* 1. **Предмет, задачи и методы микробиологии**

Микробиология (от греч. *мicros –* малый, *bios –* жизнь, *logos –* наука) – наука о микроскопически малых существах, называемых микроорганизмами. К микроорганизмам, или микробам, относятся преимущественно одноклеточные организмы – бактерии, микроскопические грибы и водоросли, простейшие. Т. е. общим признаком всех этих организмов являются микроскопические размеры. Микроорганизмы – в таксономическом отношении очень неоднородная группа, представители которой отличаются друг от друга морфологией, строением, физиологией, типами конструктивного и энергетического метаболизма, а также особенностями питания, но общим их признаком является малая величина особей. Однако основным объектом изучения микробиологии традиционно служат преимущественно бактерии.

Микроорганизмы широко распространены в природе. Их общая масса на планете примерно в 25 раз превышает массу всех животных. Встречаются они повсеместно – в воде, почве, воздухе, в организмах животных и растений, пожалуй, лишь за исключением кратеров вулканов.

**Предметом** исследования в микробиологии выступают морфология, физиология, биохимия, систематика, генетика и экология микроорганизмов.

Важнейшей **задачей** микробиологии как науки является выявление роли микроорганизмов в круговороте веществ в природе, установление значения отдельных микробиологических процессов для человека, животных и растений.

Значение микроорганизмов велико. Микроорганизмы используются в различных технологических процессах: в хлебопечении, при производстве вина, пива, кисломолочных продуктов, используются в качестве источников пищевого и кормового белка, в качестве продуцентов биологически активных соединений (органических кислот, спиртов, витаминов, гормонов, ферментов, антибиотиков) и т.п. В природе микроорганизмы участвуют в почвообразовательных процессах, формируют полезные ископаемые (нефть, залежи железа, серы), фиксируют азот.

Современная микробиология включает ряд **направлений**. Полезные микроорганизмы изучает общая микробиология и такие ее направления как промышленная, сельскохозяйственная, водная, геологическая, космическая, почвенная, генетическая микробиология. Вредные микроорганизмы изучает специальная микробиология, которая подразделяется на медицинскую, ветеринарную, санитарную микробиологию.

Несмотря на большое разнообразие микроорганизмов, можно выделить общие **методы** их исследования, специфические для микробиологии:

– методы культивирования микроорганизмов на специальных питательных средах;

– методы микроскопического исследования микроорганизмов;

– методы изучения обмена веществ микроорганизмов.

**1.2 Краткая история развития микробиологии**

«День рождения» микробиологии связан с именем голландец Антония ван Левенгук (1632–1723), мануфактурщика из Голландии. Этот человек достиг большого совершенства в деле изготовления линз, названных им «микроскопиями», которые давали увеличение в 200–270 раз. С интересом рассматривая все, что попадалось под руку – воду из пруда, зубной налет, настой перца, слюну, кровь и многое другое – А. ван Левенгук повсюду обнаруживал микроорганизмы и пришел к выводу, что окружающий мир густо заселен микроскопическими обитателями. Все виденные им микроорганизмы, в том числе и бактерии, исследователь считал маленькими животными, названными им «анималькулями». Дальнейшее систематическое изучение окружающей природы с помощью совершенствовавшихся микроскопов подтверждало обнаруженное А. ван Левенгуком повсеместное распространение в ней микроорганизмов.

Могучим стимулом для развития исследований, приведших к возникновению и последующему интенсивному развитию микробиологии, послужили три основные проблемы: природа процессов брожения и гниения, причины возникновения инфекционных болезней и проблема самозарождения организмов.

Человеком, который своими работами положил начало современной микробиологии, был выдающийся французский ученый Луи Пастер (1822–1895). Научная деятельность Л. Пастера многогранна и охватывала все основные проблемы того времени, связанные с жизнедеятельностью микроорганизмов. Результаты изучения процессов брожения, опубликованные в конце 1857 г., доказывали, что процессы брожения связаны с жизнедеятельностью определенных групп микроорганизмов и происходят в условиях без доступа воздуха. Почти одновременно Л. Пастер изучил спиртовое, молочнокислое и маслянокислого брожения. Изучение маслянокислого брожения привело Л. Пастера к выводу, что жизнь некоторых микроорганизмов не только может протекать в отсутствие свободного кислорода, но последний вреден для них. Он же ввел термины «аэробный» и «анаэробный» для обозначения жизни в присутствии или в отсутствие молекулярного кислорода.

Около 5 лет посвятил Л. Пастер изучению этого вопроса и пришел к выводу, что болезни шелковичных червей вызываются определенными микроорганизмами. Дальнейшие работы Л. Пастера в области изучения инфекционных заболеваний привели к открытию им возбудителей куриной холеры, остеомиелита, гнойных абсцессов, одного из возбудителей газовой гангрены. Таким путем Л. Пастер показал и доказал, что каждое заболевание порождается специфическим микроорганизмом.

В 1879 г. при изучении куриной холеры Л. Пастер разработал метод получения культур микробов, которые утрачивают способность быть возбудителем заболевания, т. е. теряют вирулентность, и использовал это открытие для предохранения организма от последующего заражения. Последнее легло в основу создания теории иммунитета, т. е. невосприимчивости организма к инфекционным заболеваниям.

К области теоретических открытий Л. Пастера относятся его работы о невозможности самозарождения. На основании проделанных экспериментов Л. Пастер пришел к следующему выводу: «Нет, сегодня не имеется ни одного известного факта, с помощью которого можно было бы утверждать, что микроскопические существа появились на свет без зародышей, без родителей, которые их напоминают».

Работы Л. Пастера были по достоинству оценены его современниками и получили международное признание. В 1888 г. для ученого на средства, собранные по международной подписке, был построен в Париже научно-исследовательский институт, носящий в настоящее время его имя. Л. Пастер был первым директором этого института. Открытия Л. Пастера показали, как разнообразен, необычен, активен невидимый простым глазом микромир и какое огромное поле деятельности представляет его изучение.

Одним из основоположников микробиологии наряду с Л. Пастером явился немецкий микробиолог Роберт Кох (1843-1910), занимавшийся изучением возбудителей инфекционных заболеваний. Свои исследования Р. Кох начал, будучи сельским врачом, с изучения сибирской язвы и в 1877 г. опубликовал работу, посвященную возбудителю этого заболевания – *Bacillus anthracis*. Вслед за этим внимание Р. Коха привлекла другая тяжелая и широко распространенная болезнь того времени – туберкулез. В 1882 г. Р. Кох сообщил об открытии возбудителя туберкулеза, который в его честь был назван «палочкой Коха». В 1905 г. за исследование туберкулеза Р. Коху была присуждена Нобелевская премия.

Родоначальником русской микробиологии является Л.С. Ценковский (1822–1887). Объектом его исследований были микроскопические простейшие, водоросли, грибы. Л.С. Ценковский открыл и описал большое число простейших, изучал их морфологию и циклы развития. Это позволило ему сделать вывод об отсутствии резкой границы между миром растений и животных. Л.С. Ценковским была организована одна из первых Пастеровских станций в России и предложена вакцина против сибирской язвы.

Основоположником медицинской микробиологии справедливо считают И.И. Мечникова (1845–1916). Основные научные интересы И.И. Мечникова были сосредоточены на проблеме изучения взаимоотношений хозяина и микроорганизма-паразита и в 1883 г. он создал фагоцитарную теорию иммунитета. Невосприимчивость человека к повторному заражению после перенесенного инфекционного заболевания была известна давно. И.И. Мечников показал, что защита организма от болезнетворных микроорганизмов – сложная биологическая реакция, в основе которой лежит способность белых кровяных телец (фагоцитов) захватывать и разрушать посторонние тела, попавшие в организм. В 1909 г. за исследования по фагоцитозу И.И. Мечников был удостоен Нобелевской премии.

Впитав идеи Л. Пастера о многообразии форм жизни в микромире, русский микробиолог С.Н. Виноградский (1856–1953) и голландский микробиолог М. Бейеринк (1851–1931) ввели микроэкологический принцип в исследование микроорганизмов.

Для выделения в лабораторных условиях группы бактерий с определенными свойствами С.Н. Виноградский предложил создавать специфические (элективные) условия, дающие возможность преимущественного развития данной группы организмов. В 1893 г. С.Н. Виноградским был выделен из почвы анаэробный азотфиксатор, названный им в честь Л. Пастера **Clostridium pasteurianum. Также ученый** выделил из почвы микроорганизмы, представляющие собой совершенно новый тип жизни – хемолитоавтотрофы. В качестве единственного источника углерода для построения всех веществ клетки хемолитоавтотрофы используют углекислоту, а энергию получают в результате окисления неорганических соединений серы, азота, железа, сурьмы или молекулярного водорода.

Микроэкологический принцип был успешно развит и применен М. Бейеринком при выделении различных групп микроорганизмов. В 1901 г. М. Бейеринк обнаружил в почве еще один вид бактерий, способных к азотфиксации в аэробных условиях – **Azotobacter chroococcum.** М. Бейеринку принадлежат работы по исследованию физиологии клубеньковых бактерий, изучению процесса денитрификации и сульфатредукции, работы по изучению ферментов разных групп микроорганизмов.

Развитие микробиологии в XX в. ознаменовалось крупными открытиями в области биохимии и генетики микроорганизмов. Продолжалась дальнейшая дифференциация микробиологии: от нее отпочковывались новые научные дисциплины (вирусология, микология) со своими объектами исследования, выделились направления, различающиеся задачами исследования (общая микробиология, биотехнология, сельскохозяйственная, медицинская, генетика микроорганизмов и др.).

*Вопросы для самоконтроля:*

1. *В каких отраслях народного хозяйства находят применение микроорганизмы?*
2. *Что послужило причиной обнаружения А. ван Левенгуком микроорганизмов?*
3. *Перечислите основные открытия Л. Пастера – основоположника научной микробиологии.*
4. *Какие русские ученые посвятили свои работы изучению микроорганизмов.*
5. **МИКРООРГАНИЗМЫ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ**
	1. **Положение микроорганизмов в системе живого мира**

Микроорганизмы в таксономическом отношении очень неоднородная группа. К микроорганизмам относятся представители разных царств органического мира – Дробянки, Грибы, Животные, Растения:

– все прокариоты – эубактерии, цианобактерии, архебактерии;

– отдельные эукариоты – микроскопические грибы, слизевики, простейшие животные и микроскопические водоросли – эти организмы в 18 г. Геккелем были выделены в сборную группу – царство *Protista*;

– организмы с неклеточной организацией – вирусы, вироиды, вирусоиды и прионы – которые рассматриваются сформировавшейся как ветвь микробиологии, теперь уже самостоятельной наукой – вирусологией.

Несмотря на таксономическую неоднородность, микроорганизмов объединяют следующие черты: микроскопические размеры, простота организации, способность обитать в природных экосистемах в виде многочисленных популяций и способность к быстрому размножению.

Среди микроорганизмов преобладают одноклеточные формы, но встречаются и многоклеточные – некоторые цианобактерии, многоклеточные мицелиальные грибы и водоросли.

Клеткам всех прокариотических и эукариотических микроорганизмов характерны такие свойства как способность поглощать вещества и выделять продукты метаболизма, осуществлять превращение, запасание и использование вещества и энергии, хранить, воспроизводить и реализовать наследственную информацию, способность к самовоспроизведению и росту, а также общую основу – протопласт – содержимое клетки, окруженное плазмотической мембраной.

При этом клетки прокариот отличаются от клеток эукариот строением наследственного аппарата, другими структурными, морфологическими, физиологическими и биохимическими признаками (таблица 1).

Таблица 1 – Отличительные признаки прокариотических и эукариотических организмов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Признак | Прокариоты | Эукариоты |
| Организациягенетического аппарата | Нуклеоид – участок цитоплазмы несущий одну или несколько молекул ДНК, не отграниченный собственной ядерной мембраной.  | Ядро, есть ядрышко.  |
| Хромосомы | Преимущественно кольцевые хромосомы | Линейные хромосомы |
| Белки-гистоны | Имеются гистоподобные белки только у некоторых архебактерий. | Есть белки-гистоны, которые обеспечивают суперспирализацию ДНК |
| Организация генов | Гены не несут интронов (за исключением архебактерий). Гены организованы в опероны. | Гены имеют экзонно-интронную организацию. Опероны отсутствуют. |
| ЛокализацияДНК | В нуклеоиде и плазмидах | В ядре, митохондриях, пластидах |
| Цитоплазматические органеллы | Отсутствуют (кроме рибосом) | митохондрии, пластиды, АГ, ЭПР |
| Рибосомы  | 70 S-типа | 80 S-типа в цитоплазме, 70 S-типа в митохондриях и пластидах |
| Движение цитоплазмы | Отсутствует | Имеется |
| Жгутики | Состоят из одной фибриллы, построенной из субъединиц белка флагеллина | Состоят из микротрубочек, собранных в группы |
| Компартментализация клеток | Слабо выражена | Клетка разделена мембранами на отдельные отсеки |
| Основной компонент клеточной стенки | Пептидогликан (муреин) | Целлюлоза, пектиновые вещества, гликоген |
| Место локализации рибосом | Распределены в цитоплазме | Прикреплены к ЭПР |
| Фотосинтетический аппарат  | Ассоциирован с ЦПМ или ее выростами (система ламелл, несущих фотосинтетические пигменты) | Хлоропласты |
| Дыхательный аппарат | Ассоциирован с ЦПМ или ее выростами (система ламелл, несущих компоненты ЭТЦ) | Митохондрии |
| Вакуоли | Газовые | В растительных клетках, заполненные клеточным соком |
| Размеры клеток | 0,2–10 мкм | 10–100 мкм |
| Способы клеточного деления | Прямое деление (поперечное бинарное деление) | Митоз, амитоз, мейоз |
| Способы обмена наследственной информацией  | Конъюгация, слияние протопластов, трансформация, трансдукция | Гаметогенез и образование зиготы |
| Термостойкие эндоспоры | Могут формироваться | Не формируются |
| Фиксация N2 | Может осуществляться | Не существляется |
| Хемосинтез | Может осуществляться | Не существляется |
| Метаногенез | Может осуществляться | Не существляется |
| Фотосинтез | Аноксигенный и оксигенный | Оксигенный |

Считается, что в настоящее время культивировать можно только 0,1 % всего микробного разнообразия, а остальных представителей бактерий вырастить и идентифицировать не удается, хотя уже в чистую культуру выделены и описаны около 5 тыс. видов прокариот.

* 1. **Общая характеристика вирусов**

**Вирусы** – это автономные генетические структуры, способные функционировать и репродуцироваться в восприимчивых к ним клетках бактерий, грибов, растений, животных, используя их генетический и белоксинтезирующий аппарат.

Для вирусов характерны **две стадии их жизненного цикла**: **вирион**– внеклеточная, покоящаяся стадия, представленная целой вирусной частицей, состоящая в основном из белка и нуклеиновой кислоты; вегетативный вирус– внутриклеточная, вегетативная, репродуцирующаяся стадия.

Честь открытия вирусов принадлежит русскому ученому Д.И. Ивановскому, который в 1892 г. впервые доказал существование нового типа возбудителя болезней на примере мозаичной болезни табака.

Вирусы являются своеобразной формой жизни и поэтому подчиняются законам эволюции органического мира на земле. Однако вирусам характерны **уникальные свойства:**

1. Фильтруемостъ вирусов – вирионы обладают способностью проходить через бактериальные фильтры («фильтрующийся вирус»), те размеры вирусных частиц меньше размеров бактериальных клеток. Это свойство вирусов сформулировал еще Д.И. Ивановский, что отражается в таких физических характеристиках как размеры и молекулярная масса. Размеры вирусов колеблются от 25 нм до 350–400 нм.
2. Отсутствие клеточного строения – вирион состоит из белкового капсида и нуклеиновой кислоты (втрус табачной мозаики, аденовирусы). У сложноорганизованных вирусов содержится дополнительная внешняя оболочка – суперкапсид (вирус гриппа, ВИЧ)**.**
3. Наличие одного типа нуклеиновой кислоты в составе вириона. У вирусов в качестве геномной нуклеиновой кислоты может выступать как ДНК, так и РНК. В зависимости от типа нуклеиновой кислоты все вирусы делят на ДНК- и РНК-геномные вирусы. При этом и ДНК, и РНК могут присутствовать в разных формах.
4. Отсутствие собственных белок-синтезирующих систем – вирусы являются генетическими паразитами и их воспроизводство возможно лишь в клетке.
5. Вирусы неспособны размножаться на искусственных питательных средах, т.е. вне клетки. Существуют три способа культивирования вирусов: биологический (*in vivo*) – культивирование в организме лабораторных животных; культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбрионах; размножение в культуре ткани (*in vitro*).
6. Отсутствие способности к росту и бинарному делению – воспроизводство вирусов носит дизъюнктивный характер, т.е. различные компоненты вируса синтезируются независимо в разных частях клетки-хозяина, а затем собираются в единый вирион.

Особую группу составляют вирусы-паразиты бактерий – **бактериофаги**. Фаги обнаруживаются во всех объектах окружившей среды, в которых обитают бактерии, грибы, микоплазмы. Найдены они в воде, почве, молоке, в различных выделениях человека и животных.

Различают простые фаги в виде шестигранников (колифаги *МS-2, f2, фХ174*) или нитей (фаги *f1, fd*), а сложные фаги (колифаги группы *Т1–Т7*) обладающие смешанной симметрией. У наиболее изученного сложного фага *Т2* различают: шестигранную головку, воротничок, отросток, состоящий из полого стержня, снаружи покрытого сократительным чехлом; шестиугольную базальную пластинку с отходящими от каждого угла нитями. Диаметр головки в среднем составляет 50 нм, а отростка – 100–200 Х 10–15 нм.

По химическому составу ДНК фагов отличается от ДНК вирусов животных и растений содержанием оксиметилцитозина. Сложный фаг Т2 состоит из 40–50% спирально скрученной двухцепочечной ДНК, находящейся в полости головки фага. Простые по строению головчатые и нитевидные фаги содержат одноцепочечную кольцевую ДНК, в которой находится по одному остатку метилцитозина (*фХ174, f1*), или одноцепочечную линейную РНК (*MS-2* и *f2*).

Устойчивость фагов к факторам окружающей среды достаточно велика. Они выдерживают нагревание до 75 °С, не обезвреживаются в малых концентрациях дезинфицирующих веществ, резистентны к антибиотикам, хлороформу и ферментным ядам. Быстро разрушаются фаги в желудочном соке, а также под воздействием ультрафиолетовых лучей, ионизирующих излучений.

Фаги, по характеру взаимодействия с бактериями, подразделяются на вирулентные и умеренные с полноценным и дефектным геномами. Взаимодействия вирулентного фага с бактерией приводит кпродуктивной инфекции, сопровождающейся размножением вирионов и лизированием клеток.

Взаимодействие умеренных фагов с бактериями проявляется в двух формах: одни штаммы или клетки определенного вида бактерий фаги разрушают, в другие проникают, но гибели не вызывают. В последнем случае ДНК умеренного фага объединяется с бактериальной ДНК и переходит в состояние **профага**. Описанное явление называют **лизогенией**, а бактерии, содержащие профаг – **лизогенными**. Связь профага с бактерией очень прочная и в естественных условиях нарушается с частотой 10-2–10-5. Частоту отщепления профага от бактериальной хромосомы увеличивается при воздействии на лизогенные бактерии ультрафиолетовыми лучами, ионизирующей радиацией и химическими мутагенами. При отщеплении профаг переходит в вегетативную (размножающуюся) форму и лизирует клетку. Иногда в состоянии лизогенности у бактерий появляются новые признаки и свойства, кодируемые геномом фага. Например, в результате лизогенизации у некоторых бактерий изменяются форма и цвет колоний, нетоксигенные штаммы корине-бактерий дифтерии превращаются в токсигенные. а у сальмонелл появляются новые антигенные детерминанты. Изменчивость, формирующаяся под влиянием профага, получила название **фаговой конверсии**. При индукции лизогенных бактерий в профаг нередко включаются гены бактерий, но чаще они замещают некоторую часть участка ДНК, которая остается в геноме бактериальной клетки. Утратившие часть своего генома умеренные фаги становятся **дефектными** и не способны к образованию зрелых частиц, осуществляют **трансдукцию**, т. е. перенос генов.

*Вопросы для самоконтроля:*

1. *Охарактеризуйте понятие микроорганизмы с точки зрения таксономии.*
2. *Каковы отличительные признаки прокариотических и эукариотических микроорганизмов?*
3. *Назовите уникальные признаки вирусов, отличающие их от других микроорганизмов.*
4. *Каковы основные компоненты вириона?*
5. *Объясните явление фаговой конверсии.*

**3 МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ**

**БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

* 1. **Размеры и форма клеток бактерий**

В среднем линейные размеры бактерий находятся в пределах 0,5–3 мкм, но есть среди бактерий и свои «гиганты» и «карлики». В частности, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 500 мкм; бактерии *Achromatium oxaliferum* имеют в длину 15–100 мкм при поперечнике примерно 5–33 мкм, а длина клеток спирохет может быть до 250 мкм. Самые мелкие из известных бактерий – микоплазмы, имеющие диаметр клеток 0,1–0,15 мкм.

Для бактерий характерны три основные формы клеток: кокковидная, палочковидная и извитая (рисунок 1).



Рисунок 1 – Основные формы бактерий:

*а* – стафилококки; *б* – стрептококки; *в* – сарцины; *г* – диплококки; *д* – бациллы;

*е* – вибрионы; *ж* – спириллы; *з* – спирохеты

Кокковидные бактерии обычно имеют форму правильного шара диаметром 1,0–2,0 мкм, но могут быть овальными, эллипсоидными, бобовидными. Кокковидные бактерии способны делиться в нескольких плоскостях, при этом после деления клетки могут не расходиться и формировать различного вида скопления. Если деление кокков происходит в одной плоскости, то могут образовываться пары клеток – диплококки и цепочки клеток разной длины – стрептококки. Кокки, делящиеся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и не расходящиеся после этого, образуют тетрады кокков – тетракокки. Когда деление клеток происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются пакеты из восьми кокков в виде тюков кубической формы – сарцины. У некоторых видов бактерий при делении кокков в нескольких плоскостях могут образовываться неправильные по форме скопления, напоминающие гроздья винограда – стафилококки.

Палочковидные клетки сильно различаются по величине отношения длины клетки к ее поперечнику. Делясь только в одной плоскости, клетки могут располагаться поодиночке – монобациллы, образовывать пары – диплобациллы или цепочки – стрептобациллы.

Извитые клетки различаются количеством образуемых витков. В зависимости от формы и количества витков различают: вибрионы, изогнутые клетки наподобие запятой; спириллы, имеющие 3–5 крупных витка; спирохеты – клетки с большое количество мелких витков.

Известны и клетки иных типов: клетки с выростами; булавовидной формы; веретенообразные; ланцетовидные; разветвленные и неразветвленные нитчатые формы; имеющие вид замкнутого или незамкнутого кольца; ветвящиеся; напоминающие шестиугольную звезду; пластинкообразные; в виде кусочков битого стекла, квадратиков и т.д.

Существуют бактерии, для которых характерен **плеоморфизм** – морфологическая изменчивость, и в зависимости от условий имеющие вид палочек, кокков или обнаруживающие слабое ветвление. У микоплазм и некоторых других бактерий, при прохождении цикла развития, наблюдается подобное изменение формы.

* 1. **Строение бактериальных клеток**

Прокариотическая клетка имеет цитоплазму, которая окружена цитоплазматической мембраной. Цитоплазма вместе с цитоплазматической мембраной составляют протопласт, снаружи от него расположены поверхностные структуры. К их числу относятся клеточная стенка, капсулы, чехлы, слизистые слои, жгутики, ворсинки.

**Клеточная стенка** является обязательным структурным элементом бактериальной клетки, исключение составляют микоплазмы и *L*-формы бактериальных клеток. *L*-формами принято называть бактерии, частично или полностью лишенные клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию.

На долю клеточной стенки приходится от 5 до 50 % сухих веществ. Основным компонентом клеточной стенки большинства бактерий является муреин, относящийся к классу пептидогликанов. Муреин – гетерополимер, построенный из цепочек, в которых чередуются остатки *N*-ацетил- глюкозамина и *N*-ацетилмурамовой кислоты, соединенные между собой гликозидными связями. Остатки *N*-ацетилмурамовой кислоты через лактильные группы соединены пептидной связью с тетропептидом, в составе которого обнаруживаются аминокислоты: *L*-аланин, *D*-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота и *D*-аланин. Благодаря пептидным связям гетерополимерные цепи связаны между собой и образуют мешкообразную гигантскую молекулу – муреиновый мешок, который выполняет функцию опорного каркаса клеточной стенки.

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

В зависимости от строения клеточной стенки бактерии делятся на две большие группы: грамположительные и грамотрицательные. Метод окраски, позволяющий разделить бактерии на эти две группы был предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом. Этот метод основан на различной способности микроорганизмов удерживать в клетке красители трифенилметанового ряда – кристаллический фиолетовый и генциановый фиолетовый, что в свою очередь зависит от химического состава и ультраструктуры клеточной стенки бактерий (рисунок 2).



 А Б

Рисунок 2 – Строение клеточной стенки бактерий (по К.А. Лукомской):

А – грамположительная бактерия; Б – грамотрицательная бактерия;

1 – нуклеоид; 2 – цитоплазматическая мембрана; 3 – муреин; 4 – наружная мембрана; 5 – периплазматическое пространство

Клеточная стенка грамположительных бактерий под электронным микроскопом выглядит как гомогенный плотный слой, толщина которого колеблется для разных видов от 20 до 80 нм. Муреин в клеточной стенке грамположительных бактерий составляет от 50 до 90 % ее сухой массы. С муреином связаны тейхоевые кислоты – полимеры, образованные остатками спирта рибита или глицерина, связанными фосфодиэфирными мостиками. В составе клеточной стенки грамположительных бактерий в небольшом количестве также обнаружены полисахариды, белки и липиды.

Клеточная стенка у грамположительных бактерий плотно прилегает к цитоплазматической мембране. К грамположительным бактериям относятся: *Bacillus subtilis, Sarcina ventriculi, Streptococcus lactis, Staphyloccocus aureus, Clostridium pasterianum* и др.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее составляет от 14 до 17 нм. Внутренний слой клеточной стенки представлен пептидогликаном муреином, на долю которого приходится от 1 до 10 % ее сухой массы. Структурные микрофибриллы пептидогликана грамотрицательных бактерий сшиты менее компактно. Внешний слой клеточной стенки (наружная мембрана) образован фосфолипидами, липопротеинами и белками. По строению наружная мембрана имеет типичную организацию, характерную для элементарных мембран. Основной фракцией наружной мембраны являются липиды, составляющие в среднем 22 % сухой массы клеточной стенки. Наружная мембрана выполняет не только механические, но и важные физиологические функции. В ней находятся трансмембранные белки, которые насквозь пронизывают мембрану. Они представляют собой заполненные водой каналы или гидрофильные поры в липофильной мембране, их называют поринами. Порины осуществляют транспорт через мембрану гидрофильных низкомолекулярных веществ. В клеточной стенке грамотрицательных бактерий является отсутствие тейхоевых кислот. Компоненты клеточной стенки у грамотрицательных бактерий разделены электронно-прозрачным слоем, а также четко отделены от цитоплазматической мембраны. Пространство между цитоплазматической и наружной мембраной получило название периплазматического.

Грамотрицательным бактериям являются: *Escherichia coli, Erwinia carotovora, Proteus vulgaris, Yersinia pestis, Pseudomonas aeruginosa* и др.

Клеточная стенка не является жизненно важной структурой, так как в определенных условиях она может быть удалена и бактериальные клетки при этом существуют в виде протопластов или сферопластов.

Основными функциями клеточной стенки являются: формообразующая, защитная, обеспечение связи с окружающей средой, проведение веществ в цитоплазму и выделение метобалитов в окружающую среду.

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

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

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

Функциями цитоплазматической мембраны является:

1. Поддержание внутреннего постоянства цитоплазмы клетки, что достигается за счет уникального свойства – полупроницаемости цитоплазматической мембраны. Она проницаема для воды и низкомолекулярных веществ, но не проницаема для ионизированных соединений.

2. Транспорт веществ в клетку и вывод их наружу.

3. Несет электронтранспортную цепь и ферменты окислительного фосфорилирования.

4. Участвует в синтезе клеточной стенки и капсулы.

5. Является местом закрепления жгутиков и обеспечивает энергию для их работы.

У прокариот разных таксономических групп обнаружены мезосомы, которые образуются при впячивании (инвагинации) цитоплазматической мембраны в цитоплазму (рисунок 3). По форме различают ламеллярные (пластинчатые), везикулярные (в виде пузырьков), тубулярные (трубчатые) мезосомы и мезосомы смешанного типа.





Рисунок 3 – Схема строения бактериальной клетки

Функциями мезосом является:

1. Усиление мембранзависимых функциональных активностей клетки. В мембранах мезосом находятся ферменты, участвующие в энергетическом метаболизме бактерий. Производными цитоплазматической мембраны, возникшие в результате ее разрастания и глубокого инвагинации в цитоплазму, являются фотосинтетические мембраны, которые некут фотосинтетические пигменты и образуют у бактерий хроматофоры, тилакоиды и ламеллы.

2. Мезосомы играют роль в репликации ДНК и последующем расхождении ее копий по дочерним клеткам.

3. Мезосомы участвуют в процессе инвагинации и формирования поперечной перегородки при клеточном делении.

**Цитоплазма** – это содержимое клетки, окруженное цитоплазматической мембраной, представленная двумя фракциями. Гомогенная фракция (цитозоль), содержит набор растворимых РНК, ферментных белков, продуктов и субстратов метаболических реакций, получила название. Гетерогенная фракция цитоплазмы представлена структурными элементами: рибосомами, внутрицитоплазматическими включениями, запасными веществами, нуклеоидом и мембранными структурами.

Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70*S*. Они образованы двумя субъединицами – 30*S* и 50*S*. По величине и некоторым другим особенностям рибосомы бактерий сходны с рибосомами митохондрий и хлоропластов. Меньшая субъединица 30*S*содержит молекулу 16S-pPHK и обычно 21 молекулу различных белков. Субъединица 50*S*состоит из двух типов молекул рРНК (23*S* и 5*S*) и около 35 молекул различных белков.

Бактериальная клетка содержит от 5 до 50 тыс. рибосом, число их тем больше, чем больше скорость роста клетки. Рибосомы служат местом синтеза белка. Синтез белка осуществляется полирибосомами (полисомами), состоящими из рибосом, информационной (иРНК) и транспортных (тРНК). Полирибосомы могут быть связаны с мембранными структурами или же находиться свободно в цитоплазме.

Внутрицитоплазматические включения – активно функционирующие структуры, к которым относятся хлоросомы**,** фикобилисомы,аэросомы**,** карбоксисомы, магнитосомы.

Хлоросомы зеленых бактерий и фикобилисомы цианобактерий принимают непосредственное участие в фотосинтезе и содержат пигменты, поглощающие кванты света и передающие энергию возбуждения на фотореакционные центры. Это эллипсовидные образования, окруженные тонкой белковой оболочкой.

Аэросомы, или газовые вакуоли, обнаруженные у бактерий, обитающих в воде. Аэросомы снижают удельную массу бактериальной клетки и благодаря этому поддерживают ее во взвешенном состоянии в водоеме. Аэросома представляет собой скопление газовых пузырьков, веретенообразной формы. Их оболочка состоит только из белка, т. е. устроена не так, как обычная мембрана. Белковые молекулы ориентированы таким образом, что внутренняя сторона оказывается гидрофобной, а наружная – гидрофильной.

Карбоксисомы, или полиэдрические тела, содержатся в клетках некоторых автотрофных бактерий. Они имеют форму многогранника диаметром 90–100 нм, окруженного однослойной белковой оболочкой. В карбоксисомах содержится рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза – фермент, катализирующий фиксацию СО2 в цикле Кальвина в процессе фото- и хемосинтеза.

Магнитосомы содержатся в клетках водных бактерий, способных ориентироваться в магнитном поле и перемещаться в направлении линий магнитного поля. В их состав входит 0,4 % железа (по сухому веществу). Магнитосомы располагаются в клетках вблизи мест прикрепления жгутиков.

**Запасные вещества** – это продукты клеточного метаболизма, не выделяющиеся наружу, а откладывающиеся внутри клетки, содержатся в клетках в осмотически инертной форме, т. е. не растворимы в воде. В условиях, благоприятных для роста, когда в этих веществах возникает потребность, они снова включаются в метаболизм.

К запасным веществам относятся полифосфаты, полисахариды, жиры, сера. Эти вещества накапливаются, если в питательной среде находятся соответствующие исходные соединения.

Из **полисахаридов** в клетках микроорганизмов откладываются гликоген, крахмал и крахмалоподобное вещество – гранулоза. Запасные вещества полисахариды образуются из молекул D-глюкозы, которые связаны гликозидными связями. Много крахмала имеют клетки бактерий вида *Acetobacter pasteurianus.* Гранулоза содержится в большом количестве в клетках бактерий рода *Clostridium.* Гликоген, или «животный крахмал», синтезируется у бактерий *Escherichia coli*, у бактерий рода*Salmonella*,у бацилл, дрожжей и других микроорганизмов. Запасные полисахариды используются микроорганизмами в качестве источников углерода и энергии.

**Жиры** накапливаются в виде гранул или капелек, преломляющих свет по-иному, чем содержимое цитоплазмы, и поэтому хорошо различимы в световом микроскопе. Запасным жироподобным веществом многих бактерий поли-β-гидроксимасляная кислота, которая является хорошим источником углерода и энергии. Микроорганизмы могут накапливать также триглицериды (нейтральные жиры). Особенно много их запасается в клетках дрожжей и других грибов. Кроме того, микобактерии могут содержать до 40 % восков.

**Полифосфаты** откладываются в гранулах, называемых волютиновыми зернами. Полифосфаты играют роль фосфатных депо и источников энергии.

У многих пурпурные и бесцветные серобактерии, зеленые серные бактерии и других, окисляющих сульфид до сульфата, в процессе метаболизма в клетке откладывается **молекулярная сера** в виде шариков, сильно преломляющих свет. Количество накопляемой серы зависит от содержания H2S в окружающей среде. В условиях отсутствия H2S сера, находящаяся в клетке, окисляется до SO2. Сера служит источником энергии и донором электронов.

Специфическими запасными веществами цианобактерий являются цианофитиновые гранулы, состоящие из полипептида, в который входят аргинин и аспарагиновая кислота в эквимолярных количествах. Цианофитиновые гранулы служат резервом азота, который используется цианобактериями при его недостатке в среде.

**Ворсинки,** или **фимбрии,** – поверхностные структуры, состояощие из белка пилина и не выполняют функцию движения. По размерам они короче и тоньше жгутиков. Число фимбрий на поверхности клетки колеблется от 1–2 до нескольких тысяч, их имеют как кокковидные, так и палочковидные бактерии. Они имеют вид полых белковых трубочек длиной от 0,5 до 10 мкм. Различают два типа ворсинок.

**Ф**имбрии общего типа обеспечивают прикрепление клетки к поверхности субстрата, участвуют в поступлении крупномолекулярных соединений в цитоплазму клетки. Специфические ворсинки (**половые пили, *F*-пили)** обнаруженные у клеток доноров, содержащих половой фактор (*F*-плазмиду) или другие донорспецифические плазмиды. Такие клетки способны синтезировать одну-две *F*-пили на клетку для образования конъюгационных пар при переносе генетического материала от клетки донора в клетку реципиента.

Многие микроорганизмы продуцируют на поверхности клетки **слизистое вещество**. Слизистые вещества по химической природе являются полисахаридами. Особенно обильное их образование наблюдается у многих микроорганизмов при выращивании на среде с сахарозой. Различают слизи, капсулы, слизистые чехлы, между которыми у прокариот обнаружено много переходных форм.

Слизистое вещество следует рассматривать как продукт жизнедеятельности, поверхностных слоев цитоплазмы, выделяемый клеточной оболочкой наружу. В слизистом веществе капсул обнаружены полисахариды: декстраны, галактаны, целлюланы. Кроме полисахаридов, в состав капсул входят полипептиды, состоящие главным образом из цепочек молекул глютаминовой кислоты. Химический состав капсул различных бактерий характеризуется строгой специфичностью.

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

В отличие от капсул и слизистых слоев, **слизистые чехлы** имеют сложную тонкую структуру; в их составе выявляют несколько слоев разного строения и сложного химического состава. Чехлы ряда бактерий, метаболизм которых связан с окислением восстановленных соединений металлов, часто инкрустированы их окислами.

Слизистые образования не являются обязательными структурами бактериальной клетки. Их появление или разрушение не приводят к какому-либо нарушению клеточной активности.

Слизистые образования выполняют ряд функции в клетке:

1. Защищают клетку от неблагоприятных факторов внешней среды, механических повреждений, высыхания.

2. Создают дополнительный осмотический барьер.

3. Повышают вирулентность у некоторых бактерий.

4. Препятствуя адсорбции бактериофагов на клетках бактерий.

5. Являются источником запасных питательных веществ.

6. Объединяют клетки в цепочки, колонии.

7. Обеспечивают прикрепление клеток к поверхности субстрата.

**Генетический материал** прокариот представлен молекулой (молекулами) ДНК, уложенной в компактную структуру и локализованной в ограниченных участках цитоплазмы, не имеющей, в отличие от эукариот, собственной ядерной мембраны. Учитывая эти особенности, генетический аппарат прокариот принято называть нуклеоидом. При применении световой микроскопии нуклеоид выглядит как бобовидное тело с хорошо очерченными контурами, занимающее центральную часть бактериальной клетки, и длиной около 1 мкм. Полностью «уложенный» нуклеоид представляет собой достаточно компактное образование. Стабилизирующую роль в такой организации играют специфические основные белки, сходные по аминокислотному составу и другим свойствам с гистонами эукариот.

Замкнутая в кольцо молекула ДНК нуклеоида (исключение: виды актиномицетов и некоторые другие имеют линейную ДНК) включает несколько тысяч генов, расположенных линейно, и приравнивается к бактериальной хромосоме. У большинства видов бактерий клетка содержит одну хромосому, поэтому большинство бактерий – гаплоидные организмы. Однако клетки бруцелл, *Rhodobacter sphaeroides****,*** *Agrobacterium tumefaciens****,*** *Leptospirain terrogans* имеют по две неодинаковые хромосомы**,** клетки *Burkholderia cepacia* – три разные хромосомы. Поэтому термины «нуклеоид» и «хромосома» не всегда совпадают. В зависимости от условий нуклеоид бактериальной клетки может состоять из одной или нескольких копий одной и той же хромосомы. Например, у *Azotobacter chroococcum* в экспоненциальной фазе роста на одну клетку приходится 20–25 копий хромосомы.

Обычно деление бактериальной клетки по времени осуществляется после завершения цикла репликации молекулы ДНК. Однако в интенсивно растущих культурах репликация ДНК может опережать деление клетки и нередко в ней содержится ДНК в 4-8 раз больше, чем масса одной хромосомы.

* 1. **Движение бактерий**

Выделяют три основных **способа передвижения бактерий**: при помощи жгутиков, движения спирохет при помощи аксиальных фибрилл, скользящий тип передвижения.

Большинство бактерий передвигаются при помощи жгутиков. По расположению и числу жгутиков на поверхности клетки бактерии подразделяют на: монотрихи – имеют один жгутик (родов *Vibrio*); лофотрихи – несут на одном или на обоих полюсах клетки пучок жгутиков (род *Pseudomonas*); амфитрихи – имеют по жгутику на обоих полюсах клетки (род *Spirillum*); перитрихи – большое количество жгутиков, располагающихся по всей поверхности клетки (род *Bacillus,* род *Clostridium*) (рисунок 4).

****

Рисунок 4 – Типы жгутикования бактерий:

1 – перитрих; 2 – монотрих; 3 – лофотрих; 4 – амфитрих

Жгутики представляют собой спирально закрученные нити, состоящие из из субъединиц белка флагеллина. Жгутики состоит из нити, крюка и базального тельца. С помощью базального тельца, в которое входит центральный стержень и кольца, жгутик закреплен в цитоплазматической мембране и клеточной стенке. Количество колец зависит от строения клеточной стенки: у грамположительных бактерий два кольца – *S, М* (*S*-кольцо располагается в пептидогликановом слое клеточной стенки, М-кольцо – в цитоплазматической мембране); у грамотрицательных бактерий имеются четыре кольца – *L, Р, S, М* (*L*-кольцо закреплено в наружной мембране, *Р*-кольцо – в пептидогликановом слое клеточной стенки, *S*-кольцо – в периплазматическом пространстве, *М*-кольцо – в цитоплазматической мембране клетки) (рисунок 5).



Рисунок 5 – Схема строения жгутика грамотрицательных бактерий (по В.В. Чуриковой и Д.П. Викторову)

Если клетка имеет много жгутиков, они при движении собираются в пучок, который образует своеобразный пропеллер. Пучок жгутиков, быстро вращаясь против часовой стрелки, создает силу, заставляющую бактерию двигаться почти по прямой линии. Так как у грамположительных бактерий наружная пара колец отсутствует, то считают, что для вращения жгутиков необходимо наличие только внутренней пары (кольца *S* и *М*).

Своеобразный тип движения характерен для спирохет. В периплазматическом пространстве этих грамотрицательных бактерий находятся пучки нитчатых структур – аксиальные фибриллы, которые, как и жгутики, состоят из белка флагеллина. Эти структуры обеспечивают движение спирохет как в жидкой среде, так и на разделе фаз жидкой и плотной сред.

Клетка содержит по два набора фибрилл, прикрепленных субполярно у каждого полюса клетки. Каждая аксиальная фибрилла тянется практически вдоль всей длины клетки, а в центральной части клетки аксиальные фибриллы перекрываются. Фибриллы, вращаясь или сокращаясь, обусловливают характерное для спирохет движение: путем изгибания, вращения вокруг оси, волнообразно, винтообразно.

У некоторых прокариот установлен скользящий тип передвижения. Способность к скольжению выявлена у некоторых микоплазм, миксобактерий, цианобактерий, нитчатых серобактерий и др. Общим для всех микроорганизмов, способных к скольжению, является выделение слизи. Согласно гипотезе реактивного движения, скользящее передвижение обусловлено выделением слизи через многочисленные слизевые поры в клеточной стенке. Кроме того, у ряда таких прокариот в составе клеточной стенки между пептидогликановым слоем и наружной мембраной выявлен тонкий слой белковых молекул. Скольжение нитчатых форм сопровождается и одновременным их вращением, поэтому каждая точка на поверхности трихома описывает при движении спираль.

Для подвижных бактерий характерны таксисы, т. е. направленная двигательная реакция в ответ на определенный фактор. В зависимости от природы фактора различают хемотаксис (движение относительно источника химического вещества), фототаксис (движение относительно источника света), магнитотаксис (способность передвигаться по силовым линиям магнитного поля Земли или магнита) и вискозитаксис (способность передвигаться в направлении изменения вязкости раствора) и т.д.

* 1. **Размножение бактерий**

**Рост** прокариотной клетки представляет собой согласованное увеличение количества всех химических компонентов, из которых она построена. Рост является результатом множества скоординированных биосинтетических процессов, находящихся под строгим регуляторным контролем, и приводит к увеличению массы и размеров клетки. Но рост клетки не беспределен. После достижения критических размеров клетка подвергается делению. Для прокариот характерно прямое бинарное деление клетки.

В норме делению клетки всегда предшествует репликация молекулы ДНК, происходящая по полуконсервативному механизму.

Полуконсервативный механизм предполагает, что родительская двойная спираль раскручивается, и каждая полинуклеотидная цепь служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Таким образом, новая двойная молекула оказывается «гибридом» старой и вновь синтезированной цепи.

Процесс репликации начинается с присоединения к специфическим точкам на мембране участков ДНК, определяющих начало и конец ее репликации. В местах, где происходит присоединение хромосомы к мембране, локализованы ферменты, обеспечивающие репликацию ДНК. Контакт ДНК с ЦПМ осуществляется посредством мезосом. Репликация, начавшаяся в точке прикрепления, идет затем в двух противоположных направлениях, образуя характерную для кольцевой хромосомы промежуточную структуру.

В зоне репликации (репликативной вилке) на небольшом участке происходит разрыв водородных связей, обеспечивающих поддержание двунитевой структуры ДНК. На подготовленных таким путем однонитевых участках, служащих матрицами, начинается синтез комплементарных нитей. Время удвоения хромосомы *Escherichia соli* занимает приблизительно 40 мин.

Возникающие дочерние хромосомы остаются прикрепленными к мембране. Репликация молекулы ДНК происходит параллельно с синтезом ЦПМ на этом участке, в результате чего происходит сегрегация (разделение) дочерных хромосом в пространстве и расхождение к полюсам материнской клетки.

У большинства грамположительных бактерий и нитчатых цианобактерий деление происходит путем синтеза поперечной перегородки, приводящее чаще к образованию двух одинаковых дочерних клеток (равновеликое бинарное поперечное деление). При таком способе в середине клетки сначала имеет место кольцевое впячивание ЦПМ, сопровождающееся формированием мезосом разного внешнего вида. Они образуются в месте закладки поперечной перегородки и активно участвуют в процессах синтеза пептидогликана и других компонентов клеточной стенки. Поперечная перегородка формируется из ЦПМ и пептидогликанового слоя, ее наружные слои синтезируются позднее.

Клетки большинства грамотрицательных бактерий делятся путем перетяжки (неравновеликое бинарное поперечное деление). У *Escherichia соli* на месте деления обнаруживается постепенно увеличивающееся и направленное внутрь искривление ЦПМ и клеточной стенки.

* 1. **Покоящиеся формы у бактерий**

Для перенесения неблагоприятных условий бактерии формируют такие покоящиеся формы как цисты, миксоспоры, экзоспоры, эндоспоры.

Цисты – это шарообразные толстостенные клетки, формирование которых характерно для бактерий рода *Azotobacter*. В цисту превращается вся вегетативная клетка.

Миксоспоры образуются также путем превращения всей клетки. Формирование миксоспор характерно для бактерий рода *Myxococcus.*

Экзоспоры возникают путем почкования материнской клетки. Они сходны по своим свойствам с эндоспорами бацилл. Образование экзоспор характерно для метанокисляющих бактерий.

Эндоспоры бактерий – особый тип покоящихся клеток, в основном грамположительных бактерий. Эндоспоры формируются эндогенно, т.е. внутри материнской клетки, которая называется спорангием. Бактериальная эндоспора отличается от вегетативной клетки тем, что она характеризуется повышенной резистентностью к нагреванию, действию ультрафиолетовых лучей, антибиотиков и других факторов.

Поскольку одна клетка образует одну эндоспору и увеличения числа бактерий при ее прорастании не происходит. Эндоспоры представляют собой стадию покоя и приспособлены к перенесению неблагоприятных условий.

Процесс **образования эндоспор** включает следующие этапы:

1. **Подготовительный этап** – в вегетативной клетке бактерий, переходящей к спорообразованию, прекращаются ростовые процессы, завершается репликация ДНК и изменяется метаболизм, в клетке накапливается дипиколиновая кислота.

2. **Этап формирования споры** начинается с особого неравного деления клетки. Цитоплазматическая мембрана вегетативной клетки образует инвагинацию и отделяет часть протопласта материнской клетки, в результате чего этот протопласт содержит один нуклеоид с участком уплотненной цитоплазмы. Протопласт будущей споры обрастает цитоплазматическая мембрана материнской клетки, а образующаяся структура носит название проспора.

Проспора расположена внутри материнской клетки и ограничена от нее двумя мембранами. Каждая из этих мембран участвует в синтезе стенки споры: мембрана протопласта споры синтезирует снаружи от себя стенку зародышевой клетки; мембрана, происходящая от материнской цитоплазматической мембраны, синтезирует вовнутрь кортекс. Кортекс состоит из многослойного муреина, но более кислого, чем муреин клеточной стенки материнской клетки. Также материнской клеткой синтезируется дополнительная наружная оболочка споры, которая в значительной степени представлена полипептидами. У большинства видов спорообразующих бактерий эндоспора заключена еще в один дополнительный наружный слой – экзоспориум, в состав которого входят белки, липиды, углеводы.

По мере формирования многослойных покровов проспора превращается в эндоспору, которая состоит из нуклеоида, уплотненной цитоплазмы и покровов.

3. **Этап созревания споры**. Спора приобретает характерную форму и занимает определенное положение в клетке, в результате чего бактериальная клетка принимает иную форму. Различают три типа спорангиев: бациллярный – споры в клетке располагаются центрально (род *Bacillus*), клостридиальный – споры в клетке располагаются субтерминально (вид *Clostridium botulinum*), плектридиальный – споры в клетке располагаются терминально и со спорой может принимать форму веретена или теннисной ракетки (вид *Clostridium tetani*).

Споры освобождаются при лизисе спорангия. Зрелые споры не проявляют метаболической активности. Они чрезвычайно устойчивы к воздействию высокой температуры, разного рода излучений и химических агентов.

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

*Вопросы для самоконтроля:*

1. *Перечислите основные формы бактерий.*
2. *В чем отличие в строении и химическом составе клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий?*
3. *Какова роль мезосом в бактериальной клетке?*
4. *Назовите основные компоненты гетерогенной фракции протопласта прокариот?*
5. *Объясните механизмы передвижения прокариот.*
6. *Почему деление клетки прокариот называют прямым?*
7. *Составьте схему последовательности формирования эндоспоры.*

**4 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ**

* 1. **Накопительные и чистые культуры микроорганизмов**

Для выделения микроорганизмов из смешанных популяций, получаемых из природных источников, используют элективные (избирательные, накопительные) питательные среды.

Элективной питательной средой называется среда, которая по составу или способу приготовления пригодна для выращивания только отдельных видов или специфических групп микроорганизмов. На элективной питательной среде определенные микроорганизмы удается изолировать от многих сопутствующих. Получаемая **накопительная (элективная) культура** микроорганизмов состоит преимущественно из клеток одного вида или из клеток близких физиологических групп микроорганизмов.

Пересев микроорганизмов на стерильные питательные среды в лабораторной практике осуществляют для получения чистых культур, длительном хранении микроорганизмов, изучении их физиологии и т.д.

**Чистой культурой**считается выращенная масса клеток, состоящая из микроорганизмов, которые принадлежат одному виду и получены как потомство одной клетки. Микроорганизмы чистых культур широко используются в технологии производства многих пищевых продуктов (кисломолочные сыры, хлеб, вино, пиво, и т.д.).

При длительном хранении культур в лабораторных условиях могут измениться отдельные физиолого-ботанические или морфологические особенности микроорганизмов. Поэтому применяют традиционный метод хранения – пассирование, или субкультивирование – пересев на свежие среды с временными интервалами в зависимости от вида микроорганизма, среды и условий хранения.

Посев микроорганизмов на питательные среды может осуществляться следующими способами: в жидкую питательную среду; на плотную питательную среду (в пробирки со скошенным агаром или в чашки Петри); уколом в столбик питательной среды.

При посеве необходимо соблюдать обычные правила предосторожности против заражения среды посторонними микроорганизмами.

* 1. **Типы питательных сред и условия роста микроорганизмов**

Для культивирования микроорганизмов применяют **питательные среды**, которые являются одновременно и местом обитания микроорганизмов и источником питательных веществ.

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

Синтетические среды – это среды, в которые входят соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах. Они широко используются при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов.

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

По физическому состоянию различают жидкие, сыпучие, плотные питательные среды.

Жидкие среды применяют для накопления биомассы или продуктов обмена, для исследования физиологии и биохимии микроорганизмов.

Сыпучие среды применяют главным образом в промышленной микробиологии для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений. К таким средам относятся, например, разваренное пшено, отруби и др.

Плотные среды используют для выделения чистых культур, определения количества жизнеспособных микроорганизмов, хранения культур в коллекциях, для накопления биомассы. В целях уплотнения сред применяют гелеобразные вещества: агар (2*–*3 %), желатину (10*–*15 %) или силикагель (кремнекислый гель). Эти компоненты добавляют к жидким питательным средам, например, к мясопептонному бульону (МПБ), получая, таким образом, мясопептонный агар (МПА).

Агар представляет собой сложный полисахарид, в состав которого входят агароза и агаропектин. Агар получают из красных морских водорослей. Он удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. В воде он образует гель, который плавится примерно при температуре 100 °С и затвердевает при 40 °С. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать микроорганизмы при относительно высокой температуре.

Желатина – это экстракт, получаемый из субстратов, богатых коллагеном – белком костей, хрящей, сухожилий.

По назначению питательные среды подразделяют на элективные и дифференциально-диагностические.

Элективные среды предназначены для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания. Они обеспечивают преимущественное развитие определенной физиологической группы микроорганизмов.

Дифференциально-диагностические среды дают возможность быстро отличить одни виды микроорганизмов от других и выявить некоторые их особенности. Эти среды особенно широко применяются в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации микроорганизмов. Дифференциально-диагностические среды (среда Гисса, среда Эндо, среда Левина и др.) предназначаются для дифференцирования бактерий. Они содержат индикатор, меняющий свой цвет при изменении рН в результате расщепления ферментами углеводов питательных сред. Эти простые питательные среды применяют для выращивания многих бактерий. Сложные питательные среды включают дополнительные компоненты *–* сыворотку крови (сывороточный агар), кровь (кровяной агар), сахар (сахарный бульон) и т.д.

Питательные среды, применяемые для выращивания микроорганизмов, должны быть стерильными, содержать все необходимых для роста микроорганизмов компоненты, иметь оптимальные значения рН, окислительно-восстановительного потенциала, осмотического давления и т.д.

* 1. **Рост культур микроорганизмов**

Рост – это согласованное увеличение количества всех химических компонентов, формирующих клеточные структуры. Рост клеток обычно сопровождается увеличением их массы и размеров. Однако эта закономерность наблюдается не всегда, так как в некоторых условиях клетки способны просто накапливать запасные или резервные вещества, т. е. масса может увеличиваться, но роста при этом не наблюдается. В подходящей же среде, к которой бактерии полностью адаптированы, они находятся в состоянии **сбалансированного роста**. В период сбалансированного роста удвоение биомассы сопровождается удвоением всех других учитываемых параметров популяции, например количества белка, ДНК, РНК и внутриклеточной воды, т.е. сохраняют постоянный химический состав.

В условиях сбалансированного роста легко определить величину скорости роста бактериальной популяции в каждый момент времени, если измерить прирост любого компонента клетки по отношению к его исходному количеству. Таким образом, в культуре, растущей сбалансированно, скорость прироста вещества клеток в любой данный момент пропорциональна числу или массе имеющихся в это время бактерий. Коэффициент пропорциональности называют удельной скоростью роста *(v)*. Данная величина отличается для разных культур, и даже для одной культуры.

*µ=v/x*

где N - число клеток в единице объема, X - масса клеток в единице объема, t - время, |i - удельная скорость роста.

Зная удельную скорость роста, можно определить время генерации *(g)* (время, необходимое для удвоения числа клеток популяции):

Рост клеток в культуре ограничен количеством внесенного в питательную среду компонента, то между его начальной концентрацией и полученной биомассой клеток существует постоянная линейная зависимость (при условии ограничения роста только по одному параметру). Масса клеток, образованная на единицу использованного компонента среды, представляет собой величину, которую называют экономическим коэффициентом *(Y).*

*Y=* (X *– Х0)/* (So–S),

где *X* – масса сухого вещества клеток в 1 мл культуры, вступившей в стационарную фазу роста; *Х0* – масса сухого вещества клеток в 1 мл среды сразу после инокуляции среды; (X – *Х0)* – урожай бактериальной культуры (урожай зависит от количества и природы используемых питательных веществ, а также от условий культивирования); (So–S) – количество потребленного субстрата.

* 1. **Периодическое и непрерывное культивирование**

В лабораторных и промышленных условиях используют два основных способа культивирования микроорганизмов: периодическое (статическое) и непрерывное (проточное).

Рост бактерий в **периодической культуре** происходит до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых им компонентов питательной среды не достигнет минимума, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов метаболизма, то получается так называемая периодическая культура (популяция клеток в ограниченном жизненном прост

Зависимость концентрации жизнеспособных клеток при периодическом культивировании от длительности инкубирования описывается характерной кривой, которая имеет S-образную форму (рисунок 6). На кривой можно различить несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности: начальную (или лаг-) фазу; экспоненциальную, или логарифмическую, фазу; стационарную фазу; фазу отмирания.



Рисунок 6 – Кривая роста бактериальной популяции в статической культуре

1. начальную (или лаг-) фазу,
2. экспоненциальную или логарифмическую фазу,
3. стационарную фазу,
4. фазу отмирания.

Лаг-фаза, или фаза задержанного роста, охватывает промежуток времени между инокуляцией бактерий и достижением ими максимальной скорости деления. В клетках бактерий в этот период идут в основном процессы, связанные с приспособлением их к условиям культивирования (составу среды, температуре, pH и т.п.). Продолжительность фазы определяется начальными условиями культивирования вносимого посевного материала. Если источники энергии и углерода в новой среде отличаются от тех, которые были в предшествующей культуре, то для приспособления к новым условиям в клетке должен быть синтезирован набор ферментов, потребность в которых ранее отсутствовала. Во время лаг-фазы деления клеток не происходит, отмечаются лишь процессы, подготавливающие клетку к размножению. Лаг-фаза переходит в начальную фазу размножения, или фазу ускорения роста, когда клетки начинают делиться с постепенно увеличивающейся скоростью.

Фаза экспоненциального (логарифмического) роста характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток и скоростью роста. Во время экспонециальной фазы все клетки в популяции имеют приблизительно одинаковый размер, содержат максимальное количество РНК, количество белка в них также максимально и постоянно. Во время экспоненциальной фазы клетки наиболее жизнеспособны и обладают высокой биохимической активностью

Стационарная фаза наступает тогда, когда число жизнеспособных клеток достигает максимума и не увеличивается, так как скорость размножения бактерий равна скорости их отмирания. В связи с тем, что скорость роста определяется концентрацией субстрата, то еще до его полного использования начинает снижаться и скорость роста, поэтому переход от экспоненциальной фазы к стационарной происходит постепенно. Скорость роста может снижаться не только из-за недостатка субстрата, но и вследствие высокой плотности бактериальной популяции, при низком парциальном давлении кислорода или по причине накопления токсичных продуктов обмена. Переход в стационарную фазу включает период **несбалансированного роста**, когда компоненты клеток синтезируются с различными скоростями, соответственно и содержание отдельных химических веществ в клетках на разных стадиях отличает. Клетки в стационарной фазе меньше по размеру, содержат меньше РНК, более устойчивы к различного рода воздействиям (физическим и химическим), чем в экспоненциальной фазе роста культур. В этот период в клетках или в среде культивирования нередко накапливаются продукты вторичного метаболизма (антибиотики, пигменты, бактериоцины и др.). Продолжительность этой фазы может быть от нескольких часов до нескольких дней в зависимости от вида микроорганизма.

В фазе отмирания происходит экспоненциальное снижение числа живых клеток. Скорость отмирания бактерий существенно варьирует в зависимости от условий среды и физиологических особенностей организма. Причины отмирания клеток могут быть разными: накопление органических кислот, автолиз, накопление антибиотиков, бактериоцинов и т.п.

В условиях непрерывного (проточного) культивирования в сосуд, содержащий популяцию бактерий, подается свежая питательная среда и из него одновременно удаляется часть среды с клетками микроорганизмов. Это позволяет на длительное время задержать культуру в состоянии экспоненциального роста.

Проточное культивирование осуществляется в аппаратах (ферментерах) двух типов: хемостатах и турбидостатах. Хемостат состоит из сокультиватора, в который с заданной постоянной скоростью поступает питательная среда. Для равномерного и полного смешения питательных веществ содержимое культиватора механически перемешивается и аэрируется стерильным воздухом. Избыточная биомасса клеток с питательной средой вытекает из культиватора через сливной сифон. В хемостате прирост биомассы прямо пропорционален скорости притока субстрата и удаления продуктов метаболизма (рисунок 7).



Рисунок 7 – Схема простейшего хемостата

Турбидостат представляет собой ферментер, в котором поддерживается заданная плотность клеток за счет определения оптической плотности среды культивирования. Когда количество биомассы увеличивается относительно некоторого выбранного уровня, что фиксируется фотоэлементом, соединенным с системой реле, включается подача свежей питательной среды.

* 1. **Культивирование иммобилизированных клеток**

Культивирование иммобилизированных клеток микроорганизмовнаходит широкое применение в биотехнологии, а именно в производстве ценных органических веществ, в деградации токсичных природных и неприродных соединений, а также промышленных отходов, для очистки сточных вод от загрязнений. Методы иммобилизации клеток основаны на способности микроорганизмов к адсорбции на твердых поверхностях. Существуют два принципиально различных подхода к иммобилизации: с образованием ковалентной связи между клеткой и носителем (химические) и без образования ковалентной связи между клеткой и носителем (физические).

**Химические методы** иммобилизации предполагают образование ковалентной связи между какой-либо из функциональных групп на поверхности клетки микроорганизма и материалом носителя. Химические методы применяются сравнительно редко, так как клетки в этом состоянии могут терять нужную активность.

**Физические методы** иммобилизации реализуются в результате адсорбции микроорганизмов на поверхности различных нерастворимых синтетических или природных пористых материалов, при включении клеток в поры поперечносшитого геля и т. п. Например, при смешивании суспензии клеток с раствором полимера (полиакриламид, агароза и т.п.) с последующей полимеризацией образуется пространственная структура геля с включенными в его ячейки клетками микроорганизмов. В результате микроорганизмы оказываются заключенными в ячейки, которые ограничивают их перемещение, но не препятствуют поступлению питательных веществ и осуществлению каталитических реакций. Полимерный носитель с клетками сворачивают в рулон и помещают в колонку, через которую пропускают питательный раствор. В настоящее время разрабатываются методы иммобилизации клеток путем их включения в белковые мембраны с использованием коллагена, казеина, миозина и других белков или полипептидов. Мембраны с иммобилизованными клетки сохраняют высокую ферментативную активность, что позволяет использовать их в непрерывно действующих технологических процессах. При этом облегчается выделение продуктов биосинтеза.

*Вопросы для самоконтроля:*

1. *Какова последовательность получения чистой культуры микроорганизмов?*
2. *Какие вещества применяют для приготовления плотных питательных сред?*
3. *Охарактеризуйте способы культивирования микроорганизмов.*
4. *Назовите методы иммобилизации клеток микроорганизмов.*
5. *В каких целях применяют культивирование иммобилизированных клеток?*