

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра ботаники и микробиологии

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие

Ярославль
ЯрГУ
2017

УДК 579:578(072)
ББК Е4я73
М59

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2017 года*

Рецензент
кафедра ботаники и микробиологии ЯрГУ

Составитель
Н. В. Шеховцова

Микробиология и вирусология : учебно-методическое
М59 пособие / сост. Н. В. Шеховцова ; Яросл. гос. ун-т
им. П. Г. Демидова. — Ярославль : ЯрГУ, 2017. — 64 с.

Пособие состоит из двух разделов. Первый включает шесть основных тем курса и посвящен бактериологии, в нем описаны лабораторные работы и даны необходимые для их выполнения теоретические сведения. Второй содержит общую теорию по вирусологии и описание заданий для самостоятельной работы студентов.

Предназначено для студентов, изучающих дисциплину «Микробиология и вирусология».

УДК 579:578(072)
ББК Е4я73

© ЯрГУ, 2017

Настоящее учебно-методическое пособие написано в помощь обучающимся в бакалавриате по направлению «Биология» и предназначено для самостоятельной подготовки студентов к лабораторным и практическим занятиям по курсу «Микробиология и вирусология».

В результате освоения дисциплины обучающийся должен знать особенности строения, метаболизма, размножения бактерий, архей и вирусов, их значение в природе и области применения микроорганизмов; уметь приготовить бактериальный препарат, рассмотреть его под микроскопом и оформить свои наблюдения, сделать посев микроорганизмов и произвести их качественный и количественный учёт; владеть представлениями о современных подходах к идентификации и систематике прокариотных микроорганизмов и вирусов, навыками работы с бактериями в лабораторных условиях, быть готовыми выполнять микробиологическую работу в соответствии с методическими рекомендациями и стандартными операционными процедурами.

Раздел I. Бактериология

Тема 1. Введение в работу

микробиологической лаборатории.

Методы микробиологических исследований

1.1. Основные методы микробиологического исследования

Микроскопический метод — изучение живых и убитых микроорганизмов в нативном или обработанном виде с помощью микроскопа. Основные виды микроскопов: световые, люминесцентные, электронные и лазерные. С помощью обычных световых микроскопов можно изучать живые или фиксированные микроорганизмы в светлом поле, с помощью дополнительных устройств вести прижизненные наблюдения в темном поле или фазовом контрасте. Для количественных исследований широко применяют люминесцентную микроскопию. Тонкое строение прокариот и вирусов (объекты менее 0,2 мкм) изучают с помощью просвечивающей или сканирующей электронной микроскопии, которая дает увеличение до 300 000. Развитие электронной техники сделало доступным для микробиологических исследований в XXI в. применение сканирующих зондовых, атомно-силовых, конфокальных сканирующих и лазерных интерференционных микроскопов. Это дает новые возможности для изучения группового поведения (*quorum sensing*) бактерий и формирования биопленок: получать 3D-изображения поверхностных ультраструктур с молекулярным разрешением в режиме реального времени в физиологических условиях, в определении технических параметров биопленок, включая прижизненное определение биомассы и др.

Микробиологический метод — выращивание микроорганизмов на питательных средах. При этом выделяют чистую культуру микроорганизмов и изучают её свойства. С этой целью исследуемый материал засевают на различные питательные среды.

Серологический метод — изучение антигенных свойств микроорганизмов с помощью иммунохимических реакций, в которых в качестве тест-систем применяются клетки крови экспериментальных животных или человека. Используется в микробиологии

для идентификации вида микроорганизма или штамма (серотипа, серовара), что важно в медицине для определения инфекционного заболевания и/или заключения о перенесённых заболеваниях.

Экспериментальный или биологический метод – изучение некоторых свойств микроорганизмов, в частности патогенности и/или вирулентности, на лабораторных животных. Применяется в иммунологии и медицине.

1.2. Приготовление простых бактериальных препаратов-мазков

Включает следующие этапы:

- а) приготовление препарата,
- б) высушивание,
- в) фиксация,
- г) окраска.

Для работы используют предметное стекло (78×26 мм). Стекло должно быть чистым и обезжиренным. Чтобы обезжирить стекло, натирают одну из его поверхностей кусочком хозяйственного мыла, потом удаляют его следы сухой ватой.

А. Приготовление препарата начинается с нанесения на обезжиренную поверхность стекла маленькой капли дистиллированной воды. Стекло кладется на стеклянную рейку, помещенную над кюветой.

Небольшое количество культуры, выросшей на поверхности твердой питательной среды, извлекается из пробирки или чашки Петри при помощи бактериологической петли с соблюдением правил стерильности. Бактериологические петли делают, используя тонкую проволоку из платины или нихрома, которую закрепляют в металлическом держателе или впаивают в стеклянную палочку, диаметр бактериологической петли 4–5 мм. Петлю перед взятием клеток микроорганизмов стерилизуют. Для этого проволоку накаливают докрасна в пламени спиртовки и одновременно обжигают примыкавшую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. Петлю рекомендуется держать в пламени спиртовки почти вертикально, чтобы проволока была равномерно

раскалена на всем протяжении. При прокаливании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени, поэтому не следует опускать петлю непосредственно к спиртовке. Сразу же после стерилизации петлю вводят в пробирку с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки, петлю охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности пробирки, чашки или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы. Для этого пробирку или чашку Петри берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с налетом выросших микроорганизмов была обращена кверху и хорошо видна. В правую руку петлю берут так, как держат карандаш, и прокалывают её в пламени спиртовки, затем, не выпуская петли, открывают чашку Петри в стерильной зоне и извлекают бактериальную массу. Закрывают чашку, а извлеченный материал используют для приготовления препарата. Для этого равномерно эмульгируют его в капле воды.

Б. Высушивание. Приготовленные мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате при 28 °С. Нельзя подогреть, т. к. при интенсивной потере влаги происходит быстрое свертывание белков и клетка теряет естественную форму.

В. Фиксация. Мазки фиксируют после полного их высыхания с целью закрепления на стекле. Кроме того, убитые микробы лучше воспринимают окраску.

Способы фиксации:

I — в пламени спиртовки. Стекло берут пинцетом и проводят через верхнюю часть пламени два-три раза (около 2 с). После фиксации мазку следует дать остыть. Длительная фиксация может изменить структуру клетки, а недостаточно зафиксированный мазок смывается со стекла при последующей обработке.

II — химическими веществами (в этаноле 15–30 мин, спирт + эфир 2–5 мин). Фиксацию производят, наливая фиксирующую жидкость на мазок или погружая мазок в кювету с такой жидкостью.

Г. Окраска препарата. Способы окраски можно разделить на две группы: ориентировочные, или простые, позволяющие сде-

лать вывод о морфологии культур, и дифференциальные, или сложные, выявляющие химические структурные особенности бактериальных клеток.

При простом методе окраски используют один красящий раствор. На фиксированный препарат помещают несколько капель красящего раствора так, чтобы покрыть всю поверхность мазка. Красными красителями красят 1–2 мин, а синими — 3–5 мин. Затем краску смывают дистиллированной водой, а мазок просушивают между листочками фильтровальной бумаги или на воздухе.

Микроскопируют с помощью иммерсионной системы (увеличение $10,0 \times 1,0 \times 100$ или аналогичное). Зарисовывают поле зрения под микроскопом, отражая морфологию окрашенных культур (рис. 1).

Оформление записей

В лабораторном журнале (альбоме или тетради) должны быть записаны сведения, имеющие отношение к выполнению данной работы, в следующем порядке:

1. Тема занятия.
2. Объект исследования.
3. Материалы.
4. Ход работы и полученные результаты.
5. Собственные наблюдения и выводы.

Журнал с записями и зарисовками, сделанными в ходе занятия, представляется преподавателю.

Техника безопасной работы

1. Порядок работы со спиртовками.
 - 1.1. Открыть крышку спиртовки и с помощью пинцета поправить фитиль так, чтобы он был вытянут в вертикальном положении.
 - 1.2. Зажечь спиртовку и не приподнимать держатель фитиля в течение всего времени её использования.
 - 1.3. Над горящей спиртовкой не наклоняться, не подносить к ней легковоспламеняющиеся предметы (бумагу, вату и т. п.), не оставлять без присмотра, не прекратив её горение.

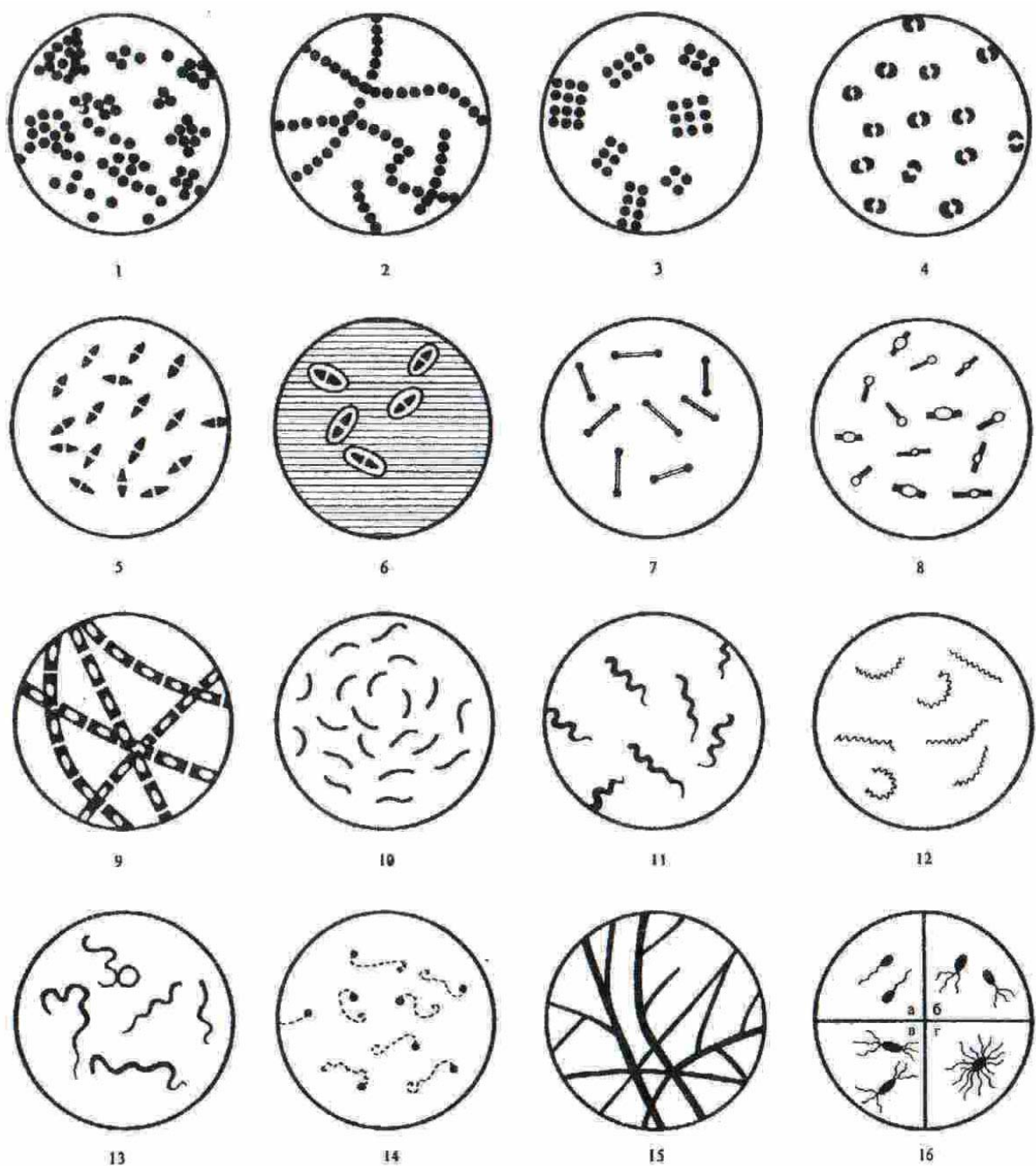


Рис. 1. Основные формы бактерий

1) стафилококки, 2) стрептококки, 3) сарцина, 4) гонококки, 5) пневмококки, 6) капсула пневмококков, 7) коринебактерии дифтерии, 8) клостридии, 9) бациллы, 10) вибрионы, 11) спириллы, 12) трепонемы, 13) бореллии, 14) лептоспиры, 15) актиномицеты, 16) расположение жгутиков: а — монотрихи, б — лофотрихи, в — амфитрихи, г — перитрихи

2. Работа в лаборатории микробиологии разрешается только в халатах, в ней нельзя есть и пить.

3. Работа с бактериальными культурами.

3.1. Клетки микроорганизмов для приготовления препаратов-мазков берут бактериологической петлей, открывая пробирку или чашку Петри в зоне пламени (в диаметре 2–7 см).

3.2. Оставшиеся на петле после приготовления препарата клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки. Прокаливание петли в этом случае начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу для того, чтобы микробная масса, оставшаяся на петле, подсохла. Затем петлю переводят в вертикальное положение и прокаливают докрасна. Такой порядок стерилизации петли необходим потому, что при быстром нагревании влажной микробной массы происходит её разбрызгивание и образуется аэрозоль, загрязняющий воздух. Только после прокаливания петлю можно положить на место.

3.3. Если посуда с чистой культурой разобьётся, надо тщательно собрать разбитые части и поместить их в дезинфицирующий раствор (2–3 %-й раствор бикарбоната натрия, 3–5 %-й раствор фенола, 0,5–3 %-й раствор хлорамина и некоторые другие дезинфектанты), руки тщательно вымыть мылом, дезинфицирующим раствором. Тщательно протереть место попадания культуры дезраствором.

3.4. На столе, где ведут работу с бактериальными культурами, не должно быть лишних предметов, мусора.

3.5. После окончания работы рабочий стол протирают, руки тщательно моют с хозяйственным мылом.

1.3. Дифференциальные методы окраски

1.3.1. Окраска мазка по Граму

Если фиксированные клетки микроорганизмов обработать сначала кристаллическим фиолетовым, а затем йодом, на поверхности клеток образуется окрашенный комплекс. При последующей обработке спиртом в зависимости от строения клеточной стенки судьба комплекса будет различна: у грамположительных видов этот комплекс удерживается клеткой, и последние остаются окрашенными;

у грамотрицательных видов окрашенный комплекс вымывается из клеток, и они обесцвечиваются. При докрасивании фуксином грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные — красный.

Техника окрашивания:

1. Готовить бактериальный препарат до стадии фиксирования.
2. Фиксированный препарат окрасить через фильтровальную бумагу карболовым генцианвиолетом 2 мин.
3. Снять бумагу и, не промывая водой, 1 мин протравливать мазок раствором Люголя (при этом мазок чернеет).
4. Слить раствор Люголя и на 30 с нанести на препарат спирт с йодом (2 мл 10 %-го раствора йода на 100 мл этанола). Обработка спиртом проводится до прекращения отхождения лиловых струек.
5. Быстро промыть мазок водой. Высушить между полосками фильтровальной бумаги.
6. Докрасить мазок фуксином 2 мин через фильтровальную бумагу.
7. Смыть краску водой, высушить между полосками фильтровальной бумаги и микроскопировать.

Примечание: дифференциальный метод окраски по Граму дает четкие результаты при соблюдении ряда существенных условий:

- возраст культуры: обычно окраске по Граму подвергают суточные культуры бактерий, в «старых» культурах тинкториальные свойства микроорганизмов могут быть смазаны;
 - концентрация бактерий в мазке: надо избегать скопления «глыбок», в них результаты могут быть искажены;
 - сушка препарата не должна быть горячей;
 - нельзя травмировать клетки петлей на предметном стекле в ходе приготовления мазка;
 - фиксация препарата должна быть только над пламенем спиртовки (химические фиксаторы исключаются). Окрашивать можно лишь полностью остывший мазок.
8. Сделать вывод о грампринадлежности исследуемых культур.
 9. Составить сводную таблицу на группу о грампринадлежности различных видов бактерий.

1.3.2. Окраска капсул по Ольту

Клетки многих микроорганизмов при росте их на богатых углеводами средах могут быть окружены рыхлым слоем – капсулой. По химическому составу эти поверхностные структуры в основном представлены полисахаридами и плохо фиксируют краситель, который легко смывается в процессе обработки препарата.

Техника окрашивания:

1. Готовить бактериальный препарат до стадии фиксирования.
2. Фиксированный препарат красить 2 %-м водным раствором сафранина в течение 1–2 мин.
3. Смыть краску водой, высушить между полосками фильтровальной бумаги.
4. Препарат рассматривать в воде: на мазок нанести каплю воды, накрыть покровным стеклом, на него капнуть иммерсионное масло. Тело бактерии и капсула различно преломляют лучи света. Тело микроба окрашивается в коричнево-красный цвет, капсулы — в бледно-желтый.
5. Сделать вывод о способности бактерий к капсулообразованию.

1.3.3. Приготовление препаратов «висячая» и «раздавленная» капля

Для наблюдения живых клеток (их морфологии, подвижности) используют микроскопию неокрашенных культур. Подвижность определяют у клеток молодой культуры (чаще суточной), поскольку с возрастом клетки могут её терять.

Способность к движению у большинства микроорганизмов обусловлена наличием жгутиков. Расположение и количество их у различных бактерий варьирует и имеет диагностическое значение. По характеру движения бактерий в препарате можно предположительно судить о типе жгутикования. Если жгутики расположены на одном или на двух полюсах клетки, то движение обычно очень быстрое, «ввинчивающееся», без покачивания из стороны в сторону. При латеральном расположении жгутиков клетки двигаются плавно, совершая колебательные отклонения от оси движения.

Бактериальный жгутик неразличим в световом микроскопе, если он не окрашен особым способом, который увеличивает кажущуюся толщину жгутика.

Методика приготовления «висячей» капли

1. Используют специальные стекла с луночкой, покровные стекла, вазелин. Края луночки покрыть небольшим слоем вазелина.

2. На покровное стекло нанести каплю дистиллированной воды, а затем внести в каплю культуру бактерий, выращенную на поверхности твердой питательной среды.

3. Осторожно стеклом с луночкой, края которой смазаны вазелином, покрыть покровное стекло с каплей культуры так, чтобы капля осталась в центре. Получается герметически закрытая камера. Склеившиеся стекла быстро перевернуть вверх покровным стеклом. Если препарат приготовлен правильно, капля будет висеть в камере и не высохнет в течение длительного времени.

4. Сделать вывод о способе движения исследуемых культур.

Методика приготовления «раздавленной» капли

1. На предметное стекло в капельку дистиллированной воды внести исследуемую культуру бактерий.

2. Сверху накрыть покровным стеклом так, чтобы при этом не образовались пузырьки воздуха, мешающие изучению препарата под микроскопом.

1.3.4. Окраска спор по методу Пешкова

Метод основан на окрашивании споры и цитоплазмы при нагревании. Промывание препарата водой ведет к обесцвечиванию цитоплазмы, тогда как спора прочно удерживает краситель.

Техника окрашивания

1. Готовить бактериальный препарат до стадии фиксирования.

2. После фиксации в пламени мазок красить при нагревании метиленовым синим по Лефлеру, доведя краситель до кипения. Продолжительность окраски, считая с момента закипания, 10–20 с. Не следует допускать высыхания красителя (по мере испарения до-

бавляют новые порции красителя, предварительно охлаждая стекло).

3. Дать препарату остыть, а затем промыть водой.

4. Докрашивать 0,5 %-м раствором нейтрального красного или сафранина в течение 30 с. 5. Краситель смыть, препарат промыть водой, высушить между полосками фильтровальной бумаги. При правильной окраске споры окрашиваются в голубовато-синий цвет, а бактериальные клетки — в красный.

6. Сделать вывод о способности бактерий к спорообразованию и методах окраски спор.

Вопросы для обсуждения

1. Принципы организации микробиологических лабораторий.
2. Морфология клеток прокариот.
3. Строение клеточных стенок прокариот.
4. Сущность окраски по Граму.
5. Место грамотрицательных и грамположительных бактерий в системе прокариот.
6. Механизмы движения прокариот. Таксисы.
7. Строение и функционирование жгутиков бактерий. Виды подвижности, обусловленные работой жгутиков.
8. Эндоспоры бактерий. Строение, образование.
9. Строение и функциональное значение капсул.

Тема 2. Физиология, питание и культивирование микроорганизмов

Характеристика питательных сред

Питательные среды для культивирования микроорганизмов классифицируют следующим образом.

А. По составу:

1. ***Натуральные*** среды состоят из продуктов животного или растительного происхождения (овощные и фруктовые соки, животные ткани, разведенная кровь, молоко, вода морей, озер, минеральных источников, отвары или экстракты, полученные из при-

родных субстратов, — мясо, почва, навоз, части растений). Достоинство этих сред — на них хорошо развиваются многие микроорганизмы. Недостаток — непригодность их для изучения обмена веществ микроорганизмов, т. к. такие среды имеют сложный непостоянный химический состав и в них трудно учесть потребление ряда компонентов и образование продуктов метаболизма. Используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления биомассы и для диагностических целей.

В лабораторной практике широко применяются мясопептонный бульон (МПБ), неохмелённое сусло, дрожжевой экстракт, почвенный экстракт, картофельная среда.

2. *Синтетические* — среды, в которые входят лишь соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах. Широко используются при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов. Примерами таких сред являются среды для различных физиологических групп бактерий (тионовых, почкующихся, азотфиксирующих, нитрифицирующих).

3. *Полусинтетические* — среды, содержащие соединения известного состава, такие как углеводы, соли аммония, нитраты, фосфаты и т. п. Однако в их состав всегда включаются вещества неопределенного состава, такие как дрожжевой автолизат, почвенный экстракт, гидролизат казеина, которые служат источником неизвестных дополнительных факторов роста. Полусинтетические среды находят широкое применение в промышленной микробиологии для получения аминокислот, витаминов, антибиотиков и других важных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. В лабораторной практике применяются для оживления микробных культур, выращиваемых на синтетических средах.

Б. По назначению:

1. *Элективные (селективные)* — обеспечивают преимущественное развитие определенной группы микроорганизмов, для которых характерна общность физиологических свойств. К факторам, определяющим элективность сред, относятся наличие или отсутствие органических субстратов в среде, аэробность или анаэробность, свет как источник энергии, отсутствие источника азота в сре-

де и т. п. При создании селективных условий необходимо знать физиологию или четко представлять те особенности, которыми должны обладать выделяемые микроорганизмы. Селективные среды применяют для получения накопительных культур определенных метаболических групп микроорганизмов.

2. **Дифференциально-диагностические (индикаторные)** — позволяют быстро отличить одни виды микроорганизмов от других или выявить некоторые их особенности. Широко применяют в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации определенных групп микроорганизмов. Примерами таких сред являются агар Эндо для выявления бактерий группы кишечной палочки, рН-индикаторные среды и т. д.

В. По физическому состоянию:

1. **Жидкие** — для накопления биомассы или продуктов обмена, для исследования физиологии и биохимии микроорганизмов, для поддержания и сохранения коллекции культур микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах, для определения количества микроорганизмов.

2. **Сыпучие** — для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений и для сохранения их культур в коллекциях. К таким средам относятся отруби, разваренное пшено, кварцевый песок, пропитанный питательным раствором, и др.

3. **Плотные** — для выделения чистых культур, в диагностических целях для описания колоний, их антибиотической активности, для хранения культур в коллекциях и в ряде других случаев. С целью уплотнения сред применяют агар-агар или желатин. Плотной основой могут служить пластинки силикагеля, которые пропитывают питательной средой (для синтетических сред строго определенного состава).

Методы стерилизации питательных сред и посуды

Стерилизация — в переводе с латинского «обеспложивание» — методы, применяемые в микробиологии для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов.

Таблица 1

Режимы стерилизации питательных сред и материалов

№ п/п	Вид стерилизации	Стерилизуемый материал
1.	Прокаливание в пламени и обжигание	Бактериологические петли, металлические инструменты, стеклянная и фарфоровая посуда, ватные пробки
2.	Сухожаровая стерилизация горячим воздухом при 160–170 °С в печи Пастера (сушильном шкафу) в течение 2 часов	Посуда, завернутая в бумагу, металлические инструменты, вазелиновое масло, тальк
3.	Дробная стерилизация (тиндализация) — прогревают несколько раз в парах кипящей воды или текучим паром в аппарате Коха или на водяной бане при 56–58 °С, а в период между прогреваниями дают прорасти жизнеспособным спорным формам	Среды, которые нельзя нагревать выше 100 °С
4.	Автоклавирование — стерилизация насыщенным паром под давлением в автоклаве	Питательные среды, которые не содержат легко разрушаемое вещество, посуда
5.	Кипячение	Мембранные фильтры, металлические инструменты, стеклянные детали
6.	Пастеризация — нагревание до 60–80 °С однократно 20 мин	Молоко, соки, пиво, вино
7.	Стерилизация фильтрованием	Среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревания

№ п/п	Вид стерилизации	Стерилизуемый материал
8.	Стерилизация облучением (УФ, рентгеновские лучи)	Помещение, медицинские принадлежности
9.	Газовая стерилизация (СО, Cl ₂ , O ₃ , SO ₃)	Изделия из термолабильных пластмасс, аппаратура с зеркальным, оптическим и радиоэлектронным оборудованием
10.	Стерилизация химическими веществами (спирт, фенол, перманганат калия)	Металлические инструменты, столы

Физиолого-биохимические свойства микроорганизмов

Характеристика физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов включает описание их способности расти на разных питательных средах и вызывать определенные превращения веществ, входящих в состав этих сред; отношение к молекулярному кислороду; ферментативную активность; способность образовывать антибиотические вещества и др.

Использование соединений углерода

Микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать различные соединения углерода для конструктивного и энергетического метаболизма. Из углеводов и многоатомных спиртов это, как правило, следующие соединения: арабиноза, ксилоза, глюкоза, фруктоза, манноза, сахароза, лактоза, декстрин, крахмал, целлюлоза, глицерол, маннит, сорбит и др. Рост микроорганизмов часто сопровождается накоплением органических кислот, газов. Многие микроорганизмы способны использовать в качестве единственного источника углерода органические кислоты, углеводороды.

Использование соединений азота

Многие микроорганизмы могут усваивать азот органических соединений (пептонов, аминокислот и белков). Процесс разложения белка сопровождается образованием побочных продуктов: аммиака, сероводорода, индола. Азот доступен бактериям в минеральных со-

лях (соли аммония и нитраты). Уникальной особенностью микроорганизмов является их способность фиксировать молекулярный азот.

Отношение к молекулярному кислороду

По отношению к молекулярному кислороду среди микроорганизмов выделяют группы облигатных аэробов и микроаэрофилов, факультативных, аэротолерантных и строгих анаэробов. Облигатные аэробы растут на поверхности среды и в верхнем слое столбика агара или жидкой среды в пробирке. Микроаэрофилы — на некотором расстоянии от поверхности. Факультативные анаэробы обычно развиваются по всей толще среды. Строгие анаэробы растут только в глубине среды, у самого дна пробирки.

Образование внеклеточных ферментов

Макромолекулы субстратов подвергаются расщеплению, которое осуществляется под воздействием экзоферментов. Крахмал подвергается гидролитическому расщеплению под действием амилаз (амилолитическая активность). Протеолитические ферменты катализируют расщепление белков на поли- и олигопептиды (протеолитическая активность). Активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатин, казеин или другие белки. Липиды подвергаются гидролитическому разложению под действием липаз (липолитическая активность).

Образование антибиотиков

В процессе жизнедеятельности многие микроорганизмы образуют специфические продукты, которые обладают высокой физиологической активностью по отношению к другим микроорганизмам, задерживая их рост или убивая их. Они называются антибиотиками. В отличие от общебиологических ядов антибиотики проявляют свое действие лишь по отношению к отдельным, вполне определенным видам или группам микроорганизмов.

2.1. Выделение чистой культуры анаэробов из почвы

Для выделения и культивирования анаэробов используют физические, химические и биологические методы и приемы выращивания:

- ***физические*** — в анаэроостате, в трубках Вейон-Виньяля, в высоком столбике агара;

- *химические* — в эксикаторах с добавлением редуцирующих веществ в среду;

- *биологические* — по Фортнеру.

Выделение осуществляется в несколько этапов. Результаты выделения документируются в виде протокола по следующей форме (табл. 2).

Таблица 2

Протокол № 1. *Выделение культуры анаэробных бактерий*

Дата анализа	Ход исследования	Результаты

Этап I

1. Приготовить препарат-мазок из взвеси почвы. Изучить микроскопическую картину. Сделать вывод о морфологических особенностях микроорганизмов *in situ*.

2. Для выделения анаэробов из взвеси почвы используют высокий столбик МПА, расплавленный и затем охлажденный до 45 °С. Внести в МПА стерильной пипеткой 1 мл почвенной суспензии и затем хорошо перемешать до застывания среды.

3. После полного охлаждения МПА пробирки с посевами поместить в термостат при 28 °С.

Этап II

1. Описать характер роста микроорганизмов в столбике агара. Для анаэробов характерны дисковидные колонии и колонии в виде комочков ваты, газообразные. Зарисовать макрокартину.

2. Подсчитать общее количество колоний в столбике МПА и рассчитать содержание анаэробных микроорганизмов в 1 г почвы по формуле:

$$N = n \times 100,$$

где N — количество микроорганизмов в 1 г почвы;

n — количество колоний в столбике МПА;

100 — коэффициент, учитывающий разведение образца почвы.

3. Описать подробно одну из колоний. С помощью шприца с водой вытеснить столбик из пробирки в пустую чашку Петри, разрезать агар-агар в месте нахождения выбранной колонии. Сделать микропрепарат. Зарисовать микроскопическую картину. Записать наблюдения.

4. Сделать вывод о численности анаэробных бактерий в почве и особенностях их выделения.

2.2. Выделение чистой культуры аэробов из смеси бактерий

Для выделения чистой культуры из смеси аэробных бактерий используют метод Коха. Принцип его — получение чистой культуры из отдельной колонии. Выделение осуществляется в несколько этапов. Результаты выделения документируются в виде протокола по вышеприведенной форме (табл. 2).

Этап I

1. Провести бактериоскопическое исследование смеси микробных культур: приготовить бактериальный мазок. Окрасить простым методом, препарат рассмотреть под микроскопом, зарисовать микроскопическую картину и описать наблюдения.

2. Расплавленную стерильную питательную среду, содержащую агар-агар, разлить в стерильные чашки Петри и дождаться, когда среда застынет.

3. Посев смеси бактерий на поверхность МПА провести бактериологической петлей методом истощающего штриха с целью механического разделения бактерий. При посеве площадь питательной среды используют максимально.

4. Чашки с посевами завернуть в бумагу крышкой вниз, подписать и оставить до следующего занятия в термостате.

Этап II

1. Рассмотреть посев смеси аэробов в чашке Петри. Крышку при этом не открывать. Зарисовать и описать макроскопическую картину роста колоний на питательной среде.

2. Выбрать отдельную колонию и характеризовать её по следующим признакам (рис. 2, 3):

форма — круглая, волокнистая, неправильная, ризоидная;
профиль — плоский, выпуклый;
край колонии — гладкий, волнистый, зубчатый, складчатый;
поверхность колонии — гладкая, шероховатая, мукоидная;
 блестящая, матовая;
степень прозрачности — прозрачная, непрозрачная; кон-
 сиденция — маслянистая, вязкая, сухая;
цвет — белый, розовый, серый, бежевый;
диаметр — в мм.

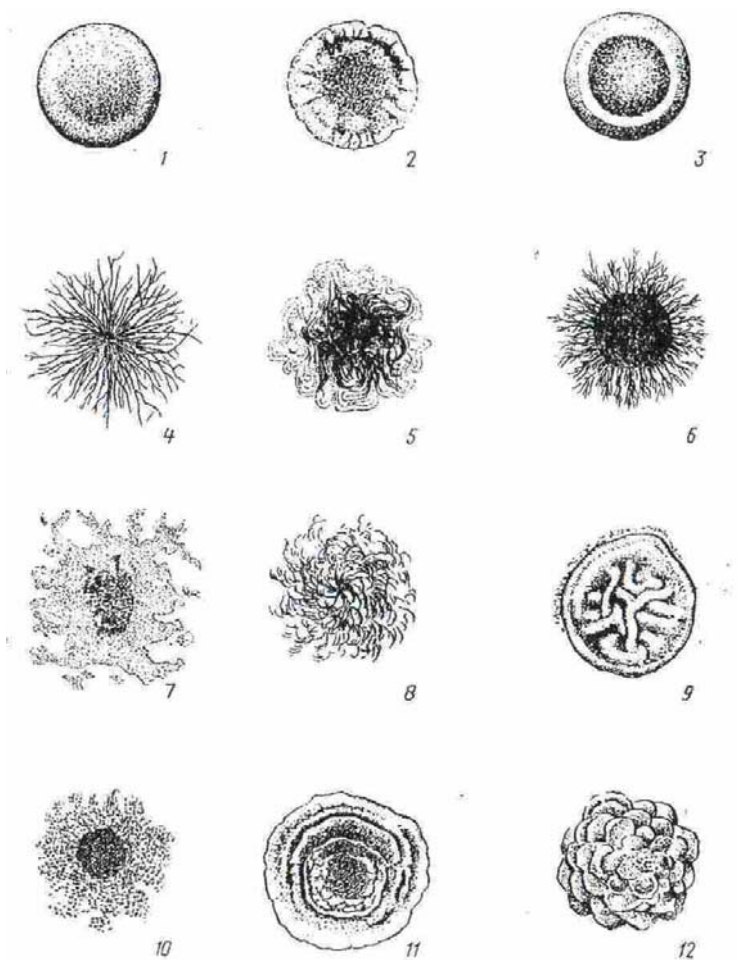


Рис. 2. Форма колоний: 1 — круглая, 2 — круглая с фестончатым краем, 3 — круглая с валиком по краю; 4, 5 — ризоидная, 6 — округлая с ризоидным краем, 7 — амёбовидная, 8 — нитевидная, 9 — складчатая, 10 — неправильная, 11 — concentрическая, 12 — сложная

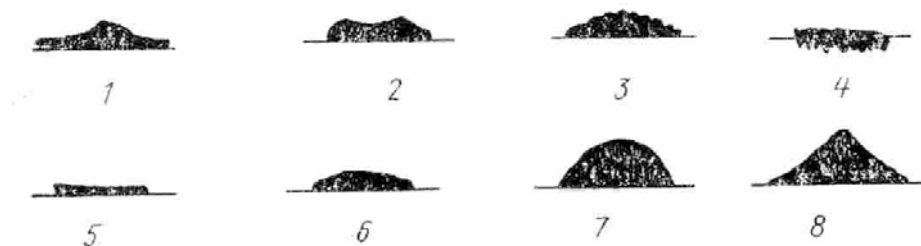


Рис. 3. Профиль колонии микроорганизмов: 1 — изогнутый, 2 — кратерообразный, 3 — бугристый, 4 — врастающий в агар, 5 — плоский, 6 — выпуклый, 7 — каплевидный, 8 — конусовидный

3. Проверить чистоту отобранной колонии: приготовить микропрепарат, окрасить фуксином, рассмотреть под микроскопом, зарисовать, описать наблюдения, сделать вывод о чистоте выделенной культуры.

4. Отобранную колонию пересеять в пробирку со стерильной средой МПА, приготовленной в виде скошенного агара, поместить в термостат.

Этап III

1. Проверить чистоту выделенной культуры: приготовить микропрепарат, микроскопировать. Отметить наличие или отсутствие спор.

2. Для изучения биохимической активности выделенной культуры произвести посев на ряд сред:

в столбик МПЖ — уколом бактериологической иглы до самого дна пробирки;

в столбик среды с сахарозой и индикатором ВР — уколом бактериологической иглы;

в высокий столбик МПА — уколом бактериологической иглы до самого дна пробирки.

3. Определить грампринадлежность и подвижность культуры.

4. Определить каталазную и оксидазную активность культуры.

а) **каталазный тест**: взаимодействие микробной культуры с раствором пероксида водорода сопровождается его разложением под влиянием каталазы клеток с образованием пузырьков кислорода. Приоткрыв пробирку, влить 0,5 мл 3 %-го раствора пероксида

водорода. Наблюдать за образованием пузырьков газа в течение первых 5 минут.

б) **оксидазный тест:** при взаимодействии бактериальной оксидазы с тетраметил-пара-фенилендиамином или другими диаминами в присутствии кислорода воздуха происходит окисление субстрата и образование хромогенного вещества. Стерильной петлей захватить большую массу микробной культуры, нанести на индикаторную бумагу (пропитанную 1 %-м раствором диамина) и растереть (втирая) в течение 30–60 с. Бактериальные культуры, не образующие оксидазы, остаются бесцветными. При положительном результате обычно через 30–60 с микробные колонии окрашиваются в ярко-синий или темно-красный (в зависимости от диамина) цвет.

Этап IV

1. Рассмотреть результаты посевов на средах.

А. **В среде с МПЖ** отмечают разжижение, если потребляется её затвердитель желатин. Желатин — вещество белковой природы, потреблять его могут микроорганизмы, выделяющие в среду протеолитические ферменты. Если среда разжижается, указать интенсивность и форму разжижения (рис. 4): послойное, кратеровидное, реповидное, воронковидное, мешковидное, пузыревидное.

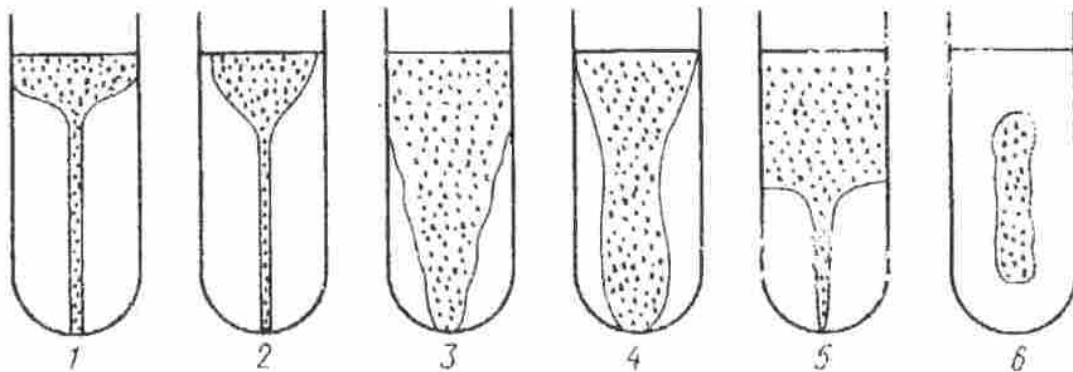


Рис. 4. Схема разжижения желатина: 1 — кратеровидное, 2 — реповидное, 3 — воронковидное, 4 — мешковидное, 5 — послойное, 6 — пузыревидное

Б. **Среда с сахарозой** содержит комбинированный индикатор ВР (смесь водного голубого и розоловой кислоты). В кислой среде

индикатор имеет синюю окраску, в щелочной — красную, при нейтральной реакции он бесцветен. Индикатор работает в пределах рН 4,5–8,0. Следовательно, по изменению цвета среды мы можем определить, идет ли потребление сахарозы данной культурой. Если цвет среды изменился и стал синим, то это свидетельствует об использовании сахарозы с превращением её до кислоты, если среда стала бесцветной, то использование сахарозы идет до CO_2 и H_2O , и наконец, красный цвет среды характеризует отсутствие сахаролитических свойств у бактерий.

В **В высоком столбике МПА** проверяется отношение исследуемой культуры к молекулярному кислороду. Строгие аэробы растут на поверхности среды и в верхнем слое. Микроаэрофилы — на некотором расстоянии от поверхности. Факультативные анаэробы обычно развиваются по всей толще среды. Строгие анаэробы растут только в глубине среды, у самого дна пробирки.

2. На основании полученных физиолого-биохимических свойств определить род и вид выделенных бактерий, пользуясь определителем и табл. 3–6.

Сокращенный определитель некоторых форм бактерий

1. Кокки	2
- палочки	3
2. Рост одиночными клетками, парами или скоплениями (табл. 3)	p. <i>Micrococcus</i>
3. Грамположительные спорообразующие (табл. 4)	p. <i>Bacillus</i>
- грамтрицательные, бесспорные	4
4. Оксидазоположительные (табл. 5)	p. <i>Pseudomonas</i>
- оксидазоотрицательные (табл. 6)	сем. Enterobacteriaceae

Таблица 3

Некоторые диагностические признаки видов рода *Micrococcus*

Физиолого-биохимические свойства	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus roseus</i>
Подвижность	–	–
Окраска по Граму	+	+
Каталаза	+	+
Оксидаза	+	+
Желатин	–	–
Сахароза	+	+
Анаэробный рост	–	–
Образование пигмента	желтый	розовый

Таблица 4

Некоторые диагностические признаки видов рода *Bacillus*

Физиолого-биохимические свойства	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Подвижность	–	–	+
Окраска по Граму	+	+	+
Каталаза	+	+	+
Оксидаза	+	+	+
Желатин	+	+	+
Сахароза	–	±	+
Анаэробный рост	+	–	–

Таблица 5

Некоторые диагностические признаки видов рода *Pseudomonas*

Физиолого-биохимические свойства	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Подвижность	+	+	+
Окраска по Граму	–	–	–
Каталаза	+	+	+
Оксидаза	+	+	+

Физиолого-биохимические свойства	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Желатин	+	+	–
Сахароза	–	+	–
Анаэробный рост	–	–	–

Таблица 6

**Некоторые диагностические признаки
видов семейства *Enterobacteriaceae***

Физиолого-биохимические свойства	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Подвижность	+	–	+
Окраска по Граму	–	–	–
Каталаза	+	+	+
Оксидаза	–	–	–
Желатин	–	–	+
Сахароза	+	+	+
Анаэробный рост	+	+	+

3. Сделать вывод о видовой принадлежности полученной чистой культуры аэробов.

Вопросы для обсуждения

1. Питательные среды, их характеристика.
2. Способы существования микроорганизмов.
3. Принципы составления сред для культивирования бактерий.
4. Методы стерилизации питательных сред и посуды.
5. Строение автоклава.
6. Автоклавирование.
7. Особенности культивирования аэробов и анаэробов.
8. Физиолого-биохимические свойства бактерий (использование соединений углерода и азота, отношение к кислороду, образование внеклеточных ферментов и антибиотиков).

Тема 3. Метаболизм бактерий

Молочнокислое брожение

Молочнокислое брожение — это анаэробный процесс разложения углеводов ферментами молочнокислых бактерий с образованием только молочной кислоты (гомоферментативное брожение) или смеси, включающей помимо молочной кислоты CO_2 этанол и/или уксусную кислоту (гетероферментативное брожение).

Возбудителями гомоферментативного брожения являются микроорганизмы: *Streptococcus lactis* — имеет вид овальных кокков диаметром 0,5–1 мкм, которые располагаются в структуре попарно (диплококки) или короткими цепочками (стрептококки); *Streptococcus cremoris* — клетки расположены более длинными цепочками; *Lactobacillus bulgaricus* — крупная палочка длиной 4–5 мкм, неподвижная, грамположительная, располагается в виде отдельных клеток и коротких палочек, оптимальная температура её развития 40–45 °С; *Lactobacillus acidophilus* по морфологии близка к *L. bulgaricus*, но имеет другой температурный оптимум развития — 37 °С, используется для изготовления ацидофилина.

Микроорганизмы гетероферментативного молочнокислого брожения чаще встречаются в заквашенных овощах и силосе. К ним относятся *Lactobacillus brevis*, *L. brassicea*, *Leuconostok mesenteroides* (разновидности палочковидных форм, одиночных или в коротких цепочках).

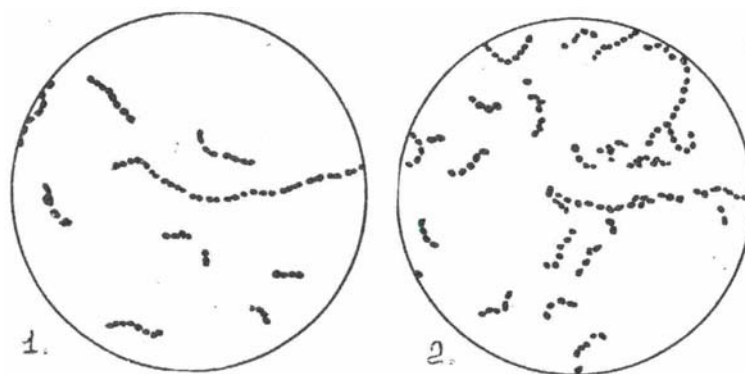


Рис. 5. Молочнокислые бактерии: 1 — *Streptococcus cremoris*,
2 — *Streptococcus thermophilus*

3.1. Разнообразие молочнокислых бактерий

1. Взять кисломолочные продукты: простоквашу, сметану, кефир, йогурт и др., а также рассол квашеных огурцов или сок квашеной капусты, квас, чайный гриб и пр.

2. Приготовить препараты для изучения под микроскопом.

Техника приготовления препарата из кефира или йогурта:

- Стерильной петлей взять немного кефира и сделать тонкий мазок.

- Высушить на воздухе.

- Фиксировать и одновременно обезжировать мазок смесью Никифорова (спирт + эфир в соотношении 1:1) 10 мин несколько раз. В течение этого времени смесь наливают и сливают с мазка. Этот способ фиксации освобождает мазок от молочного жира, который мешает рассмотреть препарат.

- Препарат высушить и окрасить метиленовым синим в течение 3–5 мин.

- Промыть водой, просушить между полосками фильтровальной бумаги. Препарат готов для микроскопирования.

Техника приготовления препарата из рассола огурцов:

- Приготовить препарат-мазок до стадии фиксирования.

- Зафиксировать над пламенем спиртовки.

- Окрасить метиленовым синим в течение 5 мин.

- Слегка промыть дистиллированной водой и высушить между полосками фильтровальной бумаги. Препарат готов для микроскопирования.

3. Рассмотреть препараты под микроскопом, зарисовать и описать наблюдения.

4. Сделать вывод о разнообразии микроорганизмов в кисломолочных продуктах.

3.2. Выделение молочнокислых бактерий

Этап I

1. Для получения накопительной культуры молочнокислых бактерий в пробирки с сусликом (10 мл) добавить 12 % этанола и внести 1 мл кисломолочного продукта.
2. Ход исследования описать в протоколе по форме табл. 2.

Этап II

1. Просмотреть пробирки с накопительными культурами молочнокислых бактерий. Отобрать не имеющие пленки. Пленку дают дрожжи, и в этом случае молочнокислые бактерии выделить трудно.
2. Приготовить в стерильной водопроводной воде 3 последовательные десятикратные разведения из накопительной культуры.
3. Внести 0,3 мл суспензии из последнего разведения на дно чашки Петри (глубинный способ).
4. В расплавленную среду (суслик-агар) перед посевом внести немного стерильного мела и тщательно перемешать.
5. Посевной материал залить предварительно охлажденным до 45 °С суслик-агаром с мелом. После застывания среды чашки поместить в термостат.



Рис. 6. Зоны растворения мела вокруг колоний молочнокислых бактерий

Этап III

1. Рассмотреть чашки с посевом. Зарисовать макроскопическую картину.

2. Выбрать колонии, вокруг которых наблюдаются зоны растворения мела в результате образования бактериями молочной кислоты.

3. Прокаленной петлей расплавить агар и отобрать немного биомассы из выбранной колонии. Сделать микропрепарат.

4. Рассмотреть микропрепарат под микроскопом. Зарисовать микроскопическую картину, описать наблюдения.

5. Сделать вывод об особенностях выделения молочнокислых бактерий.

Вопросы для обсуждения

1. Процесс гликолиза и его значение в энергетическом метаболизме прокариот. Особенности молочнокислого брожения.

2. Гомоферментативное молочнокислое брожение, его механизмы и микроорганизмы, его осуществляющие, их распространение.

3. Гетероферментативное молочнокислое брожение, его механизмы; микроорганизмы, его осуществляющие, их распространение.

4. Разнообразие видов брожения, их значение для биосферы и человека.

Тема 4. Наследственность и изменчивость прокариот

Геном прокариот представлен одной кольцевой хромосомной двухцепочечной молекулой ДНК. Помимо этого, клетки прокариот могут содержать и нехромосомные гены, которые содержат плазмиды, мигрирующие элементы, транспозоны и/или умеренные бактериофаги. В результате многие свойства (устойчивость к антибиотикам и токсическим веществам, факторы патогенности и т. п.) бактерии и археи приобретают в результате горизонтального переноса генов и обмена нехромосомными генами. Кроме того, экспрессия и активность хромосомных генов зависит от условий окружающей среды и проявляется в виде фенотипической изменчивости.

4.1. Фенотипическая изменчивость *Proteus vulgaris*

Для изучения фенотипической изменчивости *P. vulgaris* культивируют параллельно на скошенной среде МПА и МПА с фенолом. На МПА без фенола *P. vulgaris* дает ползучий (сливной) рост, затягивая всю поверхность агара. На МПА с фенолом наблюдается рост отдельных очерченных колоний из-за утраты подвижности бактериями, поскольку в присутствии фенола *P. vulgaris* жгутиков не образует. Это пример фенотипической изменчивости микроорганизмов.

Этап I

1. Провести посев культуры *P. vulgaris* на скошенный МПА и МПА, в который предварительно добавили 0,3 мл 1 %-го раствора фенола.

2. Посевы инкубировать при 37 °С.

Этап II

3. Зарисовать макроскопическую картину и описать характер роста культуры на обеих средах.

4. Из каждой культуры приготовить препарат «висячая» или «раздавленная» капля для определения подвижности бактерий. Препараты просмотреть под микроскопом, зарисовать, описать наблюдения, отметив наличие или отсутствие подвижности бактерий.

5. Пересеять культуру *P. vulgaris*, выращенную на среде с фенолом, на скошенный МПА без фенола.

6. Посевы инкубировать при 37 °С.

Этап III

7. Зарисовать макроскопическую картину и описать характер роста культуры на МПА.

8. Приготовить препарат «висячая» или «раздавленная» капля, микроскопировать, отмечая наличие или отсутствие подвижности бактерий.

9. Сделать вывод об особенностях фенотипической изменчивости микроорганизмов и факторах, вызывающих её проявление.

Вопросы для обсуждения

1. Генетический аппарат прокариот.
2. Особенности строения хромосомной ДНК бактерий и архей.
3. Нехромосомные генетические элементы прокариот.
4. Механизмы рекомбинации у бактерий.
5. Изменчивость прокариот.
6. Явление диссоциации и его адаптивное значение.

Тема 5. Микробиология внешней среды

Микробиология внешней среды имеет большое значение в жизни человека и подлежит санитарно-гигиеническому нормированию. Особенно строго она контролируется в медицинских учреждениях и на предприятиях пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Наибольшее внимание уделяется микробиологическому контролю воздушной среды как первостепенному пути инфицирования человека. В воздух микроорганизмы попадают с пылью, почвенными частицами, аэрозолями. Источником контаминации воздуха является и сам человек, выделяя в окружающую среду огромное количество микроорганизмов, в том числе в процессе дыхания. Эти факторы учитываются при разработке санитарно-гигиенических требований и правил техники безопасности в соответствующих учреждениях.

5.1. Бактериальные ценозы предметов

Этап I

1. Стерильный ватный тампон смочить стерильной водой и протереть им 24–30 см² произвольно выбранного предмета.
2. Тампон поместить в колбу со стерильной водой и поставить на качалку на 10 мин.
3. Разлить МПА в чашки Петри.
4. На поверхность застывшей среды стерильной пипеткой внести 0,1 мл жидкости из колбы. Стерильным шпателем Дригальского равномерно распределить нанесенную жидкость по поверхности среды.

5. Чашку завернуть в бумагу и поместить в термостат.

Этап II

6. Рассмотреть чашки с посевами микроорганизмов с предметов. Подсчитать число микроорганизмов на чашке и определить число микроорганизмов на 24–30 см² по формуле:

$$C = N \times a/v,$$

где C — количество микроорганизмов на 24–30 см²;

N — число колоний на чашке Петри;

a — объем воды в колбе (50 мл);

v — объем суспензии, нанесенный на чашку (0,1 мл).

7. Оценить разнообразие видов, выросших на чашке. Выявить наличие спорообразующих микроорганизмов.

8. Составить сводную таблицу (табл.7) на группу.

Таблица 7

Обсемененность предметов в IV учебном корпусе ЯрГУ

№ п/п	Предмет	Число м/о на 24–30 см ²	Число видов
1			
2			

4. Сделать вывод о степени загрязненности предметов в зависимости от их местонахождения, использования и особенностей поверхности.

5.2. Бактериальный ценоз воздуха

В окружающем нас воздухе содержится большое количество сапротрофных и патогенных микроорганизмов, попадающих в него с пылью, выделяемых при чихании, кашле, разговоре.

Для ориентировочного и сравнительного определения загрязненности воздуха наиболее прост седиментационный метод, при котором учитывается общее количество микроорганизмов, осевших на пластинку МПА чашки Петри за единицу времени. Более точно содержание микроорганизмов в 1 м³ воздуха определяют аспираци-

онным методом с помощью современных приборов — импакторов, аналогов аппарата Кротова.

Этап I

1. Стерильную чашку Петри залить МПА.
2. После застывания среды чашку оставить открытой в течение 5 мин в интересующем исследователя месте (лаборатория, столовая, коридор, библиотека и др.).
3. Чашку закрыть, завернуть в бумагу и поместить в термостат при 28 °С.

Этап II

1. Изучить макроскопический рост культур на чашках Петри, в которых был произведен посев воздуха. Зарисовать общую картину роста. Описать видовое разнообразие; наличие бактериальных и актиномицетных форм.
2. Подсчитать число микроорганизмов на чашке и пересчитать, сколько бактерий содержится в 1 м³ воздуха исследуемого помещения, исходя из того, что на поверхность площадью 100 см² за 5 мин оседают микроорганизмы из 10 л воздуха (по В. Л. Омелянскому).
3. Составить сводную таблицу на группу по форме табл. 8.

Таблица 8

Бактериальная обсемененность воздуха в IV учебном корпусе ЯрГУ

№ п/п	Помещение	Число микроорганизмов в 1 м³

4. Сделать вывод о загрязненности воздуха в разных помещениях, сравнивая полученные величины с критериями санитарной оценки воздуха жилых помещений (табл. 9).

Критерии для санитарной оценки воздуха

Оценка воздуха	Летний режим	Зимний режим
	Численность микроорганизмов, КОЕ/м ³	
Чистый	1 500	4 500
Загрязненный	2 500	7 500

Вопросы для обсуждения

1. Почва как среда обитания микроорганизмов.
2. Вода как среда обитания микроорганизмов.
3. Персонал как источник контаминации окружающей среды.
4. Микроорганизмы, ассоциированные с растениями.
5. Особенности микробиоценоза воздуха.

Тема 6. Взаимодействие микроорганизмов с другими организмами

6.1. Антибиоз микроорганизмов

Для изучения антагонистических свойств микроорганизмов используют метод агаровых блочков. С этой целью культуры продуцентов антибиотиков предварительно выращивают на МПА сплошным газоном, из которого далее стерильным пробочным сверлом вырезают агаровые блочки для наложения их на поверхность свежепосеянной культуры тест-микроба.

Этап I

1. Взять жидкую музейную тест-культуру и посеять её на поверхность МПА сплошным газоном, используя пипетку на 0,1–0,2 мл и шпатель Дригальского.

2. Вырезать и наложить на поверхность свежего посева агаровые блочки, вырезанные из культуры продуцента антибиотика при соблюдении правил асептики.

3. Чашку Петри с посевом тест-культуры поставить в термостат при 28 °С.

Этап II

1. Рассмотреть чашку с посевом. Зарисовать макроскопическую картину.
2. Измерить диаметр зоны подавления роста тест-культуры.
3. Заполнить сводную таблицу на группу по форме табл. 10.

Таблица 10

Количество гемолитических видов микроорганизмов (м/о) зева

№ п/п	ФИО студента	Видовое разнообразие микроорганизмов зева (отметить гемолитические виды)	Количество заболеваний в год (диагнозы)

6.2. Бактерии зева

В качестве характеристики бактерий из зева человека производят посев слизи с миндалин. На миндалинах обнаруживаются главным образом стрептококки, включая гемолитические, а также стафилококки и коринебактерии. Иногда встречаются энтеробактерии родов *Proteus*, *Klebsiella*, синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), а также фузобактерии, спириллы и вибрионы.

Этап I

1. Слизь собрать при помощи стерильного ватного тампона.
2. Сделать посев на чашки Петри с кровяным агаром, легко прикасаясь к поверхности в нескольких местах ватным тампоном.
3. Чашку завернуть в бумагу и поместить в термостат при 37 °С.

Этап II

1. Рассмотреть посев с миндалин на кровяном агаре. Отметить колонии, вокруг которых образовались зоны просветления среды. Это свидетельствует о гемолизе входящей в его состав крови. Зарисовать макрокартину посева.
2. Сделать препараты-мазки из колоний, имеющих зоны гемолиза. Зарисовать и описать микроскопическую картину.

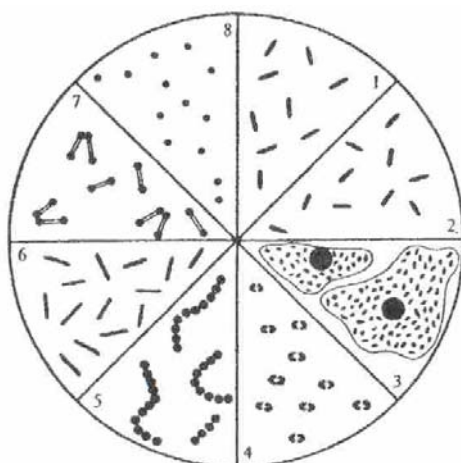


Рис. 7. Бактерии — возбудители инфекции дыхательных путей:
 1 — бордетеллы, 2 — легионеллы, 3 — хламидии, 4 — менингококки,
 5 — стрептококки, 6 — микобактерии туберкулеза, 7 — коринебактерии
 дифтерии, 8 — микоплазмы

3. Сделать сводную таблицу на группу по форме табл. 10.

4. Сделать вывод о наличии гемолитического стрептококка на миндалинах студентов и частоте заболеваемости их ангиной.

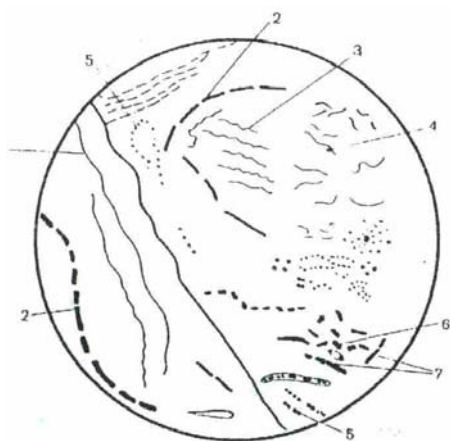
6.3. Бактерии зубного налета

В ротовой полости имеются благоприятные условия для развития многих микроорганизмов. Этому способствуют наличие питательных веществ, оптимальная температура, влажность, щелочная реакция среды, условия для жизнедеятельности как аэробных, так и анаэробных микробов. Основная масса микроорганизмов в ротовой полости локализуется в зубном налете. Микробы составляют 70 % зубного налета, в 1 мг сухой массы зубного налета содержится 250 млн микробных клеток. Основную группу бактерий составляют стрептококки (*Streptococcus salivarius*, *Str. milis*, *Str. mutans*, *Str. sanguis*, *Str. faecalis*), а также гемолитические стрептококки. Постоянно обитают в ротовой полости лактобациллы, вейлонеллы, сапротрофные нейссерии и коринебактерии, бактероиды. Кроме того, в ротовой полости обычно обнаруживаются гемофильные бактерии (*Haemophilus influenzae*), трепонемы (*Treponema macrotendium*, *T. oralis*, *T. denticola*), дрожжеподобные грибы (*Candida albicans*),

актиномицеты, микоплазмы, простейшие. Среди факультативных обитателей полости рта встречаются энтеробактерии (р. *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*), а также синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), спорообразующие бактерии (р. *Bacillus*, *Clostridium*).

Техника приготовления препарата:

1. Стерильной (охлажденной) петлей соскоблить немного зубного налета у десен.
2. Этот материал внести в каплю воды на предметном стекле и сделать суспензию.
3. Высушить на воздухе, зафиксировать в пламени спиртовки.
4. Окрасить фуксином.
5. Краситель смыть водой, просушить мазок между полосками фильтровальной бумаги.
6. Препарат зарисовать и описать с указанием вероятных таксономических групп согласно рис. 8.



1 — лептотрих (*Leptotrichia buccalis*), 2 — лактобактерии (*Lactobacillus salivarius*), 3, 4 — трепонемы (*T. macrodentium*, *T. denticola*, *T. orale*), 5, 6 — стрептококки и диплококки (*Str. salivarius*, *Str. mitis*, *Str. sanguis*, *Veillonella sp.*), 7 — фузобактерии (*Fusobacterium nucleatum*, *F. plauti*)

Рис. 8. Ценоз бактерий зубного налета

7. Сделать вывод о разнообразии бактерий зубного налета.

6.4. Чувствительность бактерий к почвенным бактериофагам

Наличие бактериофагов выявляется по образованию бляшек — негативных колоний (зон лизиса клеток) в газоне чувствительной бактериальной культуры.

Этап I

1. В стерильную чашку Петри разлить МПА с соблюдением правил асептики.

2. После застывания среды произвести посев выданной бактериальной культуры бактериологической петлей или шпателем Дригальского.

3. В центр посева капнуть (асептически) почвенную вытяжку, предварительно освобожденную от клеток мембранным фильтрованием или центрифугированием.

4. Чашку с посевом подписать и поставить в термостат при 28 °С.

Этап II

1. Просмотреть чашки с посевами. Зарисовать макроскопическую картину роста бактерий.

2. Описать наблюдения, отметить наличие или отсутствие зоны лизиса бактерий вокруг места внесения почвенной вытяжки.

3. Составить сводную таблицу по выявлению фагов, способных к лизису музейных культур бактерий, по форме табл. 11.

Таблица 11

Чувствительность бактериальных культур к почвенным фагам

Тест-культура	Диаметр зоны лизиса клеток, мм

Вопросы для обсуждения

1. Значение антибиоза в жизни микроорганизмов.
2. Антибиотики и механизм их действия.
3. Нормальная микробиота человека. Общие закономерности её формирования.
4. Микробиота полости рта, её значение в жизни человека.
5. Микробиота кишечника, её роль в формировании иммунитета хозяина.
6. Дисбактериозы, их причины и способы предотвращения.
7. Гемолитические микроорганизмы. Факторы патогенности.

Раздел II. Вирусология

Вирусология (англ. *virology*) изучает строение, функциональные свойства, экологию, филогению и систематику живых существ, называемых вирусами.

Исходно вирусологию рассматривали как составную часть молекулярной биологии, т. к. объектом её исследования являются субклеточные структуры — вирусы, которые по существу (строению и организации) являются макромолекулами. Однако в настоящее время вирусология складывается из комплекса дисциплин (цитологии, биохимии, молекулярной биологии и т. п.), которые изучают полифилетических живых существ — внутриклеточных молекулярных паразитов, специфическими хозяевами которых являются клеточные организмы разного эволюционного происхождения (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*) и различного цитологического строения.

Тема 7. Введение в вирусологию

7.1. Общая характеристика вирусов

Открытие вирусов породило дискуссию о границе между живой и неживой материей, которая продолжается до сих пор. В плане разрешения вопроса интерес представляет определение А. В. Пиневича (2007): «Жизнь — это пространственно-временная экспансия полинуклеотидных матриц, которые копируются в клетках, или мультивариантных самореплицирующихся мембранных микрокомпартаментах». Как известно, клетки способны копировать не только эндогенную матрицу (собственный геном), но и экзогенную (чужой геном), например вирусную.

В жизненном цикле вирусов различают две фазы:

1) внеклеточную, которая длится, пока вирус существует в виде инертной инфекционной частицы — вириона (*упакованной матрицы*); и

2) внутриклеточную (*неупакованной матрицы*), когда формируется особая система «вирус — клетка».

Основные свойства вирусов, которые отличают их от иных живых существ:

- 1) ультрамикроскопические размеры (20–400 нм);
- 2) наличие нуклеиновой кислоты (НК) только одного типа;
- 3) неспособность к росту и бинарному делению;
- 4) размножение путем воспроизводства себя из собственной нуклеиновой кислоты (репликации);
- 5) отсутствие систем мобилизации энергии;
- 6) отсутствие систем синтеза белка;
- 7) абсолютный внутриклеточный паразитизм.

От плазмид и транспозонов вирусы отличаются способностью образовывать вирионы. Единого определения вирусов не существует. Приведем одно из самых новых.

Вирус — это неклеточное живое существо с РНК- или ДНК-геномом без генов рРНК и генов системы ассимиляции энергии; размножается только в клетке-хозяине и способно существовать в трёх формах: в форме геномной нуклеиновой кислоты, репликативного интермедиата и вириона — содержащего геномную нуклеиновую кислоту микрокомпартамента собственного и/или гетерологичного кодирования (Пиневич и др., 2012).

Структура вирусных частиц

Вирион (элементарное тело или вироспора) представляет собой особь вируса. Он состоит из нуклеиновой кислоты и одной-двух оболочек. Это ультрамикроскопическая частица, которая идеально приспособлена для транспортировки геномной ДНК или РНК из одной клетки в другую и её доставке к сайтам репликации. В вирионе нуклеиновая кислота надежно защищена от механического, физико-химического и ферментативного воздействий.

По строению вирионов вирусы подразделяют на оболочные или сложные и безоболочные или простые.

Простые вирионы состоят из НК, заключенной в белковую оболочку — **капсид**. Совместно с геномной НК капсид образует нуклеокапсид (нуклеопротеид), представляя собой сердцевину (кор) оболочных вирусов, вирионы которых состоят из нуклеокапсида, окруженного внешней оболочкой — **суперкапсидом**. Большинство

сложных вирусов приобретают вторую оболочку на этапе созревания вириона при прохождении через соответствующую клеточную мембрану путем отпочкования. В связи с этим суперкапсид представляет собой билипидный слой с интегрированными в него вирусными белками и происходит чаще из цитоплазматической мембраны клетки, реже — из мембран ядра, аппарата Гольджи и т. п.

Морфологической регулярно повторяющейся единицей капсида является *капсомер*, основу которого составляют белковые структурные блоки — *протомеры*, формирующиеся из полипептидных субъединиц. Наружные выступы капсомеров называют *пепломерами*, их морфология специфична. Например, пепломеры аденовирусов имеют форму булавки.

Вирионы, подобно кристаллам, обладают структурной симметрией, поскольку собираются из субъединиц, представляющих собой идентичные копии одного или нескольких белков. Многократное повторение белок-белковых взаимодействий возможно лишь при условии симметричного расположения субъединиц, процесс полимеризации которых аналогичен кристаллизации.

По характеру упаковки морфологических субъединиц различают

- а) вирусы со спиральной симметрией;
- б) изометрические вирусы с икосаэдрической симметрией;
- в) вирусы с бинарной (сложной) симметрией, например фаги имеют головку с икосаэдрической симметрией, а хвостик — со спиральной.

У нитевидных и палочковидных вирусов субъединицы капсида располагаются по спирали, между ними по спирали расположена НК. Классическим примером является вирус табачной мозаики (ВТМ). Он представлен нуклеопротеидом длиной 300 нм, диаметром 18 нм, М.м. 40 мДа. Капсид ВТМ состоит из 2 130 белковых молекул, геномная РНК — из 6000 н. Белковая субъединица массой 18 240 Да включает 158 АК-остатков. С каждой субъединицей связано по 3 н. Белковая спираль состоит из 130 витков, на каждый приходится 16,3 субъединиц. Период идентичности (3 оборота спирали) имеет размер 6,5 нм.

Изометрические вирионы простых вирусов имеют форму икоса-

эдра. Он имеет 20 граней в виде равносторонних треугольников, 30 ребер и 12 вершин, в каждой из которых сходятся углы пяти граней. Икосаэдр обладает симметрией второго, третьего и пятого порядков и имеет 10 осей вращения в отличие от одной у вирусов со спиральной симметрией. Капсиды изометрических вирусов при субъединицах минимального размера имеют максимальный внутренний объем для НК. Таким образом, икосаэдры — самая эффективная и экономичная форма для упаковки НК, свернутой в клубок.

Капсид может состоять либо только из пятиугольных капсомеров — *пентонов*, либо из пентонов в сочетании с *гексонами*, шестиугольными капсомерами. У разных вирусов на ребре икосаэдра может находиться несколько капсомеров (n). Число капсомеров для вирусов данного вида является постоянным и имеет диагностическое значение.

Капсид мелкого бактериофага ϕ X174 (диаметр $d = 22$ нм) имеет на каждом ребре по два капсомера ($n = 2$), состоит из 12 пентонов, каждый из которых содержит по 5 субъединиц. Итого в состав вириона входит всего 60 субъединиц белка.

Капсид аденовирусов (сем. Adenoviridae) на каждом ребре содержит по 2 пентона и 4 гексона ($n = 6$) и в целом состоит из 252 капсомеров, имея диаметр 70 нм.

У сложных вирусов форма нуклеокапсида и морфология суперкапсидной оболочки часто не совпадают. Так, вирионы ортомиксо-, парамиксо-, коронавирусов и др. содержат нуклеокапсид палочковидной формы, упакованный в сферический суперкапсид. У рабдовирусов нуклеокапсид цилиндрический со спиральной симметрией, а суперкапсид — пулевидный и т. д.

Вирионы представителей сем. Poxviridae отличаются сложной симметрией в сочетании с чрезвычайно сложным строением. Кор-структура вируса натуральной оспы (ВНО) представлена нуклеопротеиновым «S-телом», которое одето внутренним капсидом и окружено белковыми «боковыми телами». Комплекс нуклеокапсида и боковых тел погружен в «вироплазму» и окружен двойным внешним капсидом. Снаружи такое образование покрыто мембранной оболочкой, что придает вириону форму овоида или параллелепипеда.

Химический состав вирусов

Большинство вирионов состоят из НК и белка. Вирусы содержат только **один тип нуклеиновой кислоты** — либо ДНК, либо РНК. Помимо известных форм — dsДНК (двунитчатой ДНК) и ssРНК (однонитчатой РНК) — у вирусов встречаются уникальные НК: двунитчатая dsРНК (вирусы некоторых опухолей растений) и однонитчатая ssДНК (мелкие и нитчатые фаги). Любая НК является геномом вируса.

Относительное содержание ДНК или РНК в разных типах вирионов может различаться: от 1 % у вируса гриппа до 50 % у некоторых бактериофагов. Молекулярная масса ДНК вирусов колеблется в пределах 1–200 мДа, а РНК — в пределах 2–14 мДа.

Геномные НК вирусов чрезвычайно разнообразны по нуклеотидному составу. В частности, у ДНК-содержащих вирусов животных мол. % Г-Ц варьирует в широком диапазоне 35–75%.

Вирусные ДНК часто содержат минорные азотистые основания, что позволяет отличать вирусный геном от генома хозяина. Например, 5-гидроксиметилцитозин у Т-четных фагов *E.coli*. Кроме того, с целью защиты от рестриктаз хозяина обычные пуриновые и пиримидиновые основания модифицируются посредством ферментативного метилирования в положении 2 и 5 соответственно.

Вирусные РНК также имеют свои особенности. Метилированные полирибонуклеотиды плохо транслируются, поэтому у 5'-конец мРНК блокирован 5'-5'-связью с остатком 7-метилгуанилата (вирусы осповакционы, реовирусы). Кроме того, первый нуклеотид мРНК метилирован по 2'-ОН-группе рибозы, что обеспечивает вирусной РНК защиту от действия эндонуклеаз и щелочного расщепления.

Белки вирусов являются глобулинами, состоящими из L-аминокислот, среди которых преобладают кислые дикарбоновые аминокислоты. Устойчивость вирусных белков обусловлена тем, что большинство концевых аминокислот ацетилированы, а карбоксильные группы замаскированы особым расположением пептидных связей.

В некоторых случаях геномная НК образует нуклеопротеиновый комплекс с нейтральным или слабо катионным белком, кото-

рый обеспечивает её компактизацию и стабилизирует её структуру. Иногда к таким **вирусным хромосомам** присоединяются ферменты, участвующие в копировании вирусного генома, например обратная транскриптаза и интеграз ВИЧ.

Белки капсида (пепломеры) выполняют рецепторную функцию и участвуют в ранних этапах инфекции.

Белки суперкапсида имеют вирусное происхождение и выполняют рецепторную, ферментативную или обе функции одновременно.

Помимо белков, оболочки вирусов могут содержать и **белки матрикса**, заполняющие полости вириона. Белки матрикса выполняют каркасную или ферментативную функцию, иногда их роль не известна.

В состав вирионов могут входить некоторые **ферменты**, которые кодируются вирусным геномом. Вирусные ферменты функционируют на разных стадиях онтогенеза вирусов: при прикреплении к клетке-хозяину, её заражении, репликации вирусного генома, сборке вирионов и выходе их из хозяйской клетки. К таким ферментам относятся, в частности, лизоцим бактериофагов, нейраминидаза вируса гриппа и др.

Кроме того, **часть компонентов клетки-хозяина** может оказаться внутри вирионов из-за несовершенства механизма их сборки. Так, в вирионах папилломавирусов обнаружены хромосомы хозяйской клетки, в ареновирусах — рибосомы клетки-хозяина.

Часть мембранной системы хозяина в виде суперкапсида представлена у оболочечных вирусов. При этом клеточные белки вытесняются вирусными, которые гликозилируются за счет ферментов клетки-хозяина. С мембранами попадают в вирион липиды и углеводы.

Липиды характерны для сложных вирусов животных и человека, а также фагов *E. coli* и псевдомонад. Например: в вирионе вируса энцефаломиелита лошадей содержится до 54 % липидов, липиды определяют постепенный выход вирионов из клетки по мере их созревания.

Углеводы — компонент исключительно сложных вирусов. В частности, в вирионах вирусов гриппа обнаружено до 17 % угле-

водов, которые включают галактозу, маннозу и метилозу. Олигосахара придают жесткость рецепторным белкам, что облегчает их распознавание и связывание.

К компонентам цитоплазмы, обнаруживаемым в вирионах некоторых вирусов животных (аденовирусов и др.), желтой мозаики турнепса и Т-четных фагов, относятся полиамины. Путресцин, спермидин или спермин нейтрализуют 4–60 % отрицательных зарядов фосфатных групп геномной НК.

Наконец, белок цитоскелета (актин) попадает в нитевидные вирионы вируса гриппа при их отпочковании от ЦПМ клетки.

Геномы вирусов

Вирусные геномы отличаются малыми размерами: в среднем 5–190 тыс. п. н. Для сравнения: геном *Mycoplasma genitalium* составляет 580 тыс. п. н. Соответственно вирусы обладают малым числом генов по сравнению с наиболее редуцированными клеточными геномами (~500 генов). Так, бактериофаг MS2 имеет всего 4 гена (3,5 тыс. п. н.). Перекрывающиеся рамки считывания позволяют вирусам компенсировать малый размер генома и реализовывать разные стратегии экспрессии генов, что обеспечивает баланс продуктов транскрипции. Считается, что перекрытие генов позволило вирусам в процессе эволюции не выйти за размерный предел, обозначенный стабильностью капсида. Альтернативным решением проблемы стало распределение по разным вирионам сегментов вирусного РНК-генома, аналогичных хромосомам.

У вирусов с минимальным размером генома, способных к саморепликации и образованию вирионов, как правило, геномной является ssРНК. Минимальный вирусный геном прежде всего включает в себя гены, ответственные за репликацию. Наличие нуклеотидной последовательности гена репликазы — четкий критерий отличия репликативной формы вируса от плазмиды. С другой стороны, нуклеотидная последовательность гена репликазы позволяет устанавливать филогенетическое родство между вирусами с одинаковым типом генома.

РНК-содержащие вирусы могут иметь один из следующих геномов.

Одноцепочечная нефрагментированная РНК, обладающая матричной активностью, т. н. **позитивная** или +РНК пикорнавирусов, в том числе вируса полиомиелита.

Одноцепочечная нефрагментированная РНК, не обладающая матричной активностью, т. н. **негативная** или –РНК. Вирусы с подобным геномом (парамиксо-, рабдовирусы и др.) в составе вириона содержат специфическую транскриптазу — РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая производит мРНК для синтеза вирусных белков.

Одноцепочечная фрагментированная (сегментированная) **РНК**, не обладающая матричной активностью, также нуждается в наличии специфической вирусной транскриптазы. В частности, ортомиксовирусы имеют 8 фрагментов.

Двухцепочечная фрагментированная РНК также сопровождается наличием специфической вирусной транскриптазы. Подобный геном из 10 фрагментов имеют реовирусы.

Диплоидный геном представлен двумя идентичными нитями РНК(+), его имеют ретровирусы, обладатели особого фермента — обратной транскриптазы, которая производит dsДНК-копию вирусного генома, способную встраиваться в геном клетки-хозяина.

Одноцепочечная кольцевая РНК представляет собой геном вируса гепатита дельта (VHD), являющегося неполноценным вирусом-сателлитом, поскольку для размножения ему нужен вирус-помощник — ДНК-содержащий вирус гепатита В (VHB).

У ДНК-содержащих вирусов встречается тоже 6 вариантов генома.

Одноцепочечная линейная ДНК характерна, в частности, для парвовирусов, у которых в разных вирионах содержатся как плюс-, так и минус-нити, из которых только ДНК(–) подвергается транскрипции.

Одноцепочечные кольцевые ДНК характерны для фагов, в частности M13 и φX174.

Двухцепочечные линейные ДНК свойственны геномам вирусов герпеса и др.

Двухцепочечные кольцевые ДНК представляют собой геном

паповавирусов, вируса гепатита В и др.

Двухцепочечная ДНК, имеющая терминальный гидрофобный белок, соединенный с ней ковалентной связью, характерна для аденовирусов. Все указанные геномы для синтеза мРНК используют ядерные ферменты клетки.

Двухцепочечная ДНК, замкнутая на каждом конце ковалентной связью, — геном вирусов оспы, которые обладают собственными ферментами транскрипции и поэтому размножаются в цитоплазме клетки-хозяина.

В целом РНК-содержащие вирусы более изменчивы по сравнению с ДНК-вирусами вследствие реассортации сегментированных геномов (вид генетической рекомбинации) и отсутствия в природе репарационных систем, исправляющих мутации РНК.

Репликация вирусных геномов

dsДНК вирусов реплицируется по обычному полуконсервативному механизму, как и ДНК клеток.

ssДНК(+) сначала служат матрицей для минус-нити, затем на образовавшейся dsДНК (+–) строится промежуточная репликативная форма из трех нитей (+ – +), от которой отходит дочерняя (+) форма исходной вирионной ДНК.

Вирионная ssРНК с помощью репликазы I превращается в комплементарную ей РНК, с которой, в свою очередь, репликаза II формирует комплементарную ей и идентичную исходной вирионной дочернюю РНК.

ssРНК(+) ретровирусов с помощью обратной транскриптазы служит матрицей для одной нити ДНК, на которой тот же фермент достраивает комплементарную первой вторую нить. Далее dsДНК-копия генома ретровирусов может встраиваться в геном клетки-хозяина и служить матрицей для синтеза вирусной РНК.

Кольцевая dsДНК вируса гепатита В с помощью клеточной полимеразы превращается в прегеномную РНК, на которой далее образуется вирусная dsДНК, что позволяет ей далее встраиваться в геном хозяина и превращаться в провирус или служить матрицей для вирусных белков и участвовать в продуктивной инфекции. В связи с этим вирус гепатита В называют ретроидным, или параретровирусом.

Особенности механизмов репликации определяют нижеуказанные общие закономерности. Все РНК-содержащие вирусы, за исключением вирусов гриппа и ретровирусов, размножаются в цитоплазме клетки.

Все ДНК-содержащие вирусы, исключая поксвирусы, размножаются в ядре клетки-хозяина, где осуществляются транскрипция и репликация их геномных НК, а в цитоплазме происходит трансляция вирусных белков, их процессинг и морфогенез вирионов.

Жизненный цикл вирусов

Вирион — инертная статическая форма вируса. Все динамические события начинаются лишь тогда, когда вирус проникает в клетку. Поскольку в зараженных вирусом клетках происходит глубокая перестройка вирусных компонентов, а часто и компонентов клетки-хозяина, то говорят об образовании специфической системы «вирус–клетка». Активные механизмы этого комплекса существенно отличаются от механизмов незараженной клетки.

События в инфицированных клетках могут происходить по таким сценариям:

1) ***продуктивная инфекция***, которая приводит к образованию новых вирионов;

2) ***интегративная инфекция***, когда копия вирусного генома встраивается в геном клетки-хозяина и образуется более или менее постоянная ассоциация «вирус — клетка» в виде профага или про-вируса;

3) ***абортивная инфекция***, которая завершается элиминацией вируса.

Таким образом, механизмы взаимодействия вирусов с клетками весьма разнообразны и зависят от видовой принадлежности хозяина и самого вируса.

В жизненном цикле (онтогенезе) вирусов выделяют следующие фазы:

1. Прикрепление вириона к клетке-хозяину, или его адсорбция (адгезия).
2. Проникновение в клетку-хозяина.
3. Раздевание генома.

4. Репликация.

5. Морфогенез, созревание и выход потомства вирионов из клетки-хозяина.

6. Выход новых вирионов из клетки.

В некоторых случаях первые этапы осуществляются в едином процессе. Так, у бактериофагов проникновение фаговой ДНК и её раздевание происходят одновременно.

Адсорбция вируса на поверхности чувствительной клетки — пусковой механизм инфекции, который осуществляется специфически — через рецепторы как клеток, так и вирусов. Следует отметить, что разнообразие рецепторов определяет разнообразие патогенов для клеток-хозяев и круг чувствительных клеток для вируса.

Механизмы проникновения вирусов в клетки разнообразны:

1. У сложных вирусов животных происходит слияние суперкапсида с ЦПМ клетки, что приводит к высвобождению нуклеокапсида в цитоплазму.

2. В рецептор-опосредованном эндоцитозе участвует эндосома, которая сливается с лизосомой, что приводит к протеолизу эндосомы и слиянию липидных слоев капсида с ЦПМ лизосомы, в результате чего нуклеокапсид попадает в цитозоль клетки.

3. Трансфекция бактериофагов — поглощение свободной вирусной ДНК бактериями. Кроме того, нитчатые фаги могут скатываться внутрь клетки по жгутикам, F- и I-пилям.

4. T-четные фаги, сокращая чехол, впрыскивают свою ДНК внутрь бактериальной клетки через отверстие в клеточной стенке, которое образуется за счет действия лизоцима базальной пластинки вириона. Ферментативное разрушение клеточных стенок осуществляют и многие другие вирусы одноклеточных.

5. Вирусы растений попадают внутрь клеток чаще через повреждения клеточной стенки, которые образуются самопроизвольно или насекомыми.

6. Другие вирусы растений передаются с цитоплазмой при вегетативном или семенном размножении либо инфицируют те стадии онтогенеза хозяина, которые лишены клеточной стенки (например, подвижные гаметы водорослей).

Внутриклеточное размножение вируса заключается в репликации геномной НК, биосинтезе вирусных структурных белков и сборке нуклеокапсида.

Особенности репликации и образования *репликативных интермедиатов* для различных вирусных генотипов приведены выше.

Вирусные белки синтезируются на двойственной основе. С одной стороны, вирус эксплуатирует хозяйский аппарат трансляции; с другой стороны, используется вирусная позитивная РНК (смысловая или мРНК). Общими особенностями этого процесса являются синтез нуклеокапсидных белков на свободных полирибосомах, а суперкапсидных — на рибосомах, связанных с мембранами, протеолитический процессинг (нарезание) и гликозилирование вирусных белков. Суперкапсидные белки присоединяют остаток сахара в ходе транспортировки на наружную поверхность клеточной мембраны.

Особо следует обратить внимание на стратегии размножения дефектных вирусов, у которых не активны или утрачены некоторые гены, отвечающие за образование полноценных вирионов. Вирусы, интегрированные в хромосому клетки-хозяина, реплицируются совместно с хромосомой. Дефектные интерферирующие вирусы являются делеционными мутантами, которые кодируют свои структурные белки и используют репликативную систему вируса-хелпера, нарушая тем самым репликацию последнего. Вирусы-сателлиты также интерферируют с вирусами-помощниками, однако, как правило, они не имеют структурного сходства с последними, поэтому являются еще более жесткими молекулярными паразитами. Вирусы-хелперы предоставляют вирусам-сателлитам не только свои репликазы и трансферазы, но и свои мРНК.

Морфогенез вирионов заключается в упаковывании геномной НК в капсид. Сначала все компоненты вириона образуются независимо друг от друга, затем они собираются в капсид, перед замыканием которого внутрь проникает НК, и капсид приобретает окончательную форму. На этом созревание простых вирусов завершается. У оболочных вирусов созревание происходит в процессе заключения нуклеокапсида в суперкапсид, что часто имеет место при почковании одновременно с выходом из клетки-хозяина. Оболочные

вирусы могут созревать как на ЦПМ (ортомиксо- и рабдовирусы), так и на мембранах органелл: ядра (герпесвирусы) или шероховатого эндоплазматического ретикула (корона- и буньявирусы).

Выход готовых вирионов наружу исчерпывается двумя сценариями.

Простые вирусы, которые собираются в цитоплазме или на внутренней мембране ядерной оболочки, как правило, используют цитолиз клетки-хозяина, для чего им достаточно активности одного-двух собственных ферментов.

Оболочные вирусы предпочитают механизм экзоцитоза (в том числе почкования), при котором целостность ЦПМ клетки-хозяина не нарушается, и вирионы выходят постепенно.

Не у всех вирусов продуктивная инфекция заканчивается выходом зрелых вирионов наружу. Многие вирусы растений и грибов распространяются в обход внеклеточного пространства и заражают новые клетки через цитоплазму. Некоторые вирусы животных, захваченные фагоцитами, способны блокировать фагоцитоз и распространяются *in vivo* вместе с фагоцитами.

Наконец, для провирусов, интегрированных в хозяйскую хромосому, и вирусов-плазмид, существующих в виде экстрахромосомных генетических элементов, выход из клетки не является обязательным, поскольку они продолжают сохранять себя в виде геновида внутри клетки-хозяина, передаваясь вертикально при её делении.

Встраиваясь в геном клетки-хозяина, профаг оказывает мутагенный эффект, который может проявляться в изменении таких фенотипических свойств бактерий, как окраска и форма колоний, устойчивость к антибиотикам и т. п.

Интегрирование вирусного генома с геномом многоклеточных эукариот может приводить к нарушению пролиферации клеток и вызывать их злокачественное перерождение. В связи с этим онкогенные вирусы есть в составе всех групп ДНК-содержащих вирусов. Онкогенность — побочное следствие механизмов их репродукции, в основе которого лежит способность вирусов индуцировать переход клеток в S-фазу жизненного цикла и выключать системы, контролирующие размножение в нормальных клетках, что может при-

вести к бесконтрольной пролиферации (размножению). К онковирусам относятся ДНК-содержащие папова-, адено- и герпесвирусы и РНК-содержащие ретровирусы.

7.2. Бактериофаги

Бактериофаги (греч. *phagos* — пожирающий), или «пожиратели бактерий», — это вирусы — паразиты бактерий. Они были открыты случайно в 1910-х гг. при клинических исследованиях, которые Фредерик Туорт и Феликс д'Эррель проводили на микрококках и дизентерийной палочке.

Сначала интерес исследователей привлекали бактериофаги Т1–Т7, размножающиеся в клетках *E.coli* штамма В и обозначенные как «четные» (Т2, Т4 и Т6) и «нечетные» (Т1, Т3, Т5 и Т7). Они различаются по свойствам и объединены в Т-серию (от англ. *type* — тип) только согласно хронологической последовательности их выделения.

Выбор в качестве модельных объектов именно Т-фагов, которые осуществляют литическую инфекцию, на время отвлек внимание исследователей от такого исключительно важного явления, как лизогения. Оно было открыто Жюлем Борде у *Salmonella typhi* и подробно изучено на примере фага лямбда в 1930–1950-х гг.

По современным представлениям, бактериофаги представляют собой наиболее многочисленную, широко распространённую в биосфере и, предположительно, наиболее эволюционно древнюю группу вирусов. Приблизительный размер популяции фагов составляет 10^{30} – 10^{32} фаговых частиц. Бактериофаги выполняют важную роль в контроле численности микробных популяций, в автолизе стареющих клеток, в переносе бактериальных генов, выступая в качестве векторных «систем». В них видят способ борьбы с суперустойчивыми к антибиотикам бактериями, с одной стороны, с другой — с ними приходится бороться там, где используют бактерии в качестве продуцентов полезных продуктов, включая молочнокислые.

На сегодня наиболее изученным, в том числе в молекулярно-биологическом отношении, является Т-четный фаг *E.coli* — Т4, описание которого мы приводим ниже.

Биология фага T4

Enterobacteria phage T4 – фаг T4, типовой вид семейства *Myoviridae*, которое относится к группе фагов с геномной двухцепочечной ДНК (dsДНК).

Полное *систематическое положение* фага T4 выглядит следующим образом:

Отряд — Хвостатые фаги Caudovirales.

Семейство — Myoviridae.

Род — T4-подобные вирусы.

Вид — T4.

Вирион состоит из несколько вытянутой икосаэдрической головки (85×110 нм) и хвостового отростка (110×25 нм), который присоединяется к ней через шейку, содержащую воротничок с воротничковыми фибриллами. На дистальном конце хвостового отростка находится базальная пластинка с терминальными фибриллами (рис. 9).

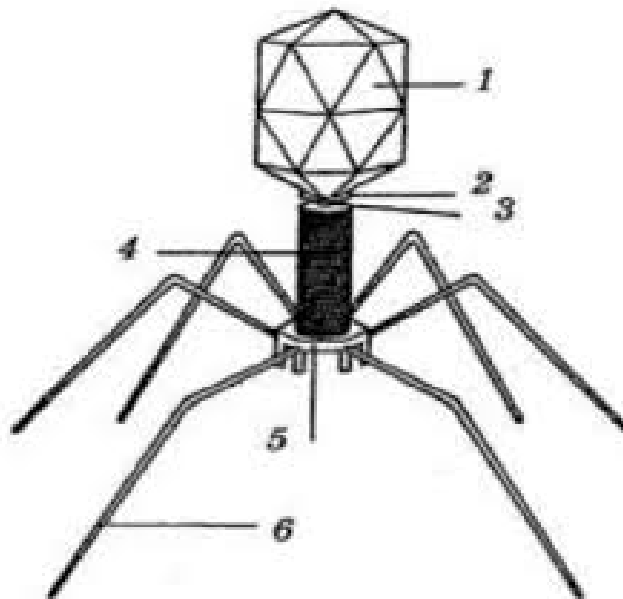


Рис. 9. Строение бактериофага: 1 — головка (икосаэдр), 2 — воротничок, 3 — отросток, 4 — чехол, 5 — базальная пластинка, 6 — хвостовые нити

Геном фага Т4 (166 тыс. п. н.) представлен примерно 200 генов. Цитозин полностью замещен 5-гидроксиметилцитозином, 5-ОН группа которого гликозилирована, что обеспечивает устойчивость вирусной ДНК к воздействию рестриктаз клетки-хозяина. Хотя геномная ДНК фага находится в линейной конфигурации, она способна переходить в кольцевую форму.

В капсиде может поместиться только одна копия генома. Особенности упаковки нуклеиновой кислоты Т4 в капсид приводят к тому, что геномные ДНК в популяции бактериофага отличаются друг от друга первыми и последними нуклеотидами. Другой особенностью генома фага Т4 является присутствие интронов в нескольких его генах, которые по строению сходны с интронами I типа эукариот и также подвергаются автосплайсингу.

Хозяева бактериофагов сем. *Myoviridae* принадлежат к нескольким филам домена *Bacteria* (B10 *Cyanobacteria*, B12 *Proteobacteria*, B13 *Firmicutes* и B14 *Actinobacteria*), а также к филе A2 *Euryarchaeota*.

Жизненный цикл. Адсорбция и проникновение фага Т4 проходят в несколько стадий и регулируется рядом белков, в том числе бактериальных. На обратимой стадии адсорбции хвостовые фибриллы связываются с липолисахаридом и базальная пластинка прикрепляется к наружной мембране клетки-хозяина. На необратимой стадии белки базальной пластинки изменяют свою конформацию, что вызывает сокращение чехла хвостового отростка. Белок Gr5, входящий в состав стержня хвостового отростка и обладающий лизоцимной активностью, локально разрушает пептидогликан (ферментативный домен активируется периплазматическими протеазами). Сократившийся отросток внедряется в образовавшийся канал; при этом N-концевой домен белка Gr5 принимает участие в транслокации фаговой ДНК в цитоплазму.

После проникновения хозяйская РНК-полимераза распознает промотор самых ранних генов, транскрипцию которых регулируют клеточные сигма-факторы. По завершении адсорбции уже через 3 мин начинается синтез ферментов, которые расщепляют ДНК хозяина до нуклеотидов и модифицируют РНК-полимеразу благодаря АДФ-рибозилированию её α -субъединицы. Фаг Т4, в отличие от Т7,

не кодирует собственную РНК-полимеразу и поэтому использует бактериальный фермент, который после модификации уже не распознает промоторы *E. coli*.

Модифицированная РНК-полимераза взаимодействует с промоторами запаздывающих ранних генов, а транскрипция самых ранних генов прекращается. Белки, синтезированные на протяжении 5–10 мин от начала инфекции, участвуют в репликации генома бактериофага, причем в качестве субстратов используются хозяйские нуклеотиды. Одновременно с этим синтезируется новый сигма-фактор, который регулирует транскрипцию поздних генов.

Поздние гены кодируют структурные и морфогенетические белки. Их транскрипция тесно связана с репликацией и активизируется ДНК-полимеразным комплексом.

Сначала геном бактериофага реплицируется *ori*-зависимым способом одновременно в семи локусах. При этом образуются линейные dsДНК, имеющие одноцепочечные ss-разрывы, которые возникают при удалении РНК-праймеров при синтезе отстающей нити. Такие детали строения репликативных интермедиатов играют важную роль на следующем рекомбинационно-зависимом этапе репликации с использованием хозяйского механизма рекомбинационной репарации ds-разрывов. По-видимому, ss-участок внедряется с помощью вирусной рекомбиназы в гомологичный участок ds-интермедиата с образованием хиазмы Холлидея. В этой области вирусная ДНК-полимераза достраивает на матрице недостающий фрагмент 3'-конца. Вирусная резольваза и лигаза демонтируют хиазму Холлидея и восстанавливают ds-интермедиат, в результате чего образуются длинные конкатемеры.

Капсид и хвостовой отросток собираются независимо друг от друга. При упаковке ДНК приобретает сверхвысокую плотность в результате паракристаллической укладки.

Через 20–30 мин после начала инфекции активизируются гены лизиса. На поздних этапах, если клетку инфицирует слишком много частиц бактериофага, литический цикл затормаживается, и в течение еще 4–6 ч продолжаются репликация и упаковка вирусной ДНК. По завершении литического цикла из клетки выходит ~200 частиц.

T4, как и другие миовирусы, проходит преимущественно литический цикл, который заканчивается гибелью бактерий-хозяев. Лизогенные циклы для них не характерны. В связи с этим они являются одними из регуляторов круговорота органического вещества бактериального пикопланктона. Сравнительно-морфологические и генетические исследования показывают, что эти бактериофаги широко распространены как в пресноводных, так и в морских экосистемах.

Резистентность. Устойчивость фагов к факторам окружающей среды достаточно велика. Они

- выдерживают нагревание до 75 °С,
- не обезвреживаются дезинфицирующими веществами в малых концентрациях,
- резистентны к антибиотикам, хлороформу и ферментным ядам, что широко используется при выделении фагов из бактериальных популяций, весьма чувствительных ко всем микробоцидным веществам;
- быстро разрушаются в желудочном соке, под воздействием УФ-лучей и ионизирующих излучений.

В организме человека сохраняются в течение 7–13 дней, поэтому при проведении профилактических мероприятий в очагах кишечных инфекций повторно назначают фаги контактным (инфицированным) лицам.

7.3. Задания для самостоятельной работы студентов

1. Выбрать 4 вида вирусов (табл. 12), среди которых первый должен быть представителем вирусов оспы или вируса гепатита В, второй — ретровирусом, третий — любым другим ДНК-содержащим вирусом, четвертый — любым другим РНК-содержащим вирусом.

2. Описать биологию каждого вируса по следующей схеме (см. 7.2.):

1. Систематика вируса.
2. Строение (структура) вириона.
3. Генотип вируса.
4. Круг чувствительных хозяев.
5. Жизненный цикл (прикрепление, проникновение в клет-

ку-хозяина, репликация, сборка и выход вирионов и т. п.).

6. Патогенетическое значение.

7. Отношение к факторам внешней среды.

3. Сделать доклад на семинаре по одному из описанных дома вирусов.

4. Письменную работу сдать преподавателю.

Таблица 12

Систематика наиболее изученных вирусов

ДНК-содержащие вирусы	РНК-содержащие вирусы
<i>Вирусы позвоночных</i>	<i>Вирусы позвоночных</i>
	Сем. Picornaviridae
Сем. Herpesviridae	р. <i>Enterovirus</i>
П/сем. Alphaherpesvirinae,	р. <i>Cardiovirus</i>
П/сем. Betaherpesvirinae,	р. <i>Rhinovirus</i>
П/сем. Gammaherpesvirinae	р. <i>Aphthovirus</i>
Сем. Adenoviridae	Сем. Caliciviridae
р. <i>Mastadenovirus</i>	Сем. Orthomyxoviridae
р. <i>Aviadenovirus</i>	р. <i>Influenzavirus</i>
Сем. Papovaviridae	Сем. Paramyxoviridae
р. <i>Papillomavirus</i>	р. <i>Paramyxovirus</i>
р. <i>Polyomavirus</i>	р. <i>Morbillivirus</i>
Сем. Hepadnaviridae	р. <i>Pneumovirus</i>
	Сем. Coronaviridae
<i>Вирусы позвоночных и беспозвоночных</i>	Сем. Togaviridae
Сем. Poxviridae	Сем. Flaviviridae
П/сем. Chordopoxvirinae	Сем. Arenoviridae
р. <i>Orthopoxvirus</i> (вирусы натуральной оспы человека и осповакцины)	Сем. Bunyaviridae
р. <i>Parapoxvirus</i> (вирус пустулезного дерматита)	Сем. Retroviridae
р. <i>Avipoxvirus</i> (птичий)	П/сем. Oncovirinae

ДНК-содержащие вирусы	РНК-содержащие вирусы
р. <i>Capripoxvirus</i> (овечий)	П/сем. Spumavirinae
р. <i>Suipoxvirus</i> (свиной)	П/сем. Lentivirina
р. <i>Leporipoxvirus</i> (вирус миксомы зайцев)	ВИЧ
П/сем. Entomopoxvirinae	
Сем. Iridoviridae	<i>Вирусы позвоночных, растений и насекомых</i>
р. <i>Iridovirus</i>	Сем. Rhabdoviridae
р. <i>Chloriridovirus</i>	р. <i>Lissavirus</i>
р. <i>Ranavirus</i>	р. <i>Vesiculovirus</i>
Сем. Parvoviridae	р. рабдовирусов растений
р. <i>Parvovirus</i>	Сем. Reoviridae
р. <i>Densovirus</i>	р. <i>Reovirus</i>
р. <i>Dependovirus</i>	р. <i>Orbivirus</i>
	р. <i>Rotavirus</i>
	р. <i>Phytoreovirus</i>
	р. <i>Fijivirus</i>
	р. <i>Cypovirus</i>
<i>Предполагаемые семейства</i>	
Сем. Filoviridae	
Сем. Birnaviridae	

Контрольные вопросы

1. Развитие вирусологии как науки.
2. Основные методы вирусологии.
3. Общее строение вирусов. Химический состав. Функции вирусных белков.
4. Диагностические признаки вирусов.
5. Разнообразие ДНК-содержащих вирусов.
6. Разнообразие РНК-содержащих вирусов.
7. Вирусы прокариот (вирусы бактерий, вирусы архей).
8. Вирусы эукариотных микроорганизмов (грибов, простейших, водорослей).
9. Фитовирусы.
10. Онкогенные вирусы.
11. Вирусы животных сем. *Hepadnaviridae* и вирусы гепатитов других семейств.
12. Вирусы животных сем. *Retroviridae*.
13. Вирусы животных сем. *Poxviridae*.
14. Биология одного из представителей сем. *Adeno-*, *Herpes-* или *Papillomoviridae*.
15. Биология одного из представителей сем. *Parvoviridae* (или *Circo-*, или *Anelloviridae*).
16. Биология одного из представителей сем. *Birna-* или *Reoviridae*.
17. Биология одного из представителей сем. *Calici-*, *Dicistro-*, *Noda-* или *Picornaviridae*.
18. Биология одного из представителей сем. *Orthomyxo-*, *Paramyxo-* или *Rhabdoviridae*.
19. Дефектные вирусы (вирусы-сателлиты) и другие неклеточные инфекционные агенты (виroidы и прионы).

Литература

Основная

1. Нетрусов, А. И. Микробиология : учебник для вузов / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М. : Академия, 2012. — 379 с.
2. Общая вирусология с основами таксономии вирусов позвоночных : учеб. пособие / А. Сизенцов, А. Плотников, Е. Дроздова и др. — Оренбург : ОГУ, 2012. — 624 с. — URL : <http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=259296>

Дополнительная

1. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник для вузов / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В. Третьякова ; под ред. Р. В. Белоусовой. — М. : КолосС, 2007. — 423 с.
2. Воробьева, Л. И. Археи : учеб. пособие для вузов / Л. И. Воробьева. — М. : Академкнига, 2007. — 447 с.
3. Гусев, М. В. Микробиология : учебник для вузов / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. — М. : Академия, 2006. — 462 с.
4. Жарикова, Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена : учебник для вузов / Г. Г. Жарикова. — М. : Академия, 2005. — 300 с.
5. Нетрусов, А. И. Микробиология : учебник для вузов / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М. : Академия, 2006. — 350 с.
6. Пиневиц, А. В. Вирусология : учебник / А. В. Пиневиц, А. К. Сироткин, О. В. Гаврилова, А. А. Потехин. — СПб. : Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2012. — 432 с.
7. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для вузов / под ред. А. И. Нетрусова. — М. : Академия, 2005. — 603 с.
8. Современная микробиология : прокариоты : учебник для вузов : в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. — М. : Мир, 2005. — Т. 1. — 654с.
9. Современная микробиология : прокариоты: учебник для вузов : в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. — М. : Мир, 2005. — Т. 2. — 493с.
10. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель ; под ред. Е. Н. Кондратьевой. — М. : Мир, 1987. — 566 с.

Ресурсы сети «Интернет»

Коллекция микроорганизмов Института экологии и генетики УрО РАН (г. Пермь) — URL : www.ecology.psu.ru/iegmcol/strains

Национальная немецкая коллекция микроорганизмов. — URL : www.dsmz.de/bactnom/

Американское микробиологическое общество. — URL : www.asmsusa.org

Международное научное общество по экологии микроорганизмов. — URL : www.isme-microbes.org

Центр экологии микроорганизмов Мичиганского (США) университета. — URL : www.cme.msu.edu

Американское экологическое общество. — URL : www.esa.org

Центр микробной экологии Мюнхенского университета. — URL : www.edv.agrar.tu-muenchen.de/microbio/

Оглавление

Раздел I. Бактериология	4
Тема 1. Введение в работу микробиологической лаборатории. Методы микробиологических исследований.....	4
1.1. Основные методы микробиологического исследования	4
1.2. Приготовление простых бактериальных препаратов-мазков.....	5
1.3. Дифференциальные методы окраски.....	9
Тема 2. Физиология, питание и культивирование микроорганизмов.....	13
2.1. Выделение чистой культуры анаэробов из почвы	18
2.2. Выделение чистой культуры аэробов из смеси бактерий... ..	20
Тема 3. Метаболизм бактерий.....	27
3.1. Разнообразие молочнокислых бактерий	28
3.2. Выделение молочнокислых бактерий	29
Тема 4. Наследственность и изменчивость прокариот	30
4.1. Фенотипическая изменчивость <i>Proteus vulgaris</i>	31
Тема 5. Микробиология внешней среды.....	32
5.1. Бактериальные ценозы предметов.....	32
5.2. Бактериальный ценоз воздуха.....	33
Тема 6. Взаимодействие микроорганизмов с другими организмами	35
6.1. Антибиоз микроорганизмов	35
6.2. Бактерии зева	36
6.3. Бактерии зубного налета.....	37
6.4. Чувствительность бактерий к почвенным бактериофагам ..	38
Раздел II. Вирусология	40
Тема 7. Введение в вирусологию	40
7.1. Общая характеристика вирусов	40
7.2. Бактериофаги	53
7.3. Задания для самостоятельной работы студентов	57
Контрольные вопросы.....	60
Литература	61

Учебное издание

Микробиология и вирусология

Учебно-методическое пособие

Составитель

Шеховцова Нина Валентиновна

Редактор, корректор М. Э. Левакова
Верстка М. Э. Леваковой

Подписано в печать 29.11.17. Формат 60×84 1/16.

Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 2,5.

Тираж 4 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова.

150003, Ярославль, ул. Советская, 14.