

Занятие 9

Экология микроорганизмов. Микрофлора окружающей среды (воды, почвы, воздуха). Микробиота организма человека. Генетика микроорганизмов.

План занятия:

1. Экология микроорганизмов

-виды взаимоотношений между микроорганизмами. Симбиоз и его формы.

2. Распространение микроорганизмов в природе (аутохтонная, аллохтонная микробиота), их значение в окружающей среде.

3. Санитарно-показательные микроорганизмы (СПМО) и их определение

4. Микрофлора почвы, почва как резервуар инфекции, санитарно-показательные микроорганизмы почвы.

5. Санитарно-микробиологическое исследование почвы: а) общее количество бактерий, б) определение титра СПМО, с) определение патогенных микроорганизмов.

6. Микрофлора воды (полисапробные, мезосапробные и олигосапробные зоны), вода как источник инфекции, СПМО воды.

7. Санитарно-микробиологическое исследование воды: а) определение общего микробного числа, б) определение титра и индекса санитарно-показательных микроорганизмов, с) определение патогенных микроорганизмов

8. Микрофлора воздуха, воздух - как фактор передачи инфекционных заболеваний. СПМО воздуха (гемолитические стафилококки и стрептококки).

9. Методы санитарно-микробиологического исследования воздуха: а) седиментационный (метод Коха), б) аспирационный (метод Кротова). Определение общего микробного числа в воздухе. Определение санитарно-показательных микроорганизмов воздуха.

10. Микробиота организма человека (кожи, дыхательных путей, пищеварительного тракта, мочеполовой системы и пр.), ее значение, количественные и качественные методы определения микробиоты. Стерильные органы.

11. Дисбиоз и дисбактериоз.

12. Генетика микроорганизмов.

13. Строение генетического аппарата бактерий (хромосомы и плазмиды).

14. Виды изменчивости у бактерий:

- Модификационная (ненаследственная) изменчивость (морфологическая, культуральная, биохимическая).

- Генетическая (генотипическая) изменчивость:

а) мутации (спонтанные, индуктивные, точечные, хромосомные мутации и т.д.).

б) генетические рекомбинации: трансформация, трансдукция и конъюгация.

15. Генетика вирусов. Модификация, мутация, генетические и негенетические взаимодействия между вирусами.

16. Цели и задачи генной инженерии, практическое применение.

17. Информация о молекулярно-генетических методах и их применении в диагностике.

Экология микробов —микрoэкология

Экология (от греч. oikos — дом, место обитания) микроорганизмов изучает взаимоотношения микроорганизмов друг с другом и с окружающей средой.

Микроорганизмы обнаруживаются в почве, воде, воздухе, на растениях, в организме человека и животных и даже в космосе. Они — составная часть биоценоза, т.е. совокупности животных, растений и микроорганизмов, заселяющих биотоп — участок суши или водоема с однородными условиями жизни.

Сообщество микроорганизмов, обитающих на определенных участках среды, называется микробиоценозом.

Распространение микробов в окружающей среде

Микроорганизмы окружающей среды участвуют в процессах круговорота веществ в природе, уничтожают остатки погибших животных и растений, повышают плодородие почвы, поддерживают устойчивое равновесие в биосфере. В качестве нормальной микрофлоры они выполняют ряд полезных функций для организма человека.

Микрофлора почвы

Почва заселена разнообразными микроорганизмами, которые принимают участие в процессах почвообразования и самоочищения почвы, круговорота в природе азота, углерода и других элементов. В почве обитают бактерии, грибы, лишайники (симбиоз грибов с цианобактериями) и простейшие. Численность бактерий в почве достигает 10 млрд клеток в 1 г. На поверхности почвы микроорганизмов относительно мало, так как на них губительно действуют УФ-лучи, высушивание и другие факторы. Наибольшее число микроорганизмов содержится в верхнем слое почвы толщиной до 10 см. По мере углубления количество микроорганизмов уменьшается, и на глубине 3–4 м они практически отсутствуют.

Состав микрофлоры почвы зависит от ее типа и состояния, видов растительности, температуры, влажности и т.д. Большинство почвенных микроорганизмов развиваются при нейтральном рН, высокой относительной влажности, температуре от 25 до 45°C.

В почве живут азотфиксирующие бактерии, способные усваивать молекулярный азот (*Azotobacter*, *Azomonas*, *Mycobacterium* и др.). Почва служит местом обитания спорообразующих палочек родов *Bacillus* и *Clostridium*. Непатогенные бациллы (*Bac. megaterium*, *Bac. subtilis* и др.) наряду с псевдомонадами, протеем и некоторыми другими бактериями являются аммонифицирующими, составляя группу гнилостных бактерий, осуществляющих минерализацию органических веществ. Патогенные спорообразующие палочки (возбудители сибирской язвы, ботулизма, столбняка, газовой гангрены) способны длительно сохраняться, а некоторые даже размножаться в почве (*Clostridium botulinum*).

Обнаружение бактерий группы кишечной палочки (колиформных бактерий) в значительных количествах служит показателем загрязнения почвы фекалиями человека и животных. Многочисленные грибы почвы участвуют в почвообразовательных процессах, превращениях соединений азота, выделяют биологически активные вещества, в том числе антибиотики и токсины. Токсинообразующие грибы, попадая в продукты питания человека, вызывают интоксикации — микотоксикозы. Количество простейших в почве колеблется от 500 до 500 000 на 1 г почвы.

Микрофлора воды

Микрофлора воды отражает микробный пейзаж почвы. В воде формируются биоценозы с преобладанием микроорганизмов, адаптировавшихся к условиям местонахождения.

Вода пресных водоемов содержит различные бактерии: палочковидные (псевдомонады, аэромонады и др.), кокковидные (микрококки), извитые и нитевидные (актиномицеты). Загрязнение воды органическими веществами сопровождается увеличением числа анаэробных и аэробных бактерий, а также грибов. Особенно много анаэробов в иле, на дне водоемов. Микрофлора воды выполняет роль активного фактора в процессе самоочищения ее от органических отходов, которые утилизируются микроорганизмами. Вместе с загрязненными ливневыми, талыми и сточными водами в озера и реки попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных (индикаторы фекального

загрязнения — кишечная палочка, энтерококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций (брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций и др.). Вода является фактором передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний.

В микрофлоре воды океанов и морей также представлены различные микроорганизмы, в том числе археобактерии, светящиеся и галофильные (солелюбивые), например галофильные вибрионы, поражающие моллюсков и некоторые виды рыб, при употреблении которых в пищу развивается пищевая токсикоинфекция.

Микрофлора воздуха

Микрофлора воздуха взаимосвязана с микрофлорой почвы, воды, человека и животных. С воздухом разносятся кокковидные и палочковидные бактерии, бациллы, клостридии, актиномицеты, грибы и вирусы. Солнечные лучи и другие факторы способствуют гибели микрофлоры воздуха. Большое количество микроорганизмов присутствует в воздухе крупных городов, меньшее — в воздухе сельской местности. Особенно мало микроорганизмов в воздухе над лесами, горами и морями. Состав и численность микроорганизмов воздуха закрытых помещений зависят от условий уборки помещения, уровня освещенности, количества людей в помещении, частоты проветривания и др.

С целью снижения микробной обсемененности воздуха проводят влажную уборку и обработку помещений лампами УФ-излучения, аэрозольную дезинфекцию в сочетании с вентиляцией и очисткой (фильтрацией) поступающего воздуха (например, в микробиологических лабораториях и операционных блоках).

Микрофлора организма человека

Человек заселен (колонизирован) примерно 1000 видами микробов, составляющими его нормальную микрофлору, в виде сообщества (микробиоценоза) массой около 2 кг, содержащего 10^{14} особей, причем преобладают облигатные анаэробы. Микробы находятся в состоянии равновесия (эубиоза) друг с другом и организмом человека. Большинство из них являются комменсалами, не причиняющими вреда человеку. Микрофлора колонизирует поверхность тела и полости, сообщающиеся с окружающей средой. В норме микробы отсутствуют в легких, матке и внутренних органах. Различают постоянную и транзиторную микрофлору. Постоянная микрофлора (резидентная, или автохтонная) представлена микробами, постоянно присутствующими в организме. Транзиторная микрофлора (непостоянная, или аллохтонная) не способна к длительному существованию в организме. Постоянную микрофлору можно разделить на облигатную и факультативную. Облигатная микрофлора (бифидобактерии, лактобактерии, бактероиды, кишечные палочки и др.) является основой микробиоценоза, а факультативная микрофлора (стафилококки, стрептококки, клебсиеллы, клостридии, некоторые грибы и др.) включает меньшую часть микробиоценоза.

Представители нормальной микрофлоры слизистых оболочек заключены в высокогидратированный экзополисахаридно-муциновый матрикс, образуя биологическую пленку, устойчивую к различным воздействиям. Плотность популяции микробов и их взаимоотношения определяются понятием Quorum Sensing (QS), или «ощущение кворума» (чувство локтя).

Кожа. На коже и в ее более глубоких слоях (волосных мешочках, протоках сальных и потовых желез) анаэробов в 2–10 раз больше, чем аэробов.

Кожу колонизируют грамположительные бактерии (пропионибактерии, коринеформные бактерии, эпидермальные стафилококки и другие коагулазоотрицательные стафилококки, микрококки, стрептококки, пептострептококки, *Derma bacter hominis*), а также некоторые грамотрицательные бактерии (рода

Acinetobacter и др.) и дрожжеподобные грибы рода *Malassezia*. Реже встречается транзиторная микрофлора: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* и др. При ослаблении организма на коже возрастает количество бактерий, появляются вирусы простого герпеса, папилломавирусы и грибы.

Конъюнктивы содержат небольшое количество коринеформных бактерий и стафилококков из-за действия лизоцима и других бактерицидных факторов слезной жидкости.

Верхние дыхательные пути содержат бактероиды, коринеформные бактерии, гемофильные палочки, лактобактерии, стафилококки, стрептококки, нейс-серии, пептококки, пептострептококки и др. Трахея, бронхи и альвеолы обычно стерильны.

Рот. Ассоцианты нормальной микрофлоры и продукты их жизнедеятельности образуют зубной налет (бляшки). В 1 мл слюны обитает до 10^8 бактерий, чему способствуют остатки пищи во рту, благоприятная температура (37°C) и щелочная реакция среды. Анаэробов больше, чем аэробов, в 10 и более раз. Микробные сообщества в полости рта образуют аутохтонные и аллохтонные микроорганизмы. Аутохтонную флору образуют резидентные (постоянно обитающие) и транзиторные (временно присутствующие) микробы. Последние наиболее часто включают условно-патогенные и патогенные виды и проникают в полость рта прежде всего из окружающей среды. Аллохтонные микробы попадают в полость рта из других микробных биотопов (например, из кишечника или носоглотки).

Среди бактерий, обитающих в полости рта, доминируют маловирулентные зеленящие стрептококки; *S. hominis* и *S. mitis* обитают на слизистой оболочке, а *S. sanguis* и *S. mutans* колонизируют поверхность зубов. Микроорганизмы разлагают углеводы, вызывая закисление pH, что приводит к декальцинации эмали зубов, а также образуют из сахарозы полисахариды. Из полисахаридов образуются декстран, способствующий образованию зубных бляшек, и леван, разлагающийся в дальнейшем до кислот.

В желудке имеются лактобациллы, дрожжи, единичные кокки и грамотрицательные бактерии. Концентрация бактерий меньше 10^3 клеток на 1 мл, так как желудочный сок имеет низкое значение pH, неблагоприятное для многих микробов. Желудок в норме это своеобразная стерилизационная камера подавляющая патогенные микробы. При гастритах, язвенной болезни желудка обнаруживаются изогнутые бактерии рода *Helicobacter*, которые являются этиологическими факторами многих патологических процессов (гастрит, язвы, опухоли).

Тонкая кишка содержит 10^4 – 10^7 микробов на 1 мл содержимого. Здесь обнаруживаются бифидобактерии, лактобактерии, клостридии, зубактерии, энтерококки, анаэробные кокки, порфиромонады, превотеллы.

Толстая кишка содержит больше бактерий (10^{10} – 10^{12} на 1 г фекалий), чем тонкая кишка. Около 95% всех видов микробов составляют анаэробные бактерии.

Основными представителями микрофлоры толстой кишки являются: анаэробные грамположительные палочки (бифидобактерии, лактобациллы, зубактерии); грамположительные спорообразующие анаэробные палочки, энтерококки; анаэробные грамположительные и грамотрицательные кокки; анаэробные грамотрицательные палочки (бактероиды, превотеллы); факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки (кишечные палочки, цитробактер, энтеробактер, клебсиеллы, протей и др.); на эпителии успешно растут спирохеты.

В меньших количествах обнаруживаются фузобактерии, порфиромонады, пропионибактерии, вейлонеллы, стафилококки, синегнойная палочка и грибы рода *Candida*. Количество простейших (*Blastocystis hominis*, *E. nana*, *hartmanni*, *T.*

hominis) колеблется в норме, в зависимости от диеты и действия факторов окружающей среды.

Рост посторонней микрофлоры задерживается в результате антагонистических свойств нормальной микрофлоры и блокирующего действия секреторного IgA и антимикробных пептидов. У младенцев угнетающим действием также обладает лактоферрин, поступающий с грудным молоком матери.

Микрофлора ЖКТ новорожденных. ЖКТ новорожденного стерилен, но уже через сутки он заселяется микроорганизмами, попадающими в организм ребенка от матери, медицинского персонала и окружающей среды. Через 48 ч после рождения общее количество бактерий достигает 10^9 клеток и более в 1 г фекалий: происходит заселение кишечника лактобактериями, энтеробактериями, стафилококками, энтерококками, вслед за которыми появляются анаэробы (бифидобактерии и бактероиды). На 9–10-е сутки жизни в кишечнике начинают преобладать бифидобактерии, составляющие впоследствии основу микробного пейзажа.

Микрофлора детей первого года жизни содержит (наряду с бифидобактериями, энтерококками, непатогенными эшерихиями и другими) и бактерии, которые могут нарушить это состояние и привести к развитию эндогенной инфекции. К концу первого года жизни происходит частичная или полная элиминация этих бактерий.

Мочеполовой тракт. Почки, мочеточники, мочевого пузыря, матка, простата обычно стерильны. Микрофлора наружных гениталий представлена эпидермальными стафилококками, коринеформными бактериями, зелеными стрептококками, сапрофитическими микобактериями (*M. smegmatis*), кандидами и энтеробактериями. На слизистой оболочке передней уретры встречаются в норме стафилококки, непатогенные нейссерии, коринеформные бактерии, сапрофитные трепонемы и др.

Влагалище включает лактобактерии, бифидобактерии, бактероиды, пропионибактерии, пептострептококки, коринеформные бактерии и др. Преобладают анаэробы: соотношение анаэробы/аэробы составляет 10:1. В репродуктивный период жизни преобладают грамположительные бактерии, а в период менопаузы она заменяется грамотрицательными бактериями. Примерно у 5–60% здоровых женщин выявляются *Gardnerella vaginalis*; у 15–30% — *Mycoplasma hominis*; у 5% — бактерии рода *Mobiluncus*.

Состав микрофлоры зависит от многих факторов: менструального цикла, беременности и др.

Значение микрофлоры организма человека

Нормальная микрофлора — важный фактор врожденного иммунитета. Она обладает антагонистическими свойствами против патогенной и гнилостной микрофлоры, так как продуцирует молочную, уксусную кислоты, антибиотики, микробный лизоцим, бактериоцины; конкурирует с посторонней микрофлорой за счет более высокого биологического потенциала.

Антигены микрофлоры стимулируют иммунную систему. Естественным стимулятором является мурамилдипептид, образующийся из пептидогликана бактерий под влиянием лизоцима и других антимикробных пептидов кишечника.. Микрофлора участвует в *колониционной резистентности*, которая является совокупностью защитных факторов организма и конкурентных, антагонистических и других свойств нормальной микрофлоры (в основном анаэробов) кишечника, придающих стабильность микрофлоре и предотвращающих колонизацию организма посторонними микробами. При снижении колониционной резистентности увеличивается количество и спектр аэробных условно-патогенных микробов. Для нормализации колониционной резистентности проводят *селективную деконтаминацию* — избирательное удаление из пищеварительного

тракта аэробных бактерий и грибов. Ее осуществляют путем приема внутрь малоадсорбируемых химиопрепаратов, подавляющих аэробную часть микрофлоры и не влияющих на анаэробы, например комплексное назначение ванкомицина, гентамицина и нистатина.

Нормальная микрофлора участвует в водно-солевом обмене, регуляции газового состава и перистальтики кишечника, обмене белков, углеводов, жирных кислот, холестерина, нуклеиновых кислот, а также в продукции биологически активных соединений: антибиотиков, витаминов (К, группы В и др.), токсинов и др.

Нормальная микрофлора участвует в переваривании и детоксикации экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов, что сравнимо с функцией печени

Нормальная микрофлора участвует в рециркуляции стероидных гормонов и желчных солей.

Выполняет морфо-кинетическую роль в развитии различных органов и систем организма, участвует в физиологическом воспалении слизистой оболочки и смене эпителия.

Нормальная микрофлора выполняет антимуtagenную функцию, разрушая канцерогенные вещества в кишечнике.

Экзополисахариды (гликокаликс) микробов, входящие в состав биологической пленки, защищают их от разнообразных физико-химических воздействий. Слизистая оболочка кишечника также находится под защитой биологической пленки.

Дисбактериоз и дисбиоз

Дисбактериоз и дисбиоз — состояния, развивающиеся в результате утраты нормальных функций микрофлоры. Эти нарушения определяются как клинко-лабораторный синдром. Они происходят под влиянием внешних факторов, стрессовых воздействий, бесконтрольного применения антимикробных препаратов, лучевой терапии и химиотерапии, нерационального питания, оперативных вмешательств и т.д. При дисбактериозе происходят количественные и качественные изменения бактерий, входящих в состав нормальной микрофлоры. При дисбиозе изменения происходят и среди других групп микроорганизмов (вирусов, грибов и др.). Дисбиозы классифицируют по этиологии (грибковый, стафилококковый, протейный и др.) и по локализации (дисбиоз рта, кишки, влагалища и т.д.). Изменения нормальной микрофлоры сопровождаются различными нарушениями: развитием инфекций, диареи, запора, синдрома мальабсорбции, гастрита, колита, язвенной болезни, злокачественных новообразований, аллергии, мочекаменной болезни и др.

Диагностика нарушений микробиоценоза проводится с помощью бактериологического метода, ПЦР-диагностики, хроматомасс-спектрометрии и исследования метаболитов (метод газожидкостной хроматографии). Возможно определение в исследуемом материале микробных метаболитов — маркеров дисбиоза (жирных кислот, гидроксигирных кислот, жирнокислотных альдегидов, ферментов и др.).

Для восстановления нормальной микрофлоры проводят селективную деконтаминацию и назначают per os различные препараты: пребиотики, пробиотики (эубиотики), синбиотики; энтеросорбенты.

Генетика микроорганизмов.

Строение генома бактерий

Бактериальный геном состоит из генетических элементов, способных к самостоятельной репликации (воспроизведению), т.е. репликаонов. Репликаонами являются бактериальная хромосома и плазмиды. Наследственная информация у бактерий хранится в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которые определяют последовательность аминокислот в белке. Каждому белку

соответствует свой ген, т.е. дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов.

Бактериальная хромосома состоит из одной двухцепочечной молекулы ДНК, которая может быть как кольцевой (*E. coli*), так и линейной формы (*B. burgdorferi*). Некоторые бактерии, в частности бруцеллы, *V. cholerae* имеют по две хромосомы. Размеры бактериальной хромосомы у различных представителей прокариот варьируют от 3×10^8 до $2,5 \times 10^9$ Да. Бактериальная хромосома обладает гаплоидным набором генов, кодирующих жизненно важные для бактериальной клетки функции. Она формирует компактный нуклеоид бактериальной клетки.

Плазмиды бактерий представляют собой двухцепочечные молекулы ДНК размером от 10^3 до 10^6 н.п. Они кодируют неосновные для жизнедеятельности бактериальной клетки функции, но придающие бактерии преимущества при попадании в неблагоприятные условия существования.

Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плазмидами, можно выделить следующие: 1) устойчивость к антибиотикам; 2) образование колицинов; 3) продукция факторов патогенности; 4) способность к синтезу антибиотических веществ; 5) расщепление сложных органических веществ; 6) образование ферментов рестрикции и модификации.

Репликацию плазмидной ДНК и бактериальной хромосомы осуществляет один и тот же набор ферментов, однако репликация плазмид происходит независимо от хромосомы.

Некоторые плазмиды находятся под строгим контролем. Это означает, что их репликация сопряжена с репликацией хромосомы так, что в каждой бактериальной клетке присутствует одна или, по крайней мере, несколько копий плазмид. Число копий плазмид, находящихся под слабым контролем, может составлять от 10 до 200 на бактериальную клетку.

Некоторые плазмиды могут обратимо встраиваться в бактериальную хромосому и функционировать в виде единого репликона. Такие плазмиды называются интегративными, или эписомами.

Ряд бактериальных плазмид способны передаваться из одной клетки в другую, иногда даже принадлежащую иной таксономической единице. Такие плазмиды называются трансмиссивными (син.: конъюгативными). Трансмиссивность присуща лишь крупным плазмидам, имеющим *tra*-оперон, в который объединены гены, ответственные за перенос плазмиды. Эти гены кодируют по- ловые пили, которые образуют мостик с клеткой, не содержащей трансмиссивную плазмиду, по которой плазмидная ДНК передается в новую клетку. Этот процесс называется конъюгацией.

Мелкие плазмиды, не несущие *tra*-гены, не могут передаваться сами по себе, но способны к передаче при наличии трансмиссивных плазмид, используя их аппарат конъюгации. Такие плазмиды называются мобилизуемыми.

Особое значение в медицинской микробиологии имеют плазмиды, обеспечивающие устойчивость бактерий к антибиотикам, получившие название R-плазмид, а также плазмиды, отвечающие за продукцию факторов патогенности, способствующие развитию инфекционного процесса. В результате наличия такой плазмиды бактериальная клетка становится устойчивой (резистентной) к действию целой группы лекарственных веществ, а иногда и к нескольким. Бактериальные штаммы, несущие R-плазмиды, часто являются этиологическими агентами внутрибольничных инфекций.

Плазмиды, детерминирующие синтез факторов патогенности, обнаружены у многих бактерий. Патогенность возбудителей шигеллезов, иерсиниозов, чумы, сибирской язвы, иксодового боррелиоза, кишечных эшерихиозов связана с наличием и функционированием у них плазмид патогенности. Первыми из этой

группы плазмид были определены Ent-плазида, определяющая синтез энтеротоксина, и Hly-плазида, детерминирующая синтез гемолизина у *E. coli*. Некоторые *E. coli* владеют Col-плазмидой, определяющей синтез колицинов, оказывающих микробоцидное действие на колиформные бактерии.

Подвижные генетические элементы

В состав бактериального генома, как в бактериальную хромосому, так и в плазмиды, входят подвижные генетические элементы, к которым относятся вставочные последовательности и транспозоны.

Вставочные (инсерционные) последовательности, IS-элементы (от англ. insertion sequences) — это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами. IS-элементы имеют размеры ~1000 н.п. и содержат лишь те гены, которые необходимы для их собственного перемещения — транспозиции: ген, кодирующий фермент транспозазу, обеспечивающую процесс исключения IS-элемента из ДНК и его интеграцию в новый локус, и ген, детерминирующий синтез репрессора, который регулирует весь процесс перемещения.

Отличительная особенность IS-элементов — наличие на концах вставочной последовательности инвертированных повторов, которые узнает транспозаза, осуществляющая одноцепочечные разрывы цепей ДНК. Оригинальная копия IS-элемента остается на прежнем месте, а ее реплицированный дубликат перемещается на новый участок.

Транспозоны — это сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но имеющие структурные гены, т.е. гены, обеспечивающие синтез молекул, обладающих специфическим биологическим свойством, например токсичностью, или обеспечивающих устойчивость к антибиотикам.

Мутации у бактерий

Мутации — это изменения в последовательности отдельных нуклеотидов ДНК, которые ведут к изменениям морфологии бактериальной клетки, возникновению потребностей в факторах роста (например, в аминокислотах, витаминах, т.е. ауксотрофности); к развитию устойчивости к антибиотикам, изменению чувствительности к температуре, снижению вирулентности (аттенуация) и т.д.

По протяженности повреждений ДНК различают мутации точечные, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, и протяженные, или абберрации. В последнем случае могут наблюдаться выпадения нескольких пар нуклеотидов, которые называются делецией, добавление нуклеотидных пар, т.е. дупликация, перемещение фрагментов хромосомы, транслокация, и перестановки нуклеотидных пар — инверсии.

Мутации могут быть спонтанными, т.е. возникающими самопроизвольно, без воздействия извне, и индуцированными.

Индукцированные мутации происходят под влиянием внешних факторов, которые называются мутагенами. Мутагены бывают физическими (УФ-лучи, -радиация), химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, азотистая кислота и ее аналоги и другие соединения) и биологическими — транспозоны. На бактериях, подвергнутых УФ-облучению, было показано, что повреждения в бактериальных ДНК, вызванные облучением, могут частично исправляться благодаря наличию репарационных систем.

Мутация, приводящая к потере функции, называется прямой мутацией. У мутантов может произойти восстановление исходных свойств, т.е. реверсия (от англ. reverse — обратный) Если происходит восстановление исходного генотипа, то мутация, восстанавливающая генотип и фенотип, является обратной или прямой реверсией. Если мутация восстанавливает фенотип, не восстанавливая генотип, то такая мутация называется супрессорной.

Рекомбинация у бактерий

Генетическая рекомбинация — это взаимодействие между двумя геномами, т.е. между двумя ДНК, обладающими различными генотипами, которое приводит к образованию рекомбинантной ДНК, формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые воспринимают его. В клетку-реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора. В результате рекомбинации образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента с включенным в него фрагментом хромосомы донора.

Рекомбинация у бактерий — это конечный этап передачи генетического материала между ними, которая осуществляется посредством трех механизмов: конъюгацией (при контакте бактерий, одна из которых несет конъюгативную плазмиду), трансдукцией (при помощи бактериофага) и трансформацией (при помощи высокополимеризованной ДНК)/

Конъюгация — передача генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент путем непосредственного контакта клеток. Необходимым условием для конъюгации является наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды.

Трансмиссивные плазмиды кодируют половые пили, образующие конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой плазмидная ДНК передается в новую клетку. Цепь ДНК переносится в клетку-реципиент, а неразорванная комплементарная цепь остается в клетке-доноре. Клеточный аппарат синтеза ДНК достраивает одиночные цепи и в доноре, и в реципиенте до двухцепочечной структуры. Примером служит перенос в реципиентную клетку F-фактора, или F-плазмиды (от англ. fertility — плодовитость), которая является как трансмиссивной, так и интегративной. Клетки-доноры, обладающие F-фактором, обозначаются как F⁺-клетки, а клетки-реципиенты, не имеющие F-фактора, — как F⁻-клетки.

Если F-фактор или другая трансмиссивная плаزمида встраиваются в хромосому клетки-донора, то плазмиды и хромосома начинают функционировать в виде единого трансмиссивного репликона, что делает возможным перенос бактериальных генов в бесплазмидную клетку-реципиент, т.е. процесс конъюгации. Штаммы, в которых плазмиды находятся в интегрированном состоянии с хромосомой, переносят свои хромосомные гены бесплазмидным клеткам с высокой частотой и поэтому называются *Hfr* (высокая частота рекомбинации).

Трансдукция — передача бактериальной ДНК посредством бактериофага. В процессе репликации бактериофага внутри бактерий фрагмент бактериальной ДНК проникает в фаговую частицу и переносится в реципиентную бактерию во время фаговой инфекции. Различают общую и специфическую трансдукцию. Общая трансдукция — перенос бактериофагом фрагмента любой части бактериальной хромосомы.

Специфическая трансдукция наблюдается в том случае, когда фаговая ДНК интегрирует в бактериальную хромосому с образованием профага. В процессе исключения ДНК-фага из бактериальной хромосомы в результате случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы, становясь дефектным фагом. Так как большинство умеренных бактериофагов интегрирует в бактериальную хромосому в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК клетки-донора.

Трансформация — передача бактерии фрагмента бактериальной высокополимеризованной ДНК из разрушенной бактерии. Феномен трансформации впервые был описан в 1928 г. Ф. Гриффитсом, обнаружившим превращение бескапсульного R-штамма пневмококков (*Streptococcus pneumoniae*) в штамм, образующий капсулу S-формы. Природу трансформирующего фактора в 1944 г. установили О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Картти, которые показали, что ДНК, экстрагированная из инкапсулированных пневмококков, может трансформировать некапсулированные пневмококки в инкапсулированную форму. Таким образом, было доказано, что именно ДНК является носителем генетической информации.

Процесс трансформации зависит от компетентности клетки-реципиента и состояния донорской трансформирующей ДНК. Компетентность — это способность бактериальной клетки поглощать ДНК. Она зависит от присутствия особых белков в клеточной мембране, обладающих специфическим аффинитетом к ДНК. Трансформирующей активностью обладает только двунитчатая высокоспирализованная молекула ДНК. Это связано с тем, что в клетку-реципиент проникает только одна нить ДНК, тогда как другая — на клеточной мембране — подвергается деградации с освобождением энергии, которая необходима для проникновения в клетку сохранившейся нити. Рекомбинация происходит на одной нити, в результате чего образуется гетеродуплексная молекула, одна нить которой имеет генотип реципиента, а другая — рекомбинантный генотип. В настоящее время это основной метод генной инженерии, используемый при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.

Особенности генетики вирусов

Особенность строения вирусного генома заключается в том, что наследственная информация может быть записана как на ДНК, так и на РНК в зависимости от типа вируса.

Мутации у вирусов могут возникать спонтанно, в процессе репликации нуклеиновой кислоты вируса, а также под влиянием тех же внешних факторов и мутагенов, что и у бактерий. Фенотипически мутации вирусного генома проявляются изменениями в антигенной структуре, неспособностью вызывать продуктивную инфекцию в чувствительной клетке, чувствительностью продуктивного цикла к температуре, а также изменением формы и размера бляшек, которые образуют вирусы в культуре клеток под агаровым покрытием.

Свойства вирусов могут изменяться при одновременном заражении несколькими вирусами чувствительной клетки. Причем изменения свойств при таких условиях могут происходить как в результате обмена между материалами нуклеиновых кислот, принадлежащих разным вирусам (генетическая рекомбинация и генетическая реактивация), так и в результате процессов, не сопровождающихся обменом генетического материала (комплементация и фенотипическое смешивание).

Генетическая рекомбинация встречается чаще у ДНК-содержащих вирусов. Среди РНК-содержащих вирусов она наблюдается у тех из них, которые обладают фрагментированным геномом, например у вируса гриппа. При рекомбинации происходит обмен между гомологичными участками генома.

Генетическая реактивация наблюдается между геномами родственных вирусов, имеющих мутации в разных генах. В результате перераспределения генетического материала формируется полноценный дочерний геном.

Комплементация встречается в том случае, когда один из двух вирусов, инфицирующих клетку, в результате мутации синтезирует нефункциональный белок. Немутантный вирус, синтезируя полноценный белок, восполняет его отсутствие у мутантного вируса.

Фенотипическое смешивание наблюдается в том случае, если при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, при сохранении неизменности генотипа.

Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней.

Рестрикционный анализ основан на применении ферментов рестриктаз, которые представляют собой эндонуклеазы, расщепляющие молекулы ДНК путем разрыва фосфатных связей в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией и считающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии. Точка разрыва ДНК может или совпадать с осью симметрии, или быть сдвинута относительно нее.

В настоящее время из различных бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты (участки) узнавания (рестрикции). Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК. В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически задетерминированное) число участков узнавания для определенной рестриктазы.

Метод молекулярной гибридизации позволяет выявить степень сходства различных ДНК. Применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию в нем ДНК микроба без выделения последнего в чистой культуре. Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, в которой определяют наличие специфичного для данного микроба гена. Обнаружение гена осуществляют его накоплением. Проводят реакцию в специальных приборах — амплификаторах. ПЦР применяется для диагностики вирусных и бактериальных инфекций.