холобазидиомицетов и гетеробазидиомицетов.

Класс *Deuteromycetes* – несовершенные грибы. Один из крупнейших классов грибов (более 20 тыс. видов), представители которого неоднородны с филогенетической точки зрения, но являются группой параллельно эволюционирующих организмов эколого-морфологической с точки зрения. Мицелий хорошо развитый, многоклеточный, сходный по строению с мицелием сумчатых грибов. Половой процесс отсутствует, однако у дейтеромицетов, так же как у базидиомицетов или аскомицетов, доказано наличие парасексуального процесса. В результате объединения протопластов, содержащих ядра разного типа, возникают гетерокарионы. Введенное в мицелий чужое ядро размножается, и образовавшиеся дочерние ядра распространяются по мицелию. Время от времени происходят кариогамия и мейоз. Таким образом, парасексуальный цикл обеспечивает рекомбинацию ядерного материала, как и истинный половой процесс.

Конидиальная стадия у этих грибов очень сходна с той, которая характерна для хорошо изученных аскомицетов.

Конидии образуются на гаплоидном мицелии, на многоклеточных или реже одноклеточных конидиеносцах, представляющих ветви мицелия, обычно поднимающиеся над ним. Они могут быть малодифференцированными, не отличающимися от вегетативных гиф мицелия, но чаще хорошо развиты. Увеличение продукции конидий достигается путем ветвления конидиеносцев различным образом (мутовчатое, моноподиальное, симподиальное, дихотомическое и др.), путем образования расширений конидиеноцев или же образованием конидий в длинных цепочках.

Конидии могут быть одноклеточными и многоклеточными, распространяются обычно воздушными течениями. В воздухе их можно обнаружить в больших количествах. У некоторых видов вместо конидий образуются оидии или почкующиеся округлые клетки, напоминающие дрожжи.

В XIX в. известный итальянский миколог П. Саккардо (1880) создал систему несовершенных грибов, основанную на морфологии конидий и конидиогенных структур. Он выделил несколько порядков:

Moniliales (гифомицеты) – конидиеносцы располагаются непосредственно на мицелии, открыто, одиночно или в пучках – коремиях;

Melanconiales (меланкониевые) – конидиеносцы располагаются в ложе;

Sphaeropsidales (пикнидиальные) – конидиеносцы в пикнидах.

Последние два порядка объединяют сейчас в группу целомецетов (*Coelomycetales*).

Классификация несовершенных грибов внутри порядков основана на параллельной изменчивости, иллюстрирующей гомологические ряды

Н. И. Вавилова: виды с темноокрашенными и светлыми конидиеносцами и конидиями, в свою очередь, разделяют на виды с одноклеточными и многоклеточными конидиями и т. д.

Система Саккардо удобна для практического определения грибов. Однако она основана исключительно на морфологии, поэтому один тот же сумчатый гриб может иметь несколько типов конидиального спороношения. С другой стороны, один и тот же тип конидиального спороношения может вырабатываться у сумчатых грибов, также относящихся к разным порядкам. Следовательно, после потери половой стадии эти неродственные грибы объединяют в один род.

Классификация несовершенных грибов основана на формах спороношения и других внешних признаках и служит только практическим целям (для номенклатуры и определения).

В последних системах грибов класс *Deuteromycetes* упразднен как искусственный, и дейтеромицеты под названием митоспоровые грибы (их ядра претерпевают только митотические деления) распределены по порядкам и семействам сумчатых. Грибы, имеющие спороношения, подобные анаморфам определенных таксонов сумчатых, помещают в эти таксоны; для иных видов несовершенных грибов единственный путь соотнесения с сумчатыми – степень сходства ДНК.

Несовершенные грибы широко распространены в природе, многие вызывают плесневение и порчу сельскохозяйственного сырья, различных пищевых продуктов и органических материалов.

К несовершенным грибам относятся анаморфы грибов *Aspergillus* (лечная плесень) и *Penicillium* (кистевидная плесень), объединяющие более 200 видов и отличающиеся друг от друга конидиальной стадией (рис. 40). Размножение осуществляется в основном бесполыми спорами – конидиями. При половом процессе сумки образуются в шаровидных плодовых телах – клейстотециях.

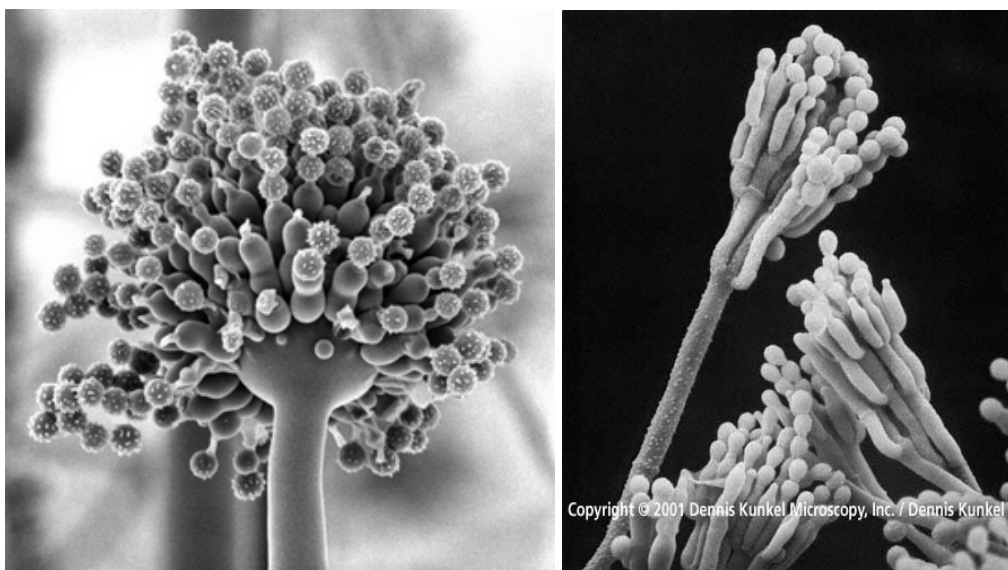


Рис. 40. Конидиеносцы грибов *Aspergillus* (слева) и *Penicillium* (справа)

Грибы из рода аспергилл – одни из наиболее распространенных гифомицетов. Естественное местообитание их – верхние горизонты почвы, особенно в южных широтах. Но чаще всего их обнаруживают на различных продуктах, главным образом растительного происхождения, где колонии их образуют плесневые налеты разного цвета. Большинство видов аспергиллов – сапротрофы, но в этом роде имеются и токсинообразователи, и паразиты животных и человека.

Вегетативное тело аспергиллов – многоклеточный, очень ветвистый мицелий, пронизывающий субстрат. Клетки мицелия многоядерные. Иногда развивается и обильный воздушный мицелий. У большинства аспергиллов плесневой налет состоит из конидиеносцев с конидиями. Конидиеносцы отходят вверх от особых клеток мицелия – опорных клеток. Верхняя часть конидиеносца вздувается, образуя пузырь. На пузыре или радиально, или только в верхней его части размещаются клетки – фиалиды, из узкого горлышка которых выходят одна за другой, располагаясь в цепочку, одноклеточные конидии. Чем выше по цепочке, тем конидии крупнее, массивнее окрашены и более зрелые.

Некоторые группы и виды аспергиллов широко распространены в природе и имеют весьма существенное практическое значение. Это, в первую очередь, представители группы *A. niger*, у которых коричневые, шоколадные или черные конидии. Они отличаются многообразной биохимической активностью: вырабатывают ферменты (амилазы, протеиназы, хитиназы и др.), способны синтезировать витамины (биотин, тиамин, рибофлавин), органические кислоты (лимонную, щавелевую, глюконовую).

Не меньшее значение имеют грибы группы *A. flavus-oryzae*. Для них характерна желтовато-зеленая окраска колоний. Эти грибы встречаются в почве и на самых разнообразных субстратах: растительных остатках, фураже, пищевых продуктах, растительных маслах, пластмассах и других материалах. Разнообразие заселяемых субстратов объясняется тем, что у видов этой группы особенно богатый набор ферментов. Спиртовая промышленность Японии и других стран Востока целиком основана на ферментативных свойствах грибов этой группы. Ферменты *A. oryzae* («така-кой») гидролизуют крахмал рисовых зерен при изготовлении рисовой водки – сакэ.

Грибы рода *Penicillium* занимают первое место по распространению среди гифомицетов. Естественный резервуар их – почва, приурочены больше к почвам северных широт. Наиболее часто обнаруживаются в виде плесневых налетов, состоящих из конидиеносцев с конидиями на разных субстратах, в основном растительного происхождения.

Грибы рода *Penicillium* имеют многоклеточные ветвящиеся конидиеносцы. На концах разветвлений конидиеносца располагаются фиалиды с цепочками конидий. Общий вид конидиеносца напоминает кисточку, метелку, отсюда русское название гриба – кистевик. Колонии грибов этого рода на питательной среде плотные, чаще бархатистые, иногда пушистые. Окраска

разнообразная, но большинство имеют голубовато-зеленый, зеленый и серо-зеленый оттенки. Многие виды издают острые запахи, в частности плесенный, затхлый.

Внимание к пенициллам возросло, когда у них впервые была открыта способность к образованию антибиотика пенициллина. В 1928 г. в Великобритании профессор А. Флеминг выделил гриб в чистую культуру и назвал *P. notatum*. В 1941 г. Х. Флори, Э. Чейн и другие ученые описали методы получения, очистки пенициллина и результаты клинических испытаний. В 1943 г. в России активные штаммы *P. chrysogenum* были выделены З. В. Ермольевой. С работ по повышению продуктивности пенициллов началась история научной селекции микроорганизмов.

Из лесных почв и подстилки выделяется *P. thomii*. Очень большое значение имеют пенициллы из серии *P. roqueforti* и *P. camamberti*. Они обитают в почве, но преобладают в группе сыров, характеризующихся «мраморностью» – Рокфор, Камамбер, Бри. Масса сыра под воздействием ферментов грибов приобретает сочность, маслянистость, специфический вкус и аромат. Есть и вредоносные виды: *P. italicum* и *P. digitatum* вызывают гниение плодов цитрусовых.

Некоторые дейтеромицеты являются возбудителями болезней культурных и лесных растений ([рис. 41](#)).

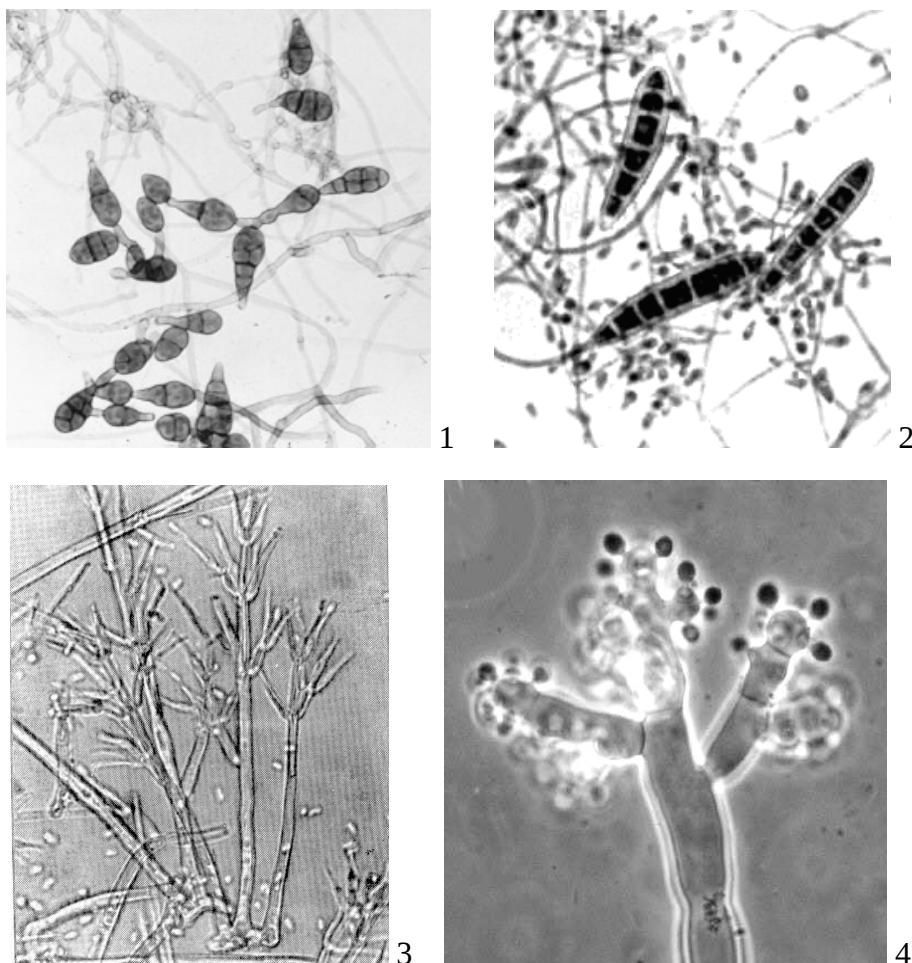


Рис. 41. Конидиальные спороношения дейтеромицетов:
1 – *Alternaria*, 2 – *Fusarium*, 3 – *Verticillium*, 4 – *Botrytis*

Род фузариум (*Fusarium*) представляет обширную биологически неоднородную группу грибов. Среди них есть сапротрофы и паразиты растений. Конидиальное спороношение у фузариев чрезвычайно разнообразно по морфологии. Грибы образуют два типа конидий: микро- и макроконидии. Макроконидии – веретеновидные, серповидные, с 3–5 перегородками. Микроконидии чаще одноклеточные. Разные виды имеют характерную окраску мицелия на питательной среде от белого, бледно-розового, желтоватого до темно-красного, сиреневого или бурого цветов, окрашивая при этом среду. Иногда колонии совершенно белые или с оранжевыми оттенками. Большую опасность представляют возбудители корневых гнилей и сосудистых микозов сельскохозяйственных и лесных культур. Некоторые представители фузариев образуют токсические для человека и животных вещества. Наиболее известные заболевания – «пьяный хлеб» (возбудитель *F. graminearum*) и алиментарно-токсическая алейкия (возбудитель *F. sporotrichioides*) – связаны с употреблением в пищу продуктов из пораженного зерна.

Род *Cladosporium* – имеет слабо ветвящиеся конидиеносцы, несущие на концах овальные споры в виде гроздей. Мицелий и конидии окрашены в темно-оливковый цвет. Выделяет в окружающую среду темный пигмент. Встречается в почве, на зерне, а также вызывает порчу продуктов животного происхождения – сыра, масла, колбасы, мяса, яиц. Может развиваться при малом доступе кислорода.

Род *Alternaria* образует многоклеточные темные конидии округлой или грушевидной формы, сидячие цепочками или одиночно на слабо развитых конидиеносцах. Колонии бархатистые, сначала оливково-коричневые, позже черного цвета. Широко распространены в почве, встречаются в свежесобранном зерне различных культур (черный зародыш), вызывая болезни сеянцев и саженцев хвойных растений в лесопитомниках, гниль корнеплодов, а также порчу некоторых молочных и мясных продуктов.

Род *Botrytis* имеет древовидно ветвящиеся конидиеносцы, несущие на концах ветвей большое число одноклеточных конидий. Мицелий и колонии серого или коричневатого-оливкового цвета. Вызывает порчу плодов, ягод и овощей, является возбудителем болезней сеянцев лесных культур.

Род *Verticillium* – возбудитель увядания или вертициллеза – вызывает корневые гнили, черную пятнистость различных растений.

Род *Oidium* – образует разветвленный белый мицелий, гифы которого легко распадаются на оидии. Один из видов этого рода – *O. lactis* – молочная плесень, часто развивается в виде бархатистой пленки на поверхности квашенных овощей и кисломолочных продуктов при их хранении. Гриб разлагает молочную кислоту, а также жир и белки этих продуктов, подвергая их быстрой порче.

Грибы рода *Trichoderma* распространены повсеместно в разнообраз-

ных географических регионах. Для них характерны очень быстрорастущие колонии, обильное зеленое (иногда белое) спороношение. Конидиеносцы от слабо дифференцированных, образующихся в воздушном мицелии, до сложных древовидно разветвленных, образующихся в подушечках (рис. 42).

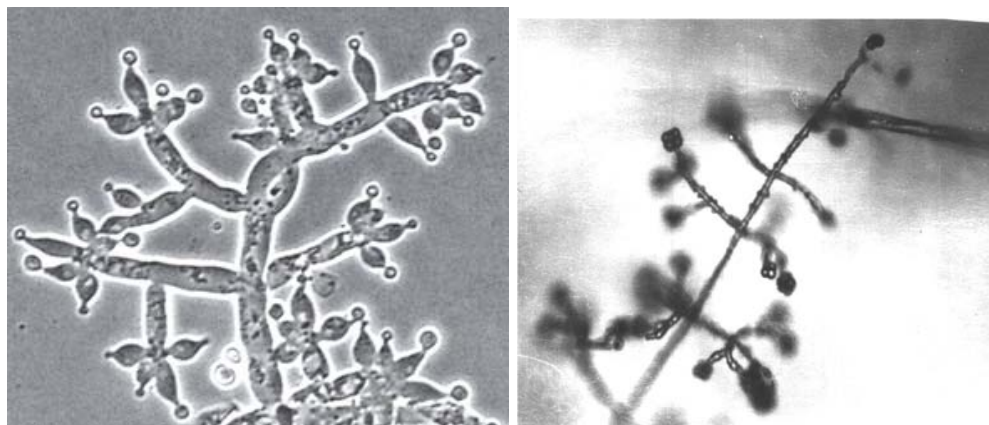


Рис. 42. Конидиеносцы грибов рода *Trichoderma*

Грибы рода *Trichoderma* хорошо известны как продуценты антибиотиков и высокоактивных экзоферментов (целлюлаз, гемицеллюлаз, хитиназ и др.). Возможность использования практически любого органического субстрата, в том числе отходов промышленности и сельского хозяйства, с высоким выходом биомассы гриба-продуцента оправдывает их применение в самых разнообразных биотехнологических процессах.

Грибы рода *Trichoderma* также широко применяются в производстве промышленных препаратов для биологической защиты растений от грибных болезней.

Техника микроскопирования мицелиальных грибов

Молодые 3–4-суточные колонии грибов, выращенные на среде сусло-агар или Чапек-агар, можно рассматривать непосредственно в чашках Петри. При этом не нарушается строение органов спороношения, которые хорошо различимы даже при микроскопировании с объективом $\times 8$.

Для более детального знакомства с особенностями строения разных видов грибов готовят препараты «раздавленная капля». Для этой цели двумя препаровальными иглами, предварительно профламбированными в пламени горелки, отделяют от питательной среды часть грибной колонии и помещают её в каплю воды и глицерина (1:4). На предметном стекле плёнку расправляют и накрывают препарат покровным стеклом. При изготовлении препарата мукоровых грибов иглами захватывают только воздушный мицелий, не касаясь питательной среды. Аккуратно переносят кусочек мицелия в каплю смеси и накрывают покровным стеклом. Предметные стекла подогревают до легкого закипания воды.

При определении видовой принадлежности грибов родов *Penicillium* и *Aspergillus* пользуются препаратами, приготовленными в капле смеси глицерина

с водой, рассматривая их с объективом $\times 40$. На таком препарате можно рассмотреть stormу вздутия на конце конидиеносца у грибов рода *Aspergillus*, строение метелки грибов рода *Penicillium*, характер расположения фиалид и другие признаки. Применяя иммерсию (объектив $\times 90$), можно исследовать еще более мелкие детали строения разных видов грибов.

Изучение органов спороношения у грибов рода *Fusarium* целесообразно проводить, пользуясь методом микрокультур (Билай, Элланская, 1975), так как грибы этого рода дают хорошее спороношение в условиях истощения питательного субстрата.

Задание

Ознакомиться с характерными особенностями строения мицелия и органов спороношения грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*.

План выполнения работы

1. Промикроскопировать колонии грибов непосредственно в чашках Петри при малом увеличении (объектив $\times 8$, $\times 20$). Зарисовать общий вид.
2. Ознакомиться с органами спороношения грибов в микрокультуре.
3. Приготовить прижизненные препараты грибов в капле смеси глицерина с водой. Просмотрев приготовленные препараты с объективом $\times 8$ (общую картину строения) и заметив участок, наиболее четко отражающий характер спороношения данного гриба, поставить объектив $\times 40$ и при этом увеличении зарисовать гифы, органы спороношения и споры.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Как рассматривается современное систематическое положение грибов в мире живых существ?
2. Какие основные таксономические критерии используются для классификации грибов?
3. Что означают термины «гетерокариоз», «анаморфа», «телеоморфа»?
4. Какие экологические группы выделяют среди грибов?
5. Какими признаками характеризуются отделы *Mycomycota* и *Heterocontae*?
6. В чем особенность систематики несовершенных грибов?
7. Какие способы размножения известны у грибов?
8. Какие фитопатогенные грибы имеют важное экономическое значение?
9. Какие типы питания встречаются у грибов?
10. Какими признаками характеризуются роды *Penicillium* и *Aspergillus*?

ЗАНЯТИЕ 11

ТЕМА: ХАРАКТЕРИСТИКА ЭУКАРИОТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. ДРОЖЖЕВЫЕ ГРИБЫ

Мицелиально-дрожжевой диморфизм

Грибам присуще явление, получившее название диморфизма: есть грибы, у которых отмечается дрожжеподобный рост (одиночные или в коротких цепочках округлые клетки, не имеющие полярности и размножающиеся почкованием), и грибы с мицелиальным ростом (цилиндрические клетки в разветвленных нитях с отчетливой полярностью – ростом верхушкой, размножающиеся делением). Многие виды грибов в разных условиях могут находиться в мицелиальном или дрожжевом состоянии. Таким образом, под дрожжами понимают все высшие грибные организмы, находящиеся в одноклеточной форме в ростовой фазе и размножающиеся почкованием или делением.

Мицелиально-дрожжевой диморфизм обусловлен различными причинами.

1. *Физиология питания.* Мицелиальные формы дейтеромицетов из рода *Verticillium* живут как сапротрофы в почве, но могут заражать корни высших растений, проникать в сосуды ксилемы и существовать там в дрожжеподобной форме, вызывая увядание (вилт) пораженного растения. Другой дейтеромицет *Candida albicans* в дрожжевой форме паразитирует в позвоночных животных и человеке, вызывая поражения внутренних органов (глубокие микозы), а в мицелиальной форме живет в почве и питается растительными остатками.

2. *Состояние ядер в клетке.* Базидиальные грибы из порядка *Ustilaginales* и сумчатые из порядка *Taphrinales* образуют в зараженных тканях высших растений хорошо развитый мицелий, клетки которого содержат по два ядра (дикарионы). Такой мицелий не может расти на искусственных питательных средах, он – облигатный (обязательный) паразит. Но одноядерные споры этих грибов (аскоспоры тафриновых и базидиоспоры головневых) размножаются почкованием, образуют дрожжеподобные колонии на искусственной среде и не способны заражать растения.

3. *Газовый состав среды.* Некоторые зигомицеты из рода *Mucor* в аэробных условиях существуют в мицелиальной форме, а в анаэробных – в дрожжевой.

Мицелиально-дрожжевой диморфизм обусловлен кардинальной перестройкой морфологии, физиологии и метаболизма грибов. При переходе к дрожжеподобному росту изменяются физиология важнейших энергетических процессов (дыхание заменяется на брожение); образ жизни (паразитический или сапротрофный); химический состав клеточной стенки (гликаны заменяются на маннаны) и цитоплазматической мембраны (содержание входящих в нее углеводов падает, а белка и липидов – увеличивается).

Морфология и физиология дрожжевых грибов

Важным следствием одноклеточного существования является повышение метаболической активности, интенсификация обмена с окружающей средой в результате увеличения отношения поверхности клетки к ее объему.

По форме дрожжевые клетки разнообразны: круглые, овальные (*Trichosporon*), яйцевидные (*Candida*), стреловидные (*Brettanomyces*), цилиндрические (*Endomyces*), лимоновидные (*Nadsonia*), грушевидные (*Schizoblastosporium*), треугольные (*Trigonopsis*), многоугольные, серповидные (*Selenotila*). В некоторых случаях форма клетки бывает настолько характерна, что она может служить опознавательным признаком рода. Строение клетки дрожжей типично для эукариотов. Размеры клеток варьируют от 1,5–2, *Pichia* до 10 мкм (*Saccharomycoides*) по ширине и достигают 20 мкм и более в длину.

Некоторые дрожжи образуют капсулы (*Cryptococcus*), включения гликогена (*Cryptococcus*), волютина (*Saccharomyces*), жира в виде отдельных капель (*Trichosporon*) либо одной липидной вакуоли (*Lipomyces*). Клетки дрожжей богаты питательными веществами – белками, жиром, витаминами, – могут быть использованы для кормовых целей.

Размножение дрожжей осуществляется различными способами. Наиболее типичным способом бесполого размножения является почкование; бинарное деление наблюдается редко. Клетки, получающиеся в результате почкования, могут оставаться соединенными, образуя псевдомицелий. Причем клетки мицелия могут быть одинаковыми либо разных размеров. В таком случае различают простой или дифференцированный ложный мицелий.

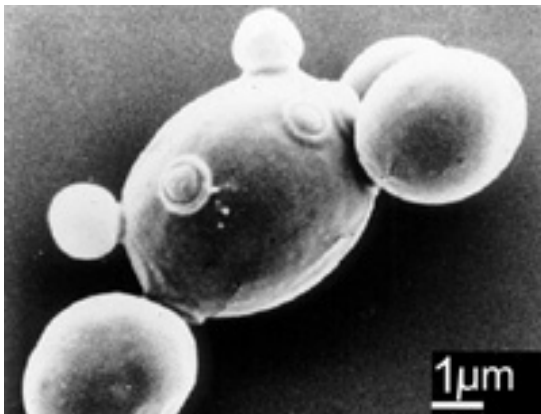


Рис. 43. Почкующиеся дрожжи

Почкование начинается с появления на поверхности клетки небольшого сферического выроста, который увеличивается в размерах и отшнуровывается от материнской клетки, оставляя на ней шрам или почечный рубец (рис. 43).

Почки могут возникать последовательно, каждый раз на новом месте, старые клетки сплошь покрываются рубцами и отмирают.

У других дрожжей почки возникают одновременно (множественное почкование) или же всегда на одном и том же месте (по полюсам). Иногда при отделении почки от материнской клетки в перешейке закладывается перегородка – септа. Такой способ называется почкующимся делением.

Дрожжи, имеющие процесс деления, образуют истинный мицелий, в клетках которого могут образовываться эндоспоры.

Кроме почкования и деления многие дрожжи способны размножаться

и с помощью бесполовых спор (рис. 44). Споры обычно образуются при неблагоприятных условиях и в присутствии большого количества кислорода.



Рис. 44. Образование спор у дрожжевых грибов

У дрожжей *Tilletiopsis* и *Bullera* могут образовываться “отстреливающиеся” споры на стеригмах. Кроме того, дрожжевые грибы могут образовывать артроспоры и хламидоспоры.

Жизненные циклы дрожжей включают чередование гаплоидных и диплоидных клеток благодаря наличию полового процесса. Гаплоидные почкующиеся клетки дрожжей могут сливаться (копулировать). За кариогамией может сразу же следовать редукционное деление (мейоз) и образование половых спор. Дрожжи – раздельнополые организмы, поэтому различают гомоталлические (слияние потомков одной споры или особей, образовавшихся из одной и той же гаплоидной клетки) и гетероталлические (конъюгация между клетками – потомками разных гаплоидных клеток). Диплоидные клетки крупнее и физиологически активнее гаплоидных. В промышленности используют преимущественно диплоидные и полиплоидные расы.

Дрожжи играют значительную роль в пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства. С давних пор дрожжи используют в заквасках для получения хлеба и кисломолочных продуктов, при изготовлении пива и вина, сидра, виноградных и ягодных вин, спирта и крепких напитков. Из дрожжей получают липиды и полисахариды, белки и многоатомные спирты, органические кислоты, витамины, ферменты. Дрожжевые препараты находят применение в медицине, фармакологии и в качестве кормовых добавок в рационах сельскохозяйственных животных.

Дрожжевые грибы могут осуществлять спиртовое брожение и аэробное дыхание. В качестве источников углерода дрожжи используют сахара, простые и многоатомные спирты, органические кислоты; некоторые виды усваивают парафины, циклические углеводороды и сложные соединения ароматического строения. Разрушение дрожжами сложных природных и непри-

родных соединений – важное свойство, которое используется для очистки сточных вод промышленных предприятий.

Дрожжи очень широко распространены в окружающей среде. Они активно размножаются в тех субстратах, где имеются доступные растворимые источники углерода, т. е. в соках, сиропах, на плодах, в нектарах цветов, в сокотечениях деревьев, на поверхности листьев, в воде, в почве. Хотя дрожжи и не вызывают образования токсических веществ при развитии на пищевых продуктах, они могут изменять их вкус, запах и внешний вид.

Необычными потребностями для роста характеризуются дрожжи, обитающие в специфических природных очагах. Например, обитатели кишечника теплокровных животных нуждаются в витаминах и аминокислотах. Осмофильные дрожжи лучше растут при высоких концентрациях сахара в среде (50 % и выше) – *Zygosaccharomyces* (рис. 45). Они встречаются в пчелиных ульях, являются причиной порчи меда, варенья, джема, вызывают скисание вин. Некоторые виды дрожжей – *Pichia*, *Hansenula* – ассоциированы с насекомыми-ксилофагами (короедами) и встречаются в местах их обитания. Они используют в качестве питательных веществ целлобиозу и ксилозу. Некоторые дрожжи, такие как *Candida*, могут быть возбудителями тяжелых заболеваний.

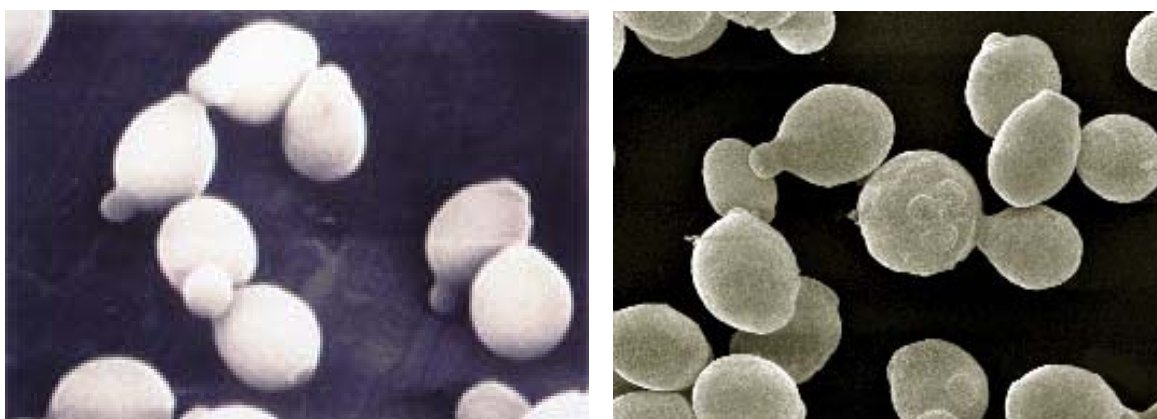


Рис. 45. Дрожжи родов *Zygosaccharomyces* (слева) и *Pichia* (справа)

Систематика дрожжевых грибов

Термин “дрожжи” таксономического значения не имеет. Филогенетические связи обнаруживаются как с сумчатыми, так и с базидиальными грибами. Дрожжи, у которых половой процесс не обнаружен, относят к несовершенным грибам.

У дрожжей из класса аскомицетов в результате полового процесса образуются сумки с аскоспорами. Количество спор в аске может быть от одной до нескольких десятков у некоторых видов. Довольно значительно разнообразие в морфологии аскоспор, что обычно служит видовым признаком. После созревания аскоспор у одних дрожжей аск лизируется лишь при набухании и прорастании спор, у других аскоспоры высвобождаются сразу же.

Базидиомицетовые дрожжи при половом процессе образуют базидии,

на которых формируются экзогенные половые споры – споридии.

Еще более упрощенными формами следует считать аспорогенные дрожжи. Только некоторые из них образуют мицелий; большинство размножается исключительно почкованием. К аспорогенным дрожжам относятся роды *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pullularia* и ряд других.

Дрожжи из класса аскомицетов насчитывают 33 рода. Наиболее изученные представители – дрожжи из рода *Saccharomyces*, который объединяет как природные виды, так и культурные, применяемые в промышленности. К ним относятся пекарские, винные и пивные дрожжи, которые представляют собой физиологические расы *Saccharomyces cerevisiae*. Клетки дрожжей этого рода круглые и овальные, иногда удлинённые. Вегетативное размножение осуществляется многосторонним почкованием (рис. 46). При росте на плотных питательных средах образуют пастообразные колонии серо-белого (с некоторыми оттенками) цвета. Все виды активно сбраживают сахара.

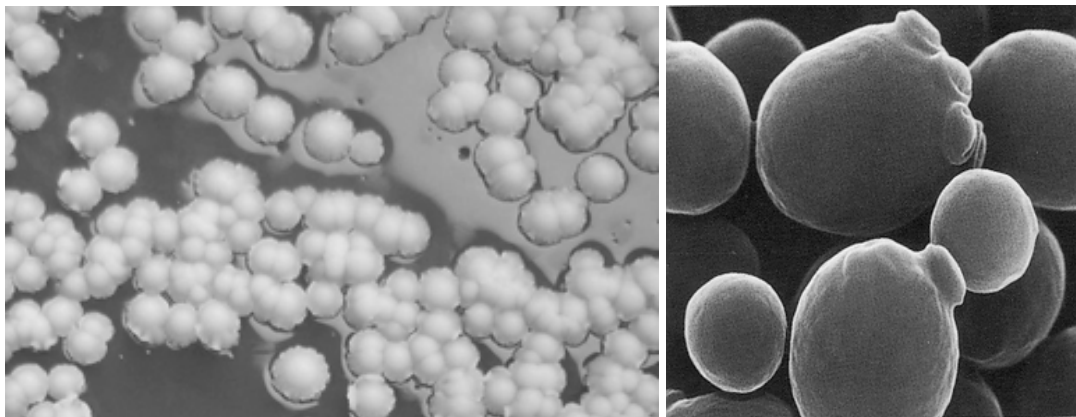


Рис. 46. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*:
колонии на суловом агаре (слева), почкующиеся клетки (справа)

Дрожжи этого рода с давних времен распространены в виноделии и широко используются в разных отраслях бродильной промышленности, в связи с чем они более других дрожжей изучены в различных аспектах. Производственные дрожжи разделяют на верховые и низовые. Верховые дрожжи в период главного брожения находятся в верхней части бродящей жидкости. Они энергично сбраживают пивное сусло. Их оптимальная температура 20 °С. Эти расы пивных дрожжей используются для приготовления крепких сортов пива с относительно высоким содержанием алкоголя. Низовые расы дрожжей расщепляют сахара менее интенсивно. Во время главного брожения они находятся в придонном слое бродящей жидкости. Оптимальная температура их роста 12–15 °С. Эти дрожжи используются для получения более легких сортов пива с низким содержанием спирта.

Род *Saccharomycodes* имеет крупные клетки (до 20 мкм и более), лимонovidные или удлинённо-овальные (рис. 47).

Вегетативное размножение происходит с помощью биполярного почкования. Колонии на плотных питательных средах белые, пастообразные. Сахара сбраживают. В этом роде известен всего один вид – *S. ludwigi* Hansen.

Дрожжи этого вида распространены в слизетечении дуба, встречаются на поверхности плодов и овощей, в забродивших плодово-ягодных соках. Иногда обнаруживается в «чайном квасе». В виноделии относятся к «сорнякам» брожения.

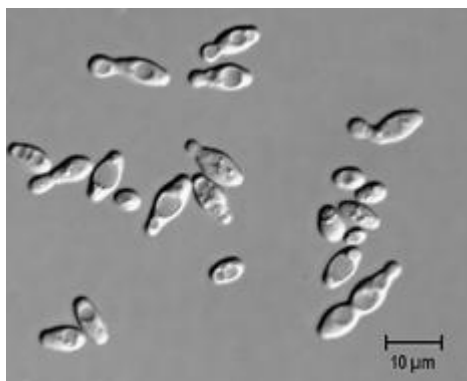


Рис. 47. Дрожжи *Saccharomyces*

Дрожжи класса *Basidiomycetes* представлены родами: *Filobasidium*, *Filobasidiella*.

Типичными представителями несовершенных грибов являются дрожжи рода *Candida*. Клетки дрожжей яйцевидные или удлинённые, иногда неправильной формы. Размножаются многосторонним почкованием. Могут образовывать ложный и истинный мицелий (рис. 48). Спиртовое брожение обнаружено у многих видов. Колонии, образующиеся на плотной питательной среде, могут быть гладкими, складчатыми или морщинистыми с мицелиальным краем. На поверхности жидкой питательной среды формируются плотные пленки.

Отдельные виды используются для получения кормового белка из мелассы, отходов винодельческого и целлюлозно-бумажного производства (*C. utilis*), для получения белково-витаминных концентратов (БВК) из нефтяных углеводов (*C. tropicalis*, *C. guilliermondii*) и метанола (*C. boidini*).

Есть и патогенные дрожжи: *C. albicans* может вызывать заболевание человека – кандидоз.

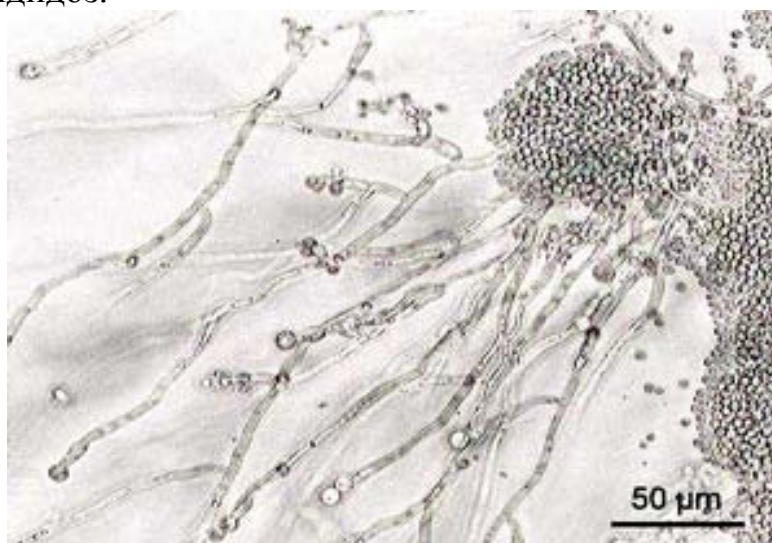


Рис. 48. Патогенные дрожжевые грибы *Candida albicans*

Род *Torulopsis*. Дрожжи этого рода имеют клетки круглые, овальные, яйцевидные, реже – удлиненные. Размножаются многосторонним почкованием. Ни бесполой, ни половой спор не образуют. Колонии бесцветные. Активно сбраживают сахара. Распространены в природе широко, главным образом в сахаросодержащих субстратах. Выделяются из пищевых продуктов. Встречаются в замутившемся пиве, придавая ему неприятный вкус, а также как примесь в прессованных и хлебопекарных дрожжах. Отдельные виды используют в производстве кумыса и кефира.

Род *Cryptococcus*. Дрожжи этого рода имеют преимущественно круглые, овальные, обычно капсулированные клетки ([рис. 49](#)).

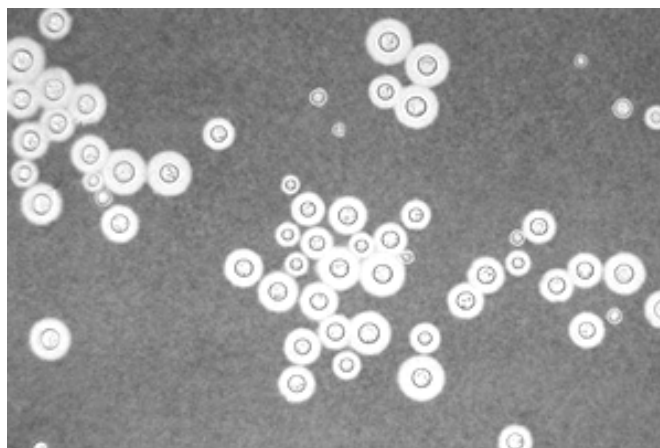


Рис. 49. Дрожжи рода *Cryptococcus*: клетки окружены капсулой

Почкование многостороннее. Истинный и ложный мицелий не образуют. На плотных средах культуры образуют бурые, желтоватые, розоватые, кремовые колонии. Сахара не сбраживают. Большинство видов при кислых значениях pH среды синтезируют крахмалоподобные соединения или внеклеточные полисахариды. Распространены повсеместно, особенно часто выделяются из почв и с растений. Дрожжи этого рода могут быть использованы для получения внеклеточных полисахаридов и белково-витаминных концентратов.

Род *Rhodotorula*. Клетки дрожжей этого рода округлые, овальные или удлиненные. Размножаются многосторонним почкованием, формируют зачатки ложного мицелия. На плотных питательных средах образуют слизистые колонии красного или желтого цветов. Клетки имеют капсулы. Крахмалоподобного вещества не образуют. Сахара не сбраживают. В природе распространены очень широко, многие ассоциированы с живыми растениями и обитают на поверхности листьев как эпифиты. Часто выделяются из пресных и морских водоемов, из воздуха. Такие дрожжи перспективны как источники получения витамина А из каротина и для обогащения этим витамином кормового белка.

Техника микроскопирования дрожжевых грибов

При изучении морфологии дрожжей следует учитывать, что в зависимости от условий выращивания продолжительность их развития и активность размножения их может меняться. Интенсивное размножение характерно для молодых дрожжей (12–16-часовая культура), у зрелых (24–48-часовая культура) процесс почкования замедляется. При наблюдении зрелых дрожжей в поле зрения микроскопа попадают 2–4 % мертвых клеток. Мертвые клетки выявляются с помощью окрашивания метиленовой синью. Раствор метиленовой сини проникает только через оболочки мертвых клеток, в результате чего последние окрашиваются в интенсивно голубой цвет, тогда как живые клетки остаются бесцветными.

Для изучения морфологии дрожжей рекомендуется использовать чистые культуры, выращенные на жидком 6–7 %-м сусле по Баллингу или на сусло-агаре (СА).

Форму и размеры вегетативных клеток, характер вегетативного размножения наблюдают на 24–48-часовых культурах. Из культур дрожжей готовят прижизненные препараты в капле воды и микроскопируют их, пользуясь объективом $\times 40$.

Способность дрожжей к спорообразованию выясняют на 5–10-суточных культурах, выращенных на СА. Однако у некоторых дрожжей способность к спорообразованию установить трудно. Проверить способность дрожжей к спорообразованию можно при переносе культуры на субстрат, не содержащий питательных веществ, где вегетативное размножение дрожжевых клеток будет исключено. В качестве такого субстрата можно рекомендовать пластинки голодного агара. На них высевает взвесь культуры дрожжей из жидкого сусла и выращивают в термостате при 22–25 °С.

Из материала, культивируемого на признак спорообразования дрожжей, готовят прижизненные препараты и микроскопируют их, пользуясь объективом $\times 40$. Просматривая препараты, прежде всего обращают внимание на способ спорообразования (из зигот или вегетативных клеток) и на форму спор (шаровидные, овальные, бобовидные и т. д.).

Как правило, дрожжевые клетки содержат значительное количество разнообразных запасных компонентов: волютиновые зерна, гранулёзу, гликоген, жировые включения. Для выявления этих включений пользуются окраской фиксированных препаратов по методу Муромцева. Готовят фиксированный мазок, затем окрашивают его в течение 1 минуты краской по Муромцеву, которая содержит раствор фуксина основного 0,16 г, спирт этиловый 96 %-й 20 мл, воду дистиллированную 200 мл. На препарате зёрна волютина должны быть окрашены в фиолетовый цвет, цитоплазма – в голубой.

Задание

Ознакомиться с характерными особенностями строения дрожжевых грибов.

План выполнения работы



1. Из культуры дрожжей рода *Saccharomyces* приготовить препарат типа «раздавленная капля». Промикроскопировать препарат с объективом $\times 40$. Рассмотреть и зарисовать форму клеток и их строение: цитоплазму, вакуоли и включения запасных питательных веществ. Цитоплазма обнаруживается при микроскопировании как более темная зернистая масса, вакуоли имеют вид светлых просвечивающихся пятнышек. Капли жира светлые, блестящие благодаря сильному преломлению света; включения имеют вид плотных зернышек. Найти и зарисовать почкующиеся клетки.

2. Окрасить препарат раствором метиленовой сини до темно-голубого цвета. Отметить наличие живых (почкующихся) клеток и окрашенных в синий цвет (мертвых).

3. Из материала, культивированного на признак спорообразования дрожжей, приготовить препарат и промикроскопировать. Отметить способ спорообразования, форму спор. Зарисовать.

4. Приготовить фиксированные препараты дрожжей и окрасить их краской по Муромцеву. Промикроскопировать с иммерсионным объективом, отметить цвет зерен волютина и цитоплазмы.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. В чем заключаются особенности морфологического строения дрожжевых грибов?
2. Каковы причины мицелиально-дрожжевого диморфизма?
3. Какими способами осуществляется размножение у дрожжевых грибов?
4. Какими признаками характеризуются аскомицетовые дрожжи?
5. Какие дрожжевые грибы широко используются в пищевой промышленности?
6. Какими признаками характеризуются аспорогенные дрожжи?
7. Имеются ли среди дрожжевых грибов патогенные для человека виды? Какие заболевания они вызывают?
8. Какие промышленно важные биологически активные вещества образуют дрожжи?
9. Какое значение в природе имеют дрожжевые грибы?
10. Как дрожжи используются в хозяйственной деятельности человека?

ЗАНЯТИЕ 12

ТЕМА: МЕТАБОЛИЗМ АЗОТА. СВОБОДНОЖИВУЩИЕ И СИМБИОТИЧЕСКИЕ АЗОТФИКСАТОРЫ. СЕМЕЙСТВА *AZOTOBACTERIACEAE* И *RHIZOBIACEAE*

Процесс фиксации азота – это в основном биологический процесс, и единственными организмами, способными его осуществлять, являются бактерии. Свыше 90 % общей фиксации азота обусловлено метаболической активностью определенных бактерий.

Уникальные по своей метаболической способности азотфиксирующие микроорганизмы имеют ферментный комплекс – нитрогеназу, активирующую инертную молекулу атмосферного азота, имеющую тройную связь между атомами азота $N \equiv N$. Процесс восстановления молекулы азота до аммиака требует затраты больших количеств энергии и идет через ряд промежуточных продуктов.

Образование нитрогеназы связано с наличием в клетках азотфиксирующих микроорганизмов *nif*-плазмиды, которая содержит *nif*-ген, регулирующий синтез этого белка. Передача *nif*-плазмиды от одного вида бактерий к другому может привести к появлению азотфиксирующей способности у новых видов микроорганизмов.

Кислород репрессирует синтез нитрогеназы. Ее активность проявляется при низкой концентрации кислорода в газовой среде. Даже аэробные азотфиксаторы осуществляют процесс фиксации азота в микроаэробных условиях, для создания которых у них имеются различные защитные приспособления. Так, свободноживущий аэробный азотфиксатор *Azotobacter* образует слизь, препятствующую диффузии кислорода в клетки и тем самым созданию вокруг них микроаэробной зоны. К тому же азотобактер часто находится в ассоциации с неазотфиксирующими аэробами, защищающими нитрогеназу азотобактера от доступа кислорода.

Способность микроорганизмов фиксировать азот атмосферы и обогащать им почву нашла применение в сельском хозяйстве. На основе использования таких микроорганизмов, как клубеньковые бактерии и азотобактер, получают бактериальные удобрительные препараты нитрагин и азотобактерин. Биологическая фиксация азота в природе осуществляется свободноживущими и симбиотическими бактериями. Микроорганизмами, способными к симбиотической фиксации азота, являются бактерии рода *Rhizobium*. К наиболее важным микроорганизмам, осуществляющим не симбиотическую фиксацию азота, относятся цианобактерии (*Anabaena* и *Nostoc*), *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Bacillus polymyxa*, *Clostridium* и др.

Семейство Azotobacteriaceae

Семейство объединяет свободноживущие азотфиксирующие бактерии, отнесенные к группе 4 определителя Берджи (1997). Это представители нескольких родов: *Azotobacter*, *Azomonas*, *Agromonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*. Это крупные палочковидные клетки, неспорообразующие, облигатные аэробы, хемоорганогетеротрофы, обитатели воды, почвы и поверхности растений, главной особенностью которых является способность фиксировать молекулярный азот.

Бактерии рода *Azotobacter* относятся к свободноживущим микроорганизмам, способным фиксировать молекулярный азот. Азотобактер обнаружен и выделен в чистую культуру в 1901 г. Бейеринком. В молодой культуре это крупные (1,5–2,0 мкм), подвижные (жгутики расположены полярно или перетрихиально) палочковидные, овальные или кокковидные клетки, располагающиеся попарно либо в коротких цепочках из четырех и более клеток, объединенных макрокапсулой. С возрастом клетки меняют форму, превращаясь в крупные кокки, часто соединенные попарно и имеющие общую капсулу. В старых культурах характерно образование цист ([рис. 50](#)).



Рис. 50. Бактерии рода *Azotobacter*: вегетативные клетки (слева) и цисты (справа)

На твердых средах колонии имеют характерный слизистый вид из-за образующегося в большом количестве внеклеточного полисахарида. Некоторые штаммы синтезируют флуоресцирующий водорастворимый пигмент. Все виды – аэробы, но могут расти при пониженном парциальном давлении кислорода. Хемоорганотрофы. В качестве источника азота могут использовать аммонийные соли, нитраты, нитриты и аминокислоты, в отсутствие названных форм азота фиксируют молекулярный азот. Используют многие источники углеродного питания: миносакхара, дисахариды, некоторые полисахариды (крахмал), различные спирты, органические кислоты. Азотобактер очень требователен к субстрату, реагирует на дефицит кальция и фосфора, не выносит кислой среды и более влаголюбив, чем другие почвенные бактерии.

Типовой вид рода – *Azotobacter chroococcum*. Для него характерно образование водорастворимого темного пигмента – меланина, который окра-

шивает колонии в бурый, почти черный цвет. В лабораторных условиях культивируется на безазотистой среде Эшби.

Типичный представитель рода *Azomonas* – *A. agilis*. Это крупные палочковидные или почти сферические клетки диаметром 2 мкм. Располагаются одиночно, в парах или группах. Подвижные перитрихи, обитающие в почве и пресной воде. Почти все штаммы образуют водорастворимые флуоресцирующие пигменты. Хемоорганотрофы. Во многом сходны с азотобактером, но не образуют цист. Для азотфиксации нуждаются в молибдене.

Род *Agromonas* описан в 1983 г. и включает единственный вид *A. oligotrophica*. Клетки бактерий изогнутые, разветвленные и почкующиеся, соединенные в виде розеток, подвижные за счет полярного жгутика. Колонии бесцветные. Олиготрофы, т. е. могут расти в среде, содержащей менее 1 мг органического углеродного субстрата в 1 л. Используют сахара и органические кислоты. Аэробы. Фиксируют атмосферный азот при низком парциальном давлении кислорода.

Род *Beijerinckia*. Это прямые или слегка изогнутые палочки, размером 0,5–1,5 × 1,7–4,5 мкм, располагаются одиночно. Иногда встречаются крупные клетки до 5–6 мкм. Могут содержать сильно преломляющие свет внутриклеточные гранулы поли-β-гидроксибутирата. Некоторые виды способны образовывать капсулы и цисты. Подвижные или неподвижные. Фиксируют молекулярный азот в аэробных и микроаэробных условиях. При росте на агаризованной среде, особенно в условиях азотфиксации, выделяют обильную плотную эластичную слизь и образуют гигантские колонии с гладкой или складчатой поверхностью. Используют сахара (глюкозу, фруктозу, сахарозу), не растут на среде с пептоном. Встречаются в почвах, особенно часто в тропическом поясе.

Род *Derxia*. Клетки бактерий крупные, палочковидные, одиночные или в коротких цепочках, плеоморфные, подвижные. Фиксируют молекулярный азот в аэробных и микроаэробных условиях. Культуры, растущие в жидкой среде, превращаются в гелеобразную массу, однако вблизи поверхности рост более интенсивный, с образованием толстой пленки. На плотной среде колонии слизистые, массивные, с морщинистой поверхностью. Старые колонии имеют красно-коричневый цвет. Единственный вид этого рода – *D. gummosa* – обнаружен в тропических почвах.

Семейство *Rhizobiaceae*

В состав семейства входят бактерии, функционально не идентичные друг другу. Их общая особенность – формирование связей с растениями и способность вызывать разрастание тканей растения хозяина в виде корневых клубеньков, галлов и т. д.

Род *Agrobacterium* – палочковидные бактерии с дыхательным типом метаболизма. Колонии гладкие, морщинистые или шероховатые, не пигментированные. Хемоорганотрофы. Бактерии рода *Agrobacterium* не обладают азотфиксирующей способностью. Источниками азота для них могут служить

соли аммония, нитраты, аминокислоты, некоторым штаммам необходимы дополнительные факторы роста.

За исключением *A. radiobacter*, бактерии рода *Agrobacterium* являются внутриклеточными паразитами, они проникают в ткань растения-хозяина через повреждения и вызывают опухоли на корнях и стеблях разных видов растений (например, на малине, винограде и др.). Вызываемые болезни известны как галл корончатый, волосяной корень, бактериальный рак стеблей. Индукция опухолей связана с присутствием в клетках бактерий Ti-плазмиды. Онкогенные штаммы встречаются в почвах, куда ранее попадал пораженный растительный материал.

Среди других бактерий, патогенных для растений, известны представители родов *Rhizobacter* (вызывают образование галлов на корнях моркови), *Rhizomonas* (вызывают опробковение корней у латука). Они так же, как и агробактерии, не обладают азотфиксирующей способностью.

В род *Rhizobium* (клубеньковые бактерии) объединены бактерии, вызывающие образование клубеньков на корнях бобовых растений и способные фиксировать азот в условиях симбиоза с ними.

Это обычные обитатели почвы, которые не могут гидролизовать клетчатку, и потому они проникают в ткань корня через те места корневых волосков, где клетчатки нет. Используя углеводы сока растения или углеводы из почвы, бактерии синтезируют слизистое вещество. Такие окруженные слизью клетки продвигаются в тканях, образуя длинную инфекционную нить. Инфекционные нити проникают в корень. Они стимулируют деление тетраплоидных клеток корня, приводящее к образованию клубенька. В нем происходит интенсивное размножение бактерий. В молодых клубеньках большинство бактериальных клеток имеют форму палочек. Бактерии усиленно размножаются, в 10–12 раз увеличиваются в размерах, меняют форму, превращаясь в бактериоиды – крупные клетки причудливой формы: угловатой, звездчатой и др. (рис. 51).

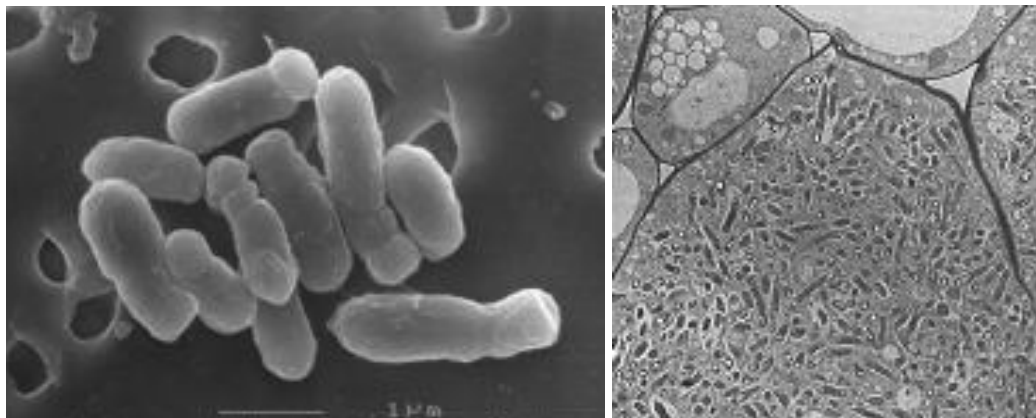


Рис. 51. Клубеньковые бактерии: вегетативные клетки (слева) и бактериоиды в клубеньке (справа)

В бактериоидах происходит активная фиксация азота. Бактериоиды можно рассматривать как дифференцированные формы, приспособленные для наилучшего осуществления определенной функции

В первую очередь, это связано с контролированием поступления в бактериоиды молекулярного кислорода, которое осуществляется с помощью находящегося в клубеньках леггемоглобина, цитоплазматического гемопротеина, в синтезе которого участвуют растение и бактерии. Апогемоглобин (белок без гема) синтезирует растение. За синтез гема ответственны бактериоиды. Леггемоглобин, обладающий, как и гемоглобин, высоким сродством к кислороду, переносит его к бактериоидам в количестве, необходимом для обеспечения их энергией, и в то же время защищает бактериоиды от избытка кислорода путем его связывания. К фиксации азота способны только клубеньки, содержащие леггемоглобин; ткань такого клубенька имеет красноватую окраску.

Отношения между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями можно определить как мутуализм, т. е. такой вид симбиоза, при котором оба симбионта извлекают выгоду из сожительства: растение получает азот, клубеньковые бактерии – углеродсодержащие вещества и минеральные соли.

Показана способность различных видов клубеньковых бактерий фиксировать азот без какой-либо связи с растительными клетками. Для этого необходимо обеспечить клубеньковые бактерии подходящими источниками углерода (преимущественно пентозами), минимальным количеством фиксированного азота и промежуточными соединениями ЦТК. Свободноживущие клубеньковые бактерии синтезируют свой собственный гемоглобин, отличающийся структурно, но не функционально от леггемоглобина.

Описано несколько видов бактерий рода *Rhizobium*. Все они специфичны в отношении растений-хозяев. Название клубеньковых бактерий определяется в основном растением-хозяином: *R. leguminosarum* живет в симбиозе с горохом и викой, *R. phasoli* – симбионт бобов рода *Fasolium*, *R. trifolii* – живет в симбиозе с различными сортами клевера.

Род *Azorhizobium* был описан в 1988 г. Это подвижные аэробные палочки, растут на агаризованной среде, а также эффективно образуют клубеньки на корнях и стеблях растений (*Sesbania rostrata*). Фиксируют молекулярный азот в микроаэробных условиях, особенно хорошо в среде без азота в присутствии витаминов. Симбиотические азотфиксаторы рода *Sinorhizobium* не имеют широкого спектра хозяев, но вызывают образование клубеньков у бобовых растений (*Glycine soja*, *Glycine max*, *Vigna*, *Cajanus* и др.).

Бактерии рода *Bradyrhizobium* встречаются на корнях тропических бобовых растений, а у определенных растений (семейства мирзиновые и мареновые) – бактерии рода *Phyllobacterium*.

Получение накопительной культуры азотфиксаторов

Для накопления свободноживущих азотфиксаторов используют среду Эшби, не содержащую минеральных и органических источников азота. Среду разливают в колбы слоем 1–1,5 см, заражают почвой и инкубируют при

температуре 28–30 °С. Через 5–7 суток на поверхности среды образуется жирная пленка, сначала серовато-белая, а затем постепенно буреющая. Микроскопируя пленку, можно обнаружить клетки азотфиксирующих бактерий.

Задание

Изучить особенности морфологии бактерии семейств *Azotobacteriaceae* и *Rhizobiaceae*.

План выполнения работы

1. Приготовить и рассмотреть с иммерсионной системой прижизненный препарат из накопительной культуры *Azotobacter*.
2. Выявить капсулу методом негативного контрастирования. Для этого каплю исследуемой культуры поместить в каплю разбавленного фуксина, а затем смешать с каплей туши и закрыть покровным стеклом. Тушь заполняет пространство, окружающее клетки, в результате чего хорошо видны не окрашивающиеся капсулы.
3. Приготовить и просмотреть прижизненный препарат бактерий из клубенька бобового растения.
4. Сделать зарисовки.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Как происходит процесс фиксации азота у бактерий? В чем заключается экологическое и практическое значение фиксации азота?
2. В какой клеточной структуре находятся гены, кодирующие нитрогеназный комплекс?
3. Какие представители относятся к свободноживущим азотфиксаторам?
4. Какими признаками характеризуется род *Azotobacter*?
5. Какие представители относятся к симбиотическим азотфиксаторам?
6. Как происходит образование корневых клубеньков? Что такое бактериоды?
7. Какую функцию выполняет леггемоглобин в клубеньках бобовых растений?
8. Какое влияние оказывает кислород на процесс фиксации азота?
9. Как получают накопительные культуры азотфиксаторов?
10. Какие функции выполняют капсулы азотобактера? Какими методами можно выявить капсулы при микроскопировании?

ЗАНЯТИЕ 13

ТЕМА: МЕТАБОЛИЗМ АЗОТА. ХЕМОЛИТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ. ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА *NITROBACTERIACEAE*

Микроорганизмы, использующие в качестве источника энергии окисление минеральных веществ, называются литотрофами. К 12-й группе определителя Берджи относятся прокариоты, получающие энергию за счет окисления восстановленных неорганических соединений серы, железа или марганца, а также азота. В зависимости от химической природы окисляемых неорганических соединений группа разделена на три подгруппы.

Бесцветные сероокисляющие бактерии

Это очень гетерогенная группа, в которую объединены бактерии семейства *Thiobacillaceae*, способные окислять неорганические восстановленные или частично окисленные соединения серы: H_2S , S^0 и др. Использование этого свойства в качестве таксономического критерия привело к объединению в одной группе многих таксономически не взаимосвязанных родов. Среди бесцветных серобактерий встречаются фактически все известные формы клеток и типы подвижности, диапазон pH от 1,0 до 10,5. Отношение к температуре также различно, есть термофилы (*Thermotrix*), мезофилы (*Thiobacillus*). В основном это грамотрицательные аэробы, некоторые способны к денитрификации (*Thiobacillus denitrificans*). Хемолитотрофы. Некоторые представители могут фиксировать CO_2 (*Thiomicrospira*, *Thiobacillus*), а также использовать органические соединения в качестве источников углерода и энергии.

Бесцветные серобактерии обнаруживаются везде, где есть восстановленные соединения серы. Это обитатели почвы, водоемов, вулканических источников, серных ключей или серных месторождений, где образуется сероводород или откладывается сера. Их можно обнаружить невооруженным глазом по наличию обильных белых отложений серы, взвесей, тяжей, розеток или пленок.

Железо- и марганцеокисляющие и/или осаждающие бактерии

Железобактерии получают энергию в процессе окисления кислородом воздуха двухвалентного железа (Fe^{2+}) до трехвалентного (Fe^{3+}).

Они способны откладывать оксиды железа или марганца вне клетки – в капсулах, на внеклеточном материале. Оксиды хорошо заметны при наблюдении в световой микроскоп и служат в качестве основного признака для отнесения организмов к этой подгруппе. Клетки бактерий разнообразной морфологии, располагаются в характерных агрегатах. Это экологически важная

группа бактерий, которые в большинстве не получены в культуре и классифицированы главным образом на основе морфологических признаков.

В состав подгруппы входит семейство *Siderocapsaceae*, включающее бактерии родов *Siderocapsa*, *Siderococcus*, *Sulfobacillus* и др. Хемолитотрофы и хемоорганогетеротрофы, аэробы. В основном обитают в железосодержащих водах.

Нитрифицирующие бактерии

В подгруппу включены грамотрицательные бактерии, объединенные в семейство *Nitrobacteraceae*.

Семейство *Nitrobacteriaceae* (рис. 52) объединяет высокоспециализированные по своей физиологии группы аэробных грамотрицательных бактерий. Они могут расти в строго минеральной среде в темноте, образуя органическое вещество клетки из углекислоты; АТФ и восстановитель – при окислении неорганического субстрата в процессе дыхания. Такой способ жизни встречается только у прокариотов. Он был открыт в 1880–1890 гг. С. Н. Виноградским.

Для нитрифицирующих бактерий источником энергии являются реакции окисления аммиака до азотистой кислоты, а затем до азотной кислоты:

1 фаза: $2\text{NH}_3 + 3\text{O}_2 = 2\text{HNO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{энергия}$.

2 фаза: $2\text{HNO}_2 + \text{O}_2 = 2\text{HNO}_3 + \text{энергия}$.

Соответственно подгруппа разделена на две секции: А – бактерии, окисляющие нитрит и Б – бактерии, окисляющие аммиак.

Секция А. Бактерии, окисляющие нитрит.

Группа морфологически разнообразных организмов: палочковидной, эллипсоидной, сферической или спиральной форм. Грамотрицательные. Клетки подвижные или неподвижные. В случае подвижности жгутики полярные или латеральные. Аэробы. Как исключение представители *Nitrobacter* могут расти за счет анаэробного дыхания. В присутствии органических субстратов и нитратов образуют NO и N₂O. Известен один штамм *Nitrobacter*, способный окислять NO до нитрата. Хемолитоавтотрофы; получают энергию для роста путем окисления нитрита до нитрата. Фиксацию CO₂ осуществляют в цикле Кальвина. Мезофилы; температурный оптимум 28 °С, диапазон pH 5,8–8,5, оптимум 7,6–7,8.

Одноклеточные; обладают способностью образовывать микроколонии, которые состоят из слабосвязанных между собой клеток, погруженных в полисахаридный слой, или из плотно упакованных клеток, окруженных плотным слизистым слоем. Биопленку описывают как зооглеи или цисты. Нитритокисляющие бактерии находят в аэробных, а также иногда в анаэробных местообитаниях, где происходит минерализация органического вещества. Они широко распространены в почвах, в пресной, солоноватой и морской воде, в иловых отложениях, в системах переработки сточных вод, в камнях исторических зданий и горных породах, а также обнаружены в коррелиро-

ванных кирпичах и на поверхностях бетонных сооружений, таких как охлаждающие башни и автомобильные туннели.

Род *Nitrobacter*. Клетки палочковидные, грушевидные или плеоморфные. Обычно размножаются почкованием. Подвижные или неподвижные. Движение за счет одного субтерминального или латерального жгутика. Содержат внутрицитоплазматические мембраны в виде полярных уплощенных везикул в периферической части протоплазмы. Клетки, выращенные литоавтотрофно или миксотрофно, всегда содержат карбоксисомы. Дополнительные включения – гранулы поли-β-гидроксibuтирата и полифосфаты. Факультативные литоавтотрофы. Основным источником энергии служит нитрит. Возможен миксотрофный рост. В присутствии нитрита и органических веществ часто происходит двухфазный рост: сначала клетки используют нитрит, а затем, после лаг-фазы, окисляют органическое вещество. Хемоорганотрофный рост медленный и несбалансированный, с накоплением больших количеств гранул поли-β-гидроксibuтирата, искажающих форму и размеры клеток. Все наземные (почвенные и пресноводные) бактерии, окисляющие нитрит, относятся исключительно к роду *Nitrobacter*. Виды, распространенные в океанах, обычно облигатно галофильные. Типовой вид: *Nitrobacter winogradskyi*.

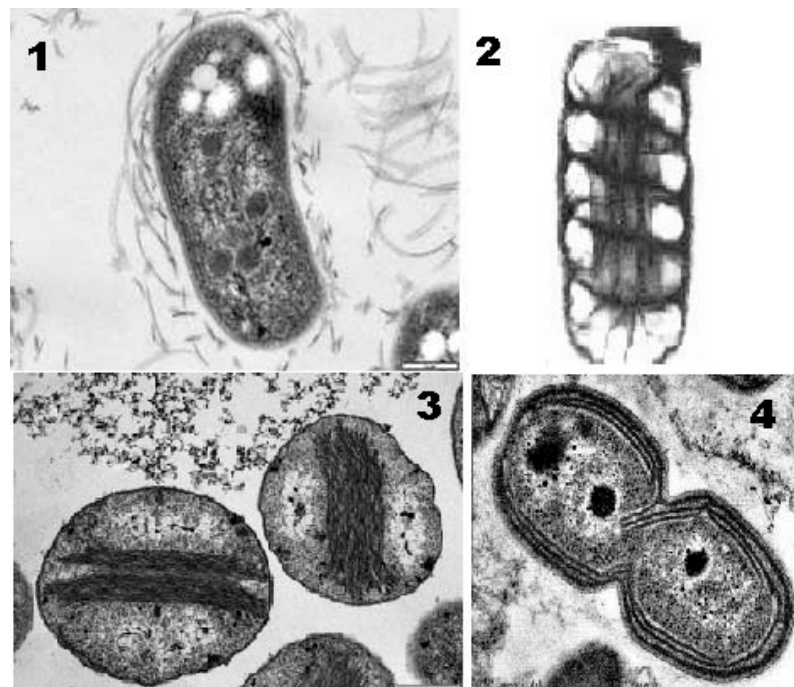


Рис. 52. Нитрифицирующие бактерии

1 – *Nitrobacter*, 2 – *Nitrospira*, 3 – *Nitrosococcus*, 4 – *Nitrosomonas*

Род *Nitrospina*. Тонкие палочки. В стационарной фазе роста и в старых культурах часто присутствуют сферические формы диаметром 1,4–1,5 мкм. Неподвижные. Системы внутрицитоплазматических мембран отсутствуют, но иногда при электронной микроскопии тонких срезов видны инвагинации цитоплазматической мембраны. Аэробы; облигатные хемолитоавтотрофы. Единственный способ получения энергии – окисление нитрита до нитрата. Основной источник углерода – CO₂. Облигатные галофилы, нуждающиеся

для роста в 70–100 %-й морской воде. Обнаружены только в морской среде. Типовой (и единственный) вид: *Nitrospina gracilis*.

Род *Nitrococcus*. Клетки сферические. Одиночные клетки перед бинарным делением слегка удлиняются. После деления располагаются парами. Подвижные за счет одного или двух жгутиков. Внутрицитоплазматические мембраны в виде трубочек расположены по всей цитоплазме. Содержат карбоксисомы. Аэробы; облигатные хемолитоавтотрофы. Мезофилы. Основной способ получения энергии для роста – окисление нитрита до нитрата. Основной источник углерода – CO₂. Облигатные галофилы. Для роста оптимальна среда на основе 70–100 %-й морской воды. Выделены только из морской среды. Типовой (и единственный) вид: *Nitrococcus mobilis*.

Род *Nitrospira*. Клетки от слабо закрученных спиральных до вибриоидных, шириной 0,3–0,4 мкм. Подвижности не наблюдается. Внутрицитоплазматические мембраны отсутствуют. Периплазматическое пространство необычно широкое, в два раза шире, чем у других грамотрицательных бактерий. Хемолитоавтотрофы. Единственным источником энергии служит нитрит, но рост в миксотрофных условиях лучше, чем в литоавтотрофных. В присутствии нитрита и органических веществ время генерации уменьшается с 90 до 23 часов и увеличивается урожай клеток. Для роста необходима морская вода. Оптимальна среда, содержащая 70–100 %-ю морскую воду плюс нитрит, пируват, глицерол, а также дрожжевой экстракт или пептон. Выделены из различных морских местообитаний, таких как океанические воды и морские осадки. В единственном случае описано выделение накопительной культуры из проб почвы, отобранных в Намибии. Типовой (и единственный) вид: *Nitrospira marina*.

Секция В. Бактерии, окисляющие аммиак.

Клетки палочковидные, сферические, спиральные или дольчатые. Грамотрицательные. У подвижных клеток жгутики полярные, субполярные или перитрихиальные. Бактерии всех видов – аэробы, но могут расти при пониженном парциальном давлении кислорода. Хемоавтотрофы, использующие в качестве энергетического субстрата аммиак и как основной источник углерода – CO₂. Обычно оптимальная температура для роста 30 °С, оптимум pH в пределах 7,5–8,0. В накопительных, но не в чистых культурах клетки часто образуют скопления, называемые зооглеями или цистами. Виды распространены в разнообразных почвах, океанах, солоновато-водных средах, реках, озерах и в системах переработки сточных вод.

Род *Nitrosomonas*. Обычно прямые палочки, но часто встречаются кокковидные формы. Для некоторых видов характерна подвижность за счет полярного жгутикования. Клеточная стенка типичная для грамотрицательных бактерий, но у морских видов обнаружен дополнительный наружный белковый слой. По периферии цитоплазмы расположены внутрицитоплазматические мембраны в виде уплощенных везикул.

Клетки некоторых, но не всех штаммов содержат карбоксисомы. Некоторые виды способны использовать как источник аммиака мочевины за счет

активности уреазы. Органические соединения могут ассимилироваться в ограниченном количестве и стимулировать литотрофный рост. Виды распространены в океанах, солоновато-водных средах, реках, озерах, сточных водах и почвах. Бактерии из морских местообитаний, как правило, облигатные галофилы. Типовой вид *Nitrosomonas europaea*.

Род *Nitrosococcus*. Клетки от сферических до эллипсоидных. Клеточная оболочка типична для грамотрицательных бактерий, но у морских видов обнаружен дополнительный наружный слой клеточной стенки. Некоторые виды могут использовать мочевины в качестве источника аммиака. Органические соединения ассимилируют в ограниченном количестве. За исключением типового вида, выделенного из почвы, виды *Nitrosococcus* облигатно галофильные, и их распространение ограничено морскими и солоновато-водными средами. Типовой вид *Nitrosococcus nitrosus*.

Род *Nitrospira*. Клетки в виде туго скрученных спиралей шириной 0,3–0,4 мкм, с 3–20 витками. Жгутикование у подвижных клеток перитрихальное. Развитой системой внутрицитоплазматических мембран не обладают, но часто наблюдаются инвагинации цитоплазматической мембраны в протоплазму. Большинство штаммов может использовать мочевины в качестве источника аммиака и ассимилировать в ограниченном количестве органические вещества. Распространены в почвах и пресноводных средах. Типовой вид *Nitrospira briensis*.

Род *Nitrosolobus*. Клетки плеоморфные, дольчатые. Протоплазма разделена на доли инвагинациями цитоплазматической мембраны. Подвижные клетки имеют перитрихальное жгутикование. Большинство штаммов использует мочевины в качестве источника аммиака и может ассимилировать в ограниченном количестве органические соединения. Представители *Nitrosolobus* выделены только из почвы. Типовой вид *Nitrosolobus multiformis*.

Род «*Nitrosovibrio*». Изогнутые тонкие палочки. В начале стационарной фазы роста наблюдаются сферические формы. Подвижные клетки обладают 1–4 жгутиками, полярными или субполярными. Развитые внутрицитоплазматические мембраны отсутствуют, однако наблюдаются инвагинации мембраны в протоплазму. Большинство штаммов может использовать мочевины в качестве источника аммиака. Органические соединения ассимилируют в ограниченном количестве. Все изоляты «*Nitrosovibrio*» выделены из почвы или камней зданий. Типовой вид «*Nitrosovibrio tenuis*».

Особенности метаболизма хемолитоавтотрофов

Литотрофные микроорганизмы отрывают электроны от минеральных соединений и направляют их по цепи переноса электронов, построенной в основном так же, как у аэробных хемоорганогетеротрофных микроорганиз-

мов. Используемые в качестве донора электронов минеральные соединения характеризуются различным окислительно-восстановительным потенциалом. Поэтому оторванные от них электроны могут поступать на различные участки дыхательной цепи. Например, при отрыве электронов от солей железа, тиосульфатов и нитратов последние могут поступать только на уровне цитохрома *c*. Направляясь далее через цитохромоксидазу к кислороду воздуха, они могут обеспечить только в одном месте образование АТФ. Микроорганизмы, окисляющие сульфиды и аммиак, направляют электроны на участок ФАД, поэтому прохождение таких электронов по цепи приводит к образованию только двух молекул АТФ. Включение электронов в цепь на уровне ФАД или цитохрома *c* не приводит к образованию НАД-Н₂ – носителя водорода, который используется в качестве восстановителя в биосинтетических процессах. Поэтому литотрофы направляют часть электронов от окисляемого минерала по дыхательной цепи в сторону НАД⁺ для образования НАД-Н₂, затрачивая на это энергию, т. е. молекулы АТФ, образуемые на конечном этапе дыхательной цепи, тратятся также и на образование НАД-Н₂. Поэтому литотрофные микроорганизмы вынуждены окислять дополнительно большее количество минералов. Таким образом, у литотрофных микроорганизмов дыхательная цепь работает в двух направлениях – от цитохрома *c* до кислорода с образованием АТФ при прямом переносе электронов, а от цитохрома *c* в сторону НАД⁺ для образования НАД-Н₂ с затратой АТФ происходит обратный перенос электронов.

Получение накопительной культуры нитрифицирующих бактерий

Чтобы получить культуры нитрифицирующих бактерий, используют минеральные среды, предложенные С. Н. Виноградским. Для возбудителей первой фазы питательная среда содержит сульфат аммония в качестве источника азота, а для возбудителей второй фазы – нитрит натрия. Среда разливают в колбы слоем 1–1,5 см и культивируют в течение 2–3 недель. Присутствие нитрификаторов в культуре определяют при микроскопировании и по качественным реакциям на наличие нитритов и нитратов в культуральной жидкости.

Задание

Изучить особенности морфологии нитрифицирующих бактерий.

План выполнения работы

1. Приготовить прижизненные препараты накопительных культур I и II фаз нитрификации, подкрасить метиленовым иним и промикроскопировать. Сделать зарисовки.
2. Проверить изменение среды по фазам нитрификации. С этой целью в

средах для возбудителей I фазы нитрификации проводят качественную реакцию на азотистую кислоту реактивом Грисса. Несколько кристалликов реактива добавляют к 2–3 мл культуры и подогревают суспензию; появление малиновой окраски указывает на наличие нитритов.

3. В средах для возбудителей II фазы нитрификации проводят реакцию на азотную кислоту дифениламином. Дифениламин вызывает синее окрашивание в присутствии не только азотной, но и азотистой кислоты. Поэтому для определения наличия азотной кислоты азотистую кислоту необходимо предварительно исключить, что достигается добавлением к среде мочевины. К 1 мл культуры добавляют несколько мг мочевины (на кончике скальпеля), 10 капель крепкой серной кислоты и 10 капель реактива дифениламина. Интенсивное синее окрашивание свидетельствует о присутствии азотной кислоты.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие микроорганизмы называются хемолитоавтотрофами? Кто обнаружил такой способ существования бактерий?
2. На какие подгруппы делятся хемолитоавтотрофные бактерии? Какой признак лежит в основе этого деления?
3. Где обнаруживаются бесцветные сероокисляющие бактерии? Какова их роль в природе?
4. Какими признаками характеризуются железобактерии?
5. Какую фазу нитрификации осуществляют бактерии рода *Nitrospira*?
6. Какую фазу нитрификации осуществляют бактерии рода *Nitrosococcus*?
7. Как можно получить накопительную культуру нитрифицирующих бактерий? Какие факторы используются для создания элективных условий?
8. Какие качественные реакции позволяют выявить наличие нитратов и нитритов в культуральной жидкости?
9. В чем заключается особенность дыхательной цепи хемолитоавтотрофных бактерий?
10. К каким подгруппам хемолитоавтотрофных бактерий относятся представители родов *Thiobacillus*, *Siderocapsa*, *Nitrobacter*?

ЗАНЯТИЕ 14

ТЕМА: МИКРООРГАНИЗМЫ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ МАСЛЯНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ. БАКТЕРИИ РОДА *CLOSTRIDIUM*

Маслянокислое брожение

Масляная кислота (бутират), *n*-бутанол, ацетон, 2-пропанол и ряд других органических кислот и спиртов являются типичными продуктами сбраживания углеводов анаэробными спорообразующими бактериями рода *Clostridium*. Продукты брожения образуются в разных соотношениях, кроме того, в большом количестве образуются газы H_2 и CO_2 .

Превращение глюкозы до пирувата осуществляется по гликолитическому пути. Следующая реакция (ключевая) – разложение пирувата до ацетил-КоА и CO_2 .

Путь, ведущий к синтезу масляной кислоты, начинается с реакции конденсации двух молекул ацетил-КоА. Он не связан с получением клеткой энергии (восстановительный), функция – акцептирование водорода, образовавшегося в процессе гликолиза. В связи с этим особое значение приобретает превращение ацетил-КоА, ведущее к синтезу ацетата, поскольку именно с этим путем связано дополнительное получение энергии в процессе маслянокислого брожения (при этом синтезируется молекула АТФ).

Основным источником выделяемых при брожении газообразных продуктов (CO_2 и H_2) служит реакция окислительного декарбоксилирования пирувата. У клостридий описаны и другие пути образования молекулярного водорода.

Выведение уравнения маслянокислого брожения и определение его энергетического выхода затруднительно из-за лабильности процесса, состоящего из двух основных ответвлений: одного – окислительного, ведущего к образованию ацетата и АТФ, другого – восстановительного. Количественное соотношение между обоими ответвлениями зависит от многих внешних факторов (состав среды, стадия роста и др.). В целом на 1 моль сбраживаемой глюкозы в маслянокислом брожении образуется 3,3 моля АТФ. Это наиболее высокий энергетический выход брожения.

Некоторые клостридии (*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. cellobioparum* и др.) при сбраживании сахаров наряду с кислотами накапливают в среде нейтральные продукты (бутиловый, изопропиловый, этиловый спирты, ацетон). Это дало основание выделить как вариант маслянокислого брожения ацетоно-бутиловое брожение.

У клостридий, осуществляющих ацетоно-бутиловое брожение, образование масляной кислоты происходит на первом этапе брожения. По мере подкисления среды (рН ниже 5) и повышения в ней концентрации жирных

кислот, индуцируется синтез ферментов, приводящих к накоплению нейтральных продуктов (*n*-бутанола и ацетона). Накопление продуктов нейтрального характера приводит к снижению кислотности среды.

Маслянокислые бактерии

Род *Clostridium* (рис. 53) – это один из самых крупных родов среди бактерий. Принадлежность к роду определяется на основании трех признаков: 1) способности образовывать эндоспоры; 2) облигатно анаэробного характера энергетического метаболизма; 3) неспособности осуществлять диссимиляционное восстановление сульфата.

Большинство видов грамположительные, подвижные. Движение осуществляется с помощью перитрихально расположенных жгутиков. По мере старения в процессе развития клетки теряют подвижность, накапливают гранулу (запасное вещество типа крахмала) и переходят к спорообразованию. Образующиеся споры овальной или сферической формы. Диаметр их, как правило, превышает диаметр вегетативной клетки, поэтому, если формирующаяся спора расположена в центре клетки, последние меняют форму, становясь веретеновидными (рис. 52, 2); если же споры образуются у одного из клеточных концов, клетки приобретают форму барабанных палочек.

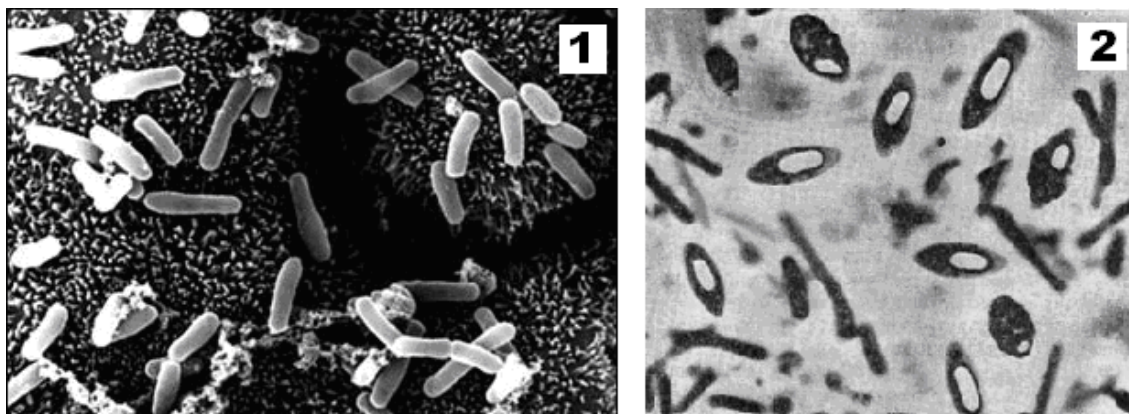


Рис. 53. Клостридии:

- 1 – *Clostridium difficile* (электронная микроскопия),
2 – *Clostridium pasteurianum* (световая микроскопия)

За исключением *C. coccoides*, вегетативные клетки бактерий из рода *Clostridium* имеют форму прямых или слегка изогнутых палочек ($0,3\text{--}2,0 \times 1,5\text{--}20$ мкм) с закругленными концами.

Клостридии – облигатные анаэробы. Они лишены цитохромов и каталазы, в значительном количестве содержат флавиновые ферменты. Однако спектр их чувствительности к молекулярному кислороду достаточно широк, что связано с обнаружением в клетках большинства клостридиев суперок-

сиддисмутазы и с другими приспособлениями на уровне клеточных популяций, помогающими нейтрализовать токсические эффекты O_2 и его производных. Именно при работе с клостридиями Л. Пастер в 1861 г. открыл форму жизни без кислорода.

Описано более 60 видов бактерий рода *Clostridium*. Классифицируют их по-разному. В зависимости от вида сбраживаемого субстрата выделяют несколько физиологических групп клостридиев.

1. Сахаролитические клостридии, использующие в качестве субстратов брожения вещества углеводной природы – моносахара, крахмал, клетчатку; (*C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*).

2. Протеолитические клостридии, субстратами брожения которых являются белки, пептиды, аминокислоты (*C. histolyticum*, *C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. botulinum*).

3. Пуринолитические клостридии, специфически приспособленные к сбраживанию гетероциклических соединений – пуринов и пиримидинов (*C. acidi-urici*, *C. cylindrosporum*). Относящиеся к этой группе виды часто узкоспециализированы в отношении пищевых субстратов.

Таким образом, типы брожений, осуществляемых клостридиями, необычайно разнообразны в отношении как используемых субстратов, так и синтезируемых конечных продуктов, и виды, осуществляющие сбраживание углеводов по гликолитическому пути с накоплением масляной кислоты в качестве одного из основных продуктов, являются только одной из групп организмов, относимых к роду *Clostridium*.

Потребности клостридиев в питательных веществах отличаются большим разнообразием. Как правило, клостридии могут расти только на сложных, богатых органическими соединениями средах. Многие клостридии выделяют экзоферменты, расщепляющие макромолекулы (углеводы, белки) на составляющие их мономеры. До сих пор только небольшое число видов удалось культивировать в лаборатории на синтетической среде. Для них выявлена потребность в витаминах (главным образом группы B) и наборе аминокислот. Оптимальная температура для роста составляет от 10 до 60 °C.

Пути включения CO_2 в клеточный метаболизм клостридиев различны. Углекислота может использоваться ими в качестве конечного акцептора электронов, что приводит к прямому восстановлению CO_2 до формиата. Донорами электронов в этой реакции служат восстановленный ферредоксин или НАД- H_2 . Образовавшийся в результате восстановления CO_2 формиат может подвергаться дальнейшему восстановлению и служить источником метильных групп, используемых для клеточных биосинтезов.

Для разных видов клостридиев показана активная фиксация CO_2 на C_2 - и C_3 -соединениях, таких как ацетил-КоА, пропионил-КоА, пируват, в реакциях восстановительного карбоксилирования.

Дальнейший шаг вперед по пути независимости от среды связан с распространением у этой группы эубактерий способности фиксировать атмосферный азот. Первый анаэробный азотфиксатор был выделен из почвы

С. Н. Виноградским и назван им в честь Л. Пастера *C. pasteurianum*.

Клостридии широко распространены в природе и имеют большое практическое значение. Большинство бактерий рода *Clostridium* – сапротрофы, обитатели почвы. Некоторые виды живут в кишечнике человека и животных. С жизнедеятельностью клостридий связаны различные процессы: разложение (гниение) азотсодержащих соединений (белков, нуклеиновых кислот) в анаэробных условиях; анаэробное разложение растительных материалов, таких как клетчатка, хитин. Некоторые сахаролитические клостридии могут использовать в качестве субстрата брожения пектиновые вещества, составляющие покровы растительных клеток. Этот вид играет важную роль в процессе мацерации волокон при мочке льна.

Еще в конце XIX в. было обнаружено, что некоторые клостридии патогенны, т. е. вызывают заболевания человека и животных. Они могут вызывать такие заболевания, как газовая гангрена и столбняк (раневые инфекции). Возбудителями газовой гангрены служат *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. bifermentans*. Возбудитель столбняка – *C. tetani*. Эти заболевания очень опасны, протекают быстро и часто с фатальным исходом.

В основе патогенности клостридий лежит их способность синтезировать и выделять из клетки токсины, являющиеся сильными биологическими ядами. *C. botulinum* – продуцент ботулина – экзотоксина, одного из самых сильных биологических ядов; *C. tetani* образует в организме человека столбнячный токсин. По химической природе это белки. В одних случаях они выступают как ингибиторы нервных функций (симптомы ботулизма и столбняка), в других – это ферменты, разрушающие ткани.

Бактерии группы *Clostridium* находят и практическое применение. Их используют в производстве масляной кислоты. Ацетоно-бутиловое брожение, осуществляемое некоторыми видами клостридий, используют для получения в промышленном масштабе ацетона и бутанола. Расширяется использование клостридий для получения ряда важнейших ферментов: пектиназ, целлюлаз, протеаз, липаз, амилаз, декарбоксилаз, гиалуронидаз и др. В некоторых странах анаэробные бактерии используют для трансформации стероидных гормонов. Показано, что споры некоторых видов анаэробных бактерий при внутривенном введении животным проявляют онколитическую активность, наблюдается разрушение злокачественных образований. Споры анаэробов обладают также радиопротекторной активностью и при внутривенном введении способны повышать выживаемость и среднюю продолжительность жизни животных, облученных смертельной дозой радиации.

Получение накопительной культуры маслянокислых клостридий

Для получения накопительной культуры обычно используют такие свойства клостридий, как способность сбраживать углеводы, анаэробность и термоустойчивость спор. Вымытый и неочищенный картофель мелко нарезают и раскладывают в физиологические пробирки на 1/3 объема, добавляют

мел (для нейтрализации масляной кислоты) и заливают водопроводной водой на 3/4 объема. Пробирки прогревают на водяной бане 15 минут при 80 °С, при этом уничтожаются вегетативные клетки и нетермостойкие споры многих микроорганизмов, а также удаляется воздух из среды. Затем пробирки закрывают пробками и культивируют при 35 °С. Через 3–5 дней ломтики картофеля всплывают, наблюдается обильное газообразование, в жидкости легко обнаруживаются бактериальные клетки с плектридиальным и клостридиальным типом спорообразования.

На картофельной среде часто выделяется *C. butyricum*. Для выделения других возбудителей маслянокислого брожения используют соответствующие питательные среды. Например, накопительные культуры пектиноразрушающих бактерий (*C. pectinovorum*, *C. felsineum*) получают методом Фрибеса. Снопки из льняной соломы (или стебля крапивы) вываривают в кипящей воде в пробирке в течение 5–10 минут, чтобы удалить экстрактивные вещества. Воду сливают, снопки заливают водопроводной водой высоким слоем, кипятят 15 минут, затем охлаждают до 25–35 °С. В снопик помещают несколько соломинок льна, не подвергшихся кипячению, и культивируют при 28–30 °С. Через 3–4 суток при наличии пектиноразрушающих бактерий наблюдается помутнение среды и газообразование, при этом снопик всплывает на поверхность. Для приготовления микроскопического препарата из снопика извлекают кусочек стебля и делают соскоб с поверхности скальпелем на предметное стекло в каплю воды.

Характерным свойством *C. pectinovorum* является накопление гранулы, которая располагается прерывисто. У *C. felsineum* гранулеза заполняет всю клетку, за исключением конца клетки, где располагается спора.

Образование масляной кислоты в среде обнаруживают по реакции с хлорнокислым железом: 5 мл культуральной жидкости переносят в пробирку, добавляют 2 мл 10 %-го раствора хлорнокислого железа и нагревают до кипения. Образующийся раствор маслянокислого железа имеет кроваво-красный цвет.

Задание

Ознакомиться с особенностями морфологии бактерий рода *Clostridium*. Приготовить препарат с окрашенными включениями гранулезы.

План выполнения работы

1. Приготовить и просмотреть прижизненный препарат накопительной культуры сахаролитических клостридий.
2. Произвести микрохимическую реакцию на гранулезу. На предметное стекло поместить каплю культуры клостридий, добавить каплю раствора Люголя. Накрыть покровным стеклом и промикроскопировать. Гранулеза окрашивается йодом в фиолетовый цвет, а гликоген – в красно-бурый. Сде-

лать зарисовки.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие продукты могут образовываться в результате маслянокислого брожения? Какие реакции ведут к образованию масляной кислоты?
2. Какие микроорганизмы осуществляют маслянокислое брожение?
3. На основании каких признаков определяется принадлежность бактерий к роду *Clostridium*?
4. Какие виды субстратов могут сбраживать клостридии? На какие группы делятся клостридии по данному признаку?
5. Назовите типы брожений, осуществляемых клостридиями.
6. Какие свойства маслянокислых клостридий используют при получение накопительной культуры?
7. Как можно выявить гранулезу и гликоген в клетках клостридий при микроскопировании?
8. Возбудителями каких заболеваний являются клостридии? Что лежит в основе их патогенности?
9. Какой ученый открыл анаэробный способ существования клостридий?
10. Какие продукты метаболизма клостридий имеют промышленное значение?

ЗАНЯТИЕ 15

ТЕМА: МИКРООРГАНИЗМЫ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ БРОЖЕНИЕ. МОЛОЧНОКИСЛЫЕ ПАЛОЧКИ И КОККИ

Молочнокислые бактерии осуществляют брожение с образованием в качестве основного, а иногда и единственного конечного продукта – молочной кислоты. К ним относятся морфологически разнообразные представители: кокки – *Lactococcus* (см. [рис. 16](#)), *Pediococcus*, *Leuconostoc* (см. [рис. 18](#)); и палочки – *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* (см. [рис. 22](#)).

Основными субстратами для молочнокислого брожения служат моносахара (в первую очередь, глюкоза) и дисахара (мальтоза, лактоза). Брожения других, более сложных субстратов проходят через путь предварительного расщепления их до глюкозы или продуктов ее превращения.

Гомоферментативные молочнокислые бактерии ([табл. 2](#)) образуют только молочную кислоту (не менее 90 %). Катаболизм глюкозы происходит по пути гликолиза до образования пирувата. Пируват служит акцептором электронов. В этом случае при участии ключевого фермента лактатдегидрогеназы 2 электрона переносятся с НАД-Н₂ на молекулу пировиноградной кислоты, что приводит к образованию молочной кислоты.

Таблица 2

Представители молочнокислых бактерий

Гомоферментативные	Гетероферментативные
<i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>

Гетероферментативные молочнокислые бактерии расщепляют глюкозу по пентозофосфатному пути. В конечных продуктах присутствуют, помимо молочной кислоты, спирт, уксусная кислота и СО₂. Преобладание в ферментационной среде того или иного продукта зависит от вида культуры, условий культивирования и фазы развития.

Типичные представители молочнокислых бактерий объединены в семейство *Lactobacillaceae*, род *Lactobacillus* ([рис.54](#)), в составе которого около 50 видов (*L. lactis*, *L. acidophilum*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*). Название семейства происходит от латинского слова «лактис» – молоко.

Это длинные тонкие палочки, до 10 мкм длиной; иногда кокковидные,

в редких случаях подвижные (за счет перитрихальных жгутиков), часто образуют нити.

Факультативные анаэробы, иногда микроаэрофилы, слабо растут на воздухе. Хемоорганотрофы, растут только на богатых сложных средах. Некоторые нуждаются в витаминах, аминокислотах, пуринах, жирных кислотах. Благодаря специфическим потребностям в питательных веществах молочнокислые бактерии используются в качестве индикаторных культур при количественном определении витаминов группы *B* и аминокислот в питательных продуктах и препаратах для промышленного и фармацевтического производства.

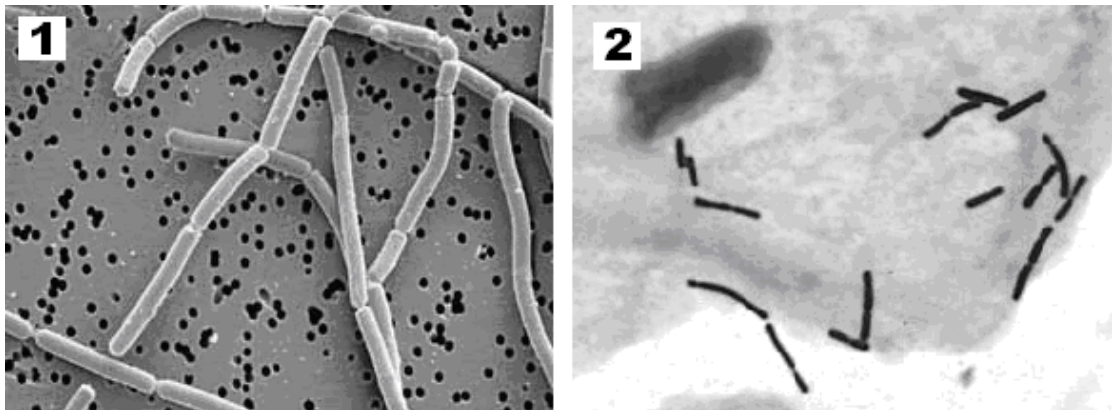


Рис. 54. Бактерии рода *Lactobacillus*

1 – *Lactobacillus delbrueckii* (электронная микроскопия);

2 – молочнокислые палочки – нормальная микрофлора слизистых оболочек

Метаболизм бродильного типа. Каталазу не образуют. У них отсутствуют цитохромы и другие гемсодержащие ферменты, поэтому синтезировать АТФ за счет дыхания они не могут. Колонии не окрашенные, известково-белого цвета, небольшого размера – 2–5 мм. Бактерии могут образовывать внеклеточный полисахарид (декстран или леван). При выделении молочнокислых бактерий на твердой питательной среде в нее добавляют мел. Колонии выросших бактерий окружены зоной просветления в местах растворения мела при взаимодействии его с образующейся молочной кислотой.

Оптимальная температура – 30–40 °С. Бактерии отличаются высокой устойчивостью к рН среды и термостабильностью. Благодаря этому они могут расти в кислых средах и при относительно высокой температуре, например в силосе, кислой капусте, бродящем пивном сусле, плодах, овощах, соках, которые подлежат консервированию (*L. plantarum*).

Широко распространены в природе: их можно обнаружить в почве, на разлагающихся остатках животного и растительного происхождения, в молоке и молочных продуктах, пиве, фруктово-винных напитках, соленьях, маринадах, пищеварительном тракте человека и теплокровных животных. Сапротрофы (за исключением отдельных видов, играющих определенную роль в кариесе зубов). В терапевтической практике широко используются при лечении дисбактериозов (препарат лактобактерин). В ассоциации с некоторы-

ми дрожжами служат закваской для приготовления пищевых продуктов из молока, например, кумыса, кефира, айрана и др. В ацидофильном молоке в качестве закваски используют чистую культуру *L. acidophilum*. Болгарская палочка – *L. bulgaricus* – входит в состав закваски для получения йогуртов. Типовой вид *L. delbrueckii*; используется в биотехнологии для промышленного получения молочной кислоты микробиологическим способом.

Задание

Ознакомиться с морфологией клеток молочнокислых бактерий.

План выполнения работы

1. Приготовить и просмотреть прижизненный препарат молочнокислых бактерий из сметаны. Для этого на предметное стекло поместить каплю сметаны, распределить ее тонким слоем, добавить смесь Никифорова (1–2 капли). Когда смесь испарится, окрасить препарат метиленовым синим и промикроскопировать.
2. Приготовить и просмотреть прижизненный препарат микрофлоры молочнокислых продуктов (кефир, йогурт).
3. Сделать зарисовки.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие реакции лежат в основе гомо- и гетероферментативного молочнокислого брожения?
2. Какие продукты образуются в результате гетероферментативного молочнокислого брожения?
3. Какие бактерии осуществляют молочнокислое брожение?
4. Какие признаки характеризуют семейство *Lactobacillaceae*?
5. Где можно обнаружить молочнокислые бактерии?
6. Какой вид бактерий используется в промышленности для получения молочной кислоты?
7. Какой внеклеточный полисахарид могут образовывать бактерии семейства *Lactobacillaceae*?
8. Какие виды молочнокислых кокков и палочек используют при производстве продуктов питания?
9. Что такое «болгарская палочка»?
10. Какую функцию выполняют молочнокислые бактерии в пищеварительном тракте человека и животных?

ЗАНЯТИЕ 16

ТЕМА: ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ ПРОКАРИОТЫ

Известно пять групп эубактерий, способных преобразовывать световую энергию в химическую с помощью хлорофилла. Фотосинтез, осуществляемый ими, делится на два типа: не сопровождающийся выделением молекулярного кислорода (бескислородный фотосинтез) и сопровождающийся выделением O_2 (кислородный фотосинтез). В соответствии с этим все фотосинтезирующие эубактерии в IX издании Определителя бактерий Берджи разделены на две таксономические группы в ранге классов: *Anoxyphotobacteria* (10-я группа) и *Oxyphotobacteria* (11-я группа).

К классу *Anoxyphotobacteria* относятся представители пурпурных, зеленых бактерий и гелиобактерий. Они осуществляют бескислородный фотосинтез и содержат специфический набор пигментов – бактериохлорофиллов (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*) и каротиноидов.

Пурпурные бактерии

Группа пурпурных бактерий, насчитывающая более 50 видов, представлена одноклеточными организмами разной морфологии. Длина колеблется от 1 до 20 мкм, ширина – от 0,3 до 6 мкм. Некоторые виды образуют выросты, есть неподвижные и подвижные формы.

Движение осуществляется с помощью одного или пучка жгутиков, расположенных обычно полярно. Большинство пурпурных бактерий размножаются бинарным делением, некоторые виды – почкованием. Клетки неподвижных форм, размножающихся поперечным делением в разных плоскостях, имеют тенденцию формировать агрегаты правильной геометрической формы.

Все пурпурные бактерии окрашиваются отрицательно по Граму.

На основании ряда физиологических признаков группу подразделяют на пурпурные серные ([рис. 55](#) – 1, 2) и несерные ([рис. 55](#) – 3, 4) бактерии.

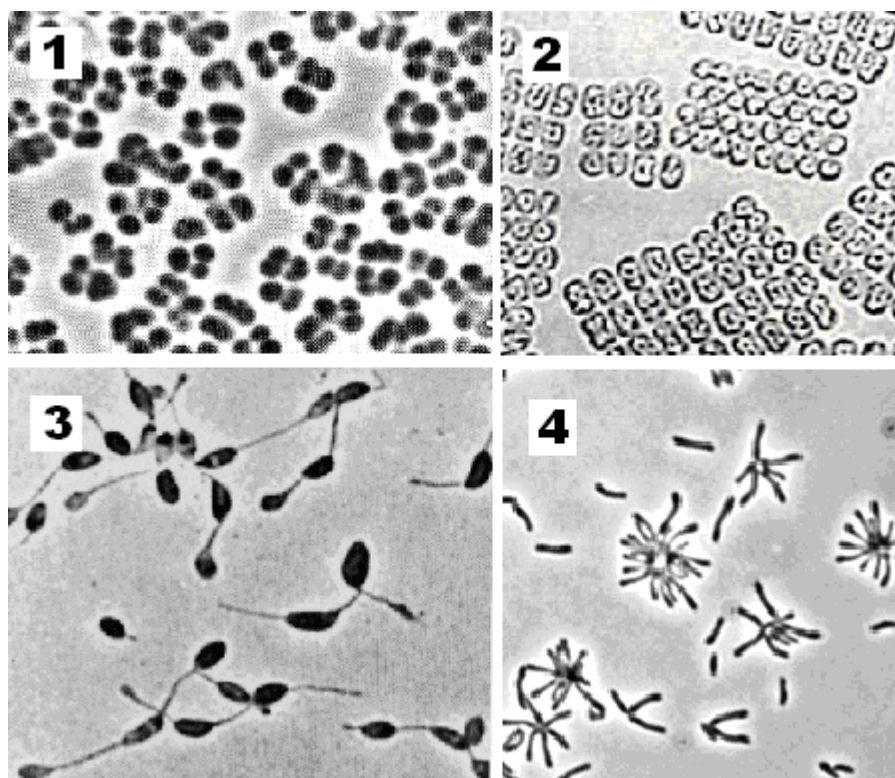


Рис. 55. Представители пурпурных бактерий
1 – *Thiocapsa*, 2 – *Thiopedia*, 3 – *Rhodomicrobium*, 4 – *Rhodopseudomonas*

Для пурпурных серобактерий основной способ существования – фотолитоавтотрофия. Все представители этой группы могут расти при освещении в анаэробных условиях на среде с CO_2 в качестве единственного источника углерода, используя как донор электронов сульфид (H_2S) и другие восстановленные соединения серы.

В группе несерных бактерий обнаружены разные биосинтетические способности, сочетающиеся с разнообразными способами получения энергии. Источниками углерода могут быть CO_2 или органические соединения, а источниками энергии – фотосинтез, аэробное и анаэробное дыхание, брожение.

Зеленые бактерии

В течение длительного времени зеленые бактерии принимали за зеленые или сине-зеленые водоросли (цианобактерии). Начало их изучения как бактерий связано с именами С. Н. Виноградского и К. ван Нилы. Эта небольшая группа бактерий, осуществляющих фотосинтез бескислородного типа, разделена на две подгруппы: серные и нитчатые.

Нитчатые, передвигающиеся скольжением формы, факультативные анаэробы, предпочитающие использовать органические соединения при фототрофном метаболизме.

Почти все зеленые серобактерии – грамтрицательные одноклеточные неподвижные формы. Клетки палочковидные, яйцеобразные или слегка изогнутые.

гнутые. При выращивании в чистой культуре часто образуют цепочки, клубки или сетчатые структуры. Размножаются бинарным делением. В качестве запасного вещества накапливают гликогеноподобный полисахарид.

Все зеленые серобактерии – облигатные фотолитоавтотрофы и строгие анаэробы (гораздо более строгие, чем пурпурные серобактерии). В присутствии O_2 они не растут. Основным источником углерода – углекислота. Как доноры электронов могут использовать только неорганические соединения: H_2S , S^0 , $Na_2S_2O_3$, H_2 . Окисление сульфида, происходящее в периплазматическом пространстве, на первом этапе приводит к образованию молекулярной серы, откладывающейся вне клетки. После исчерпания H_2S из среды S^0 поглощается клетками и в периплазматическом пространстве происходит ее последующее окисление до сульфата.

Способность использования зелеными серобактериями органических соединений ограничена несколькими сахарами, аминокислотами и органическими кислотами. Добавление этих соединений в среду приводит к некоторому стимулированию роста культуры. Ни в одном случае органические соединения не могли служить донорами электронов или основным источником углерода. Их использование возможно только при наличии в среде H_2S и CO_2 . Для большинства зеленых серобактерий показана способность к фиксации N_2 .

Физиолого-биохимическая характеристика зеленых нитчатых бактерий основана главным образом на данных, полученных для разных штаммов рода *Chloroflexus* (рис. 56).

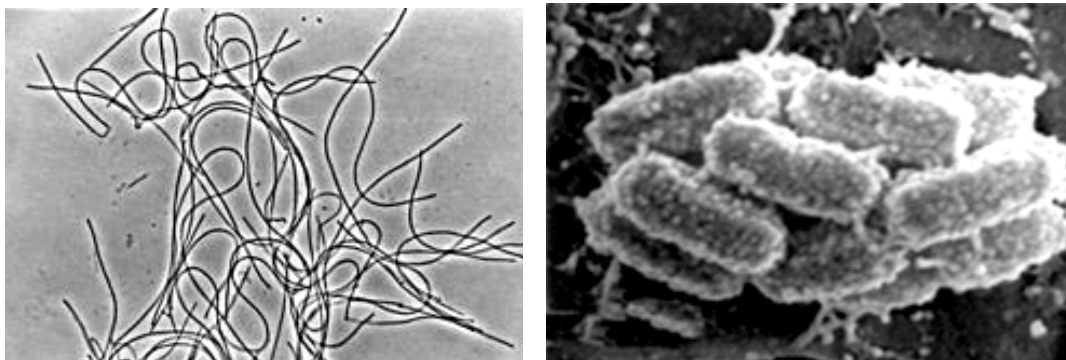


Рис. 56. Представители зеленых бактерий: *Chloroflexus* (слева) и *Chlorobium* (справа)

Гелиобактерии

Недавно обнаружены строго анаэробные фототрофные бактерии, содержащие единственный бактериохлорофилл *g*, отсутствующий в других группах фотосинтезирующих эубактерий с бескислородным типом фотосинтеза. Описаны два вида, различающиеся морфологически: *Heliobacterium chlorum* – одиночные длинные палочки ($1 \times 7-10$ мкм), способные передвигаться скольжением, и *Heliobacillus mobilis* – короткие палочковидные фор-

мы с перитрихально расположенными жгутиками. Клеточная стенка грамотрицательного типа, но по нуклеотидной последовательности 16S рРНК и составу пептидогликана обе описанные гелиобактерии близки к грамположительным эубактериям *Bacillus subtilis*.

В клетках помимо необычного бактериохлорофилла *g* обнаружено большое количество каротиноидов. Пигменты локализованы в ЦПМ, развитой системы внутрицитоплазматических мембран и хлоросом нет. Способ существования – облигатная фототрофия. Источниками углерода могут служить некоторые органические кислоты: уксусная, молочная, пировиноградная, масляная. Показана также возможность функционирования путей автотрофной фиксации CO₂ (модифицированный и неполный восстановительный ЦТК). Описанные гелиобактерии проявляют очень высокую чувствительность к молекулярному кислороду. Дыхательный метаболизм отсутствует. Обнаруженные виды – активные азотфиксаторы.

Большой интерес к гелиобактериям связан с предположением, что они являются наиболее древними из существующих в настоящее время фотосинтезирующих эубактерий. Кроме того, на основании сходства между бактериохлорофиллом *g* и хлорофиллом *c* высказывается предположение о том, что гелиобактерии – предки пластид, содержащих хлорофилл *c*, имеющих в группах бурых, диатомовых, золотистых и других водорослей.

К классу *Oxypotobacteria* относятся представители цианобактерий и прохлорофитов. Они осуществляют фотосинтез с выделением молекулярного кислорода, содержат разные наборы фотосинтетических пигментов, но обязательно – хлорофилл *a*.

Цианобактерии

К цианобактериям относится большая группа организмов, сочетающих прокариотное строение клетки со способностью осуществлять фотосинтез, сопровождающийся выделением O₂, что свойственно разным группам водорослей и высших растений. Объединение черт, присущих организмам, относящимся к разным царствам или даже надцарствам живой природы, сделало цианобактерии объектом борьбы за принадлежность к низшим растениям (водорослям) или бактериям (прокариотам).

Изучение цитологии клеток сине-зеленых водорослей с помощью современных методов показало, что эти организмы являются типичными прокариотами. Поэтому было предложено отказаться от названия "сине-зеленые водоросли" и называть данные организмы "цианобактериями" – термином, отражающим их истинную биологическую природу.

Цианобактерии – морфологически разнообразная группа грамотрицательных эубактерий, включающая одноклеточные, колониальные и многоклеточные формы. У многоклеточных форм единицей структуры служит нить (трихом). Нити бывают простые или ветвящиеся (рис. 57).

В процессе жизненного цикла некоторые цианобактерии формируют

дифференцированные единичные клетки или короткие нити, служащие для размножения (базоциты, гормогонии), выживания в неблагоприятных условиях (споры, или акинеты) или азотфиксации в аэробных условиях (гетероцисты).

Способы размножения цианобактерий: путем бинарного деления, почкования, множественного деления. Бинарное деление может происходить только в одной плоскости, что у одноклеточных форм приводит к образованию цепочки клеток, а у нитчатых – к удлинению однорядного трихома. Деление в нескольких плоскостях ведет у одноклеточных цианобактерий к формированию скоплений правильной или неправильной формы, а у нитчатых – к возникновению многорядного трихома. Размножение нитчатых форм осуществляется также с помощью обрывков трихома, состоящих из одной или нескольких клеток, у некоторых – также гормогониями, отличающимися по ряду признаков от трихомов, и в результате прорастания акинет в благоприятных условиях.

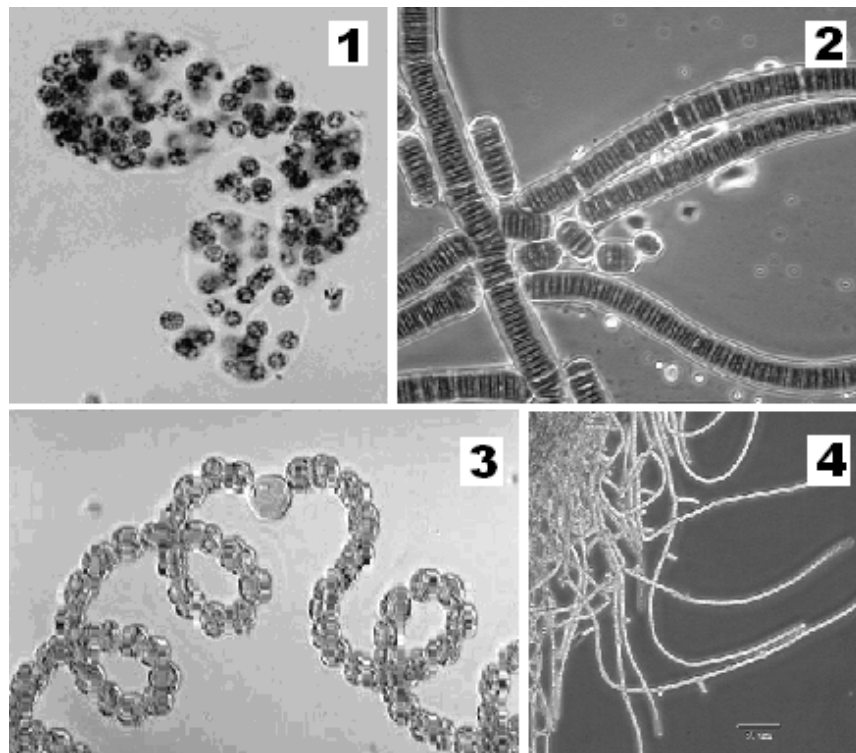


Рис. 57. Цианобактерии

1 – *Microcystis*, 2 – *Lyngbia*, 3 – *Anabaena*, 4 – *Fischerella*

Большой интерес представляет группа цианобактерий из-за сосредоточения в ней разнообразных физиологических возможностей. В недрах этой группы, вероятно, сформировался и в целом оформился фотосинтез, основанный на функционировании двух фотосистем, характеризующийся использованием H_2O в качестве экзогенного донора электронов и сопровождающийся выделением O_2 .

Хотя подавляющее большинство цианобактерий являются облигатны-

ми фототрофами, в природе они часто находятся длительное время в условиях темноты. В темноте у цианобактерий обнаружен активный эндогенный метаболизм, энергетическим субстратом которого служит запасенный на свету гликоген, катаболизируемый по окислительному пентозофосфатному циклу, обеспечивающему полное окисление молекулы глюкозы. На двух этапах этого пути с НАДФ-Н₂ водород поступает в дыхательную цепь, конечным акцептором электронов в которой служит О₂.

В ранге порядков выделено пять основных таксономических групп, различающихся морфологическими признаками (табл. 3).

Таблица 3

Таксономические группы цианобактерий

Одноклеточные формы: одиноклеточные клетки или колонии		Многоклеточные формы: нитчатые		
порядок <i>Chroococcales</i>	порядок <i>Pleurocapsales</i>	порядок <i>Oscillatoriales</i>	порядок <i>Nostocales</i>	порядок <i>Stigoneomatales</i>
Размножение бинарным делением в одной или более плоскостях или почкованием	Размножение множественным делением или чередованием бинарного и множественного деления	Трихомы неветвящиеся, состоят из одного ряда только вегетативных клеток. Рост трихома – делением клеток в одной плоскости	В неветвящихся однорядных трихомах помимо вегетативных образуются дифференцированные клетки: гетероцисты и иногда актинеты. Рост трихома – делением клеток в одной плоскости	Те же признаки, что и у представителей порядка <i>Nostocales</i> . Отличительный признак: способность вегетативных клеток трихома к делению более чем в одной плоскости, приводящему к появлению многорядных трихомов или трихомов с истинным ветвлением

Прохлорофиты

Прохлорофиты весьма сходны с цианобактериями, но отличаются от них составом фотосинтетических пигментов: отсутствием фикобилипротеинов и наличием хлорофилла *b*. В IX издании Определителя бактерий Берджи они выделены в порядок *Prochlorales*. Это одноклеточные (сферические) или многоклеточные (нитчатые) формы, неподвижные или подвижные. Размножаются бинарным делением. Клеточная стенка грамотрицательного типа напоминает таковую цианобактерий.

Большую часть цитоплазмы занимают тилакоиды, располагающиеся обычно концентрическими кругами по периферии клетки. Внутренние и наружные поверхности тилакоидных мембран гладкие. Фикобилисомы и фикобилипротеины не обнаружены.

Фотосинтетические пигменты представлены хлорофиллами *a* и *b* и каротиноидами. Основную массу последних составляют β -каротин и ксантофилл, близкий к зеаксантину. CO_2 фиксируется в восстановительном пентозофосфатном цикле (цикл Кальвина).

Задание

Ознакомиться с характерными особенностями строения фотосинтезирующих бактерий.

План выполнения работы

1. Приготовить прижизненные препараты «раздавленная капля» представителей родов *Anabaena*, *Scenodesmus*, *Lyngbia* и промикроскопировать с иммерсионной системой. Сделать зарисовку.
2. Приготовить препарат культуры водорослей *Chlorella*, промикроскопировать, сделать зарисовку.
3. Сравнить морфологию прокариотических и эукариотических фотосинтезирующих микроорганизмов. Указать различия.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие типы фотосинтеза осуществляют прокариоты?
2. Чем отличается бактериальный фотосинтез от фотосинтеза, осуществляемого растениями?
3. На какие классы подразделяются фотосинтезирующие бактерии? Какие группы бактерий к ним относятся?
4. Какие пигменты обнаружены у фотосинтезирующих прокариот?
5. Какими признаками характеризуются серные и несерные бактерии? В чем их отличие?
6. Какие источники углерода используют пурпурные бактерии?
7. По каким признакам цианобактерии подразделяются на порядки?
8. Какую функцию осуществляют гетероцисты цианобактерий?
9. Что такое бaeоциты?
10. Какой метаболический путь ведет к фиксации CO_2 у окислительных фототрофов?

ЗАНЯТИЕ 17

ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МИКРОФЛОРЫ ПОЧВЫ, ВОДЫ И ВОЗДУХА

Микрофлора почвы

Почва – естественная среда обитания микроорганизмов. Характер почвы и видовой состав ее микрофлоры неразрывно связаны. Основное место обитания микроорганизмов – твердая фаза, содержащая запасы питательных веществ. До 90 % микроорганизмов находится в адсорбированном состоянии на поверхности почвенных частиц.

Плотность микробного населения определяется, прежде всего, органическими веществами. Так, в 1 г чернозема содержится до 3 млрд клеток микроорганизмов; в бедных органическими веществами подзолистых почвах – от 300 млн до 2 млрд, в песках пустыни Сахары, где низкая влажность среды, – около 1 млн.

Почвы различаются по содержанию воды: слишком сухие и слишком влажные ограничивают рост и развитие микроорганизмов. Оптимальна для большинства микроорганизмов влажность, равная 50–60 % максимальной влагоемкости (наибольшего количества воды, которое почва может удерживать). Некоторые, например *Clostridium pasteurianum*, могут расти при 100 %-й влагоемкости почвы. Для микроорганизмов важна концентрация солей в почвенном растворе. Засоленные почвы беднее микроорганизмами, однако некоторые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* хорошо развиваются на субстратах с 20–30 % NaCl, некоторые почвенные микроорганизмы развиваются при высоких концентрациях минеральных солей (осмофильные).

Почвенный воздух отличается по составу от атмосферного. Экологически важным компонентом почвенного воздуха является количество CO₂, необходимого для автотрофных организмов. При растворении в воде он образует кислоту и, изменяя pH почвы, становится фактором, ограничивающим жизненные процессы микроорганизмов. Например, гриб *Rhizoctonia solani* погибает при концентрации CO₂ 10 %. Почвенные микроорганизмы очень чувствительны к изменениям pH среды: грибы лучше растут в кислой среде, а бактерии – в нейтральной или слегка щелочной. Изменение pH почвы вызывает изменения в популяциях почвенных микроорганизмов.

Из внешних факторов, существенно влияющих на развитие микроорганизмов в почве, основным является температура. Лучше всего почвенные микроорганизмы развиваются при температуре 15–25 °С, но могут встречаться термофильные (оптимум 50 °С) и криофильные, развивающиеся при температуре, близкой к 0 °С. Микроорганизмы обитают главным образом в

самом верхнем аккумулятивном, или перегнойном, горизонте почвенного профиля, отличающегося большой амплитудой колебаний температур, зависящей от времени года, характера местности и даже от времени суток, от температуры воздуха, поэтому почвенные микроорганизмы обладают большой пластичностью в отношении температур.

Почвенные микроорганизмы неодинаково распространены по горизонтам почвы. Наибольшее количество микроорганизмов обитает в верхнем 10-сантиметровом слое почвы. В нижних горизонтах органических веществ мало и большинство бактерий находится в покоем состоянии, в основном в виде цист и спор. Чем глубже расположен горизонт почвы, тем меньше в нем микроорганизмов.

На распределение микроорганизмов в почве влияют корни растений, выделяющие во внешнюю среду органические вещества. На поверхности корней и в прикорневой зоне сосредоточено большое количество микроорганизмов.

Наиболее многочисленной группой среди микроорганизмов всех типов почв являются бактерии, составляющие от 65 до 96 % общего числа клеток. В почвах, богатых гумусом (дерново-подзолистых, лесных и горно-луговых), влажных и холодных, преобладают неспорообразующие формы. В бурых и пустынных почвах с низким содержанием органических веществ и влаги при высокой температуре развиваются преимущественно споровые бактерии, более устойчивые к действию засухи и перегрева.

Количество грибов в почве не превышает 0,5–0,8 % общего числа микроорганизмов и зависит от pH почвы. В сильно кислых подзолистых почвах (при pH около 4) грибы составляют до 3 % всех микроорганизмов.

Различные виды обработки почв (рыхление, орошение, вспашка, внесение удобрений) способствуют усиленному размножению микроорганизмов, поэтому в окультуренных почвах число их в несколько раз больше, чем в целинных.

Из микробиологических процессов, происходящих в почве, наибольшее значение имеют минерализация растительных и животных остатков, образование гумуса и его разложение. В растительном опаде сохраняются сахара, аминокислоты, белки, которые быстро потребляются микроорганизмами. Минерализация нерастворимых в воде соединений (целлюлозы, гемицеллюлозы) идет медленно, с участием немногих видов, прежде всего грибов. Лигнин – главный исходный продукт для образования гумуса – наиболее устойчивое соединение и разлагается микроорганизмами очень медленно – месяцы и годы.

Почвенные микроорганизмы условно подразделяются на несколько групп. Микроорганизмы, разлагающие свежий растительный опад, С. Н. Виноградский назвал зимогенной микрофлорой. В основном это бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и др. Если в почве мало легкоразлагаемых питательных веществ, зимогенные микроорганизмы переходят в покоящуюся

форму или даже погибают.

Автохтонные микроорганизмы постоянно живут в почве, и численность их не зависит от поступления легкодоступных питательных веществ. Характерный представитель этой группы – бактерии рода *Arthrobacter*. Автохтонные микроорганизмы принимают активное участие в синтезе гумуса (автохтонная микрофлора А) и его распаде (автохтонная микрофлора Б).

Олиготрофные микроорганизмы – виды, способные усваивать питательные вещества из растворов с низкой концентрацией. Это бактерии родов *Microcycilus*, *Hyphomicrobium*, *Agrobacter*, *Caulobacter* и др.

Хемолитоавтотрофные бактерии – почвенные микроорганизмы, окисляющие неорганические субстраты. Группа включает нитрифицирующие, тионовые, водородные, железобактерии и др.

В разных типах почв соотношение групп бактерий неодинаково, изменяется и видовой состав представителей различных групп. Количественные показатели содержания микроорганизмов зависят от метода исследования.

Почва подвергается колоссальному антропогенному воздействию, поступающие в почву загрязнители оказывают неблагоприятное воздействие на свойства почвы, ее плодородие, урожайность возделываемых культур. Большую угрозу для почвы представляют загрязнения нефтью. Кроме того, существуют и другие весьма опасные для почвы типы загрязнений. Почва – естественное депо, где накапливаются остатки пестицидов, тяжелые металлы поглощаются почвенными частицами и оказывают пагубное влияние на организмы, живущие в почве. Стойкие пестициды накапливаются в почве и загрязняют окружающую среду и сельскохозяйственную продукцию. Иногда при их частичном разрушении образуются соединения, гораздо более токсичные и устойчивые, чем внесенные препараты. Однако и сама почва может служить местом очистки различного рода загрязнений; ее самоочищение в значительной степени зависит от деятельности почвенных микроорганизмов. На основе комменсализма и в условиях кометаболизма, или соокисления, может происходить полная минерализация загрязняющих органических веществ в почве.

Выделение почвенных микроорганизмов на питательных средах

Микробиологическое исследование включает определение общего количества сапротрофных микроорганизмов, определение количества микроорганизмов различных эколого-трофических групп, определение микробов-антагонистов и выявление их активности, определение санитарно-показательных микроорганизмов (кишечной палочки).

Для обеспечения роста микроорганизмов в искусственных условиях используют питательные среды, которые должны соответствовать следующим требованиям:

- 1) содержать все элементы, из которых строится клетка;
- 2) иметь достаточную влажность (не менее 20 % воды);

3) концентрация солей в среде должна обеспечить изотонию, т. е. соответствовать концентрации солей в микробной клетке (для большинства микроорганизмов – 0,5 %; галофильных – 3 %);

4) концентрация водородных ионов (pH) среды должна быть оптимальной для выращиваемого организма (диапазон pH 4,5–8,5);

5) окислительно-восстановительный потенциал (Eh) среды, определяющий концентрацию кислорода в среде, должен соответствовать потребностям микроорганизма: для анаэробов – 0,12–0,06 В, для аэробов – более 0,08 В. Таким образом, должен соблюдаться принцип создания условий, адекватных природным (для данного микроорганизма);

6) кроме того, питательные среды, как и посуда, и другие материалы, должны быть стерильными, поскольку успех микробиологических работ во многом определяется созданием условий надежной стерильности.

Цель процесса стерилизации состоит в удалении или уничтожении всех живых микроорганизмов внутри или на поверхности предмета. Процессы стерилизации и дезинфекции основаны на действии все тех же биофизических или физико-химических факторов: T, Eh – аэрация, pH, гидростатическое давление и др. Эффективность стерилизации выражается в виде статистической вероятности выживания клеток. По окончании процессов стерилизации вероятность выживания клетки должна составлять не более 10–6.

Факторы, которые надо учитывать при выборе метода стерилизации:

1) конструкция и химический состав образца, подлежащего стерилизации;
2) биологическое (вегетативные клетки или споры) и физическое (влажность, сухие клетки более устойчивы к каким-либо воздействиям) состояние микроорганизмов в образцах, подлежащих стерилизации;

3) наследственная устойчивость микроорганизма к стерилизации и скорость его гибели;

4) исходное количество микроорганизмов в стерилизуемом образце;

5) эффективность стерилизующего агента;

6) продолжительность стерилизующего воздействия.

В общем случае для стерилизации используются: 1) пар – культуральные среды, оборудование, стеклянная посуда, 2) сухой жар – стеклянная посуда и металлическое оборудование, 3) газ – инструменты, 4) фильтрация – растворы, 5) в особых случаях применяют радиоактивное облучение.

Воздействие влажным и сухим жаром имеет различный результат. Сухие клетки выдерживают нагревание до гораздо более высоких температур и большее время, чем клетки влажные или в условиях полного насыщения водяными парами (табл. 4).

Таблица 4

Режимы и способы стерилизации

Влажный жар		Сухой жар	
T, °C	Время стерилизации	T, °C	Время стерилизации

100	20 час	120	8 час
109	2,5 час	140	2,5 час
115	50 мин	160	1 час
121	15 мин	170	25 мин
126	10 мин	180	10 мин
134	3 мин		

Сухой жар применяется для стерилизации стеклянной посуды (пробирок, колб, чашек Петри, пипеток), а также жиров, смазок, минерального масла, восков, порошков. Для стерилизации сухим жаром используют суши-жаровые шкафы (печи Пастера).

При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате окисления внутриклеточных компонентов. Споры бактерий более устойчивы к сухому жару, чем вегетативные клетки.

Стерилизацию паром (влажным жаром) проводят в автоклаве с насыщенным паром под давлением. Большинство автоклавов относится к гравитационным: пар движется в них сверху вниз под действием разности плотностей воздуха и пара. Воздух из автоклава до начала стерилизации должен быть полностью вытеснен паром. Присутствие воздуха приводит к тому, что камера нагревается медленнее и до более низкой температуры.

Питательные среды, не содержащие углеводы, стерилизуют при 1 атм в течение 15–20 мин, с углеводами – при 0,5 атм 15 мин.

Контроль температуры в стерилизационной камере осуществляется с помощью порошкообразных химических веществ – индикаторов, имеющих определенную температуру плавления. Запаянные ампулы с порошками, смешанными с небольшим количеством красителя (метиленовая синь, фуксин, сафранин), помещают в камеру со стерилизуемым материалом. При достижении в камере определенной температуры порошки плавятся, образуя сплавы, окрашенные в цвет добавленной краски.

Показатели температуры плавления порошков-индикаторов:

Бензонафтол – 110 °С

Антипирин – 115 °С

Серный цвет – 115 °С

Резорцин чистый – 118 °С

Бензойная кислота – 121 °С.

На 100 г порошка-индикатора прибавляется 0,01 г сафранина, 0,005 г фуксина или метиленовой сини.

Используют также бумажные полоски-тесты (термотесты) и биологические индикаторы (БИ). БИ содержат известные концентрации микроорганизмов, обычно бактериальных спор, которые при определенном воздействии гибнут с прогнозируемой скоростью. БИ могут быть приготовлены на различных носителях (фильтровальной бумаге, нитях или кусочках глины).

Стерилизация текучим паром (дробная стерилизация) производится в аппарате Коха или автоклаве при незавинченной крышке и открытом вы-

пускном кране. Аппарат Коха представляет собой металлический полый цилиндр с двойным дном. Пространство между верхней и нижней пластинкой дна заполняют на 2/3 водой (для спуска оставшейся после стерилизации воды имеется кран). Крышка аппарата конической формы имеет в центре отверстие для термометра и несколько небольших отверстий для выпуска пара. Стерилизации текучим паром подвергаются в основном питательные среды, свойства которых изменяются при температуре выше 100° (питательные среды с аммиачными солями, молоко, желатин, картофель, некоторые углеводы). Стерилизацию проводят по 15–30 мин в течение трех дней подряд. При первой стерилизации погибают вегетативные формы микробов, некоторые споры при этом сохраняются и прорастают в вегетативные особи в процессе хранения питательных сред при комнатной температуре, погибая при последующих прогреваниях.

Тиндализация – дробная стерилизация с применением температуры ниже 100 °С, предложенная Тиндалем. Используется для стерилизации материалов, легко разрушающихся при высокой температуре (сывортки, витамины). Стерильность достигается повторным прогреванием объекта при температуре 60 °С по часу ежедневно в течение 5–6 дней подряд.

Пастеризация – частичная стерилизация многих пищевых продуктов (вино, пиво, соки), проводится при 65–80° С в течение 10–60 мин (споры микроорганизмов не уничтожаются).

Стерилизация фильтрованием применяется в тех случаях, когда повышенная температура может резко повлиять на качество стерилизуемых материалов (питательные среды, сывортки, антибиотики), а также для очищения бактериальных токсинов, фагов и различных продуктов жизнедеятельности бактерий. Как окончательный процесс фильтрование менее надежно, чем стерилизация паром из-за большой вероятности прохождения микроорганизмов через мембранные фильтры. Фильтры задерживают микроорганизмы благодаря поровой структуре их матрикса. Для пропускания раствора через фильтр требуется вакуум (создается, например, водоструйными насосами) или давление (типа шприцев). Существуют два основных типа фильтров – глубинные и мембранные. Глубинные фильтры состоят из волокнистых или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них благодаря адсорбции и механическому захвату в матриксе фильтра. Имеют большую емкость. Не имеют определенного размера пор. Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру, получают их из нитроклетчатки, захват ими частиц определяется размером пор. Имеют низкую емкость, непрочные по сравнению с глубинными.

Стерилизация излучением. Излучение может быть неионизирующим (инфракрасное, ультрафиолетовое, ультразвуковое, радиочастотное) и ионизирующим (β-частицы, рентгеновские лучи и γ-лучи). Ионизирующая радиация представляет собой воспроизводимый и надежный способ стерилизации.

Электронные ускорители употребляются для промышленной стерилизации образцов с низкой плотностью, таких как хирургический шовный и перевязочный материалы. Подобный способ стерилизации имеет ряд преимуществ: он позволяет быстро облучать материалы на конвейере, еще на стадии их производства.

γ -лучи: наиболее чувствительны к γ -облучению вегетативные клетки бактерий, затем – плесневые грибы, дрожжи, бактериальные споры и вирусы. γ -облучение успешно применяется для стерилизации таких предметов, как больничные принадлежности, антибиотики, витамины, гормоны, стероиды, пластмассовое разовое медицинское оборудование, одноразовые чашки Петри, хирургический шовный и перевязочный материалы.

Ультрафиолетовое облучение имеет ограниченное применение из-за малой проникающей способности. Особой чувствительностью к радиации обладают нуклеиновые кислоты, особенно ДНК, поскольку максимум спектра эффективного действия УФ совпадает с максимумом поглощения.

Радиочастотное облучение имеет ограничения: его летальное действие видоспецифично, поэтому для уничтожения разных микроорганизмов могут потребоваться различные частоты. Необходимо научиться управлять радиочастотным облучением и обеспечить надежную безопасность персонала.

Эффективность облучения зависит от полученной дозы. Выбор дозы определяется микробным загрязнением, а также формой и составом материала, подлежащего стерилизации. Единицей дозы облучения является рад, который эквивалентен поглощенной энергии примерно в 100 эрг/г. Дозы стерилизации обычно выражают в мегарадах (10⁶ рад). Величина поглощенной дозы может быть определена с помощью индикаторов, например, раствора сульфата железа (FeSO₄) и др.

Химическая стерилизация (газы). Газы для стерилизации применяются в тех случаях, когда материалы и оборудование нельзя стерилизовать другими способами. Чаще всего используют окись этилена и формальдегид. Процесс стерилизации газом более сложно контролировать, чем другие способы стерилизации, поскольку он характеризуется множеством параметров.

Чашечный метод Коха широко используется для определения количества жизнеспособных микроорганизмов в почве и других естественных субстратах. Применение его позволяет не только учесть численность микроорганизмов, но и оценить их разнообразие по морфологии колоний.

Почвенные образцы берут с помощью стерильной ложки, исследование проводится в день взятия образцов. Сущность метода заключается в высеве исследуемой пробы почвы на плотную среду в чашки Петри и последующем подсчете выросших колоний. При этом считают, что каждая колония является результатом размножения одной клетки. Работа проводится в три приема: приготовление разведений, посев в чашки, подсчет выросших колоний.

Посев делают из разведений суспензии в зависимости от предполагаемого количества микроорганизмов в исследуемом субстрате. Разведения де-

лают в стерильной водопроводной воде или изотоническом растворе хлористого натрия. В ходе опыта используют постоянный коэффициент разведения. Чаще всего делают десятичные разведения.

Образец анализируемой почвы (1–10 г) помещают в колбу со 100 мл стерильной воды и встряхивают. Затем переносят стерильной пипеткой 1 мл исследуемого материала в пробирку с 9 мл стерильной воды. Если исследуемый материал уже был разведен в 100 раз, получают разведение 1:1000. Суспензию этого разведения тщательно перемешивают, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Затем этой же пипеткой берут 1 мл полученного разведения и переносят его во вторую пробирку – получают разведение 1:10000. Таким же образом готовят и последующие разведения. Степень разведения устанавливается предполагаемым количеством микроорганизмов в образце: число разведений тем больше, чем больше микроорганизмов в исходном субстрате.

Посев производят на агаризованные среды в чашки Петри. Для определения суммарной численности микроорганизмов используют мясопептонный или рыбопептонный агар (МПА, РПА), для определения содержания грибов в почве – сусло-агар (СА), для определения численности различных физиологических групп и санитарно-показательных микроорганизмов используют соответствующие питательные среды. В стерильные чашки Петри наливают расплавленную на водяной бане агаризованную среду, по 20–30 мл в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока не застынет агар. Стерильной пипеткой наносят определенный объем (обычно 0,1–0,5 мл) соответствующего разведения, предварительно тщательно перемешанного, на поверхность агаровой пластинки в чашку Петри. Данный объем распределяют по поверхности среды стерильным шпателем. Затем этим шпателем проводят по всей поверхности среды во второй и третьей чашке, куда посевной материал не вносили (метод истощающего посева).

Из каждого разведения делают 4–6 параллельных высевок. При параллельных посевах одного разведения можно пользоваться одной стерильной пипеткой и одним шпателем. Чашки с засеянными средами помещают в термостат, отрегулированный на температуру, благоприятную для развития выявляемых организмов. Подсчет бактерий производят при культивировании с температурой 30 °С через трое суток, при комнатной температуре – через семь суток. Подсчет дрожжей и грибов – при комнатной температуре через 3–10 суток (при температуре 25 °С срок наблюдения за грибами может быть сокращен до 2–3 дней).

Подсчитывают количество колоний, выросших в чашке Петри, и делают пересчет на 1 г. Результаты параллельных высевок суммируют и вычисляют среднее число колоний, выросших при высеве из этого разведения. Колонии считают, не открывая чашки Петри.

Точность метода зависит от числа подсчитанных колоний, а не от числа повторений высевок. Лучшим разведением считают тот, при высеве из которого на плотной питательной среде возникает от 50 до 100 колоний. Если

число выросших колоний меньше 10, то эти результаты отбрасывают и для расчета количества клеток в исходном субстрате не используют. Желательно, чтобы общее количество подсчитанных колоний при высеве из данного разведения было не менее 300.

Количество микроорганизмов в 1 г (1 мл) исходного субстрата вычисляют по формуле

$$T = a \times b \times c / d,$$

где T – количество микроорганизмов в 1 г, a – количество подсчитанных колоний, b – разведение, из которого произведен высев, c – 10 (если на чашки высевали 0,1 мл суспензии), d – масса субстрата (почвы), взятого для анализа.

Статистическая обработка результатов возможна только при минимальной технической ошибке, поэтому чашечный метод требует большой чистоты и аккуратности при выполнении всех операций. Необходимо тщательно оберегать пипетки и среды от заражения посторонними микроорганизмами, так как случайно попавшая клетка может завысить число микроорганизмов в исследуемой суспензии. Приготовление разведений и высевы следует производить в боксе.

Описанный метод применим для учета аэробов и факультативных анаэробов. Для учета строгих анаэробов чашки Петри после посева помещают в анаэробные условия.

Экологические методы исследования почвенных микроорганизмов

Метод стекол обрастания (по Росси–Холодному). Метод позволяет наблюдать «микробные пейзажи». В небольшом почвенном разрезе одну из стенок зачищают и, сделав ножом вертикальную щель, закладывают в нее стерильные предметные стекла, плотно прижимая их к почве. Закапывают разрез, отмечая колышком местонахождение препаратов. Если почва содержит достаточно влаги, то закопанное стекло вскоре покрывается почвенным раствором, к его поверхности прилипают коллоидные частички органического и минерального происхождения. В этой среде поселяются и активно развиваются различные микроорганизмы, образующие на стеклах характерные для данной почвы микрорельефы. По истечении срока экспозиции (не менее одного месяца) стекло осторожно отделяют от почвы (нескользящим движением), подсушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки, препарат осторожно отмывают водой от крупных частиц почвы (для этого можно оставить стекло в стакане с водой в наклонном положении на несколько часов), окрашивают 1 %-ным карболовым эритрозин в течение 1 часа во влажной камере, промывают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Метод широко применяется в микробиологической практике. С помощью этого метода впервые оказалось возможным наблюдение за рас-

пределением различных микроорганизмов в их природной среде обитания, наблюдение за формой и размерами группировок микроорганизмов, их взаимоотношениями.

Модификации метода заключаются в том, что стекла перед помещением в почву покрывают какой-нибудь питательной средой (крахмало-аммиачным агаром, например, согласно модификации Рыбалкиной и Кононенко) или специфическим субстратом (например, фильтровальной бумагой, льняной тканью и т. д.).

Метод капиллярных педоскопов. В естественных условиях в почве, илах развитие микроорганизмов происходит в основном в почвенных капиллярах, к стенкам которых прикрепляются почвенные микроорганизмы. Исходя из этого положения, Б. В. Перфильев и Д. Р. Габе предложили использовать для наблюдения за жизнью микроорганизмов плоские капилляры с плоскопараллельными стенками. Был сконструирован специальный прибор – педоскоп, состоящий из набора таких капилляров.

Стерильные педоскопы вставляют в почву с помощью специального пробойника так, чтобы каналы ячеек приняли вертикальное положение, т.е. соответствовали преобладающему направлению движения почвенного раствора. Экспозиция педоскопов в почве длится обычно в течение месяца, после чего педоскопы вынимают из почвы, очищают снаружи от почвенных частичек, рассматривают под микроскопом с иммерсионным объективом. Микробные клетки в педоскопах могут быть зафиксированы и окрашены. Фиксируют их в парах осмиевой кислоты или в парах 40 %-ного раствора формалина. Окрашивают 1 %-ным раствором карболового эритрозина, промывают водой.

Модификация метода, предложенная Т. В. Аристовской, состоит в том, что внутренние стенки капилляров покрывают средой, содержащей фракцию гуминовых кислот.

Метод люминесцентно-микроскопического наблюдения микроорганизмов в почвенных монолитах (по Звягинцеву). Готовят цилиндрическую формочку (диаметр и высота по 1 см) из нержавеющей стали, пластмассы или стекла, имеющую острые края. Вдавливают формочку в почву исследуемого горизонта и осторожно вынимают ее так, чтобы над краями формочки возвышался слой почвы. Острой бритвой срезают почву, чтобы верхняя грань монолита была на уровне краев формочки. На поверхность почвы капают водный раствор акридинового оранжевого (1:1000) и накрывают ее очень тонким покровным стеклом (0,10–0,12 мм). Через 10–20 мин исследуют в люминесцентном микроскопе с иммерсионным объективом (×90) в отраженном свете. Основные трудности метода заключаются в подборе подходящей концентрации красителя; для каждой почвы она подбирается опытным путем.

Санитарно-микробиологический анализ почвы

В практике сравнительно редко встречается возможность прямой ко-

личественной оценки опасной микрофлоры, гораздо чаще приходится прибегать к косвенному методу – определению суммарного микробного обсеменения того или иного объекта. При этом исходят из предположения о том, что вероятность проникновения в объект потенциально опасной микрофлоры будет тем выше, чем большими окажутся величины «микробного числа».

Логическая обоснованность этой гипотезы не вызывает сомнений, но в природных условиях она правильна лишь в статистическом плане. Критерий суммарного микробного обсеменения объектов внешней среды служит основанием только для приближенных, относительных оценок. Тем не менее этот показатель имеет определенную сравнительную ценность и поэтому широко используется в санитарно-микробиологической практике.

Почвы считаются чистыми, если в 1 г почвы содержатся десятки тысяч микроорганизмов; умеренно загрязненными, если содержатся сотни тысяч, и грязными – если миллионы.

Далее определяют содержание в почве кишечной палочки. В санитарно-гигиеническом отношении важно не только зарегистрировать факт наличия кишечной палочки в том или ином субстрате, но важно учесть и количественную сторону данного явления. Это необходимо для суждения об интенсивности фекального загрязнения. Для этой цели служат два показателя: коли-титр и коли-индекс.

Под титром кишечной палочки понимают наименьшее количество исследуемого материала, в котором обнаруживается одна кишечная палочка. Титр кишечной палочки выражают для жидкостей в миллилитрах или долях миллилитра, для твердых субстратов – в граммах или долях грамма. Коли-индекс – это количество особей кишечной палочки, обнаруженное в определенном объеме исследуемого объекта.

Численность кишечной палочки определяют методом разведений при высеве на дифференциально-диагностическую среду Эндо. Другим наиболее удобным методом для вычисления коли-индекса является метод мембранных фильтров. Готовят суспензию почвы 1:10 и ее разведения 1:100 и 1:1000. 1 мл взвеси вносят в стерильную пробирку с 50 мл воды и фильтруют через мембранные фильтры № 2 или № 3. Для удаления из взвеси крупных частиц проводят предварительную фильтрацию через фильтр № 6. После этого фильтры выкладывают на среду Эндо и инкубируют в течение 24 часов при температуре 37 °С. Проводят подсчет выросших колоний кишечной палочки и с учетом разведения делают пересчет на 1 г почвы. После установления коли-индекса определяют коли-титр по формуле

$$\text{коли-титр} = 1 / \text{коли-индекс}.$$

По коли-индексу судят о чистоте почвы. Чистая почва не содержит ни одной кишечной палочки на 1 г почвы; слабозагрязненная – 10–100; умеренно загрязненная – 100–1000; сильнозагрязненная – более 1000.

Микрофлора воды

Типичными водными экосистемами являются океаны, моря, озера, пруды и проточные водоемы. Вода – естественная среда обитания микроорганизмов.

Микрофлора природных вод различается по качественному и количественному составу. В большинстве это сапротрофы, но могут встречаться патогенные и условно патогенные виды. В основном это бактерии овальной и цилиндрической формы, среди которых преобладают пигментообразующие кокки, присутствуют микроорганизмы, встречающиеся в почве, где расположены водоемы.

Каждый водоем имеет характерные особенности распределения микроорганизмов как по вертикали, так и по горизонтали. В количественном отношении содержание их достаточно велико. В морской воде и в пресноводных водоемах от 10 млн. до 3 млрд. клеток в 1 мл. Основная масса расположена в прибрежных зонах. На глубине 1 км встречаются единичные представители, а до 4 км они практически отсутствуют.

Подземные воды, родниковые и воды глубоких артезианских колодцев содержат единичные микробные клетки. Подземные воды обычных колодцев содержат значительное количество микроорганизмов; чем ближе к поверхности расположены грунтовые воды, тем обильнее их микрофлора.

В воде открытых водоемов (поверхностные воды) количество микроорганизмов изменяется в зависимости от метеоусловий и времени года. Зимой микрофлора воды в 4–12 раз беднее, чем летом.

В вертикальном направлении микроорганизмы распределены в воде более равномерно, чем в почве. На глубине 21 м микроорганизмов только в 2 раза меньше, чем на глубине 3 м.

В сточных водах содержится много биогенных фосфор-, углерод-, азотсодержащих соединений, которые попадают в водоемы. По мере удаления от населенных пунктов и предприятий, содержание органики и количество микроорганизмов в воде уменьшается. Этот процесс называется самоочищением воды. Основную роль в самоочищении вод от органических, синтетических веществ играют сапротрофные микроорганизмы, грибы, гидробионты, высшие растения. При этом микроорганизмы обладают высокой пластичностью, имеют мощные ферментные системы, благодаря которым загрязняющие вещества минерализуются и разрушаются.

Установлено, что под влиянием загрязняющих веществ в пресноводных экосистемах отмечается падение их устойчивости вследствие нарушения пищевой пирамиды и ломки сигнальных связей в биоценозе, микробиологического загрязнения, эвтрофирования и других крайне неблагоприятных процессов.

Сапробность – комплекс особенностей водоема, отличающихся степенью загрязненности органическими веществами и определяющих развитие соответствующих организмов в воде. Различают три типа сапробности.

1. Полисапробная зона – сильно загрязненная, характеризуется боль-

шим количеством высокомолекулярных органических соединений, незначительным содержанием кислорода. Преобладают анаэробные бактерии, вызывающие гниение и брожение. В 1 мл воды содержится несколько миллионов бактерий.

2. Мезосапробная зона – умеренно загрязненная. Идут интенсивные процессы минерализации, но преобладают окислительные процессы. За счет минерализации органических веществ уменьшается количество сапротрофных бактерий. В этой зоне содержатся аммиак и метан.

3. Олигосапробная зона – зона чистой воды, органических веществ нет, окислительные процессы прекращаются. Численность бактерий снижается до 10–100 кл/мл.

В естественных незагрязненных проточных водоемах часто бывает так мало одноклеточных организмов, что вода кажется кристально прозрачной. Состав микрофлоры и микрофауны в водоеме служит хорошим индикатором степени его загрязнения. Если в водоеме еще встречаются дафнии – значит, вода чистая. Присутствие *Sphaerotilus natans* указывает на сильное загрязнение органическими веществами, а запах сероводорода свидетельствует об анаэробной сульфатредукции, т. е. служит сигналом тревоги.

Интенсивность и направленность микробиологических процессов зависит от температуры и содержания в воде молекулярного кислорода. В зависимости от количества кислорода в водоемах выделяют три зоны.

1. Аэробная – поверхностная зона, содержит много кислорода. Ее населяют водоросли и микроорганизмы, осуществляющие процессы минерализации: *Pseudomonas*, *Artrobacter*, миксобактерии. Толщина слоя зависит от количества органики. Если органических веществ мало, то аэробы растут медленно, кислород проходит вглубь и зона увеличивается. Если органики много, то происходит быстрый рост микроорганизмов и кислород не проходит.

2. Анаэробная – содержит мало кислорода. Обитают факультативные и облигатные анаэробы. Нет процесса нитрификации – выделяется аммиак, вода бедна нитратами. Выделяется много метана. Если содержится много сульфатов, то образуется сероводород. Если мало сульфатов, то сероводород образуется за счет расщепления серосодержащих аминокислот. В этой зоне обнаруживаются пурпурные и зеленые серобактерии, сульфатредуцирующие бактерии, можно найти формы, обладающие газовыми вакуолями, такие как *Lamprocystis*, *Amoebobacter*, *Thiodictyon*, *Thiopedia*, *Pelodictyon* и *Ancalochloris*, а также передвигающиеся с помощью жгутиков виды *Chromatium* и *Thiospirillum*.

3. Микроаэрофильная – промежуточная между первой и второй. Сверху немного кислорода, снизу – метан, аммиак, окислы металлов. Обитают хемолитоавтотрофы: водород-, метан-, железоокисляющие бактерии. Для зоны также характерна высокая биологическая активность. Здесь развиваются некоторые цианобактерии, способные переносить присутствие сероводорода и отсутствие O₂, в том числе *Oscillatoria limnetica*.

Скорость использования веществ в анаэробных условиях невысока. При этом накапливаются продукты брожения, которые ингибируют последующие процессы разложения органики, и она оседает на дно.

Санитарно-микробиологическое исследование воды

При санитарно-микробиологическом исследовании воды определяют микробное число (численность микроорганизмов в 1 мл), коли-титр или коли-индекс в 1 л воды и наличие энтерококков в 50 мл воды. При специальном санитарно-микробиологическом исследовании воды наряду с этим учитывают патогенные микроорганизмы: возбудителей дизентерии, брюшного тифа, паратифа А, Б и холеры.

Установление микробного числа проводят методом культивирования или методом фильтрации с использованием мембранных фильтров. Последний является более точным. При определении микробного числа методом культивирования делают посев воды на МПА. Водопроводную воду засевают в количестве 1 мл, из естественных водоемов для засева используют разведения 1:10, 1:100 и 1:1000. Посевы инкубируют при 37 °С в течение двух суток, ведут подсчет выросших колоний в чашках и делают пересчет количества микроорганизмов на 1 мл воды.

Вода считается хорошего качества, если число микроорганизмов менее 100 на 1 мл воды, сомнительной – 100–150 микроорганизмов на 1 мл, загрязненной – 150–500 микроорганизмов на 1 мл, грязной – более 500 микроорганизмов на 1 мл воды. Вода, содержащая в 1 мл 100 и более микроорганизмов, считается непригодной для питья.

После установления общего микробного числа определяют бактерии группы кишечной палочки. У нас в стране действуют следующие нормативы для питьевой воды централизованного водоснабжения СанПиН 2.1.4.1074–01, для питьевой воды нецентрализованного водоснабжения СанПиН 2.1.4.544–96, согласно которым допускается не более трех кишечных палочек на 1000 мл воды. По международному стандарту вода считается превосходной, когда в 100 мл воды нет ни одной кишечной палочки; удовлетворительной – одна–три кишечные палочки; сомнительного качества – четыре–десять и неудовлетворительного качества – более десяти кишечных палочек.

Кишечные палочки в санитарной микробиологии воды используются в качестве: показателя чистоты; индикатора фекального загрязнения воды; косвенного показателя загрязнения воды патогенными микроорганизмами – возбудителями кишечных инфекций.

После обнаружения кишечной палочки в воде определяют энтерококки. В качестве санитарно-показательных используется два вида стрептококков: *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. Через мембранный фильтр пропускают 50 мл воды и мембранные фильтры выкладывают на агаризованные диагностические среды. Для обнаружения энтерококков используют среды, содержащие 40 % желчи (рН 9.6–10.2) или среды с азидом натрия и азидом калия.

На этих средах колонии энтерококков имеют черный цвет. По ГОСТу в питьевой воде не должно содержаться ни одного энтерококка в 50 мл воды.

Микрофлора воздуха

Воздух не является местом обитания микроорганизмов, но служит местом их повсеместного распространения: там, куда поступает воздух, могут быть и микроорганизмы. Обилие солнечных лучей приводит к их массовой гибели, а отсутствие источников питания исключает возможность размножения. Однако в атмосфере всегда содержится определенное количество жизнеспособных клеток, которые вместе с пылью поднимаются в воздух, а затем вновь оседают на поверхность земли. Повсеместное распространение микроорганизмов воздушными потоками составляет часть так называемой микробиологии атмосферы. Фактор географической изоляции, столь важный для животных и растений, для бактерий и грибов практически не имеет значения.

В составе твердых частиц в аэрозолях всегда присутствуют микроорганизмы. Над сушей это главным образом споры грибов, над морем – преимущественно бактерии. В воздухе над крупными городами микроорганизмов гораздо больше, чем в сельской местности или в лесу; летом больше, чем зимой. Особенно чистый воздух над морями, горами, ледяными полями Арктики и Антарктиды, где в 1 м^3 воздуха содержатся единичные клетки.

Количество микроорганизмов в воздухе уменьшается по мере удаления от поверхности земли. Верхняя граница жизни пока не установлена.

Видовой состав микрофлоры атмосферы носит случайный характер и потому сильно колеблется. Среди микроорганизмов преобладают пигментные формы стрептококков, сарцин и дрожжей, которые более устойчивы (за счет наличия каротиноидов) к ультрафиолетовым лучам, а также споры бактерий и грибов.

Очень богат микроорганизмами воздух закрытых помещений, особенно таких, где неизбежно массовое хождение людей, сопровождающееся поднятием пыли. Например, в школах до занятий численность бактерий обычно не превышает 2 тыс. в 1 м^3 , а после занятия – десятки тысяч.

В воздухе жилых помещений, поликлиник и больниц обнаруживаются в значительном количестве болезнетворные микроорганизмы, которые неустойчивы к действию света и высушиванию, поэтому большинство из них гибнет. Однако туберкулезные палочки, патогенные стрептококки и стафилококки хорошо переносят высушивание, в связи с этим воздух может быть источником инфекционных заболеваний.

Санитарно-микробиологический анализ воздуха

Санитарная оценка воздуха помещения осуществляется по двум микробиологическим показателям: общему количеству бактерий и количеству санитарно-показательных микроорганизмов в 1 м^3 воздуха. Для обнаружения

микроорганизмов в воздухе предложено большое количество методов и приборов, позволяющих определять как общее количество, так и состав микрофлоры. В основу методов положены два принципа: оседание (седиментация) и засасывание (аспирация). Простейший – метод Коха, основанный на оседании микроорганизмов, капелек жидкости и пылинок под влиянием силы тяжести на поверхность агара открытой чашки Петри. Метод Кротова основан на ударно-прибивном действии струи исследуемого воздуха, проводится с помощью прибора Кротова.

Ни один из предложенных методов не позволяет уловить и подсчитать все микроорганизмы, лучше использовать сочетание нескольких методов.

Бактериальная загрязненность воздуха определяется по количеству колоний, выросших в чашках Петри на МПА. В. Л. Омелянским установлено, что за 5 минут при спокойном состоянии воздуха на площадь в 100 см^2 оседает приблизительно столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха. Рассчитав площадь питательной среды в чашке и зная количество выросших на ней колоний микробов, можно определить количество микроорганизмов, содержащихся в 1 м^3 воздуха.

Критерии чистоты воздуха следующие: в воздухе операционных не допускается присутствие микроорганизмов. Микробное число для пищевых учреждений – не более 500 клеток в 1 м^3 , для жилых помещений – до 1500 клеток в 1 м^3 .

Санитарно-показательными микроорганизмами для оценки чистоты воздуха служат гемолитические стрептококки и стафилококки – постоянные обитатели верхних дыхательных путей, слизистой носа и ротовой полости человека. Это *Streptococcus viridans* – зеленающий стрептококк, *Streptococcus haemolyticus* – гемолитический стрептококк и *Staphylococcus aureus* – золотистый стафилококк.

В качестве диагностической среды для их выявления используют кровяной агар. Зеленающий стрептококк имеет вокруг выросших колоний положительную зону неполного просветления с позеленением среды. Гемолитический стрептококк образует на поверхности кровяного агара колонии, окруженные зоной гемолиза.

Воздух считается чистым, если в 1 м^3 воздуха содержится летом не более 4 стрептококков, зимой – не более 16. Загрязненным воздух считается, если в 1 м^3 воздуха содержится летом более 32 стрептококков, зимой – более 56. Золотистый стафилококк используется в качестве санитарно-показательного микроорганизма в хирургических палатах и родильных домах. В 250 л воздуха не должно содержаться ни одного стафилококка.

Задание

1. Определить общее микробное число для воды из водопроводной сети и аквариума.
2. Определить общее микробное число для воздуха в помещении методом Коха.

3. Оценить санитарно-микробиологическое состояние анализируемых объектов.

План выполнения работы

Посев микроорганизмов на чашки Петри (2 часа)

1. Разлить расплавленную и остуженную до 45–50 °С питательную среду в стерильные чашки Петри. После застывания агара чашку Петри открыть полностью и выдержать в течение 5 минут в исследуемом помещении. Затем чашку закрыть, поместить дном вверх в термостат и культивировать 5–7 дней при 27–30 °С.

2. Для определения количества микроорганизмов в 1 мл аквариумной воды приготовить 10-кратное разведение от 1:10 до 1:1000. Затем 0,1 мл из соответствующего разведения, начиная с большего, внести в стерильные чашки Петри с застывшей агаризованной средой и шпателем равномерно распределить по поверхности. Чашки культивировать в термостате вверх дном при температуре 27–30 °С.

3. Аналогично провести посев микроорганизмов из водопроводной воды. Для этого отобрать пробу воды в стерильную колбу и внести 0,1 мл в чашки с застывшей агаризованной средой.

Количественный учет микроорганизмов и оценка санитарного состояния воды и воздуха (2 часа):

1. Для определения общего микробного числа в анализируемом воздухе и пробах воды подсчитать количество выросших колоний на чашках и сделать пересчет на 1 м³ воздуха и 1 мл воды. Оценить степень чистоты воздуха и качество воды по нормативам общего микробного числа.

2. Провести анализ выросших колоний: подсчитать количество бактерий и грибов, пигментированных бактерий, споровых и неспоровых форм. Приготовить прижизненные препараты из некоторых колоний, промикроскопировать. Ознакомиться с морфологией клеток (форма, подвижность, взаимное расположение), зарисовать.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие факторы оказывают влияние на развитие микроорганизмов в почве?

2. Какими признаками характеризуются аллохтонные и автохтонные микроорганизмы? Кем было предложено такое разделение?

3. Какие факторы оказывают влияние на численность микроорганизмов в водоемах?

4. Какие виды загрязнений почвы и воды относятся к наиболее опасным? Как происходит самоочищение почвы и воды?

5. Как можно определить численность микроорганизмов в почве?

6. Как проводится санитарно-микробиологический анализ воды?

7. Какие микроорганизмы относятся к санитарно-показательным? Что они характеризуют?
8. Какие показатели характеризуют чистоту водоемов и питьевой воды?
9. Какие микроорганизмы могут присутствовать в воздухе? Как определить их количество?
10. Какие существуют критерии чистоты воздуха?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алешукина, А. В. Медицинская микробиология : учеб. пособие / А. В. Алешукина. – Ростов н/Д : Феникс, 2003. – 473 с.
2. Аникиев, В. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие для биологических специальностей педагогических институтов : допущено Министерством просвещения СССР / В. В. Аникиев, К. А. Лукомская. – 2-е изд. – М. : Просвещение, 1983 . – 127 с.
3. Асонов, Н. Р. Микробиология / Н. Р. Асонов. – М. : Колос, 2001. – 342 с.
4. Бабьева, И. П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И. П. Бабьева, В. И. Голубев. – М. : Пищевая пром-сть, 1979. – 132 с.
5. Борисов, Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология : учебник для вузов по медицинским специальностям : доп. министерством образования РФ / Л. Б. Борисов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Медицинское информационное агентство, 2005. – 734 с.
6. Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология : учеб. пособие по микробиологии, вирусологии, иммунологии для студентов медицинских вузов : рекомен. учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Широбоков. – М. : Академия [Academia], 2003. – 462 с.
7. Громов, Б. В. Строение бактерий : учеб. пособие / А. Б. Громов ; кол. авт. Ленинградский университет [ЛГУ]. – Л. : Изд-во ЛГУ, 1985. – 192 с.
8. Гусев, М. В. Микробиология [Электронный ресурс] : рекомендовано Комитетом по высшей школе Миннауки России в качестве учебника для студентов биологических специальностей университетов / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – 3-е изд., – М. : изд-во МГУ, 1992 – 2001. – 300 с.
9. Гусев, М. В. Микробиология : учебник для вузов по направлению 510600 «Биология» и биологическим специальностям : рекомендовано Министерством образования РФ / М. В. Гусев, Л. А. Минеева – 4-е изд., стер. – М. : Академия [Academia], 2003. – 462 с.
10. Дерябин, Д. Г. Функциональная морфология клетки : учеб. пособие для студентов, обучающихся по специальностям 020209 «Микробиология», 020201 «Биология» и другим биологическим специальностям: допущено учебно-методическим объединением по классическому университетскому образованию / Д. Г. Дерябин. – М. : Книжный дом "Университет", 2005. – 317 с.
11. Краткий определитель бактерий Берги = The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: пер. с англ. / под ред. Дж. Г. Хоулт, Г. А. Заварзин. – М. : Мир, 1980. – 495 с.
12. Определитель бактерий Берджи = Bergey's Manual of Determinative

Bacteriology : в 2 т. / кол. авт.; под ред. Д. Г. Хоулт (биология), Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уильямс. – М. : Мир, 1997.

13. Дьяков, Ю. Т. Введение в альгологию и микологию / Ю. Т. Дьяков. – М. : Изд-во МГУ, 2000. – 205 с.

14. Методы почвенной микробиологии и биохимии : учеб. пособие / под ред. Д. Г. Звягинцева. – М. : Изд-во МГУ, 1991. – 164 с.

15. Мир растений : в 7 т. / кол. авт. ; гл. ред. А. Л. Тахтаджян. – 2-е изд., перераб. – М. : Просвещение. – Т 2. Грибы / под ред. М. В. Горленко, 1991. – 475 с.

16. Мюллер, Э. Микология / Э. Мюллер, В. Леффлер. – М. : Мир, 1995. – 211 с.

17. Общая микробиология : учеб. пособие для биологических факультетов университетов : допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР / Л. Г. Бранцевич, И. А. Василевская, Л. Н. Лысенко ; под. ред. А. Е. Вершигора. – Киев : Выща шк., 1988. – С. 3–19.

18. Определитель бактерий Берджи. – 9-е изд. : В 2 т. : пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М. : Мир, 1997.

19. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студентов вузов по направлению 510600 «Биология», специальности 012400 «Микробиология» и биологическим специальностям: допущено Министерством образования и науки РФ / М. А. Егорова, Л. М. Захарчук ; под ред. А. И. Нетрусова. – М. : Академия [Academia], 2005. – 603 с.

20. Прудникова, С. В. Микробиология. Руководство для работ по малому практикуму : учеб. пособие для студентов биологических специальностей : рекомендовано Сибирским региональным учебно-методическим центром высшего профессионального образования / С. В. Прудникова, В. М. Гукасян и Н. И. Сарматова ; кол. авт. Красноярский университет [КрасГУ]. Биологический факультет. – Красноярск : Краснояр. ун-т [КрасГУ], 2004. – 103 с.

21. Руководство к практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие для биологических факультетов университетов : допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР / под ред. Н. С. Егоров. – 2-е изд. – М., 1983. – 215 с.

22. Сорокин, Н. Д. Почвенно-экологические методы изучения микроорганизмов: учеб. пособие: рекомендовано Сибирским региональным учебно-методическим центром высшего профессионального образования / Н. Д. Сорокин, Е. Н. Афанасова ; кол. авт. Красноярский университет [КрасГУ]. Биологический факультет. – Красноярск : Краснояр. ун-т [КрасГУ], 2004. – 72 с.

23. Стайниер, Р. Мир микробов. Т. 1–3 / Р. Стайниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. – М. : Мир, 1979.

24. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для сту-

дентов вузов по специальности 012400 «Микробиология» и биологическим специальностям : допущено Министерством образования РФ / Е. З. Теппер, Г. И. Переверзева ; под ред. В. К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Дрофа, 2004 . – 256 с.

25. Чурикова, В. В. Основы микробиологии и вирусологии : учеб. пособие для биологических специальностей университетов : допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР / В. В. Чурикова, Д. П. Викторов. – Воронеж : Воронеж. ун-т [ВГУ], 1989. – 272 с.

26. Шлегель, Г. Г. Общая микробиология = Allgemeine Mikrobiologie : пер. с немецкого / Г. Г. Шлегель. – М. : Мир, 1987. – 566 с.

ССЫЛКИ НА ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

- Рисунок 14 – <http://itv-midipyrenees.com>, <http://user.gwdg.de>
Рисунок 15 – mikroby.blox.pl
Рисунок 16 – ome.jgi-psf.org, <http://hpa.org.uk>
Рисунок 17 – decinepharmacie.univ-fcomte.fr
Рисунок 18 – <http://fde.metu.edu.tr>, microbewiki.kenyon.edu
Рисунок 19 – <http://avignon.inra.fr>
Рисунок 20 – <http://foodnews.ch>, <http://nugi-zentrum.de>
Рисунок 21 – www.user.gwdg.de, microbewiki.kenyon.edu
Рисунок 22 – <http://genomenewsnetwork.org>, luskiewnik.strefa.pl
Рисунок 23, 24, 26, 27, 28, 29 – <http://onih.go.jp>
Рисунок 25 – de.wikibooks.org
Рисунок 30 – <http://aber.ac.uk>, <http://biologyreference.com>
Рисунок 31 – nu-distance.unl.edu, micol.fcien.edu.uy
Рисунок 32 – <http://biolib.cz>
Рисунок 34 – <http://viten.com>
Рисунок 35 – <http://botany.hawaii.edu>
Рисунок 36 – <http://aber.ac.uk>
Рисунок 39 – 129.215.156.68, faculty.ccbcmd.edu
Рисунок 40 – <http://mycolog.com>, <http://vetmed.wisc.edu>
Рисунок 41 – <http://mycolog.com>
Рисунок 42, 45 – <http://aber.ac.uk>
Рисунок 44 – kiifc.kikkoman.co.jp, genome.jgi-psf.org
Рисунок 46 – <http://fooddata.nl>
Рисунок 47, 48 – de.wikibooks.org
Рисунок 49 – genome.jgi-psf.org, commtechlab.msu.edu
Рисунок 50 – <http://cis.kit.ac.jp>, <http://micro.biol.ethz.ch>
Рисунок 51 – genome.jgi-psf.org, <http://biotank.co.uk>, genome.jgi-psf.org, microbewiki.kenyon.edu
Рисунок 52 – phil.cdc.gov, plant.geoman.ru
Рисунок 53 – <http://genomenewsnetwork.org>, embryology.med.unsw.edu.au
Рисунок 54 – microbewiki.kenyon.edu, dwb.unl.edu, <http://mbio.ncsu.edu>, genome.jgi-psf.org
Рисунок 55 – genome.jgi-psf.org
Рисунок 56 – cyclot.hp.infoseek.co.jp, <http://uca.es>, microbewiki.kenyon.edu, <http://rz.uni-frankfurt.de>