

Микробиология

Морфология, строение, развитие

9. Прокариотные микроорганизмы. Одноклеточные бактерии: размеры и морфология. Многоклеточные формы бактерий. Строение, химический состав и функции отдельных компонентов клетки. Слизистые слои, капсулы и чехлы. Клеточные стенки Грам-положительных и Грам-отрицательных бактерий; L-формы микоплазмы.

Размеры клеток 0,2 - 10,0 мкм. Есть карлики (трепонемы, например) 0,05 - 0,1 мкм и гиганты (макромонас) до 100 мкм. Самые крупные клетки у *Erythrobacterium fishelsoni* (в длину до 600 мкм).

Формы клеток бактерий: обычно это палочки разной длины, сферические клетки (кокки), вибрионы и спириллы. Могут образовывать пары палочек и кокков (диплококки), короткие и длинные цепочки палочек и кокков (стрептококки), тетрады и пакеты из 4, 8, и более клеток (сарцины), гроздь (стафилококки), розетки и т.д.

Ядерная зона и генетический аппарат. В 1956 году внутри бактериальных клеток была обнаружена «ядерная зона», или нуклеоид, где размещена бактериальная хромосома. Бактериальная ДНК обнаружена в кольцевой и линейной формах. Индивидуальная клетка прокариот может содержать несколько идентичных копий одной хромосомы. У некоторых видов обнаружены две или три неидентичные хромосомы. Большинство бактерий несет все гены в одной группе сцепления, т.е. на одной хромосоме. Но есть свидетельства, что разные гены могут располагаться и на разных хромосомах. У бактерий нет оформленного ядра, окруженного ядерной мембраной, не найдены пока гистоны и нуклеосомы.

Плазмиды. Это кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, которые могут существовать и реплицироваться как независимо от бактериальной хромосомы, так и быть интегрированными в нее. Они могут нести гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам и другие.

Цитоплазматическая мембрана. Бактерии и археи обычно лишены внутрицитоплазматических мембран (искл.: метанотрофы, фототрофы и нитрификаторы), и содержат только ЦПМ, которая состоит из простых фосфолипидов, образующих мембранный бислой, куда погружены многочисленные белки. Этот бислой обладает свойством избирательной проницаемости, препятствуя свободному продвижению большинства веществ внутрь клетки и из нее. В матрикс ЦПМ заключены также некоторые мембранные белки, имеющие ряд важных функций, включая преобразование и запасание метаболической энергии, регуляцию поглощения и выброса всех пит. в-в и продуктов метаболизма. Кроме того они выполняют сигнальную ф-цию. ЦПМ представляет собой осмотический барьер клетки, предотвращая свободный обмен в-вами с окружающей средой. Строение: полярные группы липидов обращены наружу в водную среду, тогда как ацильные углеводородные цепочки образуют гидрофобное пространство внутри бислоя.

Включения и запасные вещества. Мезосомы - инвагинация ЦПМ в форме везикул, трубочек или ламелл. Ф-ции: считается, что она может играть роль в делении клетки, образуя септу, а затем и поперечную перегородку, а также служить местом прикрепления микробной хромосомы, участвуя в репликации и последующем расхождении дочерних клеток. Могут приниматься участие в секреции. Некоторые считают, что это артефакт. Некоторые клетки образуют газовые вакуоли (аэросомы), окруженные белковой мембраной и выполняющие у водных

организмов роль регуляторов плавучей плотности. Многие микроорганизмы откладывают внутриклеточно запасные в-ва, называемые также тельцами включения (полисахариды, полифосфаты, сера и т.д.). Все они присутствуют в клетке в инертной форме. Некоторые включения просто лежат в клетке, некоторые окружены белковой мембраной (это бета-гидроксibuтират, гликоген, сера, карбоксисомы). Карбоксисомы иногда являются местами концентрирования РубисКО. Параспоральные тельца - в них откладываются токсины, смертельные для личинок некоторых насекомых. Волютин - запасной резервуар фосфата.

Клеточная стенка. Грамположительные бактерии отличаются от грамотрицательных большим содержанием муреина (пептидогликана) в клеточной стенке и отсутствием внешней мембраны. Клеточная стенка является механически стабилизированной и противостоит высокому осмотическому давлению. Опорный элемент - муреин - поперечносшитый биополимер, гетерополисахарид, формирующий замкнутый мешок, полностью покрывающий клетку снаружи. В основе химической структуры пептидогликана заложены периодическая последовательность двух аминокислот — N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM), сшитых между собой бета-1,4-гликозидными связями. Поперечные связи из пептидных мостиков. Некоторые археи содержат сходный биополимер - псевдомуреин. Пептидогликановый слой прошит в поперечном направлении еще и тейхоевыми кислотами, образованными на основе глицерола с большим количеством разнообразных заместителей. Считается, что эти к-ты придают муреиновому мешку определенную степень свободы при растяжении и действуют как пружина.

Капсулы. На пов-ти клеточных стенок многих прокариот можно обнаружить слизистые капсулы разной толщины. Они чаще всего полисахаридной природы. Основная роль - предохранение клетки от фагоцитарных клеток. Фагоциты постоянно контролируют кровь и ткани на наличие бактерий. При столкновении с бактерией они пытаются поглотить и растворить ее. Капсулы предотвращают узнавание и поглощение фагоцитами бактерий.

Слизистые слои. Имеют упаковку и расположение, подобные паркетным дощечкам, плотно покрывающим клетку и состоящим из белков или гликопротеинов. У грамотрицательных бактерий слои прилегают непосредственно к внешней мембране, у грамполож. - ассоциированы с поверхностью пептидогликана. Слои защищают клетку от флуктуаций pH и резких изменений концентраций ионов, осмотического стресса и от воздействия ферментов.

L-формы. При действии лизоцима, пенициллина и некоторых других веществ, разрушающих пептидогликан или нарушающих его синтез, бактерии вначале превращаются в сферопласты, а далее, полностью утратив клеточную стенку, — в бесформенные протопласты, быстро подвергающиеся плазмолизу. Дефектные по клеточной стенке бактерии, которые образуются в организме, обладают жизнеспособностью и патогенностью, называют L-формами в честь института Листера, где они были открыты. Микоплазмы (сем *Mycoplasma*, класс *Mollicutes*) не способны синтезировать компоненты клеточной стенки. Вместо неё микоплазмы покрыты трехслойной эластичной мембраной, состоящей из липопротеиновых соединений, фосфолипидов с включением стероидов, которых нет у бактерий и риккетсий. Содержат большое количество белка и нуклеиновых кислот; количество углеводов варьирует.

10. Жгутики, расположение, организация, механизм движения. Движения скользящих форм. Реакции таксиса. Пили, их значение.

Жгутики. Часто подвижность микроорганизмов обусловлена наличием жгутиков. У бактерий жгутики правовращающиеся, у архей - левовращающиеся. Жгутик

состоит из базального тела, включающего четыре (у грамотриц.) или два (у грамположит.) кольца, стержень и моторные белки, а также из крючка и филамента. Базальное тело закреплено в ЦПМ двумя кольцами M и S, которые часто рассматривают как одно тело. MS-кольцо окружено несколькими белками, которые называют моторными и от которых вращающий момент передается на филамент. В пептидогликановом слое периплазмы у грамотриц. бактерий находится кольцо P, а во внешней мембране - кольцо L. Оба эти кольца выполняют роль втулки, дополнительно удерживающей механизм жгутика. Все кольца пронизаны жестким стержнем, который передает крутящий момент. На наружной стороне внешней мембраны механизм жгутика имеет крючок, переходящий затем в филамент, который заканчивается шапочкой. Филамент представляет собой ригидный цилиндр, состоящий из простого белка флагеллина. Движение клетки осуществляется путем вращения жгутика по или против часовой стрелки, одновременно сама клетка медленно вращается в обратную сторону. При вращении жгутика по часовой стрелке клетка тянется за жгутиком (жгутик - впереди). При вращении жгутика против часовой стрелки клетка выталкивается жгутиком вперед (жгутик - сзади). Выяснено, что к вращению приводит поток протонов через оба кольца или между базальным телом и близлежащим участком цитоплазматической мембраны.

Пили. Это нитеобразные полимерные органеллы белковой природы, локализованные на поверхности клеток. Пили состоят из одного или нескольких типов белковых субъединиц, называемых пилины или фимбрины, которые обычно организованы в спиральные структуры. Пили часто расположены перитрихально по поверхности клеток. Многочисленные типы пилей у бактерий отвечают за адаптацию организмов, их выживаемость. Пили выступают как акцепторы бактериофагов, помогают клеткам принимать и передавать ДНК при конъюгации, принимать участие в движении клетки. Основная функция — поддерживать специфические прикрепительные структуры клетки. Прикрепительные субъединицы пилей (адгезины) часто в качестве минорных компонентов присутствуют на концах пилей. Адгезины являются посредниками при бактериальных контактах, при контактах с неживыми объектами, тканями.

Движения скользящих форм. Скользящие бактерии лишены жгутиков и при перемещении по поверхности твердой среды оставляют слизистый след. Активнодвигающиеся клетки имеют преимущества перед неподвижными: они могут передвигаться по пов-ти твердого субстрата, потому способны использовать такие сложные нерастворимые соединения, как хитин и целлюлоза. Способность к скользящему движению помогает двигаться среди твердых субстратов, выбирать оптимальную позицию в отношении градиентов кислорода, света, сероводорода, температуры. Некоторые бактерии скользят за счет белков внешней мембраны, на которые передается усилие с белков ЦПМ, и движение вперед представляет собой вид отталкивания. Некоторые скользят в направлении длинной оси клетки, другие передвигаются винтовым движением или в направлении, перпендикулярном длинной оси клетки.

Реакции таксиса. Помогают ориентироваться в пространстве, узнавать друг друга при конъюгации или поиске симбионта, фототаксис (на свет), хемотаксис (движение к аттрактантам и от репеллентов), магнитотаксис (ориентация относительно линий магнитного поля Земли, выбирая оптимальное местоположение), аэротаксис (по градиенту кислорода).

11. Клеточная мембрана и внутриклеточные мембранные структуры. Ядерный аппарат, состав, организация и репликация. Рибосомы, газовые вакуоли и

другие органеллы бактерий; их значение. Запасные вещества и другие, внутриклеточные включения.

Ядерная зона и генетический аппарат. В 1956 году внутри бактериальных клеток была обнаружена «ядерная зона», или нуклеоид, где размещена бактериальная хромосома. Бактериальная ДНК обнаружена в кольцевой и линейной формах. Индивидуальная клетка прокариот может содержать несколько идентичных копий одной хромосомы. У некоторых видов обнаружены две или три неидентичные хромосомы. Большинство бактерий несет все гены в одной группе сцепления, т.е. на одной хромосоме. Но есть свидетельства, что разные гены могут располагаться и на разных хромосомах. У бактерий нет оформленного ядра, окруженного ядерной мембраной, не найдены пока гистоны и нуклеосомы.

Плазмиды. Это кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, которые могут существовать и реплицироваться как независимо от бактериальной хромосомы, так и быть интегрированными в нее. Они могут нести гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам и другие.

Цитоплазматическая мембрана. Бактерии и археи обычно лишены внутрицитоплазматических мембран (искл.: метанотрофы, фототрофы и нитрификаторы), и содержат только ЦПМ, которая состоит из простых фосфолипидов, образующих мембранный бислой, куда погружены многочисленные белки. Этот бислой обладает свойством избирательной проницаемости, препятствуя свободному продвижению большинства веществ внутрь клетки и из нее. В матрикс ЦПМ заключены также некоторые мембранные белки, имеющие ряд важных функций, включая преобразование и запасание метаболической энергии, регуляцию поглощения и выброса всех пит. в-в и продуктов метаболизма. Кроме того они выполняют сигнальную ф-цию. ЦПМ представляет собой осмотический барьер клетки, предотвращая свободный обмен в-вами с окружающей средой. Строение: полярные группы липидов обращены наружу в водную среду, тогда как ацильные углеводородные цепочки образуют гидрофобное пространство внутри бислоя.

Включения и запасные вещества. Мезосомы - инвагинация ЦПМ в форме везикул, трубочек или ламелл. Ф-ции: считается, что она может играть роль в делении клетки, образуя септу, а затем и поперечную перегородку, а также служить местом прикрепления микробной хромосомы, участвуя в репликации и последующем расхождении дочерних клеток. Могут приниматься участие в секреции. Некоторые считают, что это артефакт. Некоторые клетки образуют газовые вакуоли (аэросомы), окруженные белковой мембраной и выполняющие у водных организмов роль регуляторов плавучей плотности. Многие микроорганизмы откладывают внутриклеточно запасные в-ва, называемые также тельцами включения (полисахариды, полифосфаты, сера и т.д.). Все они присутствуют в клетке в инертной форме. Некоторые включения просто лежат в клетке, некоторые окружены белковой мембраной (это бета-гидроксипутират, гликоген, сера, карбоксисомы). Карбоксисомы иногда являются местами концентрирования РубисКО. Параспоральные тельца - в них откладываются токсины, смертельные для личинок некоторых насекомых. Волютин - запасной резервуар фосфата.

12. Способы размножения. Дифференцировка. Эндоспоры и другие покоящиеся формы.

Дифференциация у одноклеточных микроорганизмов выражена уже на уровне почкующихся форм. У цианобактерий в трихомах есть специализированные клетки. Это гетероцисты, имеющие толстую оболочку, не делящиеся, содержащие много нитрогеназы и без фотосистемы II, и акинеты - покоящиеся клетки с плотной оболочкой. У актинобактерий имеются различные типы мицелия (субстратный и

воздушный) и сложные органы спороношения (конидии и спорангии). У бактерий наиболее распространено бинарное деление (на две равные части), причем у грамположительных оно происходит септой, а у грамотриц. - перетяжкой. Другие типы размножения - почкование и множественное деление. Почкование иногда происходит с помощью дополнительных выростов, выделяется материнская и дочерняя клетки. При множественном делении из одной клетки образуется множество мелких бацил, которые иногда еще и подвижны. Нитчатые цианобактерии способны размножаться с помощью гонидий и гормогоний. Для бактерий размножение обычно не связано с половым процессом. Однако у некоторых наблюдается особый процесс передачи генетической информации с образованием мерозиготы - конъюгация. Еще есть трансформация (с помощью переноса голых ДНК) и трансдукция (с помощью бактериофагов).

Покоящиеся формы. Целый ряд грамположительных бактерий образует устойчивые к внешним воздействиям покоящиеся структуры, называемые эндоспорами. Эндоспоры формируются внутри вегетативных клеток бактерий рода *Bacillus*, *Clostridium* и другие. Эндоспоры чрезвычайно устойчивы к таким факторам, как нагревание, УФ-облучение, действие химических дезинфектантов, растворителей или высушивания, радиации и т.д. Обычно спора закладывается в клетке одна, но бывает до пяти. Некоторые эндоспоры остаются жизнеспособными в течение 500 лет, споры актиномицетов - до 7500 лет, но споры *Bacillus cereus* побили все рекорды - 30 млн лет! Споры большинства клеток гладкие и овоидные. Спора окружена тонким экзоспориумом, за ним лежит оболочка споры, состоящая из нескольких белковых слоев. За оболочкой располагается кортекс, который может занимать до половины объема споры. Кортекс состоит из пептидогликана. Клеточная стенка споры расположена внутри кортекса и окружает протопласт (или ядро споры). Ядро споры содержит нормальные клеточные структуры.

Другие виды покоящихся форм - цисты. Циста - это потерявшая подвижность клетка с утолщенной, ослизненной оболочкой, устойчивая к высушиванию и перепадам температур. Образование цист показано для свободноживущих азотфиксаторов, некоторых метанотрофов и олиготрофов. Функции цисты: 1) защищают популяцию от вредных воздействий окружающей среды, 2) служат способом сохранения ДНК, 3) являются способом передачи инфекционного начала от хозяина к хозяину.

13. Особенности состава и организации архей. Эукариоты. Морфология дрожжей, мицелиальных грибов, микроформ водорослей, простейших. Химический состав и функции отдельных компонентов клетки.

К археям относятся три филума: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*. Кроме нуклеотидной последовательности 16S рРНК, археи отличаются от бактерий и эукариот рядом существенных признаков. Строение мембран и липидов мембран: в обычных липидах глицерол связан сложноэфирной связью с жирными к-тами, а у архей - простой эфирной связью с С20-спиртом — фитанолом. Такие эфиры могут образовывать тетрамеры, а цепи фитанола могут содержать пятичленные кольца. Археи могут иметь как обычные бислоиные, так и ригидные монослойные мембраны. Строение клеточных стенок: у архей не найдены типичные для бактерий муреиновые клеточные стенки. Они представлены либо псевдомуреином, либо белковым S-слоем. Особенности метаболизма: у архей ДНК связаны гистонами и имеет интронные участки, подобно эукариотам. В тРНК архей не найдено риботимина. Трансляция белка не чувствительна к хлорамфениколу, зато чувствительна к дифтерийному токсину. Археи обычно существуют в экстремальных условиях и дают скудный рост.

К эукариотам относят грибы, водоросли и простейшие. Грибы - обширная группа гетеротрофных микроорганизмов, широко распространенных в природе. Большинство из них сапрофиты, есть паразитические виды. *Грибы*: эумикоты и оомикоты. Характерная особенность всей группы - образование мицелия. *Зигомицеты* имеют не разделенный на отдельные клетки многоядерный мицелий. Они характеризуются особым типом полового размножения, которое включает стадию образования зигоспоры из двух родительских гиф. *Аскомицеты* образуют гифы, которые разделены поперечными перегородками. Характерный орган спороношения - аск, в котором формируются аскоспоры. Неполовой путь размножения - с помощью конидий. *Дейтеромицеты* - разнообразная группа микроорганизмов с отсутствующей половой стадией. *Водоросли* включают фототрофные микроорганизмы. Осуществляют кислородный фотосинтез. Зеленые водоросли, диатомовые водоросли (имеют две кремниевые створки), динофлагелляты (имеют два боковых жгутика), эвгленовые (лишены клеточной стенки, способны расти в темноте, получая энергию при окислении органических веществ). *Простейшие* лишены клеточной стенки, поглощают пит. в-ва абсорбцией через клеточную мембрану или энцитозом. Размножение половое и бесполое. Включает 4 класса: амёбы, жгутиконосцы, реснитчатые и споровики.

14. Циклы развития и размножения.

У бактерий наиболее распространено бинарное деление (на две равные части), причем у грамположительных оно происходит септой, а у грамотриц. - перетяжкой. Другие типы размножения - почкование и множественное деление. Почкование иногда происходит с помощью дополнительных выростов, выделяется материнская и дочерняя клетки. При множественном делении из одной клетки образуется множество мелких бацилл, которые иногда еще и подвижны. Нитчатые цианобактерии способны размножаться с помощью гонидий и гормогоний. Для бактерий размножение обычно не связано с половым процессом. Однако у некоторых наблюдается особый процесс передачи генетической информации с образованием мерозиготы - конъюгация. Еще есть трансформация (с помощью переноса голых ДНК) и трансдукция (с помощью бактериофагов). У эукариот размножение часто связано с половым процессом или с парасексуальным циклом. *Бактерии со сложным циклом развития.* Некоторые прокариоты характеризуются сложным циклом развития, в процессе которого может меняться морфология клеток и образуются различные покоящиеся формы. Известны бактерии, образующие плодовые тела (миксобактерии).

15. Культивирование. Накопительные культуры и принцип селективности. Чистые культуры микроорганизмов. Методы получения и изучение. Основные типы сред, используемые для культивирования микроорганизмов (по составу и физическому состоянию). Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов, метод Хангейта. Поверхностное и глубинное выращивание.

При изучении свойств микроорганизмов, для получения биомассы необходимо размножить и выращивать их в условиях лаборатории. Культивирование, или выращивание, микроорганизмов возможно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Из-за малых размеров микроорганизмов работа в лаборатории проводится не с одной особью, а с популяцией организмов, или культурой. Культура микроорганизмов, состоящая из клеток одного вида, называется чистой культурой. Если число видов два или больше, что говорят о смешанной культуре. При выделении чистой культуры из природных местообитаний на первом этапе обычно пользуются предложенным Виноградским методом получения накопительных культур, в которых преобладают организмы

определенной группы. Накопление желаемых микроорганизмов происходит за счет создания элективных условий культивирования, благоприятных для данной группы. Другие организмы, также присутствующие в пробе, в этих условиях либо не размножаются, либо характеризуются незначительным ростом. После того как получена накопительная культура, приступают к выделению чистой культуры. Она может быть получена из отдельной колонии или одной клетки.

Выделение из отдельной колонии: принцип Коха. Заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии. Неприменим для выделения организмов, которые не растут или плохо растут на плотных средах. Для выделения чистой культуры аэробных микроорганизмов накопительную культуру высевают на пов-ть плотной среды с помощью шпателя. Этим же шпателем протирают пов-ть второй, третьей и четвертой чашки. В последних чашках будет наблюдаться рост изолированных колоний. Далее из этих накопительных культур засевают еще в чашки бактериологической петлей. Чашки ставят в термостат. Выросшие изолированные колонии отсевают петлей на пов-ть скошенной плотной среды в пробирке или в жидкую среду. *Метод глубинного посева:* изолированные колонии микроаэрофильных микроорг. и факультативных анаэробов чаще получают этим методом. Плотную пит. среду разливают в пробирки и стерилизуют. Потом среду расплавляют и проводят высеив из разведений накопительной культуры в стерильной водопроводной воде. В пробирку с расплавленной средой вносят 1 мл одного из разведений накопит. культуры. Перемешивают и около пламени горелки выливают содержимое пробирки в стерильную чашку Петри. Среда застывает, ставят в термостат. Колонии вырезают стерильным скальпелем, извлекают и переносят в жидкую среду, благоприятную для развития организмов. *Метод вращающихся пробирок:* когда хотят получить изолированные колонии облигатных анаэробных бактерий, характеризующихся особенно высокой чувствительностью к кислороду, используют метод Хангейта. Расплавленный агар засевают бактериями при постоянном токе через пробирку стерильного инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку. Среда равномерно распределяется и застывает тонким слоем. Тонкий слой среды позволяет получить изолированные колонии, видимые невооруженным глазом.

Выделение из одной клетки возможно двумя способами: капельным методом с помощью микроманипулятора или с помощью микроселектора. Капельный метод: используют при работе с крупными микроорганизмами. Накопительную культуру разводят в стерильной среде с расчетом на одиночные клетки. Затем на пов-ть нескольких стерильных стекол наносят по капле разведения. Готовят препараты «висячая капля». Капли просматривают и отмечают те, в которых только одна клетка. Препарат помещают во влажную камеру. Через сутки опять микроскопируют. Капли, в которых образовались микроколонии, переносят в пробирки. Микроманипулятор — прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки извлекать из суспензии одну клетку. Микроселектор — почти то же самое.

Основные типы сред (по составу и физическому состоянию). Потребности микроорганизмов в пит. в-вах чрезвычайно разнообразны и определяются особенностями их метаболизма. 1) Питательная среда должна включать доступный для клетки источник энергии (для одних - это свет, для других - органический или неорг. субстрат. 2) Среда должна содержать все необходимые компоненты для реализации конструктивных процессов в клетке. Потребности микроорг. в некоторых аминокислотах часто удовлетворяют добавлением к среде гидролизат белка. Чаще всего используют гидролизат казеина. Наиболее требовательные организмы культивируют на средах, содержащих белки или продукты их неполного

расщепления — пептоны. Многие организмы требуют наличия в среде факторов роста, к которым относятся пурины, пирамилины и аминокислоты. Прототрофы не нуждаются в факторах роста, для ауксотрофов абсолютно необходимо наличие в среде одного или нескольких факторов роста. Микроорг. могут также нуждаться в витаминах. Для построения в-ва клетки микроорганизмам необходимы фосфор, сера, калий и др. Нужны также металлы: калий, натрий, кальций, магний и другие, которые микроорг. получают в виде катионов из солей. По составу среды для культивирования микроорг. делят на натуральные (естественные) и синтетические. К натуральным относятся среды, состоящие из продуктов животного или растительного происхождения: овощные или фруктовые соки, молоко, животные ткани, кровь, морская вода, отвары, экстракты. К натуральным относят полусинтетические среды, состоящие из природных продуктов в комбинации с рядом опр. хим. соединений. Синтетические среды представляют собой комплекс опр. химически чистых соединений, взятых в точно указанных концентрациях. По физическому состоянию среды могут быть жидкими, полужидкими, твердыми (плотными) и сыпучими.

16. Рост микроорганизмов. Рост отдельных микроорганизмов и популяций (культур). Сбалансированный и несбалансированный рост. Возможные причины несбалансированного роста.

Различают сбалансированный рост, когда увеличение всех веществ и структур происходит пропорционально. Если в среде есть нехватка или избыток чего-нибудь, то рост становится несбалансированным, т.е. какие-то продукты метаболизма могут преобладать.

17. Основные параметры роста культур: время генерации, удельная скорость роста, выход биомассы, экономический коэффициент.

Чтобы правильно оценивать рост культуры, необходимы следующие простейшие параметры:

- концентрация клеток, клеток/мл;
- время генерации — промежуток времени, за который число клеток удваивается;
- константа скорости деления — число удвоений в час;
- константа скорости роста.

Важной характеристикой культуры является константа скорости роста — «мю», которая зависит от условий выращивания (если условия стандартные, то для данной культуры она совершенно определенная). Под выходом биомассы понимают разность между максимальной и исходной массой бактерий (г сухого в-ва). Экономический коэффициент — отношение урожая клеток к количеству потребленного субстрата (г).

18. Закономерности роста чистых культур при периодическом культивировании. Кривая роста, особенности отдельных фаз. Рост микроорганизмов при непрерывном культивировании.

Обычно при росте в жидких средах в закрытых сосудах определенного объема микроорганизмы находятся в закрытой системе. Такое культивирование называют периодическим, при этом популяция проходит разные фазы своей жизни. Каждая фаза характеризуется определенными физиолог. параметрами.

Лаг-фаза — фаза «привыкания» клеток к среде, при этом происходит индукция соотв. ферментов, увеличение количества ДНК и РНК. В экспоненциальной фазе клетки растут и делятся с максимальной скоростью, их рост не ограничен. По мере истощения субстратов и накопления продуктов обмена скорость роста снижается (фаза замедления роста) и культура переходит в стационарную фазу, в течение

которой процессы деления и отмирания клеток в популяции находятся в динамическом равновесии. Когда исчерпание пит. в-в и накопление продуктов метаболизма преодолеют некие пороговые концентрации, начинается фаза отмирания, которая иногда также имеет логарифмический характер.

Проточная система культивирования позволяет зафиксировать культуру в какой-то определенной фазе (обычно экспоненциальной). При этом состав среды и условия роста остаются постоянными. Подача свежей среды и удаление части суспензии (проток) происходит с той же скоростью, с какой растет культура. Существуют два принципиально разных типа непрерывных культур — хемостат и турбидостат. В хемостате фиксируется какой-нибудь химический параметр процесса (концентрация субстрата, кислорода). Эта концентрация является лимитирующей. Работа турбидостата основана на поддержании постоянной плотности бактериальной суспензии. Фотоэлемент измеряет плотность вытекающей суспензии и автоматически изменяет проток.

19. Математическое выражение роста культур в непрерывных условиях. Значения непрерывного культивирования для изучения свойств микроорганизмов и для их практического использования. Синхронные культуры, способы получения и значение.

Проточная система культивирования позволяет зафиксировать культуру в какой-то определенной фазе (обычно экспоненциальной). При этом состав среды и условия роста остаются постоянными. Подача свежей среды и удаление части суспензии (проток) происходит с той же скоростью, с какой растет культура. Существуют два принципиально разных типа непрерывных культур — хемостат и турбидостат. В хемостате фиксируется какой-нибудь химический параметр процесса (концентрация субстрата, кислорода). Эта концентрация является лимитирующей.

(написать мат. формулы!!!)

Работа турбидостата основана на поддержании постоянной плотности бактериальной суспензии. Фотоэлемент измеряет плотность вытекающей суспензии и автоматически изменяет проток.

Иногда необходимо, чтобы все клетки в популяции делились одновременно (синхронно). Для этого используют различные приемы получения синхронных культур:

- получение клеток одного размера путем фильтрации или дифференциального центрифугирования;
- резкое изменение температура инкубации;
- воздействие света.

При этом кривая роста получается ступенчатой. Обычно удается синхронизировать не более трех делений, а потом культура снова переходит к асинхронному делению.

20. Радиация, характер ее действия на микроорганизмы. Устойчивость микроорганизмов к ультрафиолетовым лучам и ионизирующему излучению. Фотореактивация.

Электромагнитные излучения подразделяются в зависимости от длины волны на ионизирующее излучение (гамма- и рентгеновские лучи с длинной волны < 200 нм), ультрафиолетовое излучение, видимую область, инфракрасное излучение и радиоволны. По характеру действия излучения делятся на: 1) оказывающее физиологическое действие; 2) оказывающие летальное и мутагенное действие; 3) оказывающие тепловое и механическое действие.

Физиологическое действие оказывают ближний ультрафиолет, видимый свет и инфракрасные лучи. Это прежде всего фотосинтез — процесс конверсии солнечной энергии в химическую. Разные фототрофные микроорганизмы поглощают свет различной длины волны. Электромагнитные волны важны для проявления фототаксиса. Существуют фотозависимые синтезы и у нефотосинтезирующих микроорганизмов (образование каротиноидов у микобактерий). У нефототрофных микроорг. акцепторами света считают также порфирины и флавины.

НО! Под действием инфракрасных лучей может происходить перегрев клетки, а видимый свет в аэробных условиях приводит к образованию синглетного кислорода, что вызывает фотоокисление клеточных ферментов. В качестве защиты микроорганизмы синтезируют каротиноиды, служащие тушителями синглетного кислорода. Ультрафиолет в зависимости от длины волны и дозы может вызывать как летальный, так и мутагенный эффект. Наблюдается повреждение молекулы ДНК (возникают тиминовые димеры, ингибирующие репликацию). Эти повреждения могут быть устранены двумя путями: фотореактивацией (на поврежденное место «садится» фермент, активируемый синим светом, и исправляет структуру ДНК, устраняя связи между тиминовыми основаниями в димерах) и темновой репарацией (свет не нужен, работают ферменты эндонуклеаза, которая вырезает поврежденный участок, и полимеразы, которая синтезирует правильную структуру по комплементарной цепи), а лигаза сшивает синтезированные пос-ти. Ультрафиолет также вреден, поскольку наряду с образованием тиминовых димеров происходит разрушение триптофана и образуются его токсичные фотопродукты, которые действуют как химические мутагены. Ионизирующее излучение представлено очень короткими волнами с высокой энергией. Низкие уровни такого излучения могут вызывать у микроорг. мутации, а высокие почти всегда приводят к гибели. Следствие ионизирующего облучения — разрывы водородных связей, окисление двойных связей.

Микроорг. весьма существенно различаются по устойчивости к радиации. Есть микроорг., выделенные из облученных продуктов и из воды атомных реакторов. Устойчивость связана с высокой эффективностью репарационных систем.

21. Рост микроорганизмов в зависимости от температуры. Психрофилы, мезофилы и термофилы. Использование высоких температур для стерилизации. Действие низких температур на выживание микроорганизмов. Влияние гидростатического давления.

Предел жизнеспособности организма определяется наличием жидкой воды. Клетки некоторых микроорг. остаются жизнеспособными при минусовых температурах, если к воде добавить антифриз. Так как местообитаний, где создаются экстремально низкотемпературные условия не так много, большинство организмов имеет низший температурный предел в 0°C. Существовать же микроорг. могут и при -196°C. Поэтому таким глубоким замораживанием часто пользуются для хранения культур под жидким азотом или в лиофилизированном состоянии. Нижние пределы роста по температуре ограничены температурой «застывания» мембраны, когда она теряет свои функции, а верхние — тепловой денатурацией жизненно важных молекул. Анализ состава жизненных форм при низких и высоких температурах показывает, что в экстремальных по температуре обитаниях преобладают более просто устроенные формы, а из них — прокариоты и нефототрофы. К *психрофильным* микроорг. относят представителей родов *Pseudomonas*, *Vibrio*, дрожжей, мицелиальных грибов, некоторых групп водорослей. У таких микроорганизмов обнаружен особый состав мембран с пониженной точкой замерзания. Они содержат больше ненасыщенных жирных кислот,

короткоцепочечных и разветвленных и меньше циклических жирных к-т. У психрофилов белки менее стабильны при температуре выше 20°C. Многие виды микроорг. способны расти при 0°C, хотя их температурный оптимум находится в интервале 20 - 30°C. Эти микроорг. называются *психротрофными*, и именно она обычно ответственны за порчу замороженных продуктов. У *термофилов* найдены высокотемпературные стабильные белки, мембранные липиды содержат больше тугоплавких насыщеннх жирных кислот и больший процент гликолипидов, все ДНК и РНК — ГЦ-типа, а рибосомы более термостабильны.

Большинство микроорг., живущих на поверхности земли или воды, не подвергается существенным изменениям давления и растет при давлении около 1 атм. Но показано, что клетки микроорг. могут выдержать глубокий вакуум, но это не активно жизнеспособные клетки, а споры. По отношению к высокому давлению микроорг. подразделяются на:

- пьезочувствительные (барочувствительные) — организмы (обычно с газовыми вакуолями), которые при повышении давления перестают расти;
- пьезотолерантные (баротолерантные) — выдерживают до 400 атм, но способны расти и при обычном давлении;
- пьезофильные (барофильные) — нуждаются для роста в повышенном давлении. Умеренные барофилы выдерживают давление до 850 атм, а экстремальные — свыше 1000 атм.

При повышении гидростатического давления происходит ряд изменений в протекании биологических процессов. Замедляются реакции, приводящие к увеличению объема. Усиливаются реакции поглощения газов. Химическое равновесие сдвигается в сторону субстратов реакции. При повышенном давлении происходят денатурация биологических полимеров и диссоциация сложных агрегатов клетки. Клетки после деления не расходятся. При давлении выше 1 атм спадаются газовые вакуоли, определяющие плавучесть водных микроорганизмов.

22. Рост микроорганизмов в зависимости от активности воды.

В осуществлении метаболизма важную роль играет активность воды a_w , равная отношению давления паров раствора к давлению паров чистой воды. Активность воды зависит как от самого ее наличия, т.е. от степени высушивания, так и от количества растворенных в ней в-в. Одни микроорг. не способны расти на твердых средах, другие (*ксерофилы*) растут при низких значениях a_w . Поскольку микроорг. отделены от окружающей среды полупроницаемой мембраной, в гипотонических растворах вода будет стремиться по градиенту концентраций растворенных в-в внутрь клетки, и нужно приложить определенную силу (осмотическое давление), чтобы предотвратить поступление воды в клетку. В гипертонических растворах имеет место обратное явление (отсасывание воды из клеток), вызывающее плазмолиз. Для развития организмов без клеточной стенки применяют изотонические растворы. Микроорганизмы, способные существовать в растворах с высокой концентрацией в-в, называются *осмофилами*. Наиболее изучены такие микроорг. по отношению к концентрации NaCl, их называют галофилами и подразделяют на группы: галотолерантные, слабогалофильные, среднегалофильные, экстремально галофильные. Удержание воды у галофилов осуществляется путем синтеза совместимых растворителей (осмолитов), нейтральных по отношению к метаболитам клетки. Совместимые растворители хорошо удерживают воду, поэтому возможно их применению в косметической промышленности в составе увлажняющих кремов.

23. Устойчивость микроорганизмов к высушиванию. Лиофилизация. Осмотическое давление. Особенности осмофилов. Галофилы. Способы осморегуляции у разных микроорганизмов.

Поскольку микроорг. отделены от окружающей среды полупроницаемой мембраной, в гипотонических растворах вода будет стремиться по градиенту концентраций растворенных в-в внутрь клетки, и нужно приложить определенную силу (осмотическое давление), чтобы предотвратить поступление воды в клетку. В гипертонических растворах имеет место обратное явление (отсасывание воды из клеток), вызывающее плазмолиз. Для развития организмов без клеточной стенки применяют изотонические растворы. Микроорганизмы, способные существовать в растворах с высокой концентрацией в-в, называются *осмофилами*. Наиболее изучены такие микроорг. по отношению к концентрации NaCl, их называют *галофилами* и подразделяют на группы: галотолерантные, слабогалофильные, среднегалофильные, экстремально галофильные. Удержание воды у галофилов осуществляется путем синтеза совместимых растворителей (осмолитов), нейтральных по отношению к метаболитам клетки. Совместимые растворители хорошо удерживают воду, поэтому возможно их применению в косметической промышленности в составе увлажняющих кремов.

Предел жизнеспособности организма определяется наличием жидкой воды. Клетки некоторых микроорг. остаются жизнеспособными при минусовых температурах, если к воде добавить антифриз. Так как местообитаний, где создаются экстремально низкотемпературные условия не так много, большинство организмов имеет низший температурный предел в 0°C. Существовать же микроорг. могут и при -196°C. Поэтому таким глубоким замораживанием часто пользуются для хранения культур под жидким азотом или в лиофилизированном состоянии.

24. Отношение микроорганизмов к молекулярному кислороду; аэробы и анаэробы (облигатные и факультативные); аэротолерантные анаэробы и микроаэрофилы. Возможные причины ингибирующего действия молекулярного кислорода на микроорганизмы. Значение pH среды для роста микроорганизмов. Ацидофилы, нейтрофилы и алкалофилы.

Концентрация водородных ионов воздействует на ионное состояние и, следовательно, на доступность для клетки многих метаболитов, так как в незаряженном состоянии они легче проникают через мембрану. По отношению к оптимальным для роста значениям pH микроорг. подразделяют на ацидофильные (0 — 5,5), нейтрофильные (5,5 — 8,0) и алкалофильные (8,5 — 11,5). Большинство бактерий и простейших — нейтрофилы, грибы и водоросли предпочитают низкие значения pH, цианобактерии растут при высоких pH. Несмотря на экстремальные значения pH в окружающей среде, значение внутриклеточного pH достаточно постоянно. У раст. клеток реакция цитоплазмы слабокислая (5,0 — 6,0), у животных — 7,0. У алкало- и ацидофильных микроорг. pH цитоплазмы поддерживается на уровне 7,5. Постоянству внутриклеточного pH способствует малая проницаемость мембраны для протонов. Но поскольку протоны все-таки медленно диффундируют по градиенту, клетка использует энергозависимые механизмы выброса протонов. У алкалофильных микроорг. клетка не может использовать протонный градиент для синтеза АТФ, и для запасания энергии служит электрическая составляющая.

По своему отношению к кислороду все микроорг. подразделяются на две большие группы: аэробы, растущие в присутствии кислорода, и анаэробы, способные расти в его отсутствие. Аэробы могут быть облигатными (требуют кислород), факультативными (не требуют кислорода, но растут при нем лучше) и

микроаэрофилами (требуют кислород в концентрации ниже атмосферной). Анаэробы: аэротолерантные (не требуют кислорода, рост не стимулирует) и облигатные (кислород угнетает рост или приводит к гибели). Грибы, в основном, аэробы, но дрожжевые анаморфы — факультативные анаэробы. Водоросли — почти всегда облигатные аэробы.

Токсическое действие кислорода на микроорг. заключается в инактивации чувствительных к окислению белков, а также в образовании сверхактивных производных кислорода.

25. Понятие "питательные и антимикробные вещества". Природа антимикробных веществ и области их применения. Антибиотики. Мутагены, механизмы устойчивости.

Для практических целей важно осуществлять контроль за ростом микроорганизмов и подавлять развитие нежелательных форм. Активность микроорганизмов может, например, приводить к порче продуктов и развитию заболеваний. Поэтому бывает необходимо подавить микроорганизм или приостановить его рост. Агенты, вызывающие такие последствия, называют соответственно бактерицидными и бактериостатическими. Характер действия антимикробного агента часто зависит от концентрации. Если необходимо убить все микроорганизмы в объекте, то говорят о стерилизации. Все антимикробные агенты распределяют по нескольким группам в соответствии с механизмом их действия.

Первая группа: в-ва, приводящие к повреждению поверхностных клеточных структур. Пример: 70%-й этанол коагулирует белки, оказывая бактерицидное действие.

Вторая группа: в-ва, действующие как ферментные яды и нарушающие нормальный метаболизм. Они связываются с SH-группами белков, нарушая их пространственную структуру. Пример: фторацетат блокирует работу цикла трикарбоновых кислот.

Третья группа: аналоги нормальных метаболитов, которые конкурируют с ними за каталитический центр фермента. Пример: лекарственное действие сульфаниламидных препаратов.

Четвертая группа: в-ва, нарушающие нормальные процессы синтеза полимеров. Пример: на белковый синтез действуют антибиотики стрептомицин и неомицин (подавляют связывание аминокислот между собой), эритромицин (нарушает функции 50S-субъединицы рибосом), тетрациклин (препятствует связыванию аминоацил-tРНК с рибосомами), хлорамфеникол (подавляет функцию пептидилтрансферазы). Пенициллин подавляет синтез пептидогликана.

Пятая группа: в-ва, оказывающие опосредованное действие. Пример: высокие концентрации NaCl и сахаров снижают активность воды, оказывая консервирующее действие.

Важное место среди антимикробных агентов занимают антибиотики. В настоящее время известно около 3 тыс. видов антибиотиков и только около ста из них нашли применение в медицине. Однако антибиотики не стали панацеей от всех бед, так как активное их применение привело к появлению многообразных микробных форм с резистентностью к этим соединениям. Устойчивость связана, с одной стороны, с выработкой ферментов, расщепляющих антибиотики, с другой — с выработкой мощных транспортных систем, выбрасывающих чужеродные в-ва из клетки.

26. Основные биоэлементы и микроэлементы. Типы питания микроорганизмов. Фототрофия и хемотрофия, автотрофия и гетеротрофия;

литотрофия и органотрофия. Сапрофиты и паразиты. Прототрофы и ауксотрофы. Ростовые вещества.

Основными биогенными элементами являются углерод, азот, фосфор, кислород, водород и сера. Это компоненты белков, углеводов, жиров и нуклеиновых кислот. Такие элементы требуются в значительных количествах и поэтому их называют *макроэлементами*. К макроэлементам относят также калий, магний, натрий, кальций и железо, которые обычно присутствуют в клетках в виде ионов и выполняют разные роли. Калий необходим для активности большого числа ферментов белкового синтеза, кальций определяет устойчивость бактериальных эндоспор к нагреванию и так далее. К *микроэлементам*, необходимым в микромолярных количествах, относят ионы таких металлов, как хром, кобальт, медь, молибден, марганец, никель, цинк и еще некоторые, обычно они входят в состав ферментов или кофакторов. Например, кобальт — компонент витамина B12, медь — входит в состав цитохромоксидазы и купредоксинов. Необходимые для микроорг. количества микроэлементов содержатся в обычной водопроводной воде. Многие организмы требуют наличия в среде так называемых факторов роста, к которым относятся пурины, пиримидины и аминокислоты. Часто для обозначения пит. потребностей организма пользуются терминами «прототроф» и «ауксотроф». Прототроф не нуждается в факторах роста, ауксотроф требует добавления таких факторов в среду. Ауксотрофные формы часто являются мутантными организмами, или патогенами. Примерами смесей, содержащих различные факторы роста, могут служить дрожжевой экстракт, дрожжевой автолизат, а также кукурузный экстракт.

По типам питания (трофии) все живые существа разделяют на несколько групп в зависимости от природы источников углерода и энергии, а также донора электронов. Организмы, использующие в качестве источника углерода в конструктивном метаболизме углекислоту, называют автотрофами, а использующие готовые органические в-ва — гетеротрофами. Если для энергетического метаболизма источником служит свет, то организм называют фототрофом. Хемотрофия характеризуется использованием энергии химических реакций. При этом органотрофы в качестве донора электронов применяют органическое в-во, а литотрофа — неорганическое.

27. Поглощение разных веществ клетками. Диффузия и транспорт. Использование микроорганизмами высокомолекулярных соединений и веществ, нерастворимых в воде. Эндо- и экзоцитоз у эукариот.

Первой стадией метаболизма того или иного вещества является его проникновение в клетку. У большинства микроорг. в клетку проникают в-ва, растворенные в воде. Поглощение нерастворенных в воде в-в имеется только у эукариот, и среди микроорг. к такому процессу способны простейшие. Процесс носит название *эндоцитоз*. При фагоцитозе поглощаются твердые в-ва, при пиноцитозе — жидкости. Рядом с частицей пищи участок ЦПМ втягивается внутрь и замыкается, образуя вокруг нее вакуоль. Эта вакуоль, находясь в цитоплазме, сливается с лизосомой, содержащей набор гидролитических ферментов. В образовавшейся пищеварительной вакуоли частица пищи лизируется. Растворимые продукты гидролиза диффундируют в цитоплазму, а неразрушенные остатки экскретируются наружу путем, обратным эндоцитозу. У высших животных эндоцитоз сохранился в виде защитной функции поглощения чужеродных клеток фагоцитами, а обратный эндоцитозу процесс — при выделении гормонов. У прокариот клеточная стенка и ЦПМ являются существенным препятствием для высокомолекулярных веществ. Поэтому такие соединения сначала расщепляются вне клетки на олиго- и мономеры соответствующими экзогидролазами. Они

выделяются во внешнюю среду или располагаются на наружной стороне ЦПМ. У грамотрицательных бактерий эти ферменты могут быть локализованы в периплазматическом пространстве. Высокомолекулярные вещества в этом случае проникают в их периплазму через поры, образованные белками-поринами, находящимися в наружной мембране.

У микроорганизмов, которые часто живут в бедных средах, существует несколько принципиально различных способов поступления в-в в клетку. Все незаряженные молекулы (H₂O, газы) могут поступать в клетку путем обычной диффузии (*пассивной диффузии*). Это проникновение в-в в клетку по градиенту концентрации, не требующее затрат энергии и происходящее до тех пор, пока не наступит равновесие между содержанием данного в-ва вне и внутри клетки. Этот процесс идет с невысокой скоростью. Скорость значительно увеличивается при участии специфических белков-переносчиков (пермеаз), и тогда процесс называют *облегченной диффузией*. В этом случае также процесс продолжается до тех пор, пока есть градиент концентрации и не затрачивается метаболическая энергия. Механизм действия пермеаз пока неясен. Это белки, расположенные либо поперек мембраны, либо способные передвигаться через мембрану как в свободном, так и в связанном с субстратом состоянии. Остается неясным, что в этом случае заставляет пермеазу освобождать субстрат на внутр. стороне мембраны. Эукариоты путем облегченной диффузии транспортируют различные сахара и аминокислоты. Прокариоты проносят так глицерол.

Механизмы *активного транспорта* позволяют в-вам поступать в клетку против градиента концентрации. Такие механизмы требуют затраты энергии. Первичный транспорт — это выброс протонов из клетки в образовании протонного градиента через цитоплазматическую мембрану. За счет этого трансмембранного градиента протонов и работают все виды вторичного транспорта. Протонный градиент в клетке всегда поддерживается на опр. уровне за счет дыхания, фотосинтеза, брожения. У грамотриц. микроорг. из-за наличия наружной мембраны в оболочке существуют более сложные смешанные механизмы с участием связывающих белков, локализованных в периплазматическом пространстве. Связывающие белки высокоспецифичны, образуют комплекс с субстратом и переносят его через периплазматическое пространство на соответствующие пермеазы, которые с затратой энергии транспортируют субстрат внутрь клетки.

28. Соединения углерода и азота, используемые микроорганизмами. Азотфиксация. Способность микроорганизмов использовать разные соединения серы и фосфора. Потребность в железе, магнии и других элементах.

(что здесь писать?!)

29. Способы обеспечения энергией. Фотосинтез и хемосинтез. Экзогенные и эндогенные окисляемые субстраты. Переносчики электронов и электронтранспортные системы: их особенности у разных микроорганизмов. Роль АТФ и способы ее образования.

По типу получения энергии все микроорг. подразделяют на фототрофы (энергия света) и хемотрофы (энергия хим. связей орг. и неорг. соединений). Энергия нужна клетке для синтеза различных в-в, для осуществления движения (перемещения в пространстве) и для поглощения в-в из окружающей среды.

АТФ — универсальный переносчик энергии. Большая часть энергозависимых реакций связана с использованием АТФ — высокоэнергетической молекулы, содержащей две макроэргические связи. Гидролиз 1 М АТФ дает около 32 кДж

свободной энергии. Существуют два принципиально разных пути синтеза АТФ в клетке:

- 1) субстратное фосфорилирование — перенос макроэргической связи с интермедиата катаболизма на АДФ в соответствии с реакцией $S \sim \Phi + \text{АДФ} = S + \text{АТФ}$. Для образования такого фосфорилированного промежуточного соединения иногда требуется сначала затратить АТФ, однако в конечном итоге микроорг. должен получить выигрыш в синтезированной АТФ. Важнейшие реакции субстратного фосфорилирования: $1,3\text{-дифГК} + \text{АДФ} \rightarrow 3\text{-фГК} + \text{АТФ}$; $\text{ФЕП} + \text{АДФ} \rightarrow \text{пируват} + \text{АТФ}$; $\text{ацетил} \sim \Phi + \text{АДФ} \rightarrow \text{орг. кислота (ацетат)} + \text{АТФ}$.
- 2) мембранное (окислительное) фосфорилирование — перенос электронов по электротранспортной цепи (ЭТЦ). При этом важно, чтобы субстраты окислялись постепенно. Такой способ получения АТФ характерен для аэробных условий, а также при анаэробном дыхании. В этом случае АТФ синтезируется на мембране.

Для работы ЭТЦ необходимо, чтобы переносчики располагались в мембране асимметрично и последовательно, в соответствии со своими окислительно-восстановительными потенциалами. Компонентами дыхательной цепи являются ферментные белки, сод. связанные с ними коферменты или простетические группы. Коферментами называют низкомолекулярные в-ва, которые передают субстрат от одного ферментного белка другому, отделяясь от белковой части. Простетические группы — тож небольшие молекулы, но они не отделяются от белка во время присоединения и переноса субстрата. Многие такие соединения относятся к витаминам (рибофлавин, никотиновая к-та), поэтому если микроорг. не способен сам синтезировать некоторые из них, то это в-во или его предшественник необходимо добавлять в пит. среду. Переносчики располагаются в мембране асимметрично, по разные стороны мембраны. При переносе электрона одновременно происходит и транслокация протона, который высвобождается на внешней стороне мембраны. Так как мембрана непроницаема для протонов, во внешней среде их становится больше и наводится трансмембранный потенциал, имеющий электрическую и хим. составляющие. В мембране наряду с переносчиками содержится АТФазная система, образующая АТФ за счет «закачивания» протонов («протонная помпа»). Отличие ЭТЦ при анаэробном дыхании заключается в том, что конечным акцептором электронов могут служить неорг. или органические соединения, а не кислород. В этом случае разность потенциалов между донором и акцептором электронов меньше и мест сопряжения меньше, где энергии достаточно для образования макроэргической связи.

30. Брожения. Определение понятия "брожение". Пути сбраживания углеводов и других органических соединений. Молочнокислое гомо- и гегероферментативное брожение, пропионовокислое, маслянокислое ацетобутиловое, спиртовое и другие брожения. Характеристика микроорганизмов, вызывающих разные брожения.

Брожению подвергаются в-ва, которые не полностью восстановлены и не полностью окислены. Во всех случаях брожение предполагает строгое равновесие процессов окисления и восстановления. По определению Л.Пастера, брожение — это жизнь без кислорода. В более узком смысле *брожение* — это бескислородные превращения пирувата, полученного в реакциях одного из путей преобразования сахаров (гликолиза, пентозофосфатного или КДФГ-пути). Существует несколько видов брожений, характерных для тех или иных групп микроорганизмов и приводящих к образованию различных конечных продуктов. Исторически первым было изучено *спиртовое брожение* у дрожжей. Дрожжи, как и большинство грибов,

осуществляют аэробное дыхание, однако в отсутствии кислорода они способны сбраживать углеводы до этанола и углекислоты: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CO_2 + 2 C_2H_5OH$. При этом пируват образуется в процессе гликолиза. Дрожжевое спиртовое брожение происходит при температурах до 30°C, а саморазогрев бродящей массы подавляет процесс. Бактерии рода *Sarcina* образуют этанол тем же путем, что и дрожжи. Некоторые бактерии способны осуществлять процесс при 45°C. Некоторые клостридии и энтеробактерии проводят брожения, в которых спирт является побочным продуктом. В зависимости от условий набор продуктов брожения сильно варьирует: ацетат, этанол, CO₂. *Молочнокислое брожение* осуществляют филогенетически неродственные микроорганизмы, объединяемые по признаку образования молочной кислоты. Это представители порядков *Lactobacillales* и *Vacillales* из класса "Bacilli" и члены семейства *Bifidobacteriaceae* из класса *Actinobacteria*. Они различны по морфологии, но все грамположительны, неподвижны и не образуют спор. Живут только за счет брожения, аэротолерантны, каталазоотрицательны, растут только на богатых средах с добавлением большого количества факторов роста. Они могут использовать лактозу, чем схожи с бактериями кишечной группы. Различают два варианта молочнокислого брожения. При *гомоферментативном молочнокислом брожении* сахара используются путем гликолиза, молочной кислоты образуется ~ 90% и только 10% приходится на другие продукты (ацетат, ацетоин, этанол). Так сбраживают сахара многие лактококки и лактобациллы. При *гетероферментативном молочнокислом брожении* сахара сбраживаются через пентозофосфатный путь, а лактата образуется ~ 50%. Такой тип брожения осуществляют лейконостоки, ряд лактобацилл, бифидобактерии и некоторые другие микроорганизмы. Бифидобактерии отличаются особой модификацией гетероферментативного молочнокислого брожения без образования этанола и выделения CO₂: $2 \text{ глюкоза} \rightarrow 2 \text{ лактат} + 3 \text{ ацетат}$. *Пропионовокислое брожение* происходит при приготовлении некоторых твердых сыров на стадии их созревания. В результате образуется пропионовая кислота. Основная группа микроорг., способных осуществлять такое брожение, относится к подпорядку *Propionibacterineae* класса *Actinobacteria*. Это обитатели рубца и кишечника жвачных животных. Это грамположительные, неподвижные бесспорные палочки, способные осуществлять характерное "снеппинг"-деление с образованием из клеток «вилочек» и «заборчиков». *Смешанное (муравьинокислое) брожение* приводит к образованию этанола и сложной смеси органических кислот (уксусной, молочной, янтарной, муравьиной и др.). Формиат сначала может накапливаться, а затем расщепляться с помощью гидрогенлиазы на H₂ и CO₂. Такое брожение осуществляют микроорганизмы, объединенные в несколько родов: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, входящих в порядок *Enterobacteriales*. *Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение* дает такие продукты, как бутират и другие орг. кислоты, а также ацетон, бутанол и этанол. Его осуществляют микроорганизмы рода *Clostridium*, относящегося к сем. *Clostridiaceae*. Клостридии - это грамположительные палочки с перитрихальным жгутикованием, формирующие сферические или овальные эндоспоры, раздувающие клетку. Характерные для клостридий запасные вещества – это крахмалоподобные полисахариды. Клостридии относят к универсальным микроорганизмам, способным использовать множество субстратов. Они обладают мощным комплексом экзогидролаз. Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение характеризуется четко выраженной двухфазностью. В I фазе клетки активно растут, образуют кислые продукты и pH снижается. При этом рост культуры замедляется, хотя субстрата еще достаточно. В течение II стадии

восстановительные эквиваленты переносятся на образовавшиеся кислые продукты и получаются нейтральные вещества, вследствие чего рН возвращается к нормальному уровню и культура снова может развиваться. Биологический смысл двухфазности заключается в более полном использовании субстрата за счет поддержания комфортных для культуры условий существования путем сброса избыточных восстановительных эквивалентов на образовавшиеся кислые продукты брожения. Таким способом решаются две проблемы – «исправления рН» и избавления от «лишнего» восстановителя.

31. Аэробное дыхание. Формы участия молекулярного кислорода в окислении разных субстратов. Полное и неполное окисление. Роль цикла трикарбоновых кислот и пентозофосфатного окислительного цикла в метаболизме органических соединений.

При аэробном дыхании конечным акцептором электронов в цепи переноса является молекулярный кислород, поэтому для облигатно аэробных микроорг. он — необходимое ростовое вещество. Молекулярный кислород необходим:

- в реакциях включения одного-двух атомов кислорода в некоторые молекулы (например, стероидов, отдельных жирных кислот, каротиноидов);
- для начальных этапов окисления некоторых субстратов (например, метана у метилотрофы и ароматических молекул при их расщеплении) с помощью моно- и диоксигеназ. Следует заметить, что сами эти реакции не дают энергии, но они помогают дальнейшему окислению субстрата;
- при работе оксидаз (например, глюкозооксидазы, цитохромоксидазы);
- как конечный акцептор электронов в дыхательной цепи.

Многоуглеродные субстраты могут при дыхании подвергаться полному или неполному окислению. В первом случае единственным окисленным продуктом будет CO₂, а конечным этапом окисления, как правило, цикл Кребса. При неполном окислении питательного субстрата в качестве конечных продуктов в среду выделяются наряду с углекислым газом различные органические соединения, часто схожие с продуктами некоторых брожений. Окисление субстрата начинается с его преобразования в вещество, которое клетка способна транспортировать внутрь и с которым смогут работать клеточные ферменты. У микроорганизмов подготовительными реакциями использования биополимеров будут реакции гидролиза с помощью выделяемых в среду ферментов. Поэтому для окисления белков некоторые патогенные, портящие продукты и почвенные бактерии и грибы синтезируют внеклеточные протеазы, которые гидролизуют белки до коротких пептидов и аминокислот. Разложение белка микроорганизмами (аммонификация) всегда сопровождается образованием ряда продуктов: аммиака при дезаминировании аминокислот, сероводорода при расщеплении серусодержащих аминокислот (метионина, цистеина и их производных) и индола при распаде триптофана. При этом происходит подщелачивание среды. Из аминокислот при дезаминировании образуются органические кислоты (пируват, ацетат и другие интермедиаты ЦТК), которые входят в цикл Кребса для полного окисления и получения клеткой энергии. Также они могут быть использованы как источник углерода для синтезов клеточных компонентов. Аминогруппы аминокислот идут либо на анаболизм азотсодержащих веществ клетки, либо выделяются в виде иона аммония.

Пентозофосфатный путь распространен у растений, а у микроорганизмов играет вспомогательную роль. В результате его реакций образуются пентозы для последующих синтезов, пируват, три молекулы пиридиннуклеотидов и 2 АТФ.

У дышащих микроорг. окислительным циклом является цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), или цикл Кребса. За один оборот цикла из ацетил-КоА образуется 2

молекулы углекислоты, 8 восстановительных эквивалентов и 1 АТФ. ЦТК выполняет функцию не только конечного окисления питат. в-в, но и обеспечивает организм многочисленными предшественниками для процессов биосинтеза.

32. Краткая характеристика важнейших микроорганизмов, участвующих в аэробном окислении белков (аммонификация), углеводов, углеводородов и других многоуглеродных веществ.

Многоуглеродные субстраты могут при дыхании подвергаться полному или неполному окислению. При полном окислении субстрата единственным окисленным продуктом является CO₂, а конечным этапом окисления — в основном цикл трикарбоновых кислот (альтернативные пути — цикл дикарбоновых кислот и пентозофосфатный путь).

Окончательное окисление может произойти, если тот или иной субстрат сначала превратится в центральный интермедиат ацетил-КоА или другие интермедиаты ЦТК. Для *окисления белков* микроорганизмы выделяют внеклеточные протеазы, которые гидролизуют белки до коротких пептидов и аминокислот. Таким свойством обладают некоторые бактерии и грибы, в основном патогенные, вызывающие порчу продуктов, а также почвенные микроорганизмы. Разложение белка микроорганизмами (аммонификация) всегда сопровождается образованием ряда продуктов: аммиака при дезаминировании аминокислот, сероводорода при расщеплении серосодержащих аминокислот и индола при распаде триптофана. Аминокислоты дезаминируются с образованием органических кислот (пирувата, ацетата и др.) и в таком виде входят в цикл Кребса для полного окисления и получения клеткой энергии.

Целлюлоза гидролизуется с помощью внеклеточных целлюлаз (в аэробных условиях — грибами и миксобактериями, в анаэробных — клостридиями и некоторыми анаэробными грибами). *Липиды* расщепляются микробными липазами до глицерола и жирных кислот. Глицерол затем фосфорилируется, окисляется до ДОАФ и катаболизируется через реакции гликолиза. Жирные кислоты подвергаются бета-окислению до ацетил-КоА. *Ароматические соединения* сначала расщепляются моно- или диоксигеназами до бета-кетoadипиновой кислоты или ее производных, которые затем разлагаются на ацетил-КоА и сукцинат. Производные *пуринов и пиримидинов* «входят» в ЦТК через фумарат, а *пентозы* — через альфа-кетоглутарат. Предельные и непредельные углеводороды используются почвенными микроорганизмами разных групп, которые сначала окисляют их до соотв. жирных кислот с помощью оксигеназ, а затем подвергают бета-окислению.

При неполном окислении питательного субстрата в качестве конечных продуктов в среду выделяются наряду с углекислым газом различные органические соединения, часто схожие с продуктами некоторых брожений. Типичные микроорг., осущ. неполные окисления, — группа уксуснокислых бактерий. Это грамотрицат. мелкие палочки, некоторые подвижны, широко распространены в природе. Наиболее известны два рода: *Acetobacter* и *Gluconobacter*.

33. Микроорганизмы (метилотрофы), окисляющие метан, метанол и другие одноуглеродные соединения. Светящиеся бактерии; механизм свечения.

Одна из групп бактерий, использующих многоуглеродные субстраты, отличается уникальной способностью к биолюминесценции. Это светящиеся бактерии — морские организмы, хемоорганотрофы. Они грамотрицательны, факультативно анаэробные палочки, которые передвигаются с помощью жгутиков. Свечение наблюдается только в присутствии кислорода. Обычно бактерии испускают синезеленый свет (около 500 нм), но один штамм *Vibrio fischeri* светится желтым светом (545 нм). В аэробных условиях микроорг. осуществляют процесс аэробного дыхания

и свечения. У них имеется обычная дыхательная цепь и работает цикл Кребса. Свечение зависит от окисления длинноцепочечного альдегида с 13-18 атомами углерода в молекуле. Светится возбужденный флаavin под действием фермента люциферазы. Люцифераза — это двухсубъединичный фермент типа монооксигеназы. Биологический смысл свечения пока непонятен. Есть гипотеза, что это защита от переокисления: когда накапливается много восстановленного пиридиннуклеотида, срабатывает «отводной канал», электроны сбрасываются на флаavin и высвечиваются. В настоящее время показано, что способностью к свечению обладают представители родов *Photobacterium*, *Veneckia* и *Vibrio*.

Метилотрофные микроорганизмы — физиологическая группа, способная расти на одноуглеродных соединениях. Одноуглеродными называют такие соединения углерода, в состав молекулы которых входит один атом углерода или их может быть несколько, но при этом молекула никогда не содержит C-C-связей. Наибольшее значение имеют такие C1-соединения как метан, выделяемый метаногенами, метанол, образуемый при разложении пектина и лигнина, продукт смешанного брожения формиат и метиламины, получающиеся при гибели морских животных и растений. Формальдегид в свободном виде не встречается. Формиат никогда не накапливается в больших количествах. Триметиламин образуется из N-окси триметиламина, которая синтезируется у морских обитателей как осморегулятор, поддерживающий в цитоплазме их клеток осмотическое равновесие. В анаэробных условиях C1-соединения используются различными группами микроорганизмов. Метан в отсутствие кислорода может окисляться до CO₂ только ассоциацией по крайней мере двух микроорганизмов — метаногенного архея и сульфатредуцирующей бактерии, и анаэробное окисление метана количественно связано с восстановлением сульфата. Метанол в анаэробной зоне используется сульфатредукторами, гомоацетогенами или метаногенами. Формиат может расщепляться самими энтеробактериями, образующими его при смешанном брожении. Окисление метана в аэробных условиях происходит в соответствии со схемой: CH₄ → CH₃OH → HCOH → HCOOH → CO₂. Метилотрофы подразделяют на факультативных и облигатных. Факультативные метилотрофы способны использовать как одно-, так и многоуглеродные соединения. Облигатные метилотрофы растут только на C1-соединениях. Среди них выделяют группу, способную окислять только метан (метанотрофы). Другие одноуглеродные соединения (обычно метанол) они окисляют значительно реже и менее эффективно. В природе метилотрофы играют важную роль в глобальном цикле углерода. Они являются бактериальным газовым фильтром для метана, выделяемого в атмосферу метаногенными археями.

34. Окисление неорганических соединений. Группы хемолитотрофных бактерий и осуществляемые ими процессы.

Процесс *хемолитоавтотрофии* был открыт Виноградским. Такой образ жизни присущ только прокариотам: для получения энергии используется восстановленное неорг. вещество, а для построения клеточного материала — CO₂. Ученый открыл этот процесс, работая с микроорг., окисляющими восстановленные соединения серы. Такой микроб, как *Beggiatoa* — серная бактерия из водных местообитаний, окисляя H₂S, откладывает элементарную серу внутри клетки. Когда сероводород кончается, микроорг. может окислять отложенную серу до сульфата. Окисление восстановленных соединений серы связано с получением энергии, микроорг. требуют небольших количеств орг. соединений и способны фиксировать CO₂, т.е. являются факультативными автотрофами. В настоящее время известно значительное число микроорганизмов, способных окислять

восстановленные соединения серы. Их называют *тионовыми микроорганизмами*. Эти микроорганизмы принимают участие в глобальном цикле серы, окисляя ее восстановленные соединения до сульфатов. Сероводород образуется повсеместно в процессе аммонификации и окисляется тионовыми микроорганизмами по достижении аэробной зоны. Природные выходы элементарной серы на поверхности земли (сульфатары) имеются в районах с вулканической активностью. Тионовые микроорганизмы являются, в основном, аэробами. Короткий период они могут существовать без кислорода, окисляя сероводород в процессе нитратного дыхания, но при наличии подвижности активно покидают анаэробные местообитания.

Следующая группа хемолитоавтотрофов - это *металлоокисляющие микроорганизмы*. Наиболее изучены виды, способные окислять Fe^{2+} до Fe^{3+} . Такие микроорганизмы легко обнаруживаются в природных водоемах в виде обрастаний нижней части водных растений. Большинство железоокисляющих микроорганизмов растут при средних температурах в аэробных условиях, экстремальные термофилы встречаются только среди архей. При $pH < 7,0$ Fe^{2+} стабилен, поэтому в таких природных местообитаниях развиваются ацидофильные железоокислители. Они, как правило, заключены в слизистые чехлы, которые постепенно инкрустируются гидроксидом железа (III). Лишь некоторые представители железоокислителей (например, *Galionella ferruginea*) растут в нейтральных средах. Выделены микроорганизмы, способные окислять и другие металлы с переменной валентностью (Cu^{2+} , As^{3+} , Sb^{3+} , Mo^{4+} , Se^0 , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Au^0 и т.д.).

Процесс превращения аммиака в нитрат использовался в Европе для получения селитры при изготовлении пороха задолго до того, как стала известна его микробная природа. Земляные валы поливали кровью животных со скотобоен, перекапывали для обогащения кислородом и вносили золу для нейтрализации и как источник калия. Белки крови разлагались под действием почвенных микроорганизмов с выделением аммиака, который окислялся *нитрифицирующими бактериями* до нитрата. При реакции нитрата с ионами калия из золы образовывался выцвет селитры, который растворяли и выпаривали. Нитрифицирующие микроорганизмы – это грамотрицательные виды, объединенные по способности окислять аммиак, а не филогенетически. Названия родов нитрификаторов I фазы обычно начинается с Nitroso-, а нитрификаторов II фазы – с Nitro-. Микроорганизмы I и II стадий нитрификации в природе всегда живут вместе, и ядовитый нитрит, образованный бактериями I стадии, быстро потребляется нитрификаторами II фазы. Клетки различной формы (палочковидные, изогнутые, спиральные, кокковидные) могут быть подвижными в молодом возрасте, а при старении формируют биопленки. Нитрификаторы имеют в разной степени развитые внутриклеточные разрастания ЦПМ. Так, у *Nitrosomonas* они параллельны мембране клетки, у *Nitrosococcus* образуют стопки ламелл, у *Nitrosolobus* формируют инвагинации. Процесс нитрификации происходит в две стадии: $NH \rightarrow NO \rightarrow NO$. На I стадии аммиак проникает в клетки и окисляется монооксигеназой до гидроксилamina: $NH_3 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NH_2OH$. Эта реакция идет с затратой энергии в виде восстановителя. При окислении гидроксилamina периплазматической гидроксилaminоксидоредуктазой образуется нитрит ($NH_2OH + H_2O \rightarrow HNO_2 + 4H^+ + 4e^-$). II стадия нитрификации приводит к окислению нитрита в нитрат с участием мембрансвязанного фермента нитритоксидоредуктазы: $NO + H_2O \rightarrow NO + 2H^+ + 2e^-$ и $2H^+ + 2e^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$. Нитрификация может происходить и в анаэробных условиях. Показано, что в

анаэробных реакторах, осуществляющих очистку стоков от соединений азота, аммоний окисляется в присутствии нитрита: $15\text{NH}_4^+ + 14\text{NO}_2^- \rightarrow 14\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

Водородные микроорганизмы окисляют молекулярный водород и ассимилируют CO_2 . H_2 – очень энергоемкий субстрат, дающий до 3 молекул АТФ при прохождении электронов по ЭТЦ. С этим субстратом работают ферменты гидрогеназы, которые бывают двух типов: поглощающая (у водородоокисляющих микроорганизмов) и выделяющая (у микроорганизмов, образующих водород в процессе брожения, фототрофов и т.д.). У аэробных форм конечным акцептором электронов служит кислород. Эти микроорганизмы способны расти на очень простой среде, по сути дела осуществляя постепенную реакцию “гемучего газа”. Среди анаэробов водородотрофные микроорганизмы распространены в группах метаногенов, гомоацетогенов, сульфатредукторов и пурпурных бактерий.

Угарный газ может служить как акцептором электронов (при *карбонатном дыхании*), так и донором электронов (у *карбоксидобактерий*). Если микроорганизмы используют CO как донор электронов, то акцептором может быть O_2 , S_0 , SO , NO , Fe^{3+} , CO_2 . CO появляется в природе, в основном, за счет деятельности человека, горения лесов, извержения вулканов. В атмосфере он подвергается фотоокислению до CO_2 .

35. Анаэробное дыхание. Определение понятия "анаэробное дыхание". Доноры и акцепторы электронов, используемые разными микроорганизмами при анаэробном дыхании. Микроорганизмы, восстанавливающие нитраты и другие соединения азота. Диссимиляционная нитратредукция и денитрификация.

Анаэробный энергодающий процесс, в котором конечным акцептором электронов служит окисленное органическое или неорганическое в-во, отличное от кислорода, называют анаэробным дыханием. Анаэробное дыхание сопряжено с функционированием ЭТЦ. Виды анаэробного дыхания подразделяются по используемому конечному акцептору электронов.

Анаэробное нитратное дыхание встречается в двух модификациях. Процесс называют *нитратредукцией*, если восстановление нитрата идет только до уровня нитрита ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$). Такая форма нитратного дыхания присуща энтеробактериям. Восстановление нитрата до нитрита кишечной микробиотой может приводить к цианозу, когда эритроциты, заблокированные нитритом, не способны переносить кислород. У некоторых микроорганизмов, восстанавливающих нитрат до нитрита, при накоплении последнего в культуральной жидкости иногда происходит ассимиляционная нитритредукция (аммонификация нитрата), не дающая энергии, но зато преобразующая нитрит в NH_4^+ . Аммоний поступает в реакции синтеза аминокислот и других азотсодержащих соединений. При восстановлении нитрата через ряд интермедиатов до газообразного азота процесс называется *денитрификацией* ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$). Такая форма нитратного дыхания встречается у псевдомонад и бацилл. Это единственный процесс, позволяющий превратить связанный азот в газообразный, и именно таким образом происходит вынос азота из почвы. Микроорганизмы, осуществляющие нитратное дыхание, относятся к факультативным анаэробам и обладают полной дыхательной системой. Донором электронов обычно служит органическое вещество. Синтез мембрансвязанных нитрат- и нитритредуктаз индуцируется только в анаэробных условиях, а у некоторых микроорганизмов – еще и в присутствии нитрата. Процесс *денитрификации* необходимо учитывать в земледелии. Обеднение почвы азотом может активизироваться при неграмотном внесении удобрений и создании анаэробных условий. Одновременное внесение

минеральных нитратов и навоза вместе в качестве удобрений при пониженном содержании кислорода в почве (например, после дождя) стимулирует мощную денитрификацию. Поэтому, чтобы не происходило выноса азота из почвы, необходима вспашка, т.е. создание аэробных условий, и отдельное использование минеральных и органических азотных удобрений.

36. Сульфатвосстанавливающие и серовосстанавливающие бактерии.

Диссимиляционная сульфатредукция.

При *сульфатном дыхании* конечным акцептором электронов служит сульфат. Физиологическую группу микроорганизмов, восстанавливающих сульфат, называют сульфатредукторами, или сульфидогенами.

Сульфатредукторы широко распространены в таксономических группах, но все они, в отличие от нитратредукторов, строгие анаэробы. Обычно обитают в морских донных осадках. Эта группа объединяет представителей с разным систематическим положением. Большая часть сероводорода в природе возникает благодаря сульфатному дыханию (или диссимиляционной сульфатредукции): $8[H] + SO_4^- \rightarrow H_2S + 2H_2O + 2OH^-$. Донорами электронов могут служить формиат, ацетат, H_2 , пропионат, бутират, лактат, высшие жирные кислоты, этанол и другие. Одна группа сульфатредукторов окисляет доноры водорода не полностью и выделяет ацетат из-за незамкнутости цикла трикарбоновых кислот. Вторая группа окисляет органические в-ва до воды и CO_2 .

Первая стадия диссимиляционного и ассимиляционного процессов одинакова, а все последующие проводятся разными ферментами. Донорами электронов могут служить молекулярный водород, органические кислоты, спирты и другие органические соединения. Сульфатредукторы способны расти гетеротрофно, причем часть их окисляет органические вещества до воды и углекислого газа, а другие осуществляют неполное окисление с образованием ацетата из-за отсутствия α -кетоглутаратдегидрогеназы в ЦТК. При истощении сульфата и наличии органических веществ сульфатредукторы могут переходить на сбраживание молочной и пировиноградной кислот с образованием ацетата и H_2 . В таких условиях они становятся синтрофами, для которых обязательно присутствие группы микроорганизмов, потребляющих молекулярный водород.

Помимо сульфатного дыхания, бактерии, грибы и растения осуществляют восстановление сульфата путем *ассимиляционной сульфатредукции*, включая затем серу в виде сульфида в серосодержащие аминокислоты и белки. У автотрофных сульфатредукторов (H_2/CO_2 и SO) присутствует ацетил-КоА-путь фиксации CO_2 (путь Вуда-Льюнгадала), такой же как у гомоацетогенов. В этом случае основным ферментным комплексом является CO -дегидрогеназа-ацетил-КоА-синтаза со сложным активным центром.

Серное дыхание может происходить в местообитаниях, связанных с вулканической деятельностью, где много abiогенной элементарной серы в анаэробных условиях. Больше всего серовосстанавливающих микроорг. обнаружено среди архей, как правило, существующих в экстремальных условиях. Из домена Bacteria наиболее изучен род *Desulfurotonas* — подвижная палочка с латерально расположенным жгутиком. Окисляет ацетат или этанол до CO_2 , содержит низкопотенциальный цитохром c_7 , FeS-белки и ферменты ЦТК. Живет в синтрофных ассоциациях с фототрофными зелеными серобактериями, потребляющими сульфид.

37. Метанообразующие археи; их особенности. Образование метана из углекислоты и других соединений. Ацетогенные бактерии, использующие

углекислоту как акцептор электронов. Путь Вуда—Льюнгдела синтеза ацетата (Ацетил-КоА-путь).

Карбонатным дыханием называют анаэробное дыхание, где конечным акцептором электронов служит углекислота (или CO). Одной физиологической группой, которая получает энергию таким образом, является группа гомоацетогенных микроорганизмов, клеточное вещество которых в автотрофных условиях синтезируется по пути Вуда—Льюнгдала (ацетил-КоА-пути). Второй физиологической и систематической группой являются микроорганизмы, образующие метан, или метаногены. Это самая большая группа архей из филума Euryarchaeota — строгие анаэробы, образующие в качестве конечного продукта метаболизма метан. Обычно являются последним звеном пищевой цепи в анаэробных пресноводных местообитаниях, т.е. в этих условиях они завершают цикл углерода на Земле (гидролитики -> бродильщики -> ацетогены -> метаногены). В морских анаэробных местообитаниях ацетат используют также сульфатредукторы. Метан в смеси с CO₂ (биогаз) образуется на дне озер и болот, поднимаясь вверх, попадает в аэробную зону и используется метанооксиляющими микроорг. Метан образуется также в рубце жвачных и в кишечнике термита. Считают, что метаногены – это древнейшие организмы в истории Земли, когда атмосфера состояла из CO₂, H₂ и CO. По морфологии они варьируют от простых палочек, кокков и сарцин до спиральных форм и нерегулярных коккоидов. В их клеточных стенках содержится псевдомуреин, пептиды и/или полисахариды. Метаногены потребляют довольно узкий набор субстратов. К первой группе субстратов относят H₂/CO₂, CO. Ко второй группе относят ацетат и некоторые спирты (ацетокластический метаногенез). Третью группу составляют одноуглеродные субстраты (формиат, метанол, метиламин, ди- и триметиламины). *Путь Вуда—Льюнгдела синтеза ацетат (Ацетил-КоА-путь)*. АТФ генерируется, в основном, с помощью хемиосмотического механизма, сопряженного с восстановлением углекислоты до ацетил-КоА.

38. Использование световой энергии (фотосинтез). Фототрофные прокариотные и эукариотные микроорганизмы. Состав, организация и функции их фотосинтезирующего аппарата. Фотосинтез с выделением и без выделения молекулярного кислорода. Использование световой энергии галобактериями.

Принципиально иным способом энергетического метаболизма в мире микробов можно считать использование световой энергии, или фотосинтез. Многие микроорг. могут поглощать энергию света и использовать ее для синтеза АТФ и восстановительных эквивалентов. Этот процесс, в котором световая энергия поглощается и преобразовывается в химическую, и называется фотосинтезом. Способность к фотосинтезу наблюдается в разных систематических группах, как среди эукариот, так и среди прокариот. Это высшие растения, а также многоклеточные зеленые, бурые, красные и одноклеточные эвгленовые, диатомовые и динофлагеллятные водоросли (эукариоты). Среди прокариот к фотосинтезу способны цианобактерии и прохлорофиты, зеленые серные и несерные бактерии, пурпурные серные и несерные бактерии, гелиобактерии и галоархеи.

Возбужденная светом молекула пигмента может энергию рассеивать, передавать и преобразовывать в химическую связь. Фотосинтетический аппарат состоит из светособирающих ловушек (антенн), реакционных центров (РЦ), электронтранспортной цепи (ЭТЦ) и локализован в мембранных структурах. Эти структуры усложняются от гелиобактерий (ЦПМ), через пурпурные бактерии (внутриклеточные выросты ЦПМ различной формы) до зеленых (хлоросомы и ЦПМ)

и цианобактерий (фикобилисомы и тилакоиды). РЦ и антенна составляют фотосинтетическую единицу. Процесс фотосинтеза делится на две стадии. В световых реакциях энергия света поглощается и преобразуется в химическую энергию. В темновых реакция эта энергия используется для восстановления и фиксация CO_2 и синтеза клеточных компонентов. Основными фотосинтетическими пигментами, участвующими в световых реакциях у эукариот и цианобактерий, являются хлорофиллы. Разновидности хлорофилла, наиболее важные из которых хлорофиллы *a* и *b*, различаются своими свойствами и максимумами поглощения. Другие широко распространенные пигменты — каротиноиды (бета-каротин и фукоксантин). Красные водоросли и цианобактерии имеют фикобилипротеины — фикоэритрин и фикоцианин. Их также называют вспомогательными пигментами. Хлорофиллы и вспомогат. пигменты объединены в высокоорганизованные образования, называемые антеннами, цель которых уловить как можно больше фотонов. Световая энергия улавливается антеннами и передается от одного хлорофилла к другому, пока не достигнет спец. хлорофилла реакционного центра, непосредственно включенного в фотосинтетический транспорт электронов. У эукариот и цианобактерий имеется два вида антенн, ассоциированных с двумя разными фотосистемами. ФС I адсорбирует более длинноволновый свет (больше 680 нм) и энергия попадает к хлорофиллу P_{700} . ФС II поглощает более коротковолновый свет (менее 680 нм) и передает энергию на спец. хлорофилл P_{680} . Когда антенны ФС I передают световую энергию к хлорофиллу P_{700} реакционного центра, он переходит в возбужденное состояние и передает высокоэнергетичный электрон специфическому акцептору. Далее электрон передается ферредоксину, а потом может пойти по двум путям. При циклическом пути электрон движется через ряд переносчиков обратно к окисленному P_{700} . При этом на участке цитохрома *b6* синтезируется АТФ. Это циклическое фотофосфорилирование (работает только ФС II). При нециклическом пути задействованы две фотосистемы. P_{700} возбуждается и передает электрон на ферредоксин, как и в циклическом пути. Здесь ферредоксин восстанавливает НАДФ⁺ до НАДФН. Так как электрон потрачен на восстановительный эквивалент и не может восстановить окисленный P_{700} , необходимо участие ФС II. Именно она дает электроны на восстановления P_{700} . Антенны ФС II поглощают свет и передают энергию на P_{680} , который переходит в возбужденное состояние и восстанавливает феофетин *a*. Электроны последовательно передаются через хиноны и ряд переносчиков к P_{700} . Хлорофилл-пигмент P_{680} получает необходимые электроны из окисления воды с выделением O_2 (кислородный фотосинтез). Таким образом, при движении двух электронов от воды до НАДФ⁺ синтезируется 1 молекула АТФ путем нециклического фосфорилирования.

Световая стадия фотосинтеза у зеленых и пурпурных бактерий происходит иначе. У них существует аноксигенный фотосинтез, когда донором электронов является не вода, а другие вещества (H_2S , S_0 , H_2 , органика). Тогда уравнение фотосинтеза выглядит так: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{A} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + \text{A}$. Пурпурные бактерии не образуют НАДФН непосредственно в световых реакциях фотосинтеза, а зеленые бактерии могут восстанавливать НАДФ⁺ во время световой стадии. Также они имеют другие фотосинтетические пигменты, называемые бактериохлорофиллами, с максимумами поглощения при более длинных волнах (до 1040 нм). Все эти различия являются следствием отсутствия у них ФС II: они не могут использовать воду как донор электроном в нециклическом электронном транспорте, образовывать кислород из воды при фотосинтезе и обладают только циклическим фотофосфорилированием.

Пурпурные бактерии — способны к автотрофии и откладывают элементарную серу внутри клеток. В качестве доноров электронов для фотосинтеза используют H_2S и S_0 . Фотосинтет. пигменты — бактериохлорофиллы а и b, каротиноиды четырех видов. *Зеленые бактерии* четко подразделяются на две группы. Хлоробии — граммотрицательные микроорганизмы, осуществляющие аноксигенный фотосинтез и откладывающие снаружи элементарную серу. В качестве запасного вещества хлоробии могут накапливать в клетках гликоген. ФС I лежит в ЦПМ и содержит Бхл а, с, d или e и каротиноиды циклического типа. Светособирающие пигменты находятся в хлоросомах (хлоробиум-везикулах), округлых тельцах, покрытых белковой оболочкой. Они прикреплены к внутренней стороне ЦПМ базальной пластинкой. *Зеленые нитчатые (несерные) бактерии* филогенетически далеко отстоят от зеленых серных бактерий. Фотосинтетический аппарат локализован в хлоросомах и ЦПМ и содержит Бхл а, с, d или e (см. табл.) и каротиноиды. Бактериохлорофиллы синтезируют на свету и в темноте, но в отсутствие кислорода. Вспомогательные пигменты представлены β -, γ -каротином или миксобактином. Представители этой группы требуют для фотосинтеза высокой интенсивности света. *Галобактерии (галоархеи)* — это одноклеточные микроорганизмы разной морфологии, часто плейоморфные, некоторые имеют газовые вакуоли. Характерной чертой этих микроорганизмов служит их абсолютная зависимость от высоких концентраций NaCl (до 20-30%). Способность к фотосинтезу реализуется у галобактерий в неблагоприятных условиях при недостатке кислорода. В концентрированных растворах соли кислород очень плохо растворим, что приводит к созданию почти анаэробных условий. В этом случае галоархеи на свету при низком содержании кислорода образуют модифицированные клеточные мембраны, содержащие несколько видов пигментов — бактериородопсин, галородопсин, слоуродопсин, фобородопсин и археродопсин. Бактериородопсин отвечает за транслокацию протонов, галородопсин закачивает K^+ в обмен на Na^+ , а слоу-, фобо- и археродопсины служат фоторецепторами на красный и синий свет, управляют активностью жгутиков для осуществления фототаксиса. Бактериородопсин (или ретиналь) синтезируется в присутствии небольшого количества O_2 из C40-каротиноидов. Окисленный C20-фрагмент присоединяется через лизин к белковой молекуле и мигрирует в ЦПМ, образуя там агрегаты. Это соединение имеет темно-пурпурный цвет, поэтому агрегаты получили название «пурпурных мембран». При поглощении света бактериородопсин изменяет конформацию, что сопровождается выбросом протонов из клетки и наведением трансмембранного потенциала. Энергия $\Delta\mu H^+$ с помощью фермента АТФазы преобразуется в макроэргические связи. Таким образом, галобактерии используют световую энергию, чтобы в неблагоприятных условиях синтезировать достаточное количество АТФ и пережить неблагоприятные условия.

39. Ассимиляция углекислоты автотрофами и гетеротрофами. Рибулозобисфосфатный цикл и другие пути усвоения углекислоты автотрофами. Ассимиляция формальдегида метилотрофами. Использование C1 и других органических веществ. Значение цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного шунта в биосинтетических процессах.

Источником углерода для автотрофов служит CO_2 , для гетеротрофов — органические соединения.

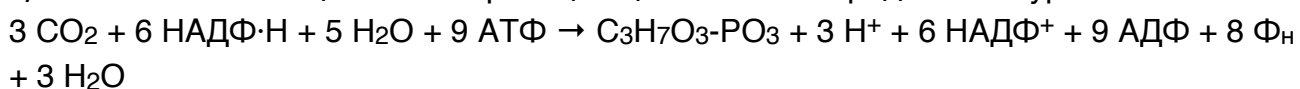
Основные пути ассимиляции углекислоты автотрофами:

- рибулозобисфосфатный цикл (цикл Кальвина) с ключевым ферментом РБФ-карбоксилазой, функционирующий в том числе у растений;

- восстановительный цикл трикарбоновых кислот с ключевым ферментом цитралиазой найден у серных бактерий и у аэробов рода *Hydrogenobacter*;
- гидроксипропионитный путь и восстановительный цикл дикарбоновых кислот у зеленых несерных бактерий;
- ацетил-КоА-путь у метаногенов, сульфатредукторов и гомоацетогенов.

Гетеротрофы не могут осуществлять полное построение в-ва клетки за счет CO₂, но у них возможна фиксация углекислоты. Это известная реакция Вуда—Веркмана, когда ФЕП или пируват путем карбоксилирования достраивается до С4-кислоты.

Цикл Кальвина. Общий баланс реакций цикла можно представить уравнением:



Две молекулы глицеральдегид-3-фосфата используются для синтеза глюкозы. Цикл состоит из трёх стадий: на первой под действием фермента рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа происходит присоединение CO₂ к рибулозо-1,5-дифосфату и расщепление полученной гексозы на две молекулы 3-фосфоглицериновой кислоты (3-ФГК). На второй 3-ФГК восстанавливается до глицеральдегид-3-фосфата (фосфоглицеральдегида, ФГА), часть молекул которого выходит из цикла для синтеза глюкозы, а другая часть используется в третьей стадии для регенерации рибулозо-1,5-дифосфата.

Другие одноуглеродные соединения — метан, метанол, формальдегид, формиат, метилированные амины, СО, цианиды — могут быть амфиболитами, т.е. источниками и углерода, и энергии. Такие соединения используются метилотрофами. Особенностью их подготовительного метаболизма является то, что одноуглеродные соединения они должны превратить в формальдегид, который затем и фиксируется в одном из циклов (рибулозомонофосфатном, сериновом или диоксиацетоновом).

Многие микроорг. должны синтезировать сахара из более восстановленных, чем CO₂, соединений. Синтез глюкозы из неуглеводных предшественников называют глюконеогенезом. На первый взгляд, этот путь является как бы обращенным гликолитическим путем, однако на трех его стадиях работают совершенно другие ферменты. Пируват превращается в ФЕП с помощью пируваткарбоксилазы и ФЕП-карбоксикиназы.

Цикл трикарбоновых кислот. За один оборот цикла из ацетил-КоА образуется 2 молекулы углекислоты, 8 восстановительных эквивалентов и 1 АТФ. Коферменты в этом случае передают водород в ЭТЦ, где и происходит синтез АТФ. ЦТК выполняет функцию не только конечного окисления питательных веществ, но и обеспечивает организм многочисленными предшественниками для процессов биосинтеза. Для восполнения промежуточных продуктов цикла Кребса, отведенных в анаболические реакции, служат анаплеротические реакции. Наиболее распространенным является *глиоксилатный шунт*. При росте на средах с органическими кислотами и другими углеродными соединениями доп. реакции требуются не только для обеспечения работы ЦТК, но и для синтеза промежуточных продуктов глюконеогенеза.

40. Усвоение соединений азота. Ассимиляционная нитратредукция. Фиксация молекулярного азота. Свободноживущие и симбиотические азотфиксаторы. Пути ассимиляции аммония. Ассимиляционная сульфатредукция.

Соединения азота, используемые в конструктивных целях, — это молекулярный азот, аммоний, нитрит, нитрат, гидроксиламин, метиламины, аминокислоты,

мочевина, пурины, пиридин, белки. Возможности использования соединений азота у микроорг. значительно шире, чем у животных и растений.

В отношении использования нитрата микроорганизмы похожи на растения. Процесс *ассимиляционной нитратредукции* проходит в два этапа: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$. На первом этапе нитратредуктаза переносит два электрона, на втором — последовательно переносится шесть электронов под действием ферментного комплекса нитритредуктазы. Ассимиляционная нитратредуктаза — растворимый фермент, и реакция происходит в цитоплазме. Фермент содержит ион Mo^{5+} и ФАД.

Часто источником аммония для микроорганизмов служит мочевина. Реакцию разложения мочевины проводит фермент уреазы: $\text{NH}_2\text{—CO—NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$ (NH_4^+). У микроорг. обнаружено несколько систем ассимиляции NH_4^+ :

- у факультативных анаэробов семейства энтеробактерий — аминирование фумарата с образованием аспарагиновой кислоты под действием фермента аспартазы;
- восстановительное аминирование кетокислот;
- аминирование пирувата с образованием аланина, глиоксилата с образованием глицина и оксалоацетата с образованием аспарагиновой кислоты под действием соотв. дегидрогеназ; у некоторых бацилл есть только аланиндегидрогеназа, у других микроорг. систем утилизации аммония может быть несколько;
- образование амидов под действием фермента глутаминсинтетазы;
- образование карбамоилфосфата.

Для формирования других аминокислот микроорг. имеют систему переаминирования. В реакции участвует фермент трансаминаза с пиридоксинфосфатом в качестве кофермента. В реакции переаминирования глутаминовая кислота служит донором аминогруппы.

Азотфиксация — уникальный процесс, присущий только прокариотическим микроорганизмам. Под азотфиксацией понимается способность к энзиматическому восстановлению атмосферного N_2 до аммония (с образованием водорода), который затем включается в клеточное вещество. Азотфиксаторов подразделяют на свободноживущих и симбиотических. Свободноживущие азотфиксаторы относятся к хемотрофам (это анаэробные клостридии и сульфатредукторы, факультативно анаэробные бациллы, аэробные метанотрофы) и фототрофам (пурпурные и зеленые бактерии, цианобактерии). Свободноживущие азотфиксаторы подразделяют на истинно свободноживущие и ассоциативные, т.е. предпочтительно встречающиеся в ризосфере некоторых высших растений (злаков). К ассоциативным diaзотрофам относятся представители семейства *Enterobacteriaceae* и *Azotobacteriaceae*. Симбиотические diaзотрофы включают прежде всего так называемые клубеньковые бактерии семейства *Rhizobiaceae*, обр. разрастания на корнях бобовых растений.

Несмотря на разнообразие микроорганизмов, осуществляющих азотфиксацию, ферментный нитрогеназный комплекс имеет принципиальное сходство в строении и свойствах и у анаэробов, и у аэробов. Один из его отличительных признаков — чрезвычайная чувствительность к наличию кислорода. Поэтому аэробные микроорганизмы сталкиваются с проблемой защиты нитрогеназы от кислорода. Фиксация азота жестко регулируется наличием его связанных форм. Нитрогеназная активность ингибируется, если в среде есть NH_4^+ . Газ азот — это химически инертное и очень стабильное вещество. Реакция $3\text{H}_2 + \text{N}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$ — эндотермическая, поэтому чтобы разорвать тройную связь в молекуле азота необходимо, по крайней мере, 8 электронов и 16 молекул АТФ. В действительности АТФ затрачивается больше, т.к. часть ее необходима для

поддержания анаэробных условий. Нитрогеназный ферментный комплекс состоит из двух белковых компонентов разной молекулярной массы. Для проявления нитрогеназной активности необходимы оба компонента, но они взаимозаменяемы у разных микроорганизмов. Нитрогеназа получает электроны и протоны непосредственно от низкопотенциального переносчика ферредоксина, который восстанавливается в реакциях фотосинтеза у фототрофов, при дыхании у аэробных diaзотрофов или при брожении у анаэробов. Реакция проходит в несколько стадий: $N \equiv N \rightarrow HN=NH \rightarrow H_2N-NH_2 \rightarrow 2NH_3$.

Сера входит в состав метионина, цистеина, глутатиона, кофермента А, сульфолипидов и сульфополисахаридов. Некоторые из этих соединений используются и в катаболизме. В составе таких веществ сера находится в восстановленной форме (S^{2-}). Большинство микроорганизмов способно восстанавливать окисленные соединения серы до этого уровня с помощью ассимиляционной сульфатредукции. У микроорганизмов первая реакция этого процесса, заключающаяся в активировании сульфата за счет его присоединения к АМФ, совпадает с начальной стадией диссимиляционного восстановления сульфата. Далее этот комплекс фосфорилируется, и происходит восстановление сульфата в сульфит. Отделившись от молекулы-переносчика, сульфит восстанавливается ферментом сульфитредуктазой до уровня S^{2-} и включается в серусодержащие аминокислоты (цистеин). Процесс ассимиляционной сульфатредукции может проходить в двух вариантах, различающихся конечными стадиями у бактерий и грибов. Сложные серусодержащие соединения (сульфолипиды и сульфополисахариды) образуются при участии фосфорилированного комплекса сульфата с АМФ (ФАФС). Микроорганизмы, не способные осуществлять ассимиляционную сульфатредукцию, могут расти только при наличии S^{2-} в среде.

41. Синтез основных биополимеров: нуклеиновых кислот, белков, липидов, углеводов. Биосинтез порфириновых соединений и других важнейших компонентов клеток (общее представление). Вторичные метаболиты.

Аминокислоты и белки. Белки синтезируются из двадцати аминокислот, предшественниками которых являются различные интермедиаты катаболизма. Все аминокислоты делятся на группы в соответствии со своим биосинтетическим происхождением. Синтез аминокислот группы глутаминовой к-ты (глутаминовая к-та, глутамин, аргинин, пролин) берет начало от альфа-кетоглутарата, интермедиата цикла Кребса. Оксалоацетат дает начало цепи реакций, приводящих к образованию аспарагиновой кислоты, аспарагина, метионина, треонина, изолейцина и лизина (группа аспарагиновой кислоты). Синтезы группы ароматических аминокислот (триптофана, фенилаланина и тирозина) начинаются с конденсации ФЕП из гликолитического пути и эритрозо-4-фосфата. 3-ФГК и пируват дают начало реакциям, приводящим к синтезу аминокислот группы серина (серин, глицин, цистеин) и группы пировиноградной кислоты (аланин, валин, лейцин) соответственно. Биосинтез гистидина тесно связан с путями образования пуринов. Два атома углерода пятичленного имидазольного кольца и три углерода боковой цепи происходят из фосфорибозилпирофосфата. Фрагмент С—N этого кольца образуется из пуринового ядра АТФ, а другой атом азота — из глутамин. Для биосинтеза белков требуется присутствие не только ферментов и мономеров, но и матрицы (молекулы иРНК), задающей последовательность присоединения аминокислот к растущей цепи, а также специфического переносчика для активирования мономера и отбора его в соответствии с заданным кодом (тРНК).

Липиды. Группа соединений, разнообразных по химическому составу, но нерастворимых в воде. Их можно условно разделить на вещества, содержащие жирные кислоты, связанные эфирной связью (нейтральные жиры, фосфолипиды, гликолипиды, липополисахариды, полиалканоаты и т.д.), и вещества, содержащие изопреновые фрагменты (полиизопрены, каротиноиды, стеролы, хлорофиллы, хиноны и т.д.). Нарастивание углеродной цепи образуемой жирной кислоты происходит на ацилпереносящем белке (АПБ). Синтез жирных кислот с нечетным числом атомов отличается только первой реакцией, где происходит конденсация пропионил-АПБ с малонил-АПБ. В синтезе фосфолипидов принимает участие интермедиат гликолиза диоксиацетонфосфат, который восстанавливается до 3-фосфоглицерола и присоединяет два остатка жирных кислот, связанных с АПБ. Первые стадии образования изопреноидных липидов связаны с последовательной конденсацией трех молекул ацетил-КоА в разных положениях и перегруппировкой полученного соединения. В результате синтезируется разветвленная мевалоновая кислота, которая претерпевает два последовательных фосфорилирования и декарбоксилирование с образованием активированного С5-соединения, являющегося предшественником сложных изопреноидных веществ. Сложные липиды могут строиться из разнообразных предшественников – жирных кислот, многоатомных спиртов, изопренов, а также моносахаров, аминокислот и аминов. Высшие жирные кислоты синтезируются из активированной уксусной кислоты, предшественником других липидных макромолекул может быть изопреновый фрагмент.

Нуклеиновые кислоты. Синтезируются из пурин- и пиримидиннуклеозидтрифосфатов, которые имеют в целом сходное строение. В них пуриновое или пиримидиновое основание соединено с пентозой через атом азота (нуклеозид), а фосфатные группы находятся в 5'-положении (нуклеотид). Дезоксирибонуклеотиды образуются из рибонуклеотидов путем восстановления. Синтез рибонуклеотидов начинается с образования 5-фосфорибозил-1-пирофосфата. Рибозо-5-фосфат является промежуточным продуктом пентозофосфатного пути. Пуриновые рибонуклеотиды далее синтезируются путем последовательного присоединения амино- и углеродсодержащих групп к ФРПФ с образованием девятичленного пуринового кольца. В случае пиримидиновых рибонуклеотидов сначала происходит конденсация аспарагиновой кислоты и карбамоилфосфата с образованием шестичленного пиримидинового кольца, а затем присоединение рибозофосфатного остатка. Образование нуклеиновых кислот осуществляется путем матричного синтеза в процессах репликации и транскрипции.

Порфирины. Важной группой изопреноидных соединений являются порфирины – сложные азотсодержащие вещества, служащие простетическими группами ряда ферментов и хлорофиллов. Конденсация сукцинил-КоА и глицина и ряд последующих модификаций приводят к образованию пятичленного азотсодержащего кольца с тремя заместителями (порфобилиногена), четыре молекулы которого далее объединяются в тетрапиррольное ядро протопорфина IX. Последующие реакции могут приводить к синтезу гема (при введении в молекулу атома железа) или образованию хлорофилла (при введении в молекулу магния). Различные формы хлорофиллов синтезируются в дальнейшем с помощью реакций периферического метаболизма определенных групп фототрофных микроорганизмов.

Вторичные метаболиты. Это вещества микробного (или растительного) происхождения, не существенные для роста и репродукции образующего их организма. Каждый вторичный метаболит производится относительно ограниченным числом видов. Эти соединения синтезируются в конце экспоненциальной или в течение стационарной фаз роста, и их формирование в

значительной степени зависит от условий роста, особенно состава питательной среды. Многие вторичные метаболиты имеют химическую структуру, необычную для биологической материи, однако их образование берет начало от интермедиатов первичного метаболизма. В отличие от синтеза первичного метаболита, который происходит одновременно с ростом и размножением культуры, для продуцента вторичных метаболитов принято говорить о трофофазе (когда культура растет и размножается) и идиофазе (когда рост замедляется или останавливается и начинается синтез продукта). Механизмы переключения путей метаболизма с первичного на вторичный не ясны. К вторичным метаболитам причисляют антибиотики, токсины, иммунодепрессанты и стимуляторы, а также некоторые запасные вещества (поли- β -алканоаты). Эти соединения относятся к разнообразным классам органических веществ (аминоциклитолы, кумарины, эпоксиды, нерибосомальные пептиды, полиены, пирролы, терпеноиды, тетрациклины, поликетиды, изопреноиды, стероиды, гиббереллины, фитоалексины и т.д.). О физиологической роли вторичных метаболитов в жизни собственного продуцента достоверно известно очень мало. Неизвестно, насколько распространен вторичный метаболизм в природе. Само понятие “вторичный метаболит” достаточно расплывчатое и многие исследователи его не признают.

42. Биохимические основы и уровни регуляции метаболизма. Регуляция синтеза ферментов. Конститутивные и индуцибельные ферменты. Индукция и репрессия. Катаболитная репрессия.

Для самого существования жизни важны как регуляция активности отдельных путей метаболизма, так и координация деятельности этих путей. Дезорганизация без адекватного контроля метаболизма приводит к гибели клетки. Задачи регуляторных механизмов: все пути метаболизма должны регулироваться и координироваться так эффективно, чтобы клеточные компоненты присутствовали в данный момент в точно необходимых количествах; микробные клетки должны эффективно «отвечать» на изменения окружающей среды использованием имеющихся на данный момент питательных веществ и включением новых катаболических путей, когда другие в-ва становятся доступными. Регуляция важна для поддержания баланса между энергодающими и синтетическими реакциями в клетке.

Поток углерода через тот или иной путь может регулироваться следующими основными способами:

- локализацией метаболитов и ферментов в разных частях клетки;
- стимуляцией или ингибированием активности определенных ферментов, позволяющей быстро менять путь метаболизма;
- контролем количества молекул фермента у микроорганизмов на уровне транскрипции.

Контроль активности ферментов осуществляется несколькими способами:

- *аллостерическая регуляция* предполагает наличие у молекулы фермента двух сайтов — каталитического и регуляторного. Под действием эффектора — небольшой молекулы, обратимо нековалентно связывающейся с регуляторным сайтом фермента, происходит конформационное изменение его каталитического сайта.
- *ковалентная модификация ферментов* — обратимый процесс, заключающийся в ковалентном связывании или удалении определенной группы, что изменяет активность фермента.

Каждый путь имеет хотя бы один фермент, определяющий скорость всего процесса, так как катализирует самую медленную, лимитирующую скорость реакцию.

Ферменты, синтезирующиеся независимо от условий выращивания микроорганизма, называются *конститутивными* (пример: ферменты утилизации глюкозы), а синтезирующиеся при наличии опр. доступного субстрата — *индуцибельными* (ферменты утилизации лактозы). РНК-полимераза нуждается в наличии сигма-фактора для связывания промотора и инициации транскрипции. Сложный процесс, требующий радикальных изменений в транскрипции или синтезе продуктов разных генов в опр. последовательности, может регулироваться серией сигма-факторов. Каждый сигма-фактор дает возможность кор-ферменту узнавать специфическую пос-ть и транскрибировать именно эти гены. Замена сигма-факторы немедленно изменяет экспрессию генов. Другой механизм управления синтезом нужного фермента — это *индукция* и *репрессия*. Например, фермент бета-галактозидаза — индуцибельный фермент, уровень которого повышается в присутствии небольшой молекулы, называемой индуктором. Аминокислоты, присутствующие в окружающей среде, могут снижать образование ферментов, ответственных за их биосинтез. Тогда эти ферменты относят к *репрессибельным*, а метаболиты, вызывающие снижение синтеза такого ферменты, называют корепрессорами. Примером оперона под позитивным контролем может служить *lac*-оперон. Такие опероны функционируют только в присутствии контролирующего фактора. *Lac*-оперон регулируется CAP-белком или цАМФ. Когда бактерии растут на глюкозе, уровень цАМФ падает, что приводит к дезактивации CAP-белка, и *lac*-оперон не экспрессируется. Это *катаболитная репрессия*.

43. Регуляция активности ферментов. Аллостерические ферменты и эффекторы. Ковалентная модификация ферментов. Аденилатный контроль, энергетический заряд клетки.

Контроль активности ферментов осуществляется несколькими способами:

- *аллостерическая регуляция* предполагает наличие у молекулы фермента двух сайтов — каталитического и регуляторного. Под действием эффектора — небольшой молекулы, обратимо нековалентно связывающейся с регуляторным сайтом фермента, происходит конформационное изменение его каталитического сайта.
- *ковалентная модификация ферментов* — обратимый процесс, заключающийся в ковалентном связывании или удалении определенной группы, что изменяет активность фермента.

Каждый путь имеет хотя бы один фермент, определяющий скорость всего процесса, так как катализирует самую медленную, лимитирующую скорость реакцию.

Ферменты, синтезирующиеся независимо от условий выращивания микроорганизма, называются *конститутивными* (пример: ферменты утилизации глюкозы), а синтезирующиеся при наличии опр. доступного субстрата — *индуцибельными* (ферменты утилизации лактозы). РНК-полимераза нуждается в наличии сигма-фактора для связывания промотора и инициации транскрипции. Сложный процесс, требующий радикальных изменений в транскрипции или синтезе продуктов разных генов в опр. последовательности, может регулироваться серией сигма-факторов. Каждый сигма-фактор дает возможность кор-ферменту узнавать специфическую пос-ть и транскрибировать именно эти гены. Замена сигма-факторы немедленно изменяет экспрессию генов. Другой механизм управления синтезом нужного фермента — это *индукция* и *репрессия*. Например, фермент бета-галактозидаза — индуцибельный фермент, уровень которого повышается в присутствии небольшой молекулы, называемой индуктором. Аминокислоты, присутствующие в окружающей среде, могут снижать образование

ферментов, ответственных за их биосинтез. Тогда эти ферменты относят к *репрессибельным*, а метаболиты, вызывающие снижение синтеза таких ферментов, называют корепрессорами. Примером оперона под позитивным контролем может служить *lac*-оперон. Такие опероны функционируют только в присутствии контролирующего фактора. *Lac*-оперон регулируется CAP-белком или цАМФ. Если микроорг. растет в среде с глюкозой и лактозой, то наблюдается явление *диауксии*: сначала используется вся глюкоза, а затем после короткого лаг-периода начинает потребляться лактоза. Когда бактерии растут на глюкозе, уровень цАМФ падает, что приводит к дезактивации CAP-белка, и *lac*-оперон не экспрессируется. Это *катаболитная репрессия*. Уменьшение кол-ва цАМФ может быть следствием влияния ФЕП-фосфотрансферазной системы на активность аденилатциклазы.

Активный катаболизм глюкозы приводит к возрастанию энергетического заряда клетки, так как среди аденозинфосфатов преобладает АТФ, поэтому можно сказать, что чем больше энергетический заряд клетки, тем меньше образуется цАМФ. Энергетический заряд клетки: $([АТФ] + 1/2[АДФ])/[АТФ] + [АДФ] + [АМФ]$.

44. Наследственная и ненаследственная изменчивость. Мутационная природа изменчивости. Частота мутантов и типы мутаций. Спонтанный и индуцированный (радиационный и химический) мутагенезы. Популяционная изменчивость. Селекция различных мутантов. Применение мутантов микроорганизмов в научных исследованиях и в практических целях.

Совокупность всех генов организма называют генотипом, а совокупность присущих организму признаков — фенотипом. При изменении внешних условий большинство клеток в популяции претерпевает изменения, имеющие приспособительный характер (*адаптационная изменчивость*). Адаптации не затрагивают генотип и вызваны регуляцией клеточного метаболизма. Скачкообразные изменения генотипа носят название мутаций. *Спонтанными* называют мутации, возникающие в естественных условиях в результате нормальных процессов в клетке или при взаимодействии клеток с окр. средой. *Индукцированные мутации* происходят под влиянием опр., специально примененных физических, химических или биологических агентов, называемых *мутагенами*. Мутагенным действием обладают ионизирующее излучение, УФ-лучи, ряд химических соединений. *Радиационный мутагенез*: рентгеновское излучение, быстрые нейтроны, УФ-облучение. Механизмы действия: преимущественно разрывы хромосомы и димеризация пиримидиновых оснований. *Химический мутагенез*: гидроксилламин, азотистая к-та, 2-аминопурин, 5-бромурацил. Механизм действия: ошибки в репликации ДНК, дезаминирование цитозина.

Применение мутантов:

- вызывая изменения в гене, а следовательно, и в фенотипе, мутации служат генетическими маркерами, позволяющими не только идентифицировать ген, но также локализовать его на хромосоме, плазмиде или другой молекуле ДНК в клетке с помощью методов генетического картирования;
- наличие набора мутаций помогает исследовать процессы метаболизма и механизмы их генет. контроля;
- исследование белков, измененных в результате мутаций, способствует установлению их структуры и функционирования;
- мутации являются основой для селекции штаммов микроорг. с полезными свойствами (пример: продуценты антибиотиков).

Изменение одного нуклеотидного остатка (замена, вставка, выпадение) называют точечной мутацией. Мутации, затрагивающие большие участки ДНК, ведут к нарушениям пос-ти и кол-ва генов. Для появления мутации необходимо, чтобы

произошла репликация ДНК и изменение закрепилось в дочерней молекуле. Для фенотипического проявления мутации требуется прохождение транскрипции и трансляции. Так как микроорг. существуют не в виде отдельных особей, а в виде популяций, то нужно несколько клеточных делений, чтобы новый признак проявился.

45. Рекомбинация у прокариот: трансформация, трансдукция конъюгация.

Наследственную изменчивость у прокариотических микроорг. вызывают рекомбинации генет. материала трех основных типов: конъюгация, трансформация и трансдукция.

Конъюгация предполагает непосредственный контакт клетки-донора и клетки-реципиента. Клетка-донор должна обладать так называемой половой плазмидой — F-фактором, который может быть автономен или интегрирован в хромосому. F-фактор обуславливает способность донорной клетки вступать в контакт с реципиентом, формировать половые F-пили, а также передавать генетический материал. При интеграции F-факторы в хромосому такая передача осущ. с высокой частотой. Перенос генет. материала строго ориентирован: разрыв копии хромосомы и передача ДНК происходит в локусе *o* в пределах полового фактора. Скорость переноса в одинаковых условиях для опр. штамма является постоянной. Обычно всей хромосоме не удается перейти в клетку-реципиент, так как контакт клеток очень нестабилен и часто прерывается до завершения перехода. Поскольку первым реципиенту передается всегда один и тот же участок хромосомы, частота передачи стоящих следом за ним генов позволяет расположить их по отношению к этому локусу и составить генет. карту хромосомы.

Трансформацией называется процесс изменения свойств одних бактерий под влиянием экзогенной растворенной ДНК, выделенной из других бактерий. Для трансформации не нужна клетка-донор, а проникновение фрагментов ДНК зависит от физиологического состояния клетки-реципиента (компетентности). Только двухцепочечные фрагменты ДНК значительной молекулярной массы могут быть трансформирующими агентами. В геном может включиться ДНК с определенной степенью гомологии с ДНК реципиента.

Гены могут переноситься из одной бактериальной клетки в другую и в процессе *трансдукции*. При этом функцию векторов выполняют фаги, случайно захватывающие фрагмент бактериальной хромосомы в процессе формирования зрелых фаговых частиц. При заражении клетки-реципиента таким фагом может произойти включение фрагмента ДНК другой клетки путем обмена по гомологичным участкам.

46. Рекомбинация и генетический анализ у фагов. Плазмиды. Понятие о транспозонах. Использование вирусов и плазмид в генетической инженерии.

У многих бактерий обнаружены нехромосомные генетические элементы: плазмиды, умеренные фаги и мигрирующие элементы (транспозоны и IS-элементы). Для плазмид характерно стабильное существование в нехромосомном состоянии. Транспозоны и IS-элементы входят, как правило, в состав хромосом, но способны переходить из хромосомы в плазмиду, поэтому также могут быть отнесены к нехромосомным генетическим элементам. Мигрирующие элементы, представленные транспозонами и IS-элементами, — это линейные молекулы двухнитевой ДНК, размеры которых колеблются от 200 до 6000 пар нуклеотидов. Отличительная особенность мигрирующих элементов — их неспособность к автономной репликации. Мигрирующие элементы могут встраиваться в разные участки бактериальной хромосомы или мигрировать с бактериальной хромосомы на плазмиду; их репликация осуществляется под контролем тех же механизмов,

что и у соответствующей хромосомы или плазмиды. Частота переносов (транспозиции) мигрирующих элементов колеблется от 10^{-4} до 10^{-7} . IS-элементы содержат информацию, необходимую только для их переноса внутри клетки, никаких выявляемых признаков в них не закодировано. Транспозоны устроены более сложно: в них включены некоторые гены, не имеющие отношения к процессу транспозиции. Известны транспозоны, содержащие гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов и другим ингибиторам.

Но фаги интересны не только как пассивные переносчики наследственного материала. Сами по себе они так же, как и вирусы высших организмов, являются генетическим объектом. Гены вирусов могут претерпевать мутации и рекомбинации, спонтанные и индуцированные различными воздействиями: ультрафиолетовыми лучами, ионизирующими излучениями и химическими агентами. Мутации могут касаться таких признаков фага, как скорость лизирования бактериальной клетки, способность заражать бактерии определенного штамма, антигенная природа белковой оболочки фага и т. д. Эти мутантные свойства фагов могут сохраняться длительное время при их размножении. При заражении клетки вирулентным фагом биосинтез клетки, находившейся под контролем генома хозяина, останавливается: синтез ДНК бактерии полностью прекращается, происходит обновление РНК и соответственно синтезируются новые белки для построения фаговых частиц. Вновь синтезируемые молекулы ДНК, РНК и белка на этом этапе осуществляются под контролем ДНК фага. При этом если геном бактерии не способен синтезировать какую-либо аминокислоту, а геном фага обладает такой возможностью, то геном фага может обеспечить ее синтез. Геном фага настраивает биосинтез на свой лад. В данном случае мы вправе говорить о генетическом паразитизме. Фаговая ДНК сначала в клетке размножается и находится в виде отдельных нитей (вегетативный фаг). В это же время гены фага контролируют формирование соответствующей белковой оболочки и части зрелой частицы. ДНК зрелых фаговых частиц в клетке хозяина не воспроизводит себя.

Одной из гипотез, объясняющих рекомбинацию у фагов, является гипотеза *сору-choise*, или *partial-replica*. Смысл этой гипотезы заключается в том, что при репликации по оси матрицы ДНК происходит смена матриц с одной нити ДНК на другую. Сначала репликация идет по одной матрице, но вследствие повреждения участка на пути репликации данной матрицы дальнейшая репликация молекулы ДНК может идти по другой ДНК — неповрежденной. Подтверждением этой гипотезы служит тот факт, что под влиянием мутагенов частота рекомбинаций у фагов повышается.

47. Рекомбинация у эукариот. Половой и парасексуальный процессы. Цитоплазматическая наследственность.

48. Участие микроорганизмов в биогеохимических циклах. Взаимосвязь циклов. Роль физиологических групп микроорганизмов в катализе этапов циклов. Ведущая роль цикла углерода. Продукция деструкция в цикле органического углерода. Связь с циклом неорганического углерода. Связь с циклом кислорода. Цикл азота и специфические группы организмов, участвующие в нем. Цикл серы, серобактерии и сульфидогены. Цикл железа. Самоочищение водотоков. Очистные сооружения и микробные сообщества в них. Морская микробиология.

Основные функции микроорг. в природных местообитаниях:

- минерализация, т.е. разрушение, органических субстратов до CO₂, NH₃, H₂, CH₄, H₂O;
- поставка пит. веществ (в виде метаболитов, полисахаридов) для других хемогетеротрофных микроорг.;
- обеспечение питания для простейших, нематод, почвенных насекомых, т.е. участие в пищевых цепях;
- модификация сложных соединений, становящихся доступными для других организмов;
- перевод соединений в растворимую или газообразную форму;
- выделение соединений, подавляющих активность других микроорг. или ограничивающих выживание и функционирование растений и животных.

Морская микробиология. В морских местообитаниях присутствует большое количество вирусов и высокое содержание архей. Приблизительно 1/3 пикопланктона (клетки размером менее 2 мкм) составляют археи, традиционно приписываемые к экстремальным местообитаниям. В морях отмечен сверхвысокий уровень ультрамикробактерий (нанобактерий), в основном рода *Sphingomonas*, которые могут проходить через мембранный фильтр с размером отверстий 0,2 мкм. Они обладают паразитической устойчивостью к голоданию и так малы, что не поедаются даже нанофлагеллятами.

Применение живых организмов для очистки воды, почвы и воздуха от различных загрязнений основано на их способности к биодegradации (биоразрушению). Это широкое понятие включает три более узких процесса:

- трансформацию, или незначительные изменения молекулы;
- фрагментацию, или разложение сложной молекулы на более простые соединения;
- минерализацию, или превращение сложного в-ва в самые простые.

В наст. время в процессах очистки применяют в основном естественно складывающиеся микробные сообщества. Пока механизмы этих процессов мало изучены и поэтому массовое применение биоремедиации, т.е. использования биологических систем для очистки окружающей среды от загрязнений, весьма ограничено.

49. Сообщества микроорганизмов. Трофические связи в сообществах. Анаэробное сообщество как модель трофических связей. Межвидовой перенос водорода. Синтрофия. Первичные анаэробы. Вторичные анаэробы.

Трофические связи — субстрат может быть расщеплен до простых веществ группой микроорг., а не отдельными ее членами, которые в виде чистых культур этот субстрат вообще не могут использовать из-за энергетических барьеров. Пример тесных связей — анаэробное сообщество, разлагающее полимерные молекулы, в частности, микробиота рубца. Полимеры расщепляются внеклеточными ферментами брожильщиков I стадии. На II стадии бродильщики — облигатные восстановители H⁺ — обычно проводят эндэргонические реакции, используя жирные кислоты с более чем двумя атомами углерода и спирты с больше чем одним атомом углерода, с образованием ацетата и H₂. Такие реакции требуют обязательно отвода H₂. При метаногенном расщеплении эту операцию осуществляют метаногены. Расщепление идет в три стадии. При вбросе большого количества орг. в-ва в анаэробную метаногенную систему снижается pH и метаногены «выключаются». Происходит разбалансировка системы, что приводит к ацидозу у жвачных животных. Таким образом, для нормального функционирования анаэробного пищевой цепи нехотим межвидовой перенос водорода от микроорганизма к микроорганизма. Выделенный при брожении H₂ могут удалять метаногены, ацетогены, сульфатредукторы. При таких условиях

возникает синтрофия — полная взаимосвязь микроорганизмов друг от друга в пищевых потребностях.

50. Экология микроорганизмов.

Микроорганизмы – существенная часть любой экосистемы, выполняющая функции синтеза нового органического вещества в процессе первичной продукции и деструкции органических веществ.

Функции микроорганизмов в природных сообществах:

- 1) Минерализация – полное разрушение органических веществ до самых простых неорганических веществ – CO₂, H₂O, H₂S, CH₄, NH₄ и др.;
- 2) Питание для других организмов сообщества – «мортмасса».
- 3) Пища для крупных микроорганизмов, простейших. Роль жертвы.
- 4) Модификация сложных соединений или газообразную форму.
- 5) Подавление/стимулирование активности или ограничение роста и жизнедеятельности других организмов сообщества.

В природных сообществах:

- Микроорганизмы никогда не находятся в оптимальных условиях.
- Пищевые ресурсы в систему поступают медленно.
- Бактерии используют 1 % от своих возможностей жизнедеятельности.

Между собой микроорганизмы строят различные взаимоотношения:

1. Конкуренция. Микроорганизмы вырабатывают антибиотики и другие агрессивные вещества, подавляя жизнедеятельность конкурирующей биоты.
2. Кооперация. Кооперативные взаимоотношения возникают при накоплении субстрата. Для анаэробов кооперативные взаимоотношения более обязательны, чем для аэробов, поскольку анаэробные бактерии часто испытывают энергетические барьеры при потреблении питательных субстратов.
3. Симбиозы. Обусловлены не только пищевой зависимостью, но и изменениями условий внешней среды (микориза, ризосфера, эндо- и экзосимбиозы с простейшими и пр.)
4. Паразитизм. Возбудители инфекционных болезней человека и животных, риккетсии и хламидии (облигатные паразиты); фитопатогенные бактерии *Agrobacterium*; хищники грамотрицательных бактерий *Bdellovibrio* и зеленых водорослей *Campylobacter*.

51. Формирование состава атмосферы. Парниковые газы. Метаногенез. Бактериальный газовый фильтр.

Почвенные микробы оказывают положительное *влияние на атмосферу*, разрушая такие воздушные «загрязнители», как метан, водород, СО, бензол, трихлорэтилен, формальдегид. Почвенные микроорг. оказывают большое влияние на глобальное содержание разных газов. Относительно стабильные газы — CO₂, NO, N₂O и метан. Эти газы называют *парниковыми газами*, так как они отражают тепловые лучи, не позволяя теплу уходить от поверхности Земли, и вызывают глобальное потепление. Метан может потребляться метанотрофами, обитающими в почве и воде. Критическим фактором, влияющим на потребление метана почвой, является концентрация иона аммония. При увеличении содержания аммония в почве из-за сельскохозяйственной деятельности или вследствие загрязнения потребление метана снижается. Таким образом почвенные и водные метанотрофы могут рассматриваться как своеобразный *бактериальный газовый фильтр*.

52. Водная микробиология. Озеро как модель водной экосистемы. Циклы веществ в водоемах.

Водные микроорганизмы осуществляют в водоемах замкнутые циклы основных элементов, поскольку в микробных сообществах представлены и первичные продуценты орг. в-ва (фотоавтотрофы, прокариоты-хемоавтотрофы), и консументы (простейшие), и деструкторы (большинство гетеротрофных прокариот и грибов). Водные микроорганизмы присутствуют в планктоне и бентосе, прикрепляясь к плавающим частицам и обитая в донных осадках. Простейшие представлены фораминиферами и радиоляриями. Среди водорослей преобладают диатомеи. Отдельные виды микроскопических грибов из оомицетов и хитридиевых приспособились к жизни в пресноводных и морских водоемах. Некоторые хитридиевые паразитируют на диатомовых водорослях. Другой важной группой нитчатый грибов являются гифомицеты из группы грибов Инголда. Эти грибы способны образовывать под водой четырехлучевые споры. В олиготрофных и бедных органическим веществом водах присутствуют скользкие и простековые микроорг., способные прикрепляться к доступному субстрату, обрастать его, образуя хлопья.

В аэробной зоне водоема расположено множество экологических ниш.

В *поверхностной зоне* преобладают микроорганизмы, способные находиться во взвешенном состоянии: клетки, имеющие жгутики, простеки, прикрепленные диски, газовые вакуоли, или организмы малых размеров. Доминирующими формами здесь являются олиготрофы и простекобактерии родов *Nurphomicrobium*, *Planctomyces*, *Blastobacter*, *Caulobacter*. Спириллы относятся к типично планктонным бактериям. Из способов метаболизма преобладают фототрофия, метилотрофия и нитрификация.

Вся *толща* водной массы в зависимости от градиентов факторов поделена на ряд подзон: подзона фотосинтеза, подзоны продукции биомассы гетеротрофных и хемолитотрофных микроорганизмов, подзона деструкции орг. в-ва, подзона термоклина. В водоемах с повышенной соленостью наблюдается заметная первичная продукция орг. в-ва за счет хемосинтеза. Основная масса орг. в-ва разлагается в аэробной водной толще и не достигает дна. Миксобактерии способны лизировать живые клетки цианобактерий и зеленых водорослей. Биополимеры мортмассы микроорг., фитопланктона и высших растений и животных разлагают различные миксобактерии.

В *поверхностном слое ила* обитают прикрепленные или скользкие микроорганизмы. Это микроаэрофильные организмы различных родов, факультативно анаэробные цитофаги и бациллы, нитчатые бактерии, железобактерии, зеленые нитчатые бактерии. Анаэробный распад в приповерхностном слое донных осадков осуществляют клостридии и энтеробактерии. *Нижние слои ила* составляют сульфатредукторы и метаногены, завершающие анаэробную деструкцию упавших на дно растительных и животных остатков.

53. Геологическая микробиология. Роль микроорганизмов в выщелачивании пород и формировании коры выветривания. Роль микроорганизмов в формировании состава природных вод. Цикл кальция и карбонатов. Рудообразование.

54. Почвенная микробиология. Структура почвы и характерные условия обитания микроорганизмов в почве. Влажность и почвенный воздух. Связь микроорганизмов с растениями. Ризосфера. Роль мицелиальных организмов в почве. Микориза. Гумусообразование. Роль микроорганизмов в формировании характерных типов почв. Самоочищение почвы.

Важнейшей земной экосистемой является почва. В почвах преобладает твердая фаза, и большинство почв является преимущественно аэробными. Основные продуценты в почвенных экосистемах — растения. В почвах формируются уникальные местообитания для многих организмов (бактерий, грибов, простейших, водорослей, насекомых, нематод, мелких животных). Все эти организмы необходимы для формирования и поддержания почвы. Бактерии имеют тенденцию присутствовать в виде микроколоний на поверхности почвенных частиц или в виде суспензии в почвенном растворе в порах. Нитчатые грибы и мицелиальные формы прокариот способны расти как на почвенных агрегатах, так и между ними, оплетая их, и с одной стороны, связывая между собой, а с другой — разобщая. Простейшие обитают в водной пленке и поедают бактерии.

Почвы состоят из песка, глины, ила и других частиц. Органическое в-ва, постоянно прибавляющееся в виде растительных и животных остатков, постепенно трансформируется в стабильный, богатый питательными в-вами материал — гумус. Все эти компоненты формируют гетерогенные агрегаты разного размера, или почвенные частицы, которые пронизаны сложной сетью пор. Большинство бактерий локализовано на пов-ти почвенных частиц, и им необходимо, чтобы вода и питательные в-ва располагались в непосредственной близости. В почве постоянно обнаруживают грамположительные палочки и кокки, образующие эндоспоры — гнилостные спорообразующие аэробы из рода *Bacillus* (*B. mycoides*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megatherium*, *B. cereus*). Анаэробы из рода *Clostridium* (*Cl. sporogenes*; *Cl. putrificum*, *Cl. perfringens*) также распространены в различных видах почв. В почве долго сохраняются споры возбудителей столбняка *Cl. tetani*, газовой гангрены *Cl. perfringens*, ботулизма *Cl. botulinum*. В почве также обнаруживаются неспорообразующие аэробные бактерии рода *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens*) и факультативно-анаэробные бактерии рода *Proteus* (*Pr. vulgaris*). В почве выявляют азотфиксирующий род *Azotobacter*, нитрифицирующие рода *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, сероокисляющие бактерии родов *Achromatium*, *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Thiospirillopsis*, *Thiothrix*; железобактерии; сапрофитные кокки родов *Micrococcus* (*Micr. albus*, *Micr. candidans*, *Micr. cereus flavus*), *Sarcina* (*S. ureae*) и грибы группы актиномицетов родов *Actinoplanes*, *Streptomyces*, *Kineosporia* и др. Актиномицеты участвуют в деструкции органических, в частности растительных остатков, подключаясь к процессу на поздних стадиях минерализации. Они способны разлагать и более сложные соединения, в том числе гумусовые вещества. Обильно населяют почвы микроскопические грибы. Обладая мощным ферментативным аппаратом, грибы активно разлагают растительные остатки. Способность грибов к образованию органических кислот отводит им главенствующую роль в процессах первичного почвообразования. Биомасса грибов в лесных почвах зачастую превышает бактериальную биомассу. Среди почвенных водорослей чаще всего встречаются представители четырех отделов: зеленые, сине-зеленые, желто-зеленые и диатомовые.

Отношения между *микроорганизмами и растениями* базируются как на обмене метаболитами, так и на обеспечении физического контакта.

Микроорганизмы в этом союзе:

- участвуют в процессах почвообразования, создают среду обитания для растений;
- разлагают сложные биологические полимеры;
- микроорганизмы возвращают в окружающую среду соединения, необходимые для роста и развития растений;
- проводят процесс связывания молекулярного азота, который обогащает почву азотными соединениями;
- специфические микробные метаболиты влияют на скорость роста растений (грибы обеспечивают растения соединениями фосфора);

- способны освоить большее пространство почвы для питания растением (мицелиальные микроорганизмы – актиномицеты);
- выделение антимикробных субстанций сдерживает колонизацию и инфицирование различных частей растения фитопатогенными микроорганизмами.

Развивающаяся корневая система, проникая в глубь почвы, вступает во взаимодействие с почвенными микроорганизмами, животными и корнями других растений. Вокруг корня формируется так называемая *ризосфера* – окружающее корень пространство почвы, характеризующееся более высокой плотностью микроорганизмов. Размер ризосферы исчисляется примерно от 0 до 8 мм в диаметре, количество микробных клеток в ней велико. Пространство поверхности корня часто определяют как отдельное местообитание микроорганизмов, называемое ризопланой.

Микориза (грибкорень) — симбиотическая ассоциация мицелия гриба с корнями высших растений. *Эктотрофная микориза* возникает, когда гифы гриба оплетают плотной сетью, образуя или чехол, или микоризные трубки. Гифы гриба проникают сквозь ризодерму корня и распространяются по межклетникам, не проникая в клетки. Для такого типа микоризы характерно отсутствие корневых волосков и редукция корневого чехлика вплоть до одного-двух слоёв клеток. Гифы гриба разделяют корень на зоны. Основное отличие *эндотрофной микоризы* в том, что гифы гриба проникают в клетки коры корня (через поры, не проходя сквозь плазмалемму). На поверхности корня микориза выражена слабо, то есть вся основная часть гриба находится внутри корня. В клетках корня могут образовываться скопления гиф гриба в виде клубков. Гифы могут разветвляться внутри клетки — эти образования называются арбускулами. *Эндоэктомикориза* охватывает в себе признаки и эндо- и эктомикоризы. Возможен переход между эктомикоризой и эндомикоризой. Со стороны высших растений участвуют все голосеменные, около 70% однодольных и 80—90% двудольных. Со стороны грибов — аскомицеты, базидиомицеты и зигомицеты. Гриб получает от дерева углеводы, аминокислоты и фитогормоны, а сам делает доступным для поглощения и всасывания растением воду и минеральные вещества, прежде всего соединения фосфора. Кроме того, гриб обеспечивает дерево большей поверхностью всасывания, что особенно важно, когда оно растёт на бедной почве.

55. Палеобактериология и эволюция биосферы в докембрии. Реликтовые сообщества. Филогения микроорганизмов, основанная на пучении последовательностей 16S рРНК. Симбиогенез.

56. Использование микроорганизмов для получения пищевых и кормовых продуктов, химических реактивов и лекарственных препаратов. Применение в сельском хозяйстве, при выщелачивании металлов из руд, очистке стоков и получении топлив.

Издавна люди готовили большое количество *продуктов из молока*. Общим для таких процессов является образование большого количества молочной кислоты из сахара, что приводит к снижению pH и предотвращает развитие микроорганизмов, вызывающих негативные процессы. Молочнокислое брожение применяется при приготовлении квашеных овощей и кислой капусты, а также при силосовании кормов. Образующаяся молочная кислота является в этих процессах естественным консервантом. Еще одна область использования молочнокислых бактерий — закваски для мясных и рыбных продуктов. Так готовят некоторые сорта сосисок, колбасы салями, сервелат и различные блюда японской кухни.

Для изготовления хлеба применяют специальные дрожжевые закваски. Все они относятся к сахаромицетам, но для хлеба, пива, кваса и т.д. используют разные расы дрожжей. Закваски для хлебопечения не должны содержать других микороорг., должны активно расти на глюкозе с обильным газообразованием. Дрожжи являются основным действующим элементом в процессах приготовления алкогольных напитков. Такие продукты могут быть получены из различных растительных субстанций, которые содержат доступные углеводы. Более крепкие напитки получают отгонкой спирта из вина или пива и отличаются начальным субстратом и модификацией послеотгоночных операций.

К соединениям, получаемым с помощью микроорг. и служащим для диагностики и лечения различных заболеваний, относятся *антибиотики*, а также различные *антимикробные агенты* (вакцины, сыворотки, антитела). В качестве продуцентов используются микроорг., выделенные из естественных мест, так и мутанты и искусственно «сконструированные» штаммы. Для получения вакцин и сывороток используются как живые ослабленные или видоизмененные возбудители, так и убитые клетки, либо их отдельные части (антигены), которые вводятся во время прививки в здоровый организм, чтобы с профилактической целью научить его вырабатывать антитела. Вакцина — собственно возбудитель, сыворотка — полученные на антиген готовые антитела, вводимые уже заболевшему человеку.

Использование биологической активности для удаления загрязняющих веществ из окружающей среды называют биоремедиацией. Для успеха таких процессов необходимо сначала найти соотв. активность, а затем разными методами ее стимулировать и создать по возможности оптимальные условия для ее проявления. При это есть две возможности:

- 1) стимулировать развитие активных микроорг., уже имеющихся в окр. среде;
- 2) интродуцировать в загрязненную область микроорг. с уже известными биодеградабельными способностями.

В искусственных очистных сооружениях значительно больше возможностей применять селектированные штаммы или сообщества, в том числе и генно-инженерные.

Биоповреждения различных объектов и материалов основаны как на непосредственной активности микроорг., так и на агрессивных продуктах их жизнедеятельности. Большая проблема в нефтедобыче и производстве нефтепродуктов — биокоррозия трубопроводов и порча самого топлива. При транспортировке нефти по трубам на их внутр. пов-ти обр. прочная пленка микроорг., с одной стороны часто механически мешающая потоку, а с другой — повреждающая трубы из-за выделения серной кислоты микробами, окисляющими серу, сод. в сырой нефти, и из-за выделения сульфатредуцирующими бактериями сероводорода, вступающего в реакцию с железом.

1. Открытие микроорганизмов А. ван Левенгуком. Роль Л. Пастера в формировании микробиологии. Значение работ Р. Коха, С.Н.Виноградского, Д.И.Ивановского, М. Бейеринка, А. Клейвера, А. Флеминга.

История развития микробиологии исчисляется примерно с 1661 года, когда Левенгук впервые описал микроскопические существа, наблюдаемые им в собственный микроскоп. Левенгук впервые увидел микробов и описал их основные группы, а также сделал вывод о том, что они вездесущи. Описания своих наблюдений он сопровождал тщательными зарисовками. Все это описательный этап развития микробиологии.

Физиологический этап начался приблизительно с середины XIX века и связан с именами Луи Пастера и Роберта Коха. Пастер доказал, что причиной химических изменений субстратов являются микроорганизмы, и опроверг теорию самозарождения. Исследования природы брожений стали продолжением работы по выяснению причины прокисания вина. Пастер показал, что каждое брожение имеет главный конечный продукт и вызывается микроорганизмами определенного типа. Эти исследования привели к открытию анаэробного метаболизма. Работы по изучению возбудителей болезней пива и вина позволили Пастеру предложить способ тепловой обработки этих продуктов, предохраняющий их от порчи (пастеризация). Они же навели Пастера на мысль, что микроорганизмы являются возбудителями инфекционных болезней человека. Роберт Кох, начав с доказательства бактериальной этиологии сибирской язвы, затем выделил возбудителей многих болезней в чистой культуре. Кох окончательно сформулировал триаду, получившую его имя, для доказательства микробной этиологии заболевания: 1) микроорганизм должен присутствовать в материале больного; 2) выделенный в чистой культуре, он должен вызывать ту же болезнь; 3) возбудитель при экспериментально вызванном повторном заболевании должен снова быть выделен в чистую культуру, и две эти чистые культуры должны быть идентичными. В лаборатории Коха введены в практику эксперимента методы получения чистых культур, использование твердых сред на желатине и агаре. Виноградскому принадлежит открытие уникального образа жизни - хемолитоавтотрофии и изучение серных и нитрифицирующих бактерий. Виноградский и Бейеринк независимо друг от друга показали, что фиксацию молекулярного азота способны проводить только микроорганизмы, и выделили свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов. Виноградский разработал метод накопительных культур. Ивановский открыл вирус табачной мозаики, тем самым обнаружив группу организмов, не имеющих клеточного строения. В чем же конкретно состоит биохимическое единство жизни? Общее основано на единстве конструктивных, энергетических процессов и механизмов передачи генетической информации. А. Клейвер доказал два первых положения: все живые организмы построены из однотипных химических макромолекул, универсальной единицей биологической энергии служит АТФ, в основе физиологического разнообразия живых существ лежит несколько основных метаболических путей. Александр Флеминг (1881-1955) — шотландский бактериолог. Труды по иммунологии, общей бактериологии, химиотерапии. Открыл лизоцим в 1922 году; в 1929 установил, что один из видов плесневого гриба выделяет антибактериальное вещество — пенициллин.

2. Развитие отечественной микробиологии. Главные направления развития современной микробиологии. Основные методы микробиологических исследований.

Большой вклад в геносистематику микроорганизмов внесли Белозерский и Спирин. Мейсель с коллегами подробно изучили клеточные структуры и их функции у микроорганизмы. Шапошников создал теорию физиологической двухфазности брожений, что позволило управлять процессами получения важных продуктов в микробиологических производствах. Физиология и биохимия многих фототрофных и хемолитотрофных микроорганизмов была подробно изучены Кондратьевой и ее коллегами. Изучением биохимии процесса азотфиксации занимались Ишменецкий, Кретович, Яковлев. Экологическое направление представлено работами Омелянского, который разработал схемы круговорота веществ в природе и изучил жизнедеятельность микроорганизмов, участвующих в глобальных циклах азота, серы и железа. Микробные сообщества, а также их роль в природных и искусственных местообитаниях изучаются Ивановым и Заварзиным. Иерусалимским была разработана теория роста и развития микробов, Работновой изучены реакции окисления-восстановления.

3. Мир микроорганизмов, общие признаки и разнообразие. Прокариотные и эукариотные микроорганизмы; сходство и основные различия. Вирусы, отличия от клеточных форм жизни.

Мир микроорганизмов включает любой микроорганизм микроскопических размеров, поэтому понятно, что термин «микроорганизм» не имеет таксономического смысла. Микроорганизмы встречаются в самых разных таксономических группах, причем другие члены этой группы могут быть и макроорганизмами. По принципу клеточной организации все микроорганизмы могут быть разделены на два типа - прокариоты и эукариоты. У прокариот ядерный аппарат, называемый часто нуклеоидом, представлен в большинстве случаев кольцевой молекулой ДНК, соответствующей одной хромосоме. У эукариот ядро содержит набор хромосом и отделено от цитоплазмы мембраной. Первоначально к микроорганизмам относили вирусы, однако в настоящее время их чаще рассматривают как особые формы жизни, не имеющие клеточного строения и содержащие, в отличие от про- и эукариот, лишь один тип нуклеиновых кислот (ДНК или РНК).

4. Принципы классификации прокариотных микроорганизмов. Правила номенклатуры и идентификации.

Под классификацией понимают отнесение конкретного биологического объекта к определенной группе однородности (таксону) по совокупности присущих ему признаков. Отношения между таксонами организмов изучает систематика. Иерархия таксонов: домен, филум, класс, порядок, семейство, род, вид. Вид является основной таксономической единицей. Микробиологи пользуются биномиальной системой обозначения объекта (номенклатуры), включающей родовое и видовое название. В настоящее время определение микроорганизмов (идентификация) базируется на следующих критериях:

- морфология клеток и колоний (на опр. средах и при опр. условиях)
- цитология клеток (про- или эукариоты)
- культуральные признаки (характер роста на твердых и жидких средах)
- физиологические свойства (использование различных субстратов, отношение к температуре)
- биохимические свойства (метаболические пути)
- молекулярно-биологические свойства (содержание ГЦ-АТ-пар в процентах)
- хемотаксономия (химический состав различных соединений и структур)
- серодиагностика (реакция антиген-антитело)
- фаготипирование (использование специфических фагов)

В настоящее время разрабатывается классификация всех живых существ, в которой выделены три домена: Bacteria, Archaea, Eukarya на основании анализа нуклеотидной последовательности и 16S рРНК. В домен Eukarya вошли все эукариотические организмы, включая человека. Из микроорганизмов сюда вошли: водоросли, грибы и простейшие. Домен Bacteria включает прокариотические микроорганизмы, имеющие типичные признаки бактерий, в частности клеточные оболочки, сод. пептидогликан. К Archaea относятся три филума: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota.

5. Прокариоты. Характеристика отдельных групп бактерий и архей.

Среди прокариот различают бактерии и археи. Основанием для выделения этих групп послужили результаты сравнения олигонуклеотидных последовательностей 16S рибосомных РНК, а также выявления различий в составах клеточных стенок, липидов и ряда других особенностей.

К археям относятся микроорганизмы, разделенные на три филума: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota. Первый филум объединяет повсеместно распространенные микроорганизмы. Это метаногены - строгие анаэробы, обитающие в донных осадках пресноводных зон, богатых органикой, или в рубце жвачных. Широко распространены также экстремальные галофилы, растущие при высоких концентрациях соли и способные осуществлять особый тип фотосинтеза с помощью бактериородопсина, который на свету работает как протонная помпа. Ко второму филуму относятся микроорганизмы, имеющие очень узкие и специфические места обитания. Это экстремофилы, зависящие от серных соединений, оптимумы рН и температуры роста которых отличаются экстремальными значениями. Третий филум зарезервирован за представителями до настоящего времени некультивируемых прокариот, для которых, однако, известны последовательности генов, кодирующих молекулу 16S рРНК.

Бактерии включают прокариотические микроорганизмы, имеющие типичные признаки бактерий, в частности клеточные оболочки, сод. пептидогликан.

6. Эукариоты. Краткая характеристика грибов, водорослей простейших.

К эукариотам относят грибы, водоросли и простейшие. Грибы - обширная группа гетеротрофных микроорганизмов, широко распространенных в природе. Большинство из них сапрофиты, есть паразитические виды. *Грибы*: зумикоты и оомикоты. Характерная особенность всей группы - образование мицелия. *Зигомицеты* имеют не разделенный на отдельные клетки многоядерный мицелий. Они характеризуются особым типом полового размножения, которое включает стадию образования зигоспоры из двух родительских гиф. *Аскомицеты* образуют гифы, которые разделены поперечными перегородками. Характерный орган спороношения - аск, в котором формируются аскоспоры. Неполовой путь размножения - с помощью конидий. К аскомицетам относятся многие дрожжи, которые существуют в виде отдельных неподвижных клеток и размножаются почкованием или делением. Аскомицетные дрожжи могут размножаться и половым путем, образуя аски с 2-8 спорами. На определенных стадиях развития некоторые дрожжи образуют мицелий или псевдомицелий, на концах которого можно обнаружить споры. *Дейтеромицеты* - разнообразная группа микроорганизмов с отсутствующей половой стадией. Многие несовершенные грибы могут осуществлять парасексуальный процесс, при котором слияние и последующее деление ядер происходят непосредственно в мицелии. *Водоросли* включают фототрофные микроорганизмы. Осуществляют кислородный фотосинтез. Состав пигментов обуславливает их цвет, который может быть зеленым, бурым, красным, золотистым. Все водоросли образуют каротиноиды и хлорофилл а, а некоторые

хлорофилл b и c, а также фикобилины. В клетках водорослей могут накапливаться различные запасные вещества - крахмал, парамилон, ламинарин. Зеленые водоросли (обитатели пресных и соленых водоемов, почв и стволов деревьев, одноклеточные и многоклеточные, многие из них содержат в составе клеточной стенки целлюлозу), диатомовые водоросли (одноклеточные микроорганизмы, имеют панцирь из двух кремниевых створок, который раскрывается в процессе бесполого размножения, расходится после деления на две части, каждая из которых достраивает себе недостающие половинки), динофлагелляты (одноклеточные, имеют два боковых жгутика, некоторые образуют токсины, летальные для человека), эвгленовые (лишены клеточной стенки, способны расти в темноте, получая энергию при окислении органических веществ). *Простейшие* лишены клеточной стенки, поглощают пит. в-ва абсорбцией через клеточную мембрану или энзоцитозом. Размножение половое и бесполое, иногда оба способа воспроизводства составляют стадии единого жизненного цикла. Включает 4 класса: амёбы, жгутиконосцы, реснитчатые и споровики. Амёбы обитают преимущественно в воде. Они подвижны благодаря псевдоподиям, которые также способствуют захвату пищи с последующим фагоцитозом. В ж/ц есть фаза инцистирования. Жгутиконосцы - организмы, включающие паразитирующие и свободноживущие формы. Некоторые вызывают тяжелые болезни человека и животных. Реснитчатые - в основном свободноживущие виды, играющие активную роль в разложении органических загрязнений при очистке воды. Споровики - образуют споры на определенных стадиях развития. Имеют сложный ж/ц, который включает половую и бесполоую стадии размножения. Много возбудителей заболеваний.

7. Микроскопические методы изучения микроорганизмов. Разновидности световой микроскопии. Исследования живых фиксированных объектов.

Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величина которых измеряется в большинстве случаев микрометрами, возможно только с помощью микроскопов, обеспечивающих увеличение исследуемых объектов в сотни (световая) и десятки тысяч (электронная микроскопия) раз. Изображение в световом микроскопе формируется вследствие того, что объект и различные элементы его структуры избирательно поглощают свет с различной длиной волны (абсорбционный контраст) или вследствие изменения фазы световой волны при прохождении света через объект (фазовый контраст). Световая микроскопия включает обычную просвечивающую микроскопию (светло- и темнопольную), фазово-контрастную и люминесцентную.

Светлопольная микроскопия. Такой вид микроскопии позволяет определить форму клеток микроорганизмов, их размер, подвижность, степень морфологической гетерогенности, а также способность к дифференцированному окрашиванию. Оптическая система микроскопа состоит из осветительного аппарата, объектива и окуляра. Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора и предназначен для наилучшего освещения препарата. Зеркало концентрирует в плоскости препарата пучок лучей, конденсор собирает параллельные лучи света, идущие от источника света и отраженные плоским зеркалом в одной точке - фокусе, который должен находиться в плоскости препарата. В конденсор вмонтирована диафрагма, позволяющая задерживать излишние лучи света и регулировать апертуру конденсора. Объектив состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Самая главная - наружная линза, от фокусного расстояния которой зависит увеличение объектива. Окуляр содержит две линзы — глазную и собирающую и служит для рассмотрения изображения предмета, даваемого объективом, т.е. выполняет роль лупы. Отчетливость получаемого изображения

определяется разрешающей способностью микроскопа, которая зависит от длины волны используемого света и числовой апертуры оптической системы микроскопа. Разрешающая способность связана обратной зависимостью с пределом разрешения — минимальным расстоянием между двумя точками, при котором еще можно различить каждую из них.

Темнопольная микроскопия. Микроскопия в темном поле основана на освещении объекта косыми лучами света. Эти лучи не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Если препарат содержит клетки микроорганизмов, то косые лучи, проходя через такой препарат, в значительной степени отражаются от пов-ти клеток и настолько уклоняются от своего первоначального направления, что попадают в объектив. Тогда мы видим на черном фоне интенсивно светящиеся объекты. Такая микроскопия позволяет различить более мелкие объекты, чем светлопольная, но можно увидеть лишь контуры микроорганизмов, но не их внутреннее строение.

Фазово-контрастная микроскопия. Основана на том, что с помощью фазово-контрастного устройства различия в фазе световых лучей, возникающие при прохождении их через прозрачные объекты, превращаются в амплитудные, поэтому объект становится контрастными. Применение фазово-контрастного устройства не позволяет увеличить разрешающую способность микроскопа, но дает возможность увидеть прозрачные объекты более четко и даже выявить некоторые структуры и включения в клетках крупных бактерий.

Люминесцентная микроскопия. Основана на способности многих веществ биологического происхождения и красителей светиться под воздействием падающего на них света. Молекулы в-в, способных к люминесценции, поглощают энергию падающего света и переходят в возбужденное состояние, которое характеризуется более высоким энергетическим уровнем. В таком состоянии они находятся непродолжительное время и вновь возвращаются к исходному энергетическому уровню. Этот переход сопровождается отдачей избытка энергии в виде света — люминесценцией. Объект освещают ультрафиолетовыми или синевioletовыми лучами. Эта микроскопия увеличивает контрастность изображения, дает возможность различить отдельные клеточные структуры и даже отметить их изменения при различных функциональных состояниях клетки.

8. Использование электронной микроскопии.

Электронный микроскоп (ЭМ) — прибор, позволяющий получать изображение объектов с максимальным увеличением до 10^6 раз, благодаря использованию, в отличие от оптического микроскопа, вместо светового потока пучка электронов с энергиями 200 эВ ÷ 400 кэВ и более. Для получения изображения в электронном микроскопе используются специальные магнитные линзы, управляющие движением электронов в колонне прибора при помощи магнитного поля. Виды электронной микроскопии: просвечивающая электронная микроскопия, просвечивающая сканирующая электронная микроскопия и просвечивающая электронная микроскопия. *Просвечивающая электронная микроскопия:* в просвечивающем электронном микроскопе используется высокоэнергетический электронный пучок для формирования изображения. Электронный пучок создается посредством катода (вольфрамового, LaB₆, Шоттки или холодной полевой эмиссии). Полученный электронный пучок ускоряется обычно до +200 кэВ, фокусируется системой магнитных линз (иногда электростатических линз), проходит через образец так, что часть электронов рассеивается на образце, а часть — нет. Таким образом, прошедший через образец электронный пучок несет информацию о структуре образца. Далее пучок проходит через систему увеличивающих линз и формирует изображение на люминесцентном экране (как

правило, из сульфида цинка), фото-пластинке или CCD-камере. *Просвечивающая сканирующая электронная микроскопия*: один из типов просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), однако есть приборы работающие исключительно в режиме ПРЭМ. Пучок электронов пропускается через относительно тонкий образец, но, в отличие от обычной просвечивающей электронной микроскопии, электронный пучок фокусируется в точку, которая перемещается по образцу по растру. *Просвечивающая электронная микроскопия*: в основе лежит телевизионный принцип развертки тонкого пучка электронов по поверхности образца.

15. Культивирование. Накопительные культуры и принцип селективности. Чистые культуры микроорганизмов. Методы получения и изучение. Основные типы сред, используемые для культивирования микроорганизмов (по составу и физическому состоянию). Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов, метод Хангейта. Поверхностное и глубинное выращивание. Из-за малых размеров