



№ 5072

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное  
автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Южный федеральный университет»

**А.И. Забалуева, Н.К. Плуготаренко**

# **ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ**

Таганрог 2013

**УДК 576.8(075.8)+573.6(075.8)**

Рецензент В.В. Панова, канд.пед.наук, доцент кафедры естествознания ФГБОУ ВПО «Педагогический институт им.А.П.Чехова».

**Забалуева А.И., Плуготаренко Н.К.** Основы микробиологии и биотехнологии: Учебное пособие. – Таганрог: Изд-во ТТИ ЮФУ, 2013. – 51с.

Предназначено для студентов направления 280700 «Техносферная безопасность» и специальности 280201 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» всех форм обучения в соответствии с требованиями Государственных образовательных стандартов и может быть использовано студентами при изучении курсов: «Физиология человека», «Экотоксикология и физиология человека», «Медико-биологические основы безопасности», «Экология».

Ил. 5. Библиогр.: 4 назв.

© ТТИ ЮФУ, 2013  
© Забалуева А.И., 2013  
© Плуготаренко Н.К., 2013

## Содержание

<b>ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ МИКРОБИОЛОГИИ .....</b>	<b>3</b>
<b>ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ МИКРОБИОЛОГИИ.....</b>	<b>5</b>
<b>1. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....</b>	<b>6</b>
1.1. ФОРМА И РАЗМЕРЫ БАКТЕРИЙ.....	6
1.2. СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ .....	7
1.3. ПОДВИЖНОСТЬ БАКТЕРИЙ (ЖГУТИКИ).....	12
1.4. РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ .....	13
1.5. СПОРООБРАЗОВАНИЕ .....	14
<b>2. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....</b>	<b>16</b>
2.1. ПОНЯТИЕ ОБ ОБМЕНЕ ВЕЩЕСТВ .....	16
2.2. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ .....	17
2.3. ПИТАНИЕ БАКТЕРИЙ.....	19
<b>3. ВИРУСЫ И ФАГИ.....</b>	<b>21</b>
<b>4. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ.....</b>	<b>24</b>
<b>5. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ .....</b>	<b>34</b>
5.1. МИКРОФЛОРА ПОЧВЫ .....	34
5.2. МИКРОФЛОРА ВОДЫ.....	35
5.3. МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА.....	36
<b>6. ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ.....</b>	<b>37</b>
6.1. ПОНЯТИЕ О БИОТЕХНОЛОГИИ, ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....	37
6.2. КРАТКАЯ ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ .....	40
6.3. МИКРООРГАНИЗМЫ, КЛЕТКИ И ПРОЦЕССЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ.....	41
6.4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И ОБЛАСТЬ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ.....	46
<b>БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....</b>	<b>49</b>

## ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ МИКРОБИОЛОГИИ

Микробиология (от греч. *mikros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – учение) является одной из биологических наук. Она изучает строение, жизнедеятельность, закономерности и условия развития организмов, большинство которых можно видеть только с помощью оптического микроскопа. Размеры многих из них настолько малы, что в капле воды их могут быть миллионы. Эти организмы называют микроорганизмами, или микробами.

Многие микроорганизмы одноклеточные, но имеются и многоклеточные.

Микроорганизмы широко распространены в природе – в почве, воде и воздухе всех климатических зон. Множество различных микробов живет на поверхности тела и в кишечнике животных и людей, на растениях, на окружающих нас предметах и пищевых продуктах. Они активно участвуют в различных превращениях веществ в природе. Реакции, осуществляемые ими, превосходят чисто химические по специфичности и эффективности.

Велико значение микроорганизмов в жизни нашей планеты. С их жизнедеятельностью связано образование каменного угля, нефти, некоторых руд, торфа. Они играют большую роль в почвообразовательных процессах, способствуя повышению урожайности сельскохозяйственных культур.

Большое значение они имеют и в хозяйственно-технической деятельности человека. На жизнедеятельности различных микроорганизмов основано промышленное производство органических кислот (молочной, масляной, лимонной и др.), ацетона, бутилового и этилового спиртов. Микроорганизмы используют в производстве витаминов, аминокислот, ферментных препаратов и антибиотиков. Многие микроорганизмы с давних пор применяют в пищевой и легкой промышленности, а также в домашнем хозяйстве. С помощью дрожжей, например, получают вина, пиво, тесто для хлеба. Молочнокислые бактерии используют в производстве различных кисломолочных продуктов, они же участвуют в процессах созревания сыров и квашения овощей.

Задачи современной микробиологии настолько разнообразны и специфичны, что из нее выделился ряд специализированных дисциплин — медицинская, ветеринарная, сельскохозяйственная и техническая (промышленная) микробиология. Техническая

микробиология изучает роль и значение хозяйственно-полезных микроорганизмов, используемых в различных производственных процессах, и тех, которые причиняют вред, а также способы воздействия на их развитие и жизнедеятельность. В последние годы возникла космическая микробиология, изучающая биологическое воздействие космической радиации, а также проблему жизни в космосе и на других планетах.

## **ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ МИКРОБИОЛОГИИ**

Микробиология – наука, изучающая строение, жизнедеятельность и экологию микроорганизмов – мельчайших форм жизни растительного или животного происхождения, невидимых невооруженным глазом. Микробиология изучает всех представителей микромира (бактерии, грибы, простейшие, вирусы). Для изучения микроорганизмов она использует методы других наук, прежде всего физики, биологии, биоорганической химии, молекулярной биологии, генетики, цитологии, иммунологии.

Как и всякая наука, микробиология подразделяется на общую и частную. Общая микробиология изучает закономерности строения и жизнедеятельности микроорганизмов на всех уровнях (молекулярном, клеточном, популяционном), генетику и взаимоотношения их с окружающей средой. Предметом изучения частной микробиологии являются отдельные представители микромира в зависимости от проявления и влияния их на окружающую среду, живую природу, в том числе человека. К частным разделам микробиологии относятся: медицинская, ветеринарная, сельскохозяйственная, техническая (раздел биотехнология), морская, космическая микробиология.

Медицинская микробиология изучает патогенные для человека микроорганизмы: бактерии, вирусы, грибы, простейшие.

Морская и космическая микробиологии изучают соответственно микрофлору морей и водоемов и космического пространства других планет.

Техническая микробиология, являющаяся частью биотехнологии, разрабатывает технологию получения из микроорганизмов разнообразных продуктов для народного хозяйства и медицины (антибиотики, вакцины, ферменты, белки, витамины). Основа современной биотехнологии – генетическая инженерия.

# 1. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Основными группами микроорганизмов являются бактерии и близкие к ним формы, грибы (включая дрожжи), водоросли, простейшие (простейшие животные), вирусы.

Бактерии представляют обширную группу мельчайших и в большинстве одноклеточных организмов.

## 1.1. Форма и размеры бактерий

Основными формами бактерий являются шаровидная, палочковидная и извитая (рис.1).

**Шаровидные бактерии** – кокки – в большинстве имеют обычно форму шара, но встречаются и уплощенные, слабо овальной или бобовидной формы. Кокки могут быть в виде клеток одиночных (микрочкокки) или соединенных в различных сочетаниях: попарно – диплококки, по четыре – тетракокки, в виде более или менее длинных цепочек – стрептококки, скоплений кубической формы из восьми клеток, расположенных в два яруса один над другим, – сарцины. Встречаются также скопления неправильной формы, напоминающие грозди винограда – стафилококки.

**Палочковидные (цилиндрические) бактерии** могут быть одиночными, соединенными попарно (диплобактерии) или цепочками по три-четыре и более клеток (стрептобактерии). Соотношения между длиной и толщиной палочек бывают самыми различными.

**Извитые, или изогнутые, бактерии** различаются по длине, толщине и степени изогнутости. Палочки, слегка изогнутые в виде запятой, называют вибрионами, палочки с одним или несколькими завитками (в виде штопора) – спириллами.

Размеры бактерий очень малы – от десятых долей микрона до нескольких микрон (мкм). В среднем диаметр тела большинства бактерий 0,5–1 мкм, а средняя длина палочковидных бактерий 1–5 мкм. Встречаются бактерии, размеры которых значительно превышают среднюю величину; имеются и такие, величина которых находится на грани видимости в обычные оптические микроскопы (0,1–0,2 мкм).

Масса (вес) бактериальной клетки также очень мала – приблизительно  $4 \cdot 10^{-13}$  г.

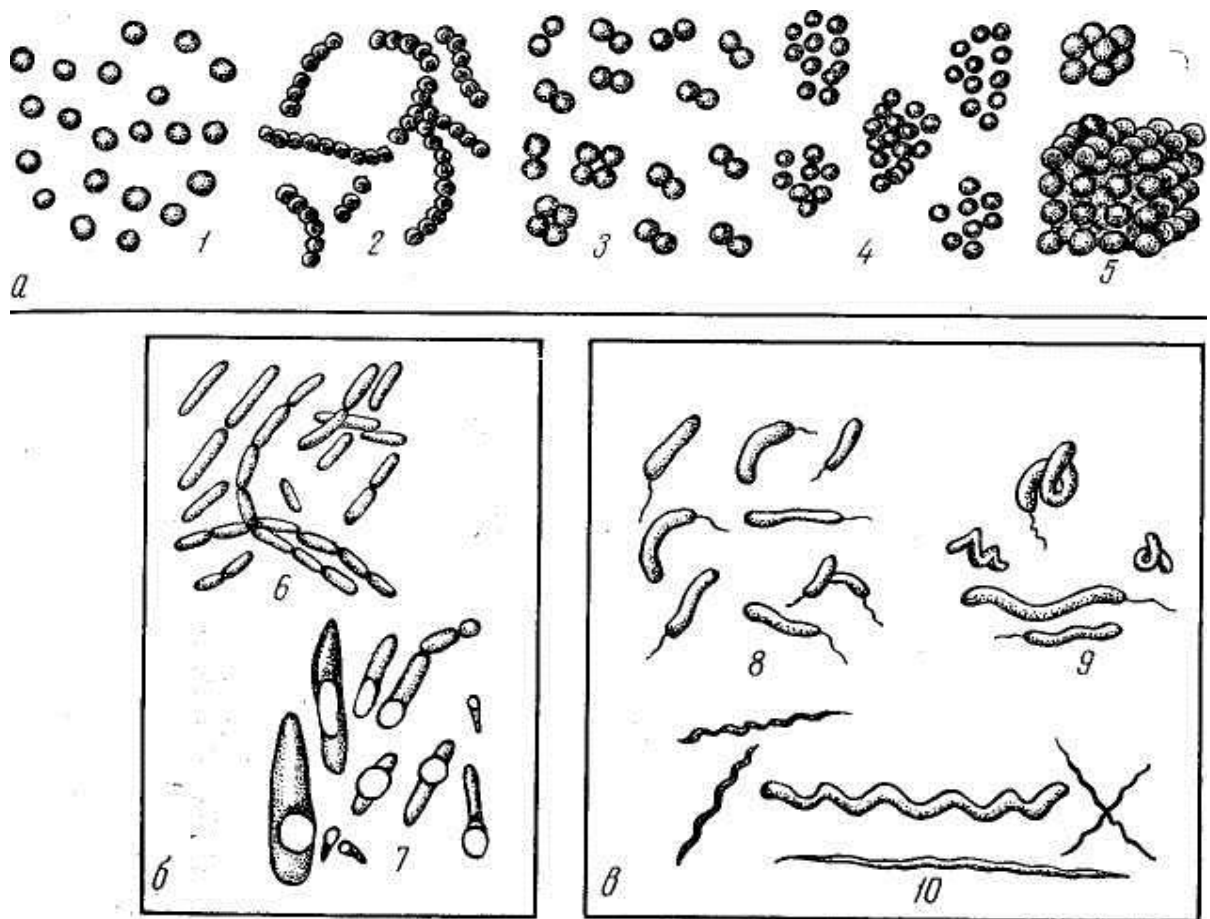


Рис.1. Формы бактерий: *a* – шаровидных: 1 – микрококки, 2 – стрептококки; 3 – диплококки и тетракокки; 4 – стафилококки; 5 – сарцины; *б* – палочковидных: 6 – палочки без спор; 7 – палочки со спорами; *в* – извитых: 8 – вибрионы; 9 – спираиллы; 10 – спирохеты

Форма тела бактерий, как и их размеры, может изменяться под влиянием условий развития. Однако при определенных и относительно стабильных условиях бактерии сохраняют присущие данному виду свойства (размеры, форма), приобретенные ими в процессе эволюции.

## 1.2. Строение бактериальной клетки

Несмотря на внешнюю простоту, бактерии являются сложными организмами. Клетки бактерий состоят из протопласта и оболочки.

Основными структурными бактериальной клетки являются: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма с включениями и ядро, называемое нуклеоидом. Бактерии могут иметь

и дополнительные структуры: капсулу, микрокапсулу, слизь, жгутики. Многие бактерии способны образовывать споры.

**Клеточная стенка** – прочная, упругая структура, придающая бактерии определенную форму и сдерживающая высокое осмотическое давление в стенке. Она участвует в процессе деления клетки и транспорте метаболитов. В клеточной стенке бактерий содержится небольшое количество полисахаридов, липидов и белков. Клеточная стенка бактерий выполняет ряд функций: она является наружным барьером клетки, устанавливающим контакт микроорганизма со средой; обладая высокой степенью прочности, выдерживает внутреннее давление протопласта в гипотоническом растворе.

**Цитоплазматическая мембрана** является трехслойной структурой и окружает наружную часть цитоплазмы бактерий. Она является обязательным полифункциональным структурным элементом клетки. Цитоплазматическая мембрана составляет 8 – 15 % сухой массы клетки. Она участвует в регуляции осмотического давления, транспорте веществ и энергетическом метаболизме клетки (за счет ферментов цепи переноса электронов, АТФ и др.). На мембране локализованы окислительные ферменты и ферменты транспорта электронов. Химический состав цитоплазматической мембраны представлен белково-липидным комплексом, в котором на долю белков приходится 50 – 70 %, липидов – 15 – 50 %. В цитоплазматической мембране некоторых бактерий обнаружено незначительное количество углеводов. Главным липидным компонентом мембраны являются фосфолипиды. Белковая фракция цитоплазматической мембраны представлена структурными белками, обладающими ферментативной активностью.

К строению цитоплазматической мембраны бактерий относится жидкостно-мозаичная модель мембран. По этой модели мембрана образована текучим биослоем липидов, в который включены ассиметрично расположенные белковые молекулы.

**Цитоплазма** бактерий занимает основной объем клетки и состоит из растворимых белков. Цитоплазма представлена структурными элементами: рибосомами, включениями и нуклеоидом. Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70S. Диаметр рибосом составляет 15 – 20 нм. Число рибосом в бактериальной клетке может быть разным. Так, в быстрорастущей клетке *Escherichia coli* насчитывается около 15 000 рибосом. Процесс биосинтеза белка в



клетке осуществляется полисомами. Иногда в полисоме насчитывается несколько десятков рибосом.

**Нуклеоид** (образование, подобное ядру) – эквивалент ядра у бактерий. Нуклеоид расположен в центральной зоне бактерий в виде двунитчатой ДНК, замкнутой в кольцо и плотно уложенной наподобие клубка. В отличие от эукариот ядро бактерий не имеет ядерной оболочки, ядрышка и основных белков. Часто в бактериальной клетке содержится одна хромосома, представленная замкнутой в кольцо молекулой ДНК. Нуклеоид выявляется в световом микроскопе после окраски ДНК по методам Фельгена или Гимзе.

Некоторые бактерии (пневмококки и др.) образуют **капсулу** – слизистое образование, прочно связанное с клеточной стенкой, имеющее четко очерченные внешние границы. В чистых культурах бактерий капсула образуется реже. Выявляется при специальных методах окраски, создающих негативное контрастирование вещества капсулы. Капсула состоит из полисахаридов, иногда полипептидов. Капсула гидрофильна, препятствует фагоцитозу бактерий. Многие бактерии образуют микрокапсулу – слизистое образование, выявляемое при электронной микроскопии.

Основная функция капсулы – защитная. Она предохраняет клетку от действия различного рода неблагоприятных факторов внешней среды. У многих бактерий капсула снаружи покрыта слизью. У почвенных микроорганизмов в условиях жаркого засушливого климата слизистый слой предохраняет клетку от высыхания.

В протопласте различают цитоплазму, ядроподобные образования и различные включения.

Цитоплазма (протоплазма) имеет очень сложный, изменяющийся химический состав. Основными химическими соединениями цитоплазмы являются белки, нуклеиновые кислоты, липиды; содержится большое количество воды.

Прилегающий к оболочке тонкий поверхностный слой цитоплазмы, более плотный, чем остальная ее масса, называется цитоплазматической мембраной (рис. 2). Она обладает полупроницаемостью и выполняет важную роль в обмене веществ между клеткой и окружающей средой. Цитоплазматическая мембрана состоит из трех слоев: одного липидного и двух, примыкающих к нему с обеих сторон, белковых. Она содержит 60 – 65 % белка и 35 – 40 % липидов; в ней локализованы многие ферменты.

Современные методы исследований с помощью электронного микроскопа показали, что цитоплазма негомогенна. Помимо бесструктурной полужидкой, вязкой массы, находящейся в коллоидном состоянии, она местами пронизана мембранами; в ней находятся различные по форме и величине микроскопические структурно оформленные частички. Это рассеянные в цитоплазме в виде мелких зернышек богатые рибонуклеиновой кислотой (РНК) рибосомы. Они состоят примерно на 60 % из РНК и на 40 % из белка. В одной бактериальной клетке содержатся тысячи и десятки тысяч рибосом; в них осуществляется синтез белков клетки.

Кроме рибосом обнаружены особые, различной формы мембранные (пластинчатые) структуры, называемые мезосомами. Они образуются путем ответвления и впячивания в полость клетки цитоплазматической мембраны. В мезосомах происходят процессы окисления органических веществ, являющихся источником энергии; здесь синтезируются вещества с большим запасом энергии, например аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Мезосомы бактерий, таким образом, являются аналогами митохондрий других организмов (дрожжей, растений, животных).

Помимо этих образований, где протекают важнейшие процессы обмена веществ клетки, в цитоплазме также содержатся разнообразные включения, являющиеся запасными питательными веществами: крупинки гликогена (крахмалоподобного вещества), капли жира, гранулы волютина (метахроматин), состоящие преимущественно из полифосфатов и др. В клетках некоторых бактерий находятся красящие вещества – пигменты.

Ядро, морфологически оформленное и типичное для клеток других организмов (эукариотов), у бактерий отсутствует.

Современные методы исследований позволили выявить в клетках истинных бактерий сходные с ядром образования, которые называют нуклеоидами. Однако сконцентрированное в определенных местах клетки (чаще в центре) ядерное вещество не отграничено от цитоплазмы мембраной, и форма этих ядроподобных структур непостоянна.

Бактерии и близкие к ним организмы (спирохеты, микоплазмы, актиномицеты) как не имеющие истинного ядра называют прокариотами (доядерными организмами).

Оболочка клеток бактерий, которую нередко называют клеточной стенкой, плотная, обладает известной упругостью и эластичностью.

Она обуславливает относительное постоянство формы клетки, служит защитой от неблагоприятных внешних воздействий и участвует в обмене веществ клетки. Оболочка проницаема для воды и низкомолекулярных веществ. В электронном микроскопе она легко отличима от цитоплазмы, имеет слоистое строение.

Химический состав оболочки довольно сложный и неоднородный у разных бактерий; опорным ее каркасом является сложный полисахарид-пептид, называемый муреином (от лат. *murus* – стенка). Кроме муреина имеются и другие компоненты: липиды, полипептиды, полисахариды, тейховые кислоты, аминокислоты, в частности диаминопимелиновая, которая отсутствует у других организмов. Соотношение этих веществ в оболочках клеток разных бактерий значительно варьирует.

Различие в химическом составе клеточных оболочек бактерий сказывается на их способности окрашиваться по методу Грама. По этому признаку различают бактерии грамположительные (окрашивающиеся) и грамотрицательные (не окрашивающиеся). В оболочках грамположительных бактерий содержится больше полисахаридов, муреина и тейховых кислот. Оболочки грамотрицательных бактерий имеют многослойную структуру, в них высокое содержание липидов в виде липопротеидов и липополисахаридов.

Оболочка у некоторых бактерий может ослизняться. Слизистый слой, окружающий оболочку, бывает очень тонким и приближается к пределу видимости под обычным световым микроскопом. Он может достигнуть и значительной толщины, образуя так называемую капсулу. Нередко размер капсулы намного превышает величину бактериальной клетки. Ослизнение оболочек иногда бывает настолько сильным, что капсулы отдельных клеток сливаются в слизистые массы, в которые вкраплены бактериальные клетки (зооглеи). Продуцируемые некоторыми бактериями слизистые вещества не удерживаются в виде компактной массы вокруг клеточной оболочки, а диффундируют в окружающую среду.

Химический состав слизей различен у отдельных видов, но может быть и одинаковым. Большое значение имеет состав питательной среды, на которой развиваются бактерии. В составе бактериальных слизей обнаружены различные полисахариды (декстраны, глюканы, леваны), а также азотсодержащие вещества (типа полипептидов, протеин-полисахариды и др.).

Интенсивность слизиобразования в значительной мере зависит от условий внешней среды. У многих бактерий слизиобразование стимулируется, например, культивированием при низких температурах. Слизеобразующие бактерии при быстром размножении в жидких субстратах могут превратить их в сплошную слизистую массу. Подобное явление, причиняющее значительные убытки, наблюдается иногда при производстве сахара в сахаристых экстрактах из свеклы. Возбудителем этого порока является бактерия лейконосток (*Leuconostoc mesenteroides*). За короткое время сахарный сироп может превратиться в тягучую слизистую массу. Ослизнению подвергаются мясо, колбасы, творог; тягучими могут быть молоко, рассолы квашеных овощей, пиво, вино.

### **1.3. Подвижность бактерий (жгутики)**

Шаровидные бактерии, за редким исключением, не способны к передвижению. Среди палочковидных бактерий имеются подвижные и неподвижные формы. Изогнутые бактерии все подвижны.

Движение бактерий осуществляется обычно с помощью жгутиков, которые представляют собой спирально закрученные, тонкие белковой природы нити, способные сокращаться. Каждая нить, в свою очередь, состоит из нескольких тонких волоконцев, скрученных вместе. Жгутики некоторых бактерий достигают значительной длины, превосходящей в десятки раз и более длину клетки, но у большинства их длина 5 – 10 мкм, а толщина 0,01 – 0,03 мкм, т. е. ниже разрешающей способности светового микроскопа. Благодаря этому увидеть их можно только после специальных методов обработки или в электронный микроскоп.

Жгутики располагаются на поверхности тела бактерий либо поодиночке (монотрихальное жгутование), либо пучком (лофотрихальное жгутование) на одном или обоих концах клетки; они могут также находиться на всей поверхности клетки (перитрихальное жгутование) (рис. 2).

Характер и скорость движения неодинаковы у отдельных видов бактерий. Подвижность бактерий может быть утрачена под влиянием неблагоприятных условий жизни, при старении клеток. Жгутики легко отрываются при механических воздействиях.

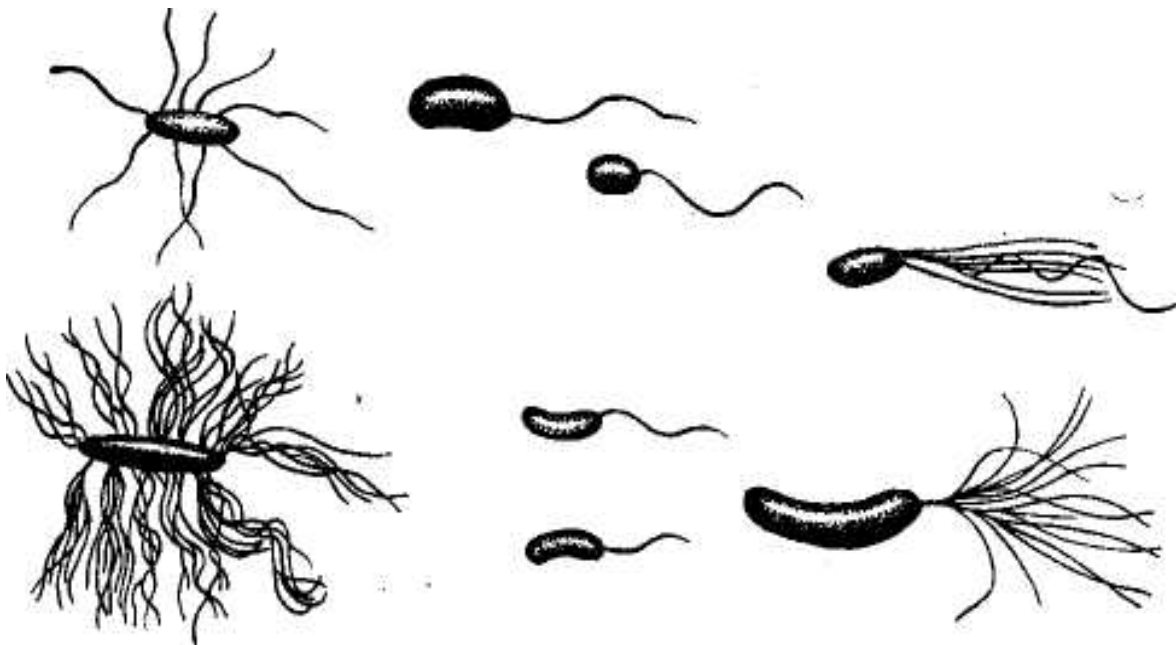


Рис. 2. Жгутики бактерий

#### 1.4. Размножение бактерий

Размножаются бактерии обычно путем деления клетки пополам. При этом в средней части клетки путем кольцевидного врастания оболочки образуется перегородка, которая, расщепляясь, разделяет клетку на две новые. Перегородка может возникнуть и не в центре клетки, и новые клетки получаются неодинакового размера. Делению клетки предшествуют значительные изменения в ней – перегруппировка содержимого, ядерной субстанции, включений и др.

У шаровидных бактерий перегородка может проходить по любому из диаметров клетки. Если при делении кокков перегородка последовательно располагается в одной плоскости (параллельно предыдущей) и клетки не разъединяются, то образуются различной длины цепочки из кокков (стрептококки). Когда кокки делятся последовательно в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются сrostки из восьми клеток в виде пакетов (сарцины), а при последовательном делении в различных плоскостях возникают беспорядочные скопления клеток. У некоторых бактерий эти скопления сходны с гроздьями винограда (стафилококки).

Палочковидные и извитые формы образуют перегородку перпендикулярно их длинной оси.

К характерным особенностям бактерий относится способность

чрезвычайно быстро размножаться: при благоприятных условиях жизни через каждые 20 – 30 мин количество их может удваиваться. При таком интенсивном размножении число поколений одной клетки в течение суток будет около 60, и число клеток достигнет огромных величин. Проявление этой особенности бактерий наблюдается часто. Так, быстрое прокисание оставленного в теплом месте молока происходит в результате массового размножения кислотообразующих бактерий. Очень быстро портятся вследствие размножения гнилостных бактерий мясные, рыбные и другие продукты.

На скорость размножения бактерий влияет состав питательной среды, температура и другие условия жизни.

### **1.5. Спорообразование**

Спорообразование происходит почти исключительно у палочковидных бактерий. В клетке бактерий образуется только одна спора. Спорообразование у бактерий не следует рассматривать как способ размножения. Споры – это покоящиеся клетки, обладающие устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, служащие для сохранения вида. Спорообразование – процесс сложный и полностью еще не изученный. Он обычно наступает при обеднении среды питательными веществами или при накоплении в ней продуктов обмена. Перед спорообразованием в клетке накапливаются запасные питательные вещества (белки, липиды), образуется специфическое для спор вещество – дипиколиновая кислота (в вегетативных клетках она отсутствует). Эта кислота в виде кальциевой соли входит в состав оболочки зрелой споры.

Спора развивается из части протопласта (цитоплазмы с ядерным материалом) материнской вегетативной клетки. По мере развития и созревания споры закладываются ее оболочки, число и толщина которых варьируют у разных бактерий. Оболочки составляют значительную часть споры. Поверхность наружной оболочки может быть гладкой либо с выростами, с выступами. Процесс образования споры происходит в течение нескольких часов.

Обычно споры имеют круглую или овальную форму. Они располагаются в центре клетки, ближе к концу (субтерминально) и на самом конце (терминально). У одних видов бактерий расположение спор строго определенное, у других – строгой локализации не наблюдается.

Диаметр спор некоторых бактерий превышает ширину клетки, вследствие чего форма спорносящих клеток изменяется. Клетка приобретает форму веретена (кlostридиум), если спора расположена в ее центре, или форму барабанной палочки (плектридиум), когда спора находится на конце клетки.

После созревания споры материнская вегетативная клетка отмирает, оболочка ее разрушается и спора высвобождается. Зрелые споры под микроскопом имеют вид плотных блестящих телец, так как отличаются от вегетативных клеток большим светопреломлением. При обычном окрашивании бактерий споры не окрашиваются, потому что их оболочки малопроницаемы для краски.

Плотная оболочка, малое содержание свободной воды, наличие дипиколиновой кислоты создают большую устойчивость спор к физико-химическим воздействиям. Так, споры некоторых бактерий выдерживают кипячение в течение нескольких часов, могут длительное время сохраняться (десятки и сотни лет) в сухом состоянии, они значительно более стойки, чем вегетативные клетки, по отношению к действию химических ядов, радиации и других факторов внешней среды.

В благоприятных условиях споры прорастают в вегетативные клетки. При этом они набухают вследствие поглощения воды, активизируются их ферменты, усиливаются биохимические процессы, приводящие к росту. Затем происходит растворение или разрыв внешней оболочки, и через образовавшееся отверстие проросток (молодая бактериальная клетка) выходит наружу.

Скорость прорастания спор зависит от условий внешней среды; прорастание обычно длится несколько часов. Спорообразующие бактерии аэробные и факультативно-анаэробные называют бациллами, анаэробные – кlostридиями. Спорообразующие бактерии могут терять способность к спорообразованию и переходить в так называемые аспорогенные формы.

Помимо описанных истинных бактерий имеются и другие более или менее отличающиеся от них. Это нитчатые бактерии, слизистые (миксобактерии), спирохеты, актиномицеты, риккетсии, микоплазмы.

## 2. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Физиология микроорганизмов изучает жизнедеятельность микробных клеток, процессы их питания, дыхания, роста, размножения, закономерности взаимодействия с окружающей средой.

### 2.1. Понятие об обмене веществ

Процессы роста, развития, размножения организма сопровождаются значительным расходом энергии и различных веществ. Эти расходы восполняются за счет пищи, поступающей в организм из внешней среды. При этом организм выделяет во внешнюю среду различные продукты своей жизнедеятельности.

Обмен веществ с окружающей средой – неотъемлемое свойство живого существа. «Жизнь есть способ существования белковых тел, существенным моментом которого является *постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой*, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь, что приводит к разложению белка».

В живом теле сотни тысяч химических реакций, составляющих в совокупности обмен веществ (метаболизм), протекают в определенной последовательности. Они согласованы между собой и гармонично сочетаются. В результате этих реакций происходит рост организма, его самообновление и развитие.

Неживое тело в процессе обмена с внешней средой разрушается. Чем лучше неживое тело будет изолировано от внешней среды, тем дольше оно сохранится.

Основными процессами обмена веществ организма являются питание и дыхание.

Процесс питания организма состоит из поступления и усвоения пищи (ассимиляция). Поступившие извне вещества, нередко далекие по химической природе от веществ организма, подвергаются сложной переработке. Питательные вещества сначала расщепляются на более простые (распад, или катаболизм) и из этих разнообразных низкомолекулярных соединений синтезируются сложные клеточные вещества (анаболизм), свойственные данному организму. Это так



называемый строительный, или конструктивный, обмен.

Дыхание организма состоит из процессов расщепления и окисления органических веществ (диссимиляция), которые сопровождаются освобождением энергии, необходимой для жизни и осуществления синтетических процессов. Это энергетический обмен.

Поступившая в клетку пища, таким образом, расходуется по двум основным направлениям: часть ее используется в биосинтезе веществ тела, а часть – расходуется в процессах, обеспечивающих организм энергией. Одно и то же вещество может служить и источником энергии, и строительным материалом, но нередко в реакциях конструктивного и энергетического обмена используются разные вещества.

Оба эти прямо противоположные процессы – питание и дыхание, представляющие собой сложный комплекс разнообразных превращений веществ и энергии, находятся в тесной взаимосвязи и взаимозависимости. Они неотделимы один от другого, обуславливают рост, развитие и размножение организма. В этом проявляется один из законов диалектики – закон развития как борьба противоположностей. Многие промежуточные продукты процессов диссимиляции используются в реакциях процессов ассимиляции. Конечные продукты обмена веществ выделяются во внешнюю среду. Значительное накопление их в среде неблагоприятно для организма.

Особенностью микроорганизмов является необычайно интенсивный обмен веществ. За сутки при благоприятных условиях одна клетка потребляет пищи (по массе) в 30 – 40 раз больше массы своего тела. Основная часть пищи расходуется в энергетическом обмене, при котором выделяется в среду большое количество продуктов обмена (кислот, спиртов, углекислого газа и др.). Эта способность микроорганизмов широко используется в практике переработки растительного и животного пищевого и непищевого сырья. Кроме того, она объясняет многие вопросы, связанные с порчей пищевых продуктов.

## **2.2. Химический состав бактерий**

В состав микроорганизмов входят вода, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, минеральные вещества.

Вода – основной компонент бактериальной клетки,

составляющий около 80 % ее массы. Она находится в свободном или связанном состоянии со структурными элементами клетки. В спорах количество воды уменьшается до 18 – 20 %. Вода является растворителем для многих веществ, а также выполняет механическую роль в обеспечении тургора. При плазмолизе – потере клеткой воды в гипертоническом растворе – происходит отслоение протоплазмы от клеточной оболочки. Удаление воды из клетки, высушивание приостанавливают процессы метаболизма. Большинство микроорганизмов хорошо переносят высушивание. При недостатке воды микроорганизмы не размножаются. Высушивание в вакууме из замороженного состояния (лиофилизация) прекращает размножение и способствует длительному сохранению микробных особей.

Белки (40 – 80 % сухой массы) определяют важнейшие биологические свойства бактерий и состоят обычно из сочетаний 20 аминокислот. В состав бактерий входит диаминопимелиновая кислота (ДАП), отсутствующая в клетках человека и животных. Бактерии содержат более 2000 различных белков, находящихся в структурных компонентах и участвующих в процессах метаболизма. Большая часть белков обладает ферментативной активностью. Белки бактериальной клетки обуславливают антигенность и иммуногенность, вирулентность, видовую принадлежность бактерий.

Нуклеиновые кислоты бактерий выполняют функции, аналогичные нуклеиновым кислотам эукариотических клеток: молекула ДНК в виде хромосомы отвечает за наследственность, рибонуклеиновые кислоты (информационная, или матричная, транспортная и рибосомная) участвуют в биосинтезе белка.

Бактерии можно характеризовать (таксономически) по содержанию суммы гуанина и цитозина (ГЦ) в молярных процентах (М %) от общего количества оснований ДНК. Более точной характеристикой микроорганизмов является гибридизация их ДНК. Основа метода гибридизации ДНК — способность денатурированной (однонитчатой) ДНК ренатурироваться, т.е. соединяться с комплементарной нитью ДНК и образовывать двухцепочечную молекулу ДНК.

Углеводы бактерий представлены простыми веществами (моно- и дисахариды) и комплексными соединениями. Полисахариды часто входят в состав капсул. Некоторые внутриклеточные полисахариды (крахмал, гликоген и др.) являются запасными питательными веществами.

Липиды в основном входят в состав цитоплазматической мембраны и ее производных, а также клеточной стенки бактерий, например наружной мембраны, где, кроме биомолекулярного слоя липидов, имеется ЛПС. Липиды могут выполнять в цитоплазме роль запасных питательных веществ. Липиды бактерий представлены фосфолипидами, жирными кислотами и глицеридами. Наибольшее количество липидов (до 40 %) содержат микобактерии туберкулеза.

Минеральные вещества бактерий обнаруживают в золе после сжигания клеток. В большом количестве выявляются фосфор, калий, натрий, сера, железо, кальций, магний, а также микроэлементы (цинк, медь, кобальт, барий, марганец и др.). Они участвуют в регуляции осмотического давления, рН среды, окислительно-восстановительного потенциала, активируют ферменты, входят в состав ферментов, витаминов и структурных компонентов микробной клетки.

### 2.3. Питание бактерий

Особенности питания бактериальной клетки состоят в поступлении питательных субстратов внутрь через всю ее поверхность, а также в высокой скорости процессов метаболизма и адаптации к меняющимся условиям окружающей среды.

**Типы питания.** Широкому распространению бактерий способствует разнообразие типов питания. Микроорганизмы нуждаются в углеводе, азоте, сере, фосфоре, калии и других элементах. В зависимости от источников углерода для питания бактерии делятся на ауотрофы (от греч. *autos* – сам, *trophe* – пища), использующие для построения своих клеток диоксид углерода  $\text{CO}_2$  и другие неорганические соединения, и гетеротрофы (от греч. *heteros* – другой, *trophe* – пища), питающиеся за счет готовых органических соединений. Ауотрофными бактериями являются нитрифицирующие бактерии, находящиеся в почве; серобактерии, обитающие в воде с сероводородом; железобактерии, живущие в воде с закисным железом, и др.

Гетеротрофы, утилизирующие органические остатки отмерших организмов в окружающей среде, называются сапрофитами. Гетеротрофы, вызывающие заболевания у человека или животных, относят к патогенным и условно-патогенным. Среди патогенных микроорганизмов встречаются облигатные и факультативные паразиты (от греч. *parasitos* – нахлебник). Облигатные паразиты

способны существовать только внутри клетки, например риккетсии, вирусы и некоторые простейшие.

В зависимости от окисляемого субстрата, называемого донором электронов или водорода, микроорганизмы делят на две группы. Микроорганизмы, использующие в качестве доноров водорода неорганические соединения, называют литотрофными (от греч. *lithos* – камень), а микроорганизмы, использующие в качестве доноров водорода органические соединения, – органотрофами.

Учитывая источник энергии, среди бактерий различают фототрофы, т.е. фотосинтезирующие (например, сине-зеленые водоросли, использующие энергию света), и хемотрофы, нуждающиеся в химических источниках энергии.

**Факторы роста.** Микроорганизмам для роста на питательных средах необходимы определенные дополнительные компоненты, которые получили название факторов роста. Факторы роста – необходимые для микроорганизмов соединения, которые они сами синтезировать не могут, поэтому их необходимо добавлять в питательные среды. Среди факторов роста различают: аминокислоты, необходимые для построения белков; пурины и пиримидины, которые требуются для образования нуклеиновых кислот; витамины, входящие в состав некоторых ферментов. Для обозначения отношения микроорганизмов к факторам роста используют термины «ауксотрофы» и «прототрофы». Ауксотрофы нуждаются в одном или нескольких факторах роста, прототрофы могут сами синтезировать необходимые для роста соединения. Они способны синтезировать компоненты из глюкозы и солей аммония.

**Механизмы питания.** Поступление различных веществ в бактериальную клетку зависит от величины и растворимости их молекул в липидах или воде, рН среды, концентрации веществ, различных факторов проницаемости мембран и др. Клеточная стенка пропускает небольшие молекулы и ионы, задерживая макромолекулы массой более 600 Д. Основным регулятором поступления веществ в клетку является цитоплазматическая мембрана. Условно можно выделить четыре механизма проникновения питательных веществ в бактериальную клетку: это простая диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт, транслокация групп.

Наиболее простой механизм поступления веществ в клетку – простая диффузия, при которой перемещение веществ происходит

вследствие разницы их концентрации по обе стороны цитоплазматической мембраны. Вещества проходят через липидную часть цитоплазматической мембраны (органические молекулы, лекарственные препараты) и реже по заполненным водой каналам в цитоплазматической мембране. Пассивная диффузия осуществляется без затраты энергии.

Облегченная диффузия происходит также в результате разницы концентрации веществ по обе стороны цитоплазматической мембраны. Однако этот процесс осуществляется с помощью молекул-переносчиков, локализующихся в цитоплазматической мембране и обладающих специфичностью. Каждый переносчик транспортирует через мембрану соответствующее вещество или передает его другому компоненту цитоплазматической мембраны – собственно переносчику. Белками-переносчиками могут быть пермеазы, место синтеза которых – цитоплазматическая мембрана. Облегченная диффузия протекает без затраты энергии, вещества перемещаются от более высокой концентрации к более низкой.

Активный транспорт происходит с помощью пермеаз и направлен на перенос веществ от меньшей концентрации в сторону большей, т.е. как бы против течения, поэтому данный процесс сопровождается затратой метаболической энергии (АТФ), образующейся в результате окислительно-восстановительных реакций в клетке.

Перенос (транслокация) групп сходен с активным транспортом, отличаясь тем, что переносимая молекула видоизменяется в процессе переноса, например фосфорилируется.

Выход веществ из клетки осуществляется за счет диффузии и при участии транспортных систем.

### 3. ВИРУСЫ И ФАГИ

**Вирусы** – это особая группа организмов, значительно меньших размеров и более простого строения, чем бактерии. Они не имеют клеточной структуры (нет ядра, цитоплазмы, оболочки), а величина их измеряется миллимикронами (нм)<sup>2</sup>.

Вирусы невидимы в обычные световые микроскопы; они различимы только с помощью электронного микроскопа. Однако о существовании этих ультрамикроскопических организмов стало известно еще в конце XIX века. Вирусы были открыты в 1892 г. Д. И.

Ивановским (1864 – 1926) при изучении причин гибели табака от мозаичной болезни (светлая пятнистость листьев) на табачных плантациях Крыма.

Являясь внутриклеточными паразитами, вирусы вызывают многие болезни человека (оспу, грипп, бешенство, корь, полиомиелит и др.), животных (ящур, чума крупного рогатого скота) и растений («мозаики» и другого вида заболевания полевых и огородных культур).

Данные электронной микроскопии показывают, что вирусы разнообразны по форме. Они бывают округлыми, палочковидными, спиралевидными, но чаще в виде многогранников. Размеры вирусов колеблются от десятых до сотых долей микрона, поэтому они проходят (фильтруются) через мелкопористые бактериологические фильтры. Некоторые, наиболее крупные вирусы после специальной обработки могут быть видимы и под световым микроскопом.

Вирусы неоднородны по химическому составу. Одни из них состоят только из белка и одной нуклеиновой кислоты — ДНК или РНК; другие содержат еще липоиды, полисахариды. Нуклеиновая кислота (в виде спирали) находится внутри вируса. Снаружи она закрыта белковой «оболочкой» (капсидом), состоящей из отдельных белковых субъединиц. На искусственных питательных средах вирусы, как правило, не растут, выращивают их обычно на культурах тканей.

Некоторые вирусы при большом накоплении в пораженной клетке образуют кристаллы разнообразной формы.

На рис. 3,а показаны кристаллы вируса оспенной вакцины.

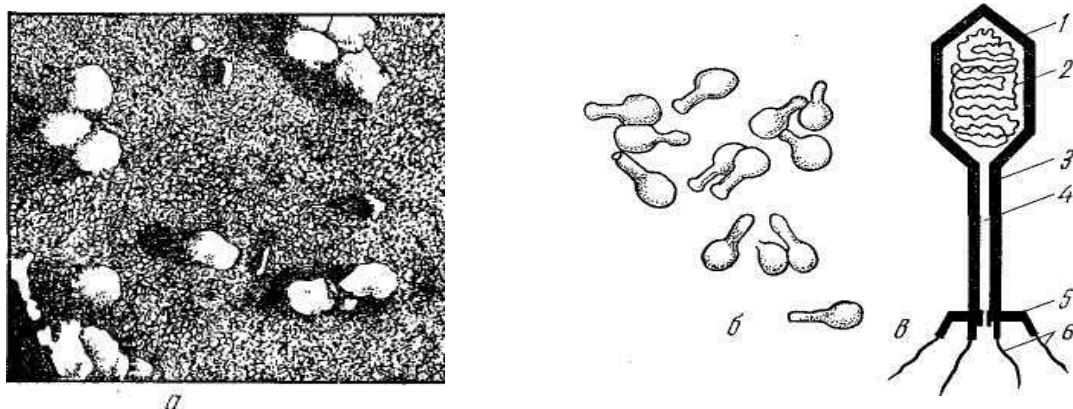


Рис. 3. Электронная микроскопия вируса и бактериофага:  
а – вирус оспенной вакцины; б – бактериофаг; в – схема строения фага: 1 – головка; 2 – ДНК; 3 – отросток; 4 – стержень; 5 – пластинка отростка; 6 – волокна

Различные вирусы неодинаково устойчивы к внешним воздействиям. Так, многие инактивируются при 60 ° С в течение 30 мин, другие выдерживают температуру 90 ° С до 10 мин. Вирусы легко переносят высушивание и низкие температуры, но малоустойчивы ко многим антисептикам, ультрафиолетовым лучам, радиоактивным излучениям.

**Фаги** – это вирусы, поражающие микроорганизмы и вызывающие их растворение (лизис). Вирусы бактерий называют бактериофагами, актиномицетов – актинофагами. Обнаружены вирусы грибов (микофаги) и некоторых водорослей, так, цианофаги – паразиты сине-зеленых водорослей.

Впервые лизис бактерий (сибиреязвенных) наблюдал Н.Ф. Гамалея (в 1898 г.). В 1917 г. Д'Эрелль установил подобное явление у бактерий дизентерии. Невидимый ультрамикроскопический паразит бактерий был им подробно изучен, описан и назван бактериофагом (пожирателем бактерий).

Электронная микроскопия показывает, что большинство фагов имеет округлую или многогранную «головку» и отросток (рис. 3, б, в). Головка имеет белковую оболочку; внутри головки заключена дезоксирибонуклеиновая (ДНК) или реже рибонуклеиновая (РНК) кислота. Размеры головки от 40 до 100 нм. Длина отростка 20 – 225 нм; он представляет собой белковую трубочку – это полый стержень, окруженный сократительным чехлом из белка. Стержень оканчивается пластинкой с выростами и тонкими нитями. Существуют фаги, которые состоят из одной головки, без отростка, и фаги, имеющие форму палочки. Фаги фильтруются через бактериальные фильтры и способны размножаться только в живых клетках

В настоящее время изучен механизм проникновения фага в клетки бактерий. Фаг пластинкой отростка прикасается к клетке, адсорбируется на ее поверхности и стержень как бы прокалывает оболочку бактерии. Разрыв оболочки обусловлен наличием в конце отростка фага специфических ферментов. Вслед за этим белковый чехол отростка сокращается и содержимое головки (нуклеиновая кислота) по каналу отростка переходит («впрыскивается») в бактериальную клетку. Белковые оболочки головки и отростка остаются на поверхности клетки. Фаговая ДНК вызывает перестройку обмена веществ пораженной клетки. Синтезируются уже не

бактериальные ДНК и белок, а фаговые, что и приводит к образованию в клетке новых фагов. Оболочка клетки лизируется и фаги освобождаются.

Фаги широко распространены в природе, они обладают специфичностью, так как каждый может воздействовать лишь на определенный вид или на группу родственных видов микроорганизмов.

Явление бактериофагии иногда наблюдается на производствах, использующих микроорганизмы; при этом технологический процесс резко нарушается. Так, нередко лизируются молочнокислые бактерии, входящие в состав заквасок, используемых при изготовлении кисломолочных продуктов. Такие закваски становятся непригодными к употреблению.

Некоторые фаги применяют в медицинской практике для профилактики или лечения заболеваний (например, дизентерии, холеры). В последнее время фаги служат объектами и «моделями» при изучении многих имеющих теоретическое и практическое значение вопросов общей и молекулярной биологии, биохимии, генетики, медицины и др.

#### 4. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Генетика прокариот изучает закономерности наследственности и изменчивости организмов, относящихся к этому обширному и многообразному царству.

Наследственность прокариот обеспечивает сохранение и точное воспроизведение признаков данного вида. Изменчивость определяет появление различий в признаках между особями одного вида бактерий, что в конечном итоге, в процессе эволюции, приводит к возникновению разнообразных форм жизни.

Для прокариот, как и для эукариот, характерны два типа изменчивости: *генотипическая* (наследственная) и *фенотипическая* (модификационная). Фенотипические изменения признаков получили название *модификаций*.

**Фенотипическая изменчивость.** Фенотипическая изменчивость возникает как ответная реакция организма на изменение условий окружающей среды и проявляется у большинства особей в популяции. Она не является наследственной и не приводит к изменению



генетического аппарата бактерий. Фенотипическая изменчивость носит адаптационный характер. Модификации бактерий проявляются лишь временно, в период непосредственного действия фактора, и исчезают при его устранении. Например, широко распространенные в почве бактерии рода *Azotobacter* активно фиксируют атмосферный азот в условиях недостатка его в почве и резко снижают азотфиксацию при внесении в почву минеральных азотных удобрений. Недостаток кальция в среде вызывает слизистый рост бацилл сибирской язвы, но стоит добавить кальций – и слизееобразование прекращается.

Возникающие модификации бактерий могут быть относительно стабильными или, наоборот, очень лабильными. Иногда они могут сохраняться в течение нескольких поколений. Так, при длительном воздействии на культуру бактерий пенициллина или ультрафиолетового облучения происходит образование L-форм бактерий, которые сохраняются в течение нескольких поколений.

В природе фенотипические изменения часто повторяются в жизни прокариот. Нередко они носят циклический характер, связанный с сезонными климатическими факторами. Например, в почвах южных районов в сезон знойного засушливого лета большинство бактерий приобретают слизистый матрикс, предохраняющий клетку от высыхания. Роль фенотипической изменчивости сводится к обеспечению выживаемости микробной популяции в изменившихся условиях среды.

**Генотипическая изменчивость.** Генотипическая изменчивость прокариот проявляется в виде мутаций и рекомбинаций и осуществляется в результате изменений в первичной структуре генетического аппарата.

Генотипические изменения возникают в природе как редкие события в жизни бактериальной популяции. Они не носят направленного характера и не являются адекватными изменению условий среды.

Мутация (от лат. *mutatio* – изменение) – термин, употребляемый в двух смыслах: возникновение изменения в структуре генетического материала и само изменение.

Анализ возникновения мутаций и накопление мутантов в бактериальных культурах был впервые проведен в 1943 г. С. Лурия и М. Дельбрюком. Их работы заложили основы генетики бактерий.

Мутации – стойкие наследственные изменения в структуре

генетического аппарата. Механизм мутаций заключается в выпадении, вставке или замене одной пары нуклеотидов либо группы нуклеотидов в молекуле ДНК, а также в изменении последовательности их расположения. Мутационной изменчивости подвержены такие признаки бактерий, как ауксотрофность по аминокислотам, пуринам, пиримидинам, витаминам и другим компонентам питательного субстрата, чувствительность, или резистентность, к антибиотикам, ферментативная активность и т. д.

Если мутантная бактериальная клетка оказывается лучше приспособлена к условиям окружающей среды, чем исходные особи, то потомство ее при размножении культуры будет занимать все большую часть популяции и постепенно вытеснит исходные клетки. В результате произойдет изменение генотипического состава и соответственно свойств данной культуры микроорганизма.

По происхождению различают спонтанные и индуцированные мутации.

**Спонтанные мутации** возникают в популяциях прокариот без видимого внешнего воздействия и проявляются в самопроизвольном изменении их генома. Они носят случайный, ненаправленный характер и возникают до воздействия какого-либо селектирующего фактора. Распространенными типами спонтанных мутаций являются устойчивость бактерий к фагам, ауксотрофность, антибиотикорезистентность. Частота спонтанных мутаций отдельных генов составляет  $10^4 - 10^{11}$ . Это значит, что любая культура бактерий, достигшая численности  $10^4 - 10^{11}$  клеток, неизбежно содержит мутанты. Одной из причин возникновения спонтанных мутаций могут быть ошибки в работе ДНК-полимеразы во время процесса репликации ДНК, например включение в синтезируемую дочернюю цепь нуклеотида, некомплементарного нуклеотиду родительской цепи (вместо аденина, комплементарного тимину, включается гуанин или цитозин). В природе спонтанные мутации служат основным источником естественной изменчивости бактерий, а, следовательно, именно они и лежат в основе эволюционного процесса прокариот.

**Индукцированные мутации** вызывают экспериментально действием какого-либо фактора – химического соединения или различного рода излучениями (рентгеновские, ультрафиолетовые и гамма-лучи). Впервые возможность индуцирования мутаций показали в 1925 г. Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов. Они обнаружили мутагенное

действие рентгеновских лучей на клетки дрожжей.

Частота индуцированных мутаций значительно выше частоты спонтанных и зависит от природы мутагена и его дозы.

По количеству мутировавших генов и характеру изменений в первичной структуре ДНК выделяют генные и хромосомные мутации.

**Генные мутации** затрагивают только один ген и чаще всего являются точковыми. Последние представляют собой выпадение, вставку или замену одной пары нуклеотидов.

**Хромосомные мутации** распространяются на несколько генов. Они носят характер крупных перестроек в отдельных фрагментах ДНК и проявляются в виде делеции – выпадение меньшего или большего числа нуклеотидов, инверсии – поворот участка ДНК на  $180^\circ$ , дупликации – повторение какого-нибудь фрагмента ДНК. Нередко хромосомные мутации приводят к дезинтеграции всех систем бактериальной клетки, что сопровождается летальным эффектом.

Факторы, вызывающие мутации, получили название мутагенов. Наиболее доступным мутагеном является ультрафиолетовое облучение бактериальных культур бактерицидными лампами с длиной волны около 260 нм. При этом механизм повреждения заключается в образовании димера тимина в молекуле ДНК, что приводит к блокированию нормального процесса репликации. В зависимости от дозы ультрафиолетовое облучение может оказать на бактериальные клетки мутагенный или даже летальный эффект.

При рентгеновском и гамма-облучении в ДНК бактерии возникают различные повреждения – разрывы цепей и химические изменения нуклеотидов. Эффект повреждения прямо пропорционален дозе облучения.

Исключительной эффективностью характеризуются некоторые химические мутагены. Наиболее сильным супермутагеном является нитрозометилмочевина и родственные ей нитрозосоединения. Относительно безопасным мутагеном считается азотистая кислота  $\text{HNO}_2$ . В растворе при pH 4,4 она активна по отношению ко всем группам микроорганизмов от вирусов до бактерий и грибов. Сильными мутагенами являются акридиновые красители, приводящие к мутациям типа вставок и выпадения нуклеотидов.

Эксперименты по индуцированному мутагенезу бактерий используются для решения общебиологических проблем

мутагенеза, а также прикладных задач промышленной и медицинской микробиологии.

Генотипическая изменчивость прокариот наблюдается в результате *рекомбинации* генетического материала за счет частичного объединения геномов двух клеток и проявляется в фенотипе бактерий. К рекомбинативной изменчивости генетического материала прокариот приводят трансформация, трансдукция и конъюгация.

В отличие от эукариот, у которых при половом процессе происходит образование истинной зиготы, объединяющей генетический материал обоих родителей, у прокариот при всех трех вышеуказанных процессах наблюдается лишь частичный перенос генетического материала из клетки-донора в клетку-реципиент, что приводит к образованию неполноценной зиготы – *мерозиготы* (от греч. *meros* – часть). Таким образом, прокариотная клетка-реципиент становится частично диплоидной, сохраняя в основном генотип клетки-реципиента и приобретая лишь отдельные свойства клетки-донора.

Ответственность за рекомбинации несут специальные гены клетки-реципиента, получившие название *гес-генов*. Механизм рекомбинаций включает ряд последовательных стадий: разрыв нитей ДНК клетки-реципиента; встраивание фрагментов ДНК, привнесенных из клетки-донора в геном клетки-реципиента; репликация рекомбинативной ДНК, дающей начало потомству клеток с измененным геномом. Доказательства вышеуказанного механизма рекомбинации были экспериментально получены при изучении процесса конъюгации кишечной палочки (*Escherichia coli*) с использованием меченых по фосфору ( $P^{32}$ ) клеток-доноров.

*Трансформация* (от лат. *transformation* – преобразование) – изменение генома, а, следовательно, и свойств бактерий в результате переноса информации при проникновении фрагмента свободной ДНК из среды в клетку. При трансформации не требуется непосредственного контакта между клеткой-донором и клеткой-реципиентом. Источником трансформирующей ДНК может служить свежееубитая культура бактерий или чистые препараты ДНК, экстрагированной из нее.

Явление трансформации у бактерий впервые наблюдал Ф. Гриффите в 1928 г. Он обнаружил, что при совместном введении в организм мышей убитого вирулентного капсульного

пневмококка 5-го типа с живым авирулентным бескапсульным пневмококком К-типа все животные погибают. При этом из крови погибших мышей наряду с бескапсульными пневмококками К-типа выделяются вирулентные капсульные пневмококки 5-типа. Гриффите не сумел объяснить явление трансформации. Лишь в 1944 г. О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти выделили трансформирующее вещество из убитых клеток капсульных пневмококков и показали, что им является ДНК, чувствительная к ДНК-полимеразе.

Процесс трансформации проходит в несколько этапов:

1) адсорбция трансформирующей ДНК на поверхности компетентной клетки-реципиента;

2) ферментативное расщепление трансформирующей ДНК с образованием фрагментов со средней молекулярной массой  $(4-5) \cdot 10^6$ ;

3) проникновение фрагментов ДНК в клетку-реципиент, сопровождающееся деградацией одной из цепей ДНК и образованием одноцепочечных фрагментов;

4) интеграция – включение фрагментов трансформирующей ДНК в ДНК клетки-реципиента путем генетического обмена (рис. 4);

5) экспрессия – интенсивное размножение трансформированных клеток, потомство которых будет иметь измененный ген в молекуле ДНК.

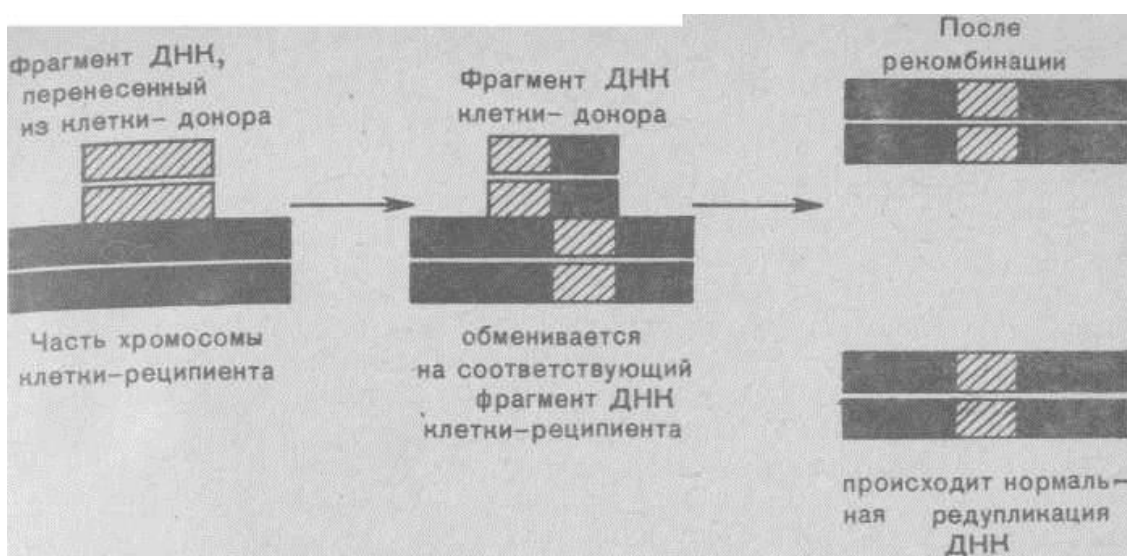


Рис. 4. Схематическое изображение обмена между фрагментом ДНК и хромосомой клетки-реципиента (Г. Шлегель, 1972).

Трансформирующий фрагмент ДНК обычно соответствует 0,3 % бактериальной хромосомы, или примерно 15 генам. В клетку-реципиент проникает очень малый фрагмент ДНК, что обуславливает трансформацию только одного признака и редко двух. Путем трансформации из одной клетки в другую могут быть перенесены такие признаки бактерий, как устойчивость к лекарственным препаратам, способность к синтезу капсульных полисахаридов, ферментов, определенных метаболитов и т. д. При трансформации, как правило, не происходит добавления качественно нового наследственного признака, наблюдается лишь замена одного признака другим.

Процесс трансформации показан для многих видов бактерий – пневмококков, стафилококков, гонококков, менингококков, кишечной палочки, некоторых бацилл и клубеньковых бактерий. Изучение возможности трансформации бактерий свидетельствует о распространенности в царстве прокариот этого механизма передачи генетического материала, а, следовательно, о существенной роли его в эволюционном процессе. Установлено, что проникновение фрагмента ДНК в клетку-реципиент вызывает трансформацию бактерий с достаточно высокой частотой  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  и зависит от вида микроорганизма, свойств трансформирующей ДНК и состояния клеток-реципиентов.

**Трансдукция** заключается в переносе генетического материала из клетки-донора в клетку-реципиент умеренным бактериофагом. Явление трансдукции в 1952 г. открыли Н. Циндер и Дж. Ледерберг на примере двух штаммов сальмонелл.

Прежде чем рассмотреть суть процесса трансдукции, следует, отметить, что по механизму взаимодействия с бактериальной клеткой фаги подразделяются на вирулентные и умеренные. Вирулентные фаги, проникая в клетку, обуславливают формирование новых фагов и лизис бактерий. Заражение клеток умеренными фагами не всегда сопровождается лизисом бактерий, часть их выживает и становится лизогенными. В лизогенных бактериях ДНК фага включается в ДНК клетки, и умеренный фаг превращается в профаг, утрачивая при этом способность лизировать бактериальную клетку. Профаг ведет себя как часть бактериальной хромосомы и репродуцируется в ее составе в течение ряда поколений. Освобождение умеренных фагов из

клеток лизогенных бактерий происходит спонтанно либо под действием индуцирующих агентов – ультрафиолетовых лучей, ионизирующей радиации и химических мутагенов.

Механизм трансдукции заключается в следующем. В процессе репродукции некоторых умеренных фагов небольшой фрагмент бактериальной хромосомы, содержащей один ген или несколько сцепленных генов, включается в геном фага. Трансдуцирующий фаг переносит фрагмент ДНК предыдущего хозяина в новую, чувствительную к нему бактериальную клетку. Таким образом, бактериальная клетка-реципиент становится частичной зиготой.

У бактерий различают 3 типа трансдукции: специализированную, общую и abortивную.

При **специализированной трансдукции** в геном фага включаются строго определенные гены ДНК бактерии-донора, расположенные на хромосоме бактерии непосредственно рядом с профагом. Прилегающие к профагу гены выщепляются из бактериальной хромосомы, а часть генов профага остается в ее составе. Освобождающиеся из клетки-донора трансдуцирующие дефектные фаги вызывают лизогенизацию клетки-реципиента. ДНК дефектного фага включается в состав хромосомы клетки-реципиента, привнося в нее и гены бактерии-донора.

**Общая трансдукция** отличается от специализированной тем, что в состав ДНК фага включается любой фрагмент ДНК бактерии-донора.

Таким образом, при общей трансдукции трансдуцирующие фаги переносят из хромосомы бактерии-донора любые гены, контролируемые различными признаками, в клетку бактерии-реципиента.

При **abortивной трансдукции** фрагмент хромосомы клетки-донора, привнесенный трансдуцирующим фагом в клетку-реципиент, не включается в ее хромосому, а локализуется в цитоплазме и деление клетки-реципиента передается только одной из образующихся клеток.

Трансдукция в эксперименте показана на кишечных бактериях, псевдомонадах, стафилококках, бациллах и актиномицетах. Очевидно, в естественных условиях перенос генетического материала с помощью фагов может быть самым распространенным механизмом рекомбинации у прокариот. Трансдукция определяет появление разновидностей бактерий с новыми свойствами,

устойчивость к лекарственным препаратам, синтез ферментов, аминокислот и др.

В экспериментах по генной инженерии трансдукция открывает не только широкие возможности межвидовой гибридизации бактерий, но и возможность получения гибридов среди таксономически отдаленных групп прокариот.

**Конъюгация** происходит при непосредственном контакте бактериальных клеток и предусматривает направленный перенос генетического материала из клетки-донора в клетку-реципиент. Феномен конъюгации в 1946 г. описали Дж. Ледерберг и Э. Тейтум на примере кишечной палочки штамма K12.

Способность бактерий к конъюгации связана с наличием у них полового F-фактора, относящегося к числу конъюгативных плазмид. Клетки, несущие F-фактор, обозначаются  $F^+$ ; клетки, лишенные F-фактора, –  $F^-$ . F-фактор (F-плазида) в клетках  $F^+$  обычно находится в изолированном состоянии от бактериальной хромосомы и является цитоплазматической структурой. Бактериальные клетки, содержащие F-фактор, отличаются от остальных клеток рядом свойств: измененным поверхностным зарядом и способностью синтезировать дополнительные поверхностные структуры F-пили.

Процесс конъюгации начинается с прикрепления конца F-пили клетки-донора к клетке-реципиенту. В течение нескольких минут клетка-донор и клетка-реципиент сближаются, возможно, за счет сокращения F-пили и вступают в непосредственный контакт. Через цитоплазматический мостик по каналу сокращенной F-пили, менее чем за 5 мин, происходит передача полового F-фактора, независимо от бактериальной хромосомы, из цитоплазмы клетки-донора  $F^+$  в цитоплазму клетки-реципиента  $F^-$ . При этом клетка-донор не теряет своей донорной способности, так как в ней остаются копии F-фактора.

Среди популяции клеток  $F^+$  имеются бактерии, способные при конъюгации передавать не F-фактор, а фрагмент бактериальной хромосомы. Эти клетки бактерий и образованные ими штаммы обозначаются Hfr (от англ. *high frequency of recombination*), что означает бактерии с высокой частотой рекомбинации. Рекомбинации между клетками Hfr и клетками  $F^-$  происходят в тысячу раз чаще, чем между клетками  $F^+$  и  $F^-$ . Отличие клеток Hfr от клеток  $F^+$  заключается в том, что половой F-фактор у них



включен в бактериальную хромосому. Во время конъюгации в клетке-доноре Hfr идет процесс репликации ДНК.

При этом одна из реплицирующихся цепей ДНК через конъюгационный мостик проникает в клетку-реципиент  $F^-$ , вторая остается в клетке-доноре Hfr, затем каждая из этих цепей достраивается комплементарной нитью. Конъюгационный мостик непрочен, он легко разрывается, поэтому из клетки-донора Hfr в клетку-реципиент  $F^-$  передается не вся хромосома, а лишь ее фрагмент. Между перенесенным из клетки Hfr фрагментом хромосомы и гомологичным участком хромосомы клетки  $F^-$  происходит генетический обмен. В результате часть донорной ДНК встраивается в ДНК реципиента, а соответствующая часть реципиентной ДНК исключается из нее. Эффективность включения донорной ДНК в хромосому реципиента высока и составляет примерно 0,5. Конъюгацию прокариот не следует отождествлять с половым процессом эукариот, так как при конъюгации в клетку р. передается только часть генетического материала клетки  $F^+$ , в результате чего образуется неполноценная мерозигота. Основу последней составляет геном клетки-реципиента с привнесенной частью генома клетки-донора.

Скачком в эволюции прокариот явилось появление рекомбинативной изменчивости, заключающейся в частичном объединении генетической информации двух прокариотных клеток донора и реципиента. Таким образом возник новый дополнительный материал для естественного отбора, ускоряющий процесс эволюции. Из трех вышерассмотренных рекомбинативных процессов наиболее совершенным является конъюгация, так как она обеспечивает более полный обмен генетической информацией между двумя клетками. Известны случаи, когда при длительной конъюгации (90 мин) двух клеток *Escherichia coli* наблюдается вхождение всей хромосомы клетки-донора в клетку-реципиент.

Однако, оценивая значимость рекомбинаций в эволюционном процессе прокариот, следует иметь в виду, что эффективность генетических рекомбинаций оказывается высокой только для близкородственных бактерий, имеющих родство в пределах вида.

## 5. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Экология (от греч. *oikos* – дом, место обитания) микроорганизмов изучает их взаимоотношения друг с другом и с окружающей средой. Как известно, микроорганизмы обнаруживаются в почве, воде, воздухе, на растениях, в организме человека и животных.

### 5.1. Микрофлора почвы

Микрофлора почвы характеризуется большим разнообразием микроорганизмов, которые принимают участие в процессах почвообразования и самоочищения почвы, кругооборота в природе азота, углерода и других элементов. В почве обитают бактерии, грибы, лишайники (симбиоз грибов с цианобактериями) и простейшие.

На поверхности почвы микроорганизмов относительно мало, на них губительно действуют УФ-лучи, высушивание и т. д.

Наибольшее число микроорганизмов содержится в верхнем слое почвы толщиной до 10 см. По мере углубления в почву количество микроорганизмов уменьшается и на глубине 3–4 м они практически отсутствуют;

Состав микрофлоры почвы меняется в зависимости от состояния почвы, состава растительности, температуры, влажности и т.д. Большинство микроорганизмов почвы способны развиваться при нейтральном рН, высокой относительной влажности, при температуре от 25 до 45 °С.

В почве живут бактерии, способные усваивать молекулярный азот (азотфиксирующие), относящиеся к родам *Azotobacter*, *Azomonas*, *Mycobacterium* и др. Азотфиксирующие разновидности цианобактерий, или сине-зеленых водорослей, применяют для повышения плодородия рисовых полей. Такие бактерии, как псевдомонады, активно участвуют в минерализации органических веществ, а также восстановлении нитратов до молекулярного азота. Кишечные бактерии (сем. *Enterobacteriaceae*) – кишечная палочка, возбудители брюшного тифа, сальмонеллезов, дизентерии – могут попадать в почву с фекалиями. Однако в почве отсутствуют условия для их размножения, и они постепенно отмирают. В чистых почвах кишечная палочка и протей встречаются редко; обнаружение их в значительных количествах является показателем загрязнения почвы

фекалиями человека и животных и свидетельствует о ее санитарно-эпидемиологическом неблагополучии (возможность передачи возбудителей инфекционных заболеваний).

Почва служит местом обитания спорообразующих палочек родов *Bacillus* и *Clostridium*. Непатогенные бациллы (*Bac. megatherium*, *Bac. subtilis* и др.) наряду с псевдомонадами, протеем и некоторыми другими бактериями являются аммонифицирующими, составляя группу гнилостных бактерий, осуществляющих минерализацию белков. Патогенные палочки (возбудитель сибирской язвы, ботулизма, столбняка, газовой гангрены) способны длительно сохраняться в почве.

В почве находятся также многочисленные представители фибов. Грибы участвуют в почвообразовательных процессах, превращениях соединений азота, выделяют биологически активные вещества, в том числе антибиотики и токсины. Токсинообразующие грибы, попадая в продукты питания человека, вызывают интоксикации – микотоксикозы и афлатоксикозы.

Микрофауна почвы представлена простейшими, количество которых колеблется от 500 до 500 000 на 1 г почвы. Питаясь бактериями и органическими остатками, простейшие вызывают изменения в составе органических веществ почвы.

## 5.2. Микрофлора воды

Микрофлора воды, являясь естественной средой обитания микроорганизмов, отражает микробный пейзаж почвы, так как микроорганизмы попадают в воду с частичками почвы. Вместе с тем в воде формируются определенные биоценозы с преобладанием микроорганизмов, адаптировавшихся к условиям местонахождения, т. е. физико-химическим условиям, освещенности, степени растворимости кислорода и диоксида углерода, содержания органических и минеральных веществ и т.д.

В водах пресных водоемов обнаруживаются палочковидные (псевдомонады, аэромонады и др.), кокковидные (микрококки) и извитые бактерии. Загрязнение воды органическими веществами сопровождается увеличением анаэробных и аэробных бактерий, а также грибов. Особенно много анаэробов в иле, на дне водоемов. Микрофлора воды выполняет роль активного фактора в процессе самоочищения ее от органических отходов, которые утилизируются

микроорганизмами. Вместе с загрязненными ливневыми, талыми и сточными водами в озера и реки попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных (кишечная палочка, цитробактер, энтеробактер, энтерококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций – брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций и др. Поэтому вода является фактором передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний. Некоторые возбудители могут даже размножаться в воде (холерный вибрион, легионеллы).

Вода артезианских скважин практически не содержит микроорганизмов, обычно задерживающихся более верхними слоями почвы. Микрофлора воды океанов и морей также содержит различные микроорганизмы, в том числе светящиеся и галофильные (солелюбивые), например галофильные вибрионы, поражающие моллюски и некоторые виды рыбы, при употреблении которых в пищу развивается пищевая токсикоинфекция.

### **5.3. Микрофлора воздуха**

Микрофлора воздуха взаимосвязана с микрофлорой почвы и воды. В воздух также попадают микроорганизмы из дыхательных путей и с каплями слюны человека и животных. Солнечные лучи и другие факторы способствуют гибели микрофлоры воздуха. Больше количество микроорганизмов присутствует в воздухе крупных городов, меньше – в воздухе сельской местности. Особенно мало микроорганизмов в воздухе над лесами, горами и морями. В воздухе обнаруживаются кокковидные и палочковидные бактерии, бациллы и клостридии, актиномицеты, грибы и вирусы. Много микроорганизмов содержится в воздухе закрытых помещений, микробная обсемененность которых зависит от степени уборки помещения, уровня освещенности, количества людей в помещении, частоты проветривания и др. Количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха (так называемое микробное число, или обсемененность воздуха) отражает санитарно-гигиеническое состояние воздуха, особенно в больничных и детских учреждениях. Косвенно о выделении патогенных микроорганизмов (возбудителей туберкулеза, дифтерии, коклюша, скарлатины, кори, гриппа и др.) при разговоре, кашле, чиханье больных и носителей можно судить по наличию санитарно-показательных бактерий (золотистого

стафилококка и стрептококков), так как последние являются представителями микрофлоры верхних дыхательных путей и имеют общий путь выделения с патогенными микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем.

С целью снижения микробной обсемененности воздуха проводят влажную уборку помещения в сочетании с вентиляцией и очисткой (фильтрацией) поступающего воздуха; применяют обработку помещений лампами ультрафиолетового излучения.

## **6. ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**

### **6.1. Понятие о биотехнологии, цели и задачи**

Биотехнология представляет собой область знаний, которая возникла и оформилась на стыке микробиологии, молекулярной биологии, генетической инженерии, химической технологии и ряда других наук. Рождение биотехнологии обусловлено потребностями общества в новых, более дешевых продуктах для народного хозяйства, в том числе медицины и ветеринарии, а также в принципиально новых технологиях. Биотехнология (от греч. *bios* – жизнь, *teken* – искусство, мастерство, *logos* – наука, умение, мастерство) – это получение продуктов из биологических объектов или с применением биологических объектов. В качестве биологических объектов могут быть использованы организмы животных и человека (например, получение иммуноглобулинов из сывороток вакцинированных лошадей или людей; получение препаратов крови доноров), отдельные органы (получение гормона инсулина из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней) или культуры тканей (получение лекарственных препаратов). Однако в качестве биологических объектов чаще всего используют одноклеточные микроорганизмы, а также животные и растительные клетки. Выбор этих объектов обусловлен следующими причинами:

– клетки являются своего рода «биофабриками», вырабатывающими в процессе жизнедеятельности разнообразные ценные продукты (белки, жиры, углеводы, витамины, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты, спирты и пр.). Эти продукты, крайне необходимые в жизни человека, пока недоступны для получения «небиотехнологическими» способами

из-за сложности технологии процессов или экономической нецелесообразности, особенно в условиях крупномасштабного производства;

– клетки чрезвычайно быстро воспроизводятся, что позволяет за относительно короткое время искусственно нарастить на сравнительно дешевых и недефицитных питательных средах в промышленных масштабах огромные количества биомассы микробных, животных или растительных клеток;

– биосинтез сложных веществ (белков, антибиотиков, антигенов, антител и др.) значительно экономичнее и технологически доступнее, чем химический синтез. Коэффициент полезного действия «работы» клетки равен 70 %, а самого совершенного технологического процесса – значительно ниже;

– возможность проведения биотехнологического процесса в промышленных масштабах, т.е. наличие соответствующего технологического оборудования и аппаратуры, доступность сырья, технологии переработки и др.

Клетки животных и растений, микробные клетки в процессе жизнедеятельности (ассимиляции и диссимиляции) образуют новые продукты и выделяют метаболиты, обладающие разнообразными физико-химическими свойствами и биологическим действием. Обычно продукты жизнедеятельности одноклеточных делят на 4 категории:

1) сами клетки как источник целевого продукта. Например, выращенные бактерии или вирусы используют для получения живой или убитой корпускулярной вакцины; дрожжи – как кормовой белок или основу для получения гидролизатов питательных сред и т.д.;

2) крупные молекулы (макромолекулы), которые синтезируются клетками в процессе выращивания: ферменты, токсины, антигены, антитела, пептидогликаны и др.;

3) первичные метаболиты – низкомолекулярные вещества, необходимые для роста клеток (аминокислоты, витамины, нуклеотиды, органические кислоты);

4) вторичные метаболиты (идиолиты) — низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста клеток (антибиотики, алкалоиды, токсины, гормоны).

Биотехнология использует эту продукцию клеток как сырье, которое в результате технологической обработки превращается в конечный продукт. С помощью биотехнологии получают множество

продуктов, используемых в различных отраслях:

- медицине (антибиотики, витамины, ферменты, аминокислоты, гормоны, вакцины, антитела, компоненты крови, диагностические препараты, иммуномодуляторы, алкалоиды, пищевые белки, нуклеиновые кислоты, нуклеозиды, нуклеотиды, липиды, антиметаболиты, антиоксиданты, противоглистные и противоопухолевые препараты);

- ветеринарии и сельском хозяйстве (кормовой белок: кормовые антибиотики, витамины, гормоны, вакцины, биологические средства защиты растений, инсектициды);

- пищевой промышленности (аминокислоты, органические кислоты, пищевые белки, ферменты, липиды, сахара, спирты, дрожжи);

- химической промышленности (ацетон, этилен, бутанол);

- энергетике (биогаз, этанол).

Следовательно, биотехнология направлена на создание диагностических, профилактических и лечебных медицинских и ветеринарных препаратов, на решение продовольственных вопросов (повышение урожайности, продуктивности животноводства, улучшение качества пищевых продуктов — молочных, кондитерских, хлебобулочных, мясных, рыбных); на обеспечение многих технологических процессов в легкой, химической и других отраслях промышленности. Необходимо отметить также все возрастающую роль биотехнологии в экологии, так как очистка сточных вод, переработка отходов и побочных продуктов, их деградация (фенол, нефтепродукты и другие вредные для окружающей среды вещества) осуществляются с помощью микроорганизмов.

Биотехнологию также подразделяют на традиционную (старую) и новую. Последнюю связывают с генетической инженерией. Общепризнанное определение предмета «биотехнология» отсутствует и даже ведется дискуссия о том, наука это или производство.

Видимо, правильно будет определить биотехнологию как сферу деятельности, которая на основе изучения процессов жизнедеятельности живых организмов, главным образом клеток микроорганизмов, животных и растительных клеток, использует эти процессы и сами объекты для промышленного производства продуктов, необходимых в жизни человека, а также получения биоэффектов, ранее не встречавшихся в природе (например, получение рекомбинантных бактерий, трансгенных растений и

животных).

В биотехнологии, как в никакой другой области знаний, тесно увязываются, интегрируются наука и производство.

Промышленное производство в биотехнологии по сути основано на нескольких принципах: брожении (ферментация), биоконверсии (превращение одного вещества в другое), культивировании растительных и животных клеток, бактерий и вирусов, генетических манипуляциях. Реализация этих научных принципов в производстве потребовала разработки промышленного оборудования и аппаратуры, отработки и оптимизации технологических процессов, разработки способов оценки и контроля продукции на всех ее стадиях.

Современная биотехнологическая промышленность располагает крупными заводами, опытно-конструкторскими учреждениями, научно-исследовательскими институтами. Фундаментальными проблемами биотехнологии заняты научно-исследовательские институты РАН, РАМН и ряд прикладных отраслевых институтов.

## **6.2. Краткая история развития биотехнологии**

Биотехнология возникла в древности (примерно 6000—5000 лет до н.э.), когда люди научились выпекать хлеб, варить пиво, готовить сыр и вино. Этот первый этап развития биотехнологии был сугубо эмпирический и продолжал оставаться таким, несмотря на совершенствование технологических процессов и расширение сфер использования биотехнологических приемов, вплоть до открытия Л.Пастером в XIX в. природы процесса брожения. С этого момента начался второй научный этап традиционной биотехнологии. В этот период получены и выделены ферменты, открыты многие микроорганизмы; разработаны способы их выращивания в массовых количествах; получены культуры животных и растительных клеток и разработаны способы искусственного их культивирования; в результате изучения физиологии, биохимии и генетики микробных и животных клеток получены многие продукты микробиологического синтеза, необходимые для медицины, сельского хозяйства и промышленности. Сформировалась вначале техническая микробиология, а затем биотехнология. Однако промышленное производство сводилось в основном к получению продуктов на основе природных штаммов.

На смену старой традиционной биотехнологии пришла новая



биотехнология, основанная на применении искусственно получаемых штаммов — суперпродуцентов, использовании иммобилизованных ферментов, применении культур животных и растительных клеток, широком использовании генетической инженерии для получения клеток-рекомбинантов, моноклональных антител и других биологически активных веществ.

Новая биотехнология возникла, таким образом, на основе достижений молекулярной биологии и микробиологии, генетики и генетической инженерии, иммунологии и химической технологии. Основой ее явилась генетическая инженерия, индустрия рекомбинантных ДНК.

### **6.3. Микроорганизмы, клетки и процессы, применяемые в биотехнологии**

В природе существует огромное число микроорганизмов. Все они способны синтезировать продукты или осуществлять реакции, которые могут быть полезны для биотехнологии. Однако практическое применение нашли не более 100 видов микроорганизмов (бактерии, грибы, дрожжи, вирусы, водоросли), так как остальные мало изучены.

Дрожжи широко используют в хлебопечении, пивоварении, виноделии, получении соков, кормового белка, питательных сред для выращивания бактерий и культур животных клеток. Из 500 известных видов дрожжей используется только несколько видов – *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces uvarum*.

Среди бактерий чаще всего применяют в биотехнологии представителей следующих родов: *Acetobacter*, которые превращают этанол в уксусную кислоту и уксусную кислоту в углекислый газ и воду; *Bacillus* - для получения ферментов (*B. subtilis*), средств защиты растений (*B. thuringiensis*); *Clostridium* – для сбраживания сахаров в ацетон, этанол, бутанол; молочнокислые бактерии (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*); псевдомонады – например *P. glutamatum* – для получения витамина B<sub>12</sub>, *Corynebacterium* – для получения аминокислот и др.

Для получения разнообразных антибиотиков в биотехнологии применяют актиномицеты (род *Streptomyces*), грибы *Penicillium chrysogenum*, *Cephalosporium* и др.

Многие микроорганизмы – бактерии, дрожжи, вирусы –

используют в качестве реципиентов чужеродного генетического материала с целью получения рекомбинантных штаммов — продуцентов биотехнологической продукции. Получены рекомбинантные штаммы *E. coli*, продуцирующие интерфероны, инсулин, гормон роста, антигены вируса СПИДа; штаммы *B. subtilis*, вырабатывающие интерферон; штаммы дрожжей, продуцирующих интерлейкин-2, антиген вируса гепатита В; рекомбинантные вирусы осповакцины, синтезирующие антигены гепатита В, вируса бешенства, клещевого энцефалита и др.

Для получения вакцин и диагностических препаратов используют также патогенные микроорганизмы (брюшного тифа, коклюша, дифтерии, столбняка и др.).

Широкое применение в биотехнологии нашли культуры животных и растительных клеток. Известно, что строение, физиология и биотехнология животных и растительных клеток более сложны, чем бактериальных клеток. Из культур животных и растительных клеток можно извлечь более широкий ассортимент сложной и ценной продукции, однако процесс культивирования растительных и животных клеток более трудоемкий и дорогостоящий. Из культур тканей растений можно получать разнообразные соединения, используемые в медицине (алкалоиды, противовоспалительные вещества, противолейкозные и противоопухолевые, противобактериальные, сердечные и почечные средства, ферменты, витамины, опиаты и др.), сельском хозяйстве, химической и других отраслях промышленности. Животные клетки используют как для получения продукции, синтезируемой клетками, так и для выращивания в клетках вирусов с целью получения из них вакцин и диагностических препаратов.

**Технология получения продуктов микробного или клеточного синтеза.** Основным условием для успешного проведения технологического процесса является выбор или получение высокопродуктивного промышленного штамма-продуцента и поддержание его в активном состоянии. Известно, что различные штаммы по количеству и качеству продукции того или иного вещества (фермента, антибиотика, витамина, аминокислоты, антигена, алкалоида и др.) могут существенно отличаться. Естественно, что от этого в значительной мере зависят экономическая эффективность и активность целевого продукта.

Вторым важным условием является подбор питательных сред,

обеспечивающих максимальное накопление биомассы или целевого продукта; питательные среды должны состоять из дешевого, недефицитного и доступного сырья, поскольку при промышленном культивировании микроорганизмов потребляются огромные их количества. В крупномасштабном производстве для приготовления питательных сред служит обычно сравнительно дешевое сырье (меласса, парафины нефти, дрожжи, уксусная кислота, природный газ). Более ограниченное применение, главным образом при получении медицинских препаратов, находят казеин, препараты крови, среды из мясных гидролизатов.

Для выращивания животных клеток применяют питательные среды, имеющие сложный состав. Они komponуются из высококачественного сравнительно дорогого сырья (аминокислоты, соли, ростовые факторы). В последнее время успешно разрабатываются питательные среды для культур клеток из гидролизатов казеина, дрожжей, мяса и крови.

Для получения продукции в максимальных количествах активный штамм-продуцент выращивают на оптимальной питательной среде в оптимальных условиях культивирования (посевная доза, температура, рН, окислительно-восстановительный потенциал, аэрация, массообменные характеристики, питательные и ростовые добавки, сроки культивирования). Выращивание проводят в ферментаторах (культиваторах), вместимость которых может варьировать от 2 л до 100–400 м<sup>3</sup> в зависимости от потребности в продукте. Для получения культур животных клеток объем ферментаторов пока не превышает 3 м<sup>3</sup>. В настоящее время биотехнологическая промышленность оснащена ферментаторами, позволяющими вести процесс в автоматическом режиме с программным управлением. Процесс культивирования ведется в асептических условиях, чтобы получить чистые культуры целевых микроорганизмов или культуры клеток.

Помимо суспензионного (глубинного) культивирования в ферментаторах иногда применяют поверхностное культивирование на плотных питательных средах (бактерии, грибы) или в жидком монослое (культуры животных клеток). Последний способ осуществляется в роллерных (вращающихся) установках.

Полученную биомассу микроорганизмов или культуры клеток подвергают затем переработке, сущность которой определяется технологией получения целевого продукта. Наиболее типовыми

являются следующие процессы:

- концентрирование биомассы (сепарированием, центрифугированием) и приготовление из него жидкого (суспензии, пасты) или сухого продукта;

- высушивание, которое проводится лиофильным способом из замороженного состояния или путем распыления в потоке теплого воздуха. Для этого существуют специальные лиофильные аппараты (в том числе ленточные автоматические сушилки большой мощности) и распылительные сушилки, в том числе экологически чистые, так как процесс ведется в замкнутом цикле. Последние имеют большую мощность, однако не позволяют сушить термолабильные продукты;

- сбор центрифугата после отделения биомассы и выделения из него целевого продукта, например антигенов, токсинов, инсулина и др. Иногда предварительно прибегают к дезинтеграции (разрушению) клеток механическим способом или с помощью ультразвука, осмоса, чтобы увеличить выход целевого продукта.

В тех случаях, когда из биомассы или центрифугата (культуральная жидкость) необходимо выделить активную субстанцию – витамин, аминокислоту, антиген, антитело, фермент и пр., применяют физические или физико-химические методы очистки. Выбор их определяется свойствами выделяемого вещества (природа, молекулярная масса, лабильность к внешним воздействиям, химическое сродство и т. д.). Из физических методов чаще всего применяют на первичных стадиях сепарирование, центрифугирование (ультрацентрифугирование), а из физико-химических — осаждение нейтральными солями, спиртом, ацетоном, а также ультрафильтрацию, хроматографию, электрофорез. Методы выделения и очистки, как правило, многоступенчатые. Чистоту получаемого продукта характеризуют наличием в нем примесей и выражают коэффициентом очистки, который представляет отношение числа активных единиц продуктов на 1 мг белка или азота (так называемая удельная активность) в очищенном препарате к удельной активности исходного (неочищенного) продукта.

Обычно в препаратах активная субстанция не всегда находится в предельно очищенном состоянии, поскольку в производственных условиях при переработке больших объемов сырья и существующих методах очистки этого добиться пока не удастся. Поэтому иммунобиологические препараты, полученные как традиционным методом, так и способом генетической инженерии, содержат, как

правило, примеси питательных сред, на которых выращивали микроорганизмы, а также продукты метаболизма и неспецифические компоненты – продукты распада микробной клетки. К примесям относятся белки, полисахариды и их комплексы, нуклеиновые кислоты, соли и другие низкомолекулярные вещества. Они не только бесполезны для препаратов, но иногда вызывают нежелательные побочные реакции в организме при применении этих препаратов (местные реакции, повышение температуры тела, аллергические проявления). В принципе необходимо стремиться к получению препаратов, содержащих активную субстанцию в предельно очищенном состоянии.

После получения активной субстанции из нее конструируют конечный препарат. В соответствии с назначением и способом применения он может быть в жидком или сухом состоянии (раствор, суспензия, порошок) или в виде мазей. Препарат может быть предназначен для наружного, парентерального или энтерального, аэрозольного применения. В зависимости от этого препарат может быть стерильным и нестерильным.

Конечный препарат обычно содержит, помимо примесей, от которых не удалось освободиться, необходимые добавки: консервант (антисептик для поддержания стерильности препарата при хранении), стабилизатор (обычно инертные белки, аминокислоты для повышения устойчивости лабильного активного начала при хранении), активаторы (например, адъюванты и иммуномодуляторы в вакцинах). В конечной композиции препарат фасуется (ампулы, флаконы, таблетки, мази), этикируется, снабжается инструкцией по применению.

Каждая серия препарата проходит стандартизацию в соответствии с технической документацией (технические условия, технологический регламент на изготовление) на производстве и в Государственном институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича или в Фармакологическом комитете, в зависимости от назначения препарата.

## 6.4. Генетическая инженерия и область ее применения в биотехнологии

Генетическая инженерия является основой биотехнологии. Генетическая инженерия по существу сводится к генетической рекомбинации, т.е. обмену генами между двумя хромосомами, которая приводит к возникновению клеток или организмов с двумя и более наследственными детерминантами (генами), по которым родители различались между собой. Метод рекомбинации заключается в следующем:

- выделение ДНК из разных видов организмов или клеток;
- получение гибридных молекул ДНК;
- введение рекомбинантных (гибридных) молекул в живые клетки;
- создание условий для экспрессии и секреции продуктов, кодируемых генами.

Гены, кодирующие те или иные структуры, выделяются (клонироваются) из хромосом или плазмид, прицельно выщепляются из этих генетических образований с помощью ферментов рестрикции или синтезируются химически. Набор ферментов (известно более 500 рестриктаз), способных резать ДНК по определенным связям (сайтам), является важным инструментом генетической инженерии. В последнее время обнаружены ферменты, расщепляющие по определенным связям РНК наподобие рестрикции ДНК. Эти ферменты названы рибозимами. Их роль еще пока не выяснена.

С помощью химического синтеза могут быть получены сравнительно небольшие гены. Для этого вначале расшифровывают число и последовательность аминокислот в белковой молекуле вещества и по этим данным узнают очередность нуклеотидов в гене, поскольку каждой аминокислоте соответствуют три нуклеотида (кодон). С помощью синтезатора создают химическим путем ген, аналогичный природному гену.

Полученный целевой ген с помощью ферментов лигаз сшивают с другим геном, который используется в качестве вектора для встраивания гибридного гена в клетку. В качестве вектора могут служить плазмиды, бактериофаги, вирусы человека, животных и растений.

Количество плазмид в бактериальной клетке может колебаться от

одной до нескольких сотен, причем, чем большие размеры имеет плазида, тем меньше ее копий в клетке. С помощью ам -пфикации генов, т. е. увеличения числа копий определенного гена в клетке, можно резко повысить производство кодируемого вещества клеткой. Амплификацией удастся добиться получения до 3000 копий плазмидных генов на клетку.

Бактериофаг как вектор используется аналогично. Целевой ген встраивается в геном фага, реплицируется вместе с генами вируса при размножении последнего в бактериальной клетке. Чаще всего используется фаг ламбда, который содержит ДНК, состоящую из 50 тыс. пар нуклеотидов. Преимущество фага ламбда перед плазидами в том, что фаговый вектор позволяет клонировать большие фрагменты чужеродной ДНК.

В случае использования в качестве векторов вирусов человека, животных и растений чужеродный ген встраивают в ДНК вируса, и он реплицируется вместе с размножением последнего в клетке. Применяют в качестве вектора космиды, представляющие собой гибрид плазмиды с фагом. Космиды используются для клонирования больших (до 45 тыс. пар нуклеотидов) фрагментов ДНК эукариот.

Для РНК-содержащих вирусов передача генетической информации возможна с помощью ревертазы (обратной транскрипта -зы), передающей информацию о структуре белка от РНК к ДНК, которая является комплементарной и РНК.

На рис. 5. показана принципиальная схема получения рекомбинантных молекул ДНК и рекомбинантных бактерий.

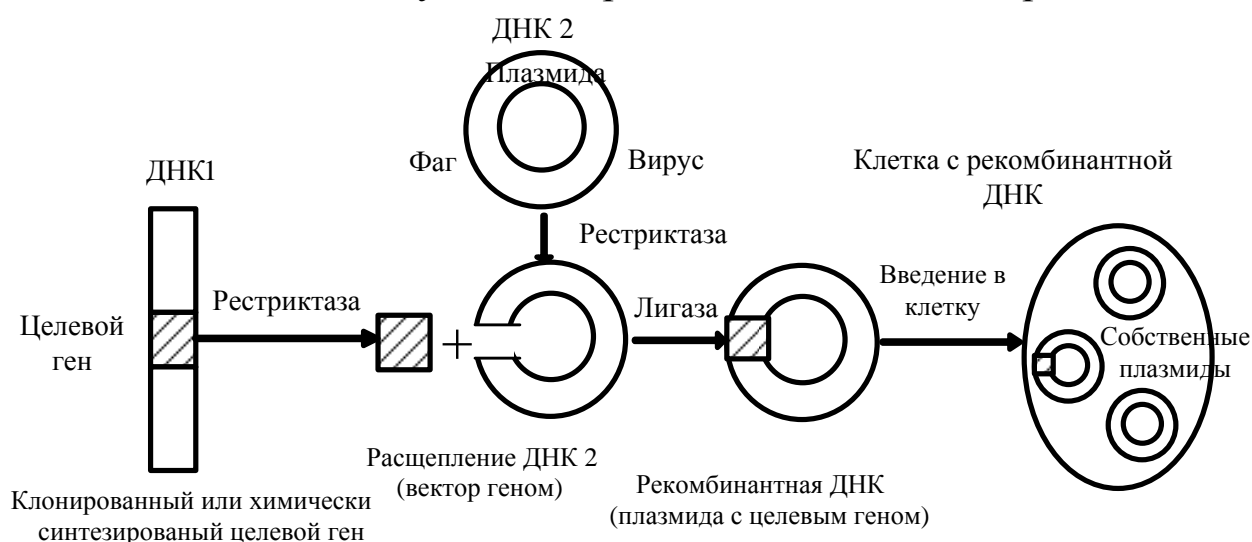


Рис.5. Получение рекомбинантных ДНК и рекомбинантных штаммов

Экспрессируемый ген в виде рекомбинантной ДНК (плазмида, фаг, космида, вирусная ДНК) встраивается в бактериальную или животную клетку, которая приобретает новое свойство – способность продуцировать не свойственное этой клетке вещество, кодируемое экспрессируемым геном. Для лучшего проникновения вектора через стенку бактерий иногда прибегают к воздействию на стенку (например, хлоридом кальция), чтобы увеличить ее проницаемость.

В качестве реципиентов экспрессируемого гена чаще всего используют *E. coli*, *B. subtilis*, псевдомонады, дрожжи, вирусы. Реципиента подбирают не только с учетом возможности встройки чужеродного гена, но и уровня выраженности (экспрессии) синтеза вещества, кодируемого геном, возможности его секреции в окружающую среду, легкости и доступности массового культивирования, экологической безопасности. Некоторые штаммы рекомбинантных бактерий способны переключать на синтез чужеродного вещества, экспрессируемого геном, до 50 % своего синтетического потенциала. Такие штаммы - суперпродуценты целевых продуктов - уже получены и применяются в биотехнологической промышленности; они носят название промышленных штаммов. В качестве примера можно привести штаммы - суперпродуценты интерферона, интерлейкина, белков ВИЧ и др.

Некоторые штаммы микроорганизмов хорошо экспрессируют чужеродные гены, но плохо секретируют продукт в окружающую среду. В таких случаях приходится применять дезинтеграцию (разрушение) клетки с целью высвобождения из нее синтезированного продукта.

В некоторых случаях, несмотря на наличие экспрессии и секреции, продукт не удается получить, вернее собрать, из-за разрушения в процессе синтеза или после него протеазами и другими ингибиторами. Это прежде всего относится к низкомолекулярным пептидам.

С целью повышения уровня секреции целевого белка пользуются следующим приемом: к гену целевого белка присоединяют ген белка, хорошо секретиремого клеткой реципиента. Образующийся в



результате такой манипуляции химерный белок, хорошо секретлируемый клеткой, собирают и от него отщепляют целевой белок. Возможно также к гену целевого белка присоединить ген-индикатор, т. е. ген, кодирующий легко узнаваемый белок, в результате чего получают химерный индикаторный белок, а из него - целевой белок. В качестве индикатора можно использовать, например, галактозидазу.

## **БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология –М.: Академия, 2003. –461с.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии – М.: Просвещение. 1997. – 190с.
3. Мудрецова-Вис К.А., Чистяков Ф.М.. Микробиология. –М.: Экономика. 1989. 263с.
4. Воробьев А.А., Быков А.С.. Микробиология. – М.: Медицина. 1998.



**УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ**

**Забалуева Алла Игоревна  
Плуготаренко Нина Константиновна**

**ОСНОВЫ  
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ**

Ответственный за выпуск **Забалуева А.И.**

Редактор **Проценко И.А.**  
Корректор **Чиканенко Л.В.**

ЛР №020565 от 23.06.1997 г. Подписано к печати 20.08.2013г.

Печать офсетная  
Усл.п.л. – 3,0.  
Заказ №

Формат 60x84 1/16.  
Бумага офсетная.  
Уч.-изд.л.– 2,8.  
Тираж 100 экз.

“С”

---

Издательство ЮФУ  
ГСП 17А, Таганрог 28, Некрасовский, 44  
Типография ЮФУ  
ГСП 17А, Таганрог 28, Некрасовский, 44