**Лекция 3**

Физиология микроорганизмов. Метаболизм и размножение. Экология микроорганизмов. Микрофлора лекарственного сырья и готовых лекарств. Влияние факторов внешней среды (физических, химических и биологических) на микроорганизмы. Бактериофаги. Генетика микроорганизмов.

**Цель лекции:** Ознакомить студентовс особенностями физиологии, метаболизма, питания, размножения микроорганизмов. Ознакомить студентов с генетическим аппаратом бактерий (хромосома, плазмида, мигрирующие генетические элементы). Объяснить понятия мутация и рекомбинация. Бактериофаги – строение, особенности, их практическое применение. Oзнакомить студентовс особенностями экологии микроорганизмов, с ролью нормальной микрофлоры организма человека. Информировать студентов о микрофлоре лекарственного сырья и готовых лекарств.

**План лекции: физиология микроорганизмов**

1. Физиология микроорганизмов. Особенности метаболизма питания дыхания и размножения микроорганизмов. Типы питания микроорганизмов.

- размножение бактерий. Фазы размножения.

-репродукция вирусов. Особенности репродукции ДНК и РНК-содержащих вирусов. Mетоды индикации и идентификации вирусов.

- методы культивации, индикации и идентификации вирусов в культуре клеток, куриных эмбрионах и в

лабораторных животных.

- Принципы культивации микроорганизмов, культуральные особенности и их значение в идентификации.

2. Экология микроорганизмов. Распространение микроорганизмов в окружающей среде.

3. Микрофлора лекарственного сырья и готовых лекарств.

**-** нормальная микрофлора растений эпифиты и фитопатогенные микроорганизмы.

- микрофлора готовых лекарственных средств.

4. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы;

- физические

- химические

- биологические факторы

5. Бактериофаги;

- природа, строение и особенности бактериофагов.

- вирулентные и умеренные бактериофаги. Дефектные фаги.

- применение фагов в практике.

6. Генетика микроорганизмов:

- понятие о генетике микроорганизмов, информация о наследственности и изменчивости.

- формы изменчивости: ненаследственная (модификация) и наследственная (генетическая).

- ненаследственная изменчивость (модификация) у бактерий.

- наследственная изменчивость (мутации и рекомбинации) у бактерий.

- генетические рекомбинации у бактерий. Механизм трансформации, трансдукции и конъюгации.

- генетика вирусов.

**Оснащение лекции*:*** компьютер, проектор, электронные слайды

**Литература**: cтр. 1

Физиология бактерий изучает жизнедеятельность, метаболизм, питание, энер-

гию роста и размножение бактерий, а также их взаимодействие с окружающей

средой. Метаболизм бактерий лежит в основе изучения и разработки методов их

культивирования, получения чистых культур и их идентификации.

Химический состав бактериальной клетки. Бактериальная клетка на 80-

90% состоит из воды, и только 10% приходится на долю сухого вещества. Вода

в клетке находится в свободном или связанном состоянии. Она выполняет ме-

ханическую роль в обеспечении тургора, участвует в гидролитических реак-

циях. Высушивание микроор-  
ганизмов в вакууме из замороженного состояния (лиофилизация) прекращает   
размножение микробов и способствует длительному их сохранению.

Состав сухого вещества распределен следующим образом: 52% составляют белки, 17% — углеводы, 9% — липиды, 16% — РНК, 3% — ДНК и 3% — мине-  
ральные вещества.

*Белки* являются ферментами, а также составной частью клетки, входят   
в состав цитоплазматической мембраны и ее производных, клеточной стенки,   
жгутиков, спор и некоторых капсул. Некоторые бактериальные белки служат антигенами и токсинами бактерий. В состав бактерий входят отсутствующие   
у человека D-аминокислоты, а также диаминопимелиновая кислота

*Углеводы* представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди-, олигоса-  
харов и полисахаридов, а также входят в состав комплексных соединений с бел-  
ками, липидами и другими соединениями. Полисахариды находятся в составе некоторых капсул, клеточной стенки; крахмал и гликоген являются запасны-  
ми питательными веществами. Некоторые полисахариды принимают участие в формировании антигенов.

*Липиды* или жиры входят в состав цитоплазматической мембраны и ее про-  
изводных, клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также служат за-  
пасными веществами, входят в состав эндотоксина грамотрицательных бакте-  
рий, в составе ЛПС формируют антигены. В бактериальных жирах преобладают   
длинноцепочечные (С14-С18) насыщенные жирные кислоты и ненасыщенные   
жирные кислоты, содержащие одну двойную связь. Сложные липиды представ-  
лены фосфатидилинозитом, фосфатидилглицерином и фосфатидилэтанолами-  
ном. У некоторых бактерий в клетке находятся воски, эфиры миколовой кисло-  
ты. Микоплазмы — единственные представители прокариот, имеющие в составе   
цитоплазматической мембраны стеролы.

*Нуклеиновые кислоты.* В бактериальной клетке присутствуют все типы   
РНК: иРНК, тРНК, рРНК. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды — это те   
строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кроме   
того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав многих кофер-  
ментов и служат для активации и переноса аминокислот, моносахаров, органи-  
ческих кислот.

ДНК выполняет в бактериальной клетке наследственную функцию. Моле-  
кула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепочек. Каждый нуклеотид   
состоит из азотистого основания, сахара дезоксирибозы и фосфатной группы   
(рис. 3.1, *а*). Азотистые основания представлены пуринами (аденин, гуанин)   
и пиримидинами (тимин, цитозин). Каждый нуклеотид обладает полярностью.   
У него имеется дезоксирибозный 3’-конец и фосфатный 5’-конец. Нуклеотиды   
соединяются в полинуклеотидную цепочку посредством фосфодиэфирных свя-  
зей между 5’-концом одного нуклеотида и 3’-концом другого (см. рис. 3.1, *б*).   
Сцепление между двумя цепями обеспечивается водородными связями меж-  
ду комплементарными азотистыми основаниями: аденина с тимином, гуани-  
на с цитозином. Нуклеотидные цепи антипараллельны: на каждом из концов   
линейной молекулы ДНК расположен 5’-конец одной цепи и 3’-конец другой   
цепи. Процентное содержание количества гуанин/цитозин (ГЦ)-пар в ДНК   
определяет степень родства между бактериями и используется при определе-  
нии таксономического положения бактерий.

*Другие вещества.* Минеральные вещества обнаруживаются в золе, полу-  
ченной после сжигания клеток. В большом количестве представлены N, S, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, а также микроэлементы Zn, Cu, Co, Ba.

Азот входит в состав белков, нуклеотидов, коферментов. Сера входит в виде   
сульфгидрильных групп в структуру белков. Фосфор в виде фосфатов пред-  
ставлен в нуклеиновых кислотах, АТФ, коферментах. В качестве активаторов   
ферментов используются ионы Mg, Fe, Mn. Ионы K и Mg необходимы для акти-  
вации рибосом. У многих бактерий имеются *сидерохромы*,которые обеспечива-  
ют транспортировку ионов Fe внутрь клетки в виде растворимых комплексных   
соединений.

Классификация бактерий по типам питания и способам получения энер-  
гии.Поскольку основными компонентами бактерий являются органические   
соединения, белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и липиды, остов которых   
построен из атомов углерода, то для их роста требуется постоянный приток ато-  
мов углерода.

В зависимости от источника усвояемого углерода бактерии подразделяют на: x *аутотрофы* (от греч. *autos* — сам, *trophe* — питание), использующие для   
 построения своих клеток неорганический углерод в виде СО2;   
x *гетеротрофы* (от греч. *heteros* — другой), использующие органический   
 углерод, легкоусвояемыми источниками которого являются гексозы, мно-  
 гоатомные спирты и аминокислоты.

Белки, жиры, углеводы и нуклеиновые кислоты — крупные полимерные мо-  
лекулы, которые синтезируются из мономеров в реакциях поликонденсации,   
протекающих с поглощением энергии. Поэтому для восполнения своей биомас сы бактериям помимо источника углерода требуется источник энергии. Энер-  
гия запасается бактериальной клеткой в форме молекул АТФ.

Организмы, для которых источником энергии является свет, называются   
*фототрофами.* Те организмы, которые получают энергию за счет окис-  
лительно-восстановительных реакций, называются *хемотрофами*.

Среди хемотрофов выделяют *литотрофы* (от греч. *lithos* — камень), способ-  
ные использовать неорганические доноры электронов (H2, NH3, H2S, Fe2+ и др.),   
и *органотрофы*, которые используют в качестве доноров электронов органиче-  
ские соединения.

Бактерии, изучаемые медицинской микробиологией, являются *гетерохемо-*  
*органотрофами*. Отличительная особенность этой группы в том, что углерод у них служит источником энергии. Учитывая разнообразие микромира и типов метаболизма, далее изложение материала ограничено рассмотрением метабо-  
лизма у гетерохемоорганотрофов.

Степень гетеротрофности у различных бактерий неодинакова. Среди них вы-  
деляют *сапрофиты* (от греч. *sapros* — гнилой, *phyton* — растение), питающиеся   
мертвым органическим материалом и независимы от других организмов; *пара-*  
*зиты* (от греч. *parasitos* — нахлебник) — гетеротрофные микроорганизмы, зави-  
симые в получении питательных веществ от макроорганизма. Различают обли-  
гатные и факультативные паразиты. Облигатные паразиты полностью лишены   
возможности жить вне клеток. К ним относятся представители родов *Rickettsia*,   
*Coxiella*, *Ehrlichia* и *Chlamуdia*, размножающиеся только внутри клеток макроор-  
ганизма. Факультативные паразиты могут жить и без хозяина и размножаться,   
так же как и сапрофиты, на питательных средах *in vitro*, т.е. вне организма.

Культивирование бактерий в системах *in vitro* осуществляется на *пита-*  
*тельных средах*. Искусственные питательные среды должны отвечать следую-  
щим требованиям.

1. Питательная среда должна содержать воду, так как все процессы жизне-  
деятельности бактерий протекают в воде.

2. Для культивирования гетероорганотрофных бактерий в среде должен со-  
держаться органический источник углерода и энергии (углеводы, аминокисло-  
ты, органические кислоты, липиды). Наибольшим энергетическим потенциа-  
лом обладает глюкоза, так как она непосредственно подвергается расщеплению   
с образованием АТФ и ингредиентов для биосинтетических путей. Часто ис-  
пользуется в этих целях *пептон* — продукт неполного гидролиза белков, состо-  
ящий из поли-, олиго- и дипептидов. Пептон также поставляет аминокислоты   
для построения бактериальных белков.

3. Для синтеза белков, нуклеотидов, АТФ и коферментов бактериям требу-  
ются источники азота, серы, фосфаты и другие минеральные вещества, в том   
числе микроэлементы. Источником азота могут служить пептон и соли аммо ния. Серу и фосфор бактерии способны утилизировать в виде неорганических солей: сульфатов и фосфатов. Для нормального функционирования ферментов бактериям требуются ионы Cа2+, Mg2+, Mn2+, Fe2+, которые добавляют в пита-  
тельную среду в виде солей, чаще всего фосфатов.

4. Решающее значение для роста микроорганизмов имеет рН среды для пре-  
дотвращения гибели от ими же образованных продуктов обмена. С этой целью питательную среду забуферивают, чаще всего используя фосфатный буфер. При сильном выделении бактериями кислот как продуктов обмена добавляют к питательной среде карбонат кальция CaCl2.

5. Среда должна обладать определенным осмотическим давлением. Большин-  
ство бактерий способны расти на изотоничных средах, что достигается добав-  
лением NaCl в концентрации 0,87%. Бактерии, не способные расти на средах с концентрацией соли ниже 1%, называются *галофильными*.

Так как устойчивость к осмотическому давлению определяется наличием у бактерий клеточной стенки, бактерии, лишенные клеточной стенки, мико-  
плазмы и L-формы, могут расти на питательных средах, содержащих гиперто-  
нический раствор, обычно сахарозы.

При необходимости к питательной среде добавляют факторы роста, ингиби-  
торы роста определенных бактерий, субстраты для действия ферментов, инди-  
каторы.

6. Питательные среды должны быть стерильными.

В зависимости от консистенции питательные среды могут быть жидкими,   
полужидкими и плотными. Плотность среды достигается добавлением агара.   
 *Агар* — полисахарид, получаемый из водорослей. Он плавится при темпера-  
туре 100 qС, но при охлаждении остывает при температуре 45-50 qС. Агар до-  
бавляют в концентрации 0,5% — для полужидких сред и 1,5-2% — для создания плотных сред.

В зависимости от состава и цели применения различают простые, сложные, элективные, минимальные, дифференциально-диагностические и комбини-  
рованные среды. К *простым средам* относятся пептонная вода, питательный бульон, мясопептонный агар. На основе этих простых сред готовят *сложные*, например сахарный и сывороточный бульоны, кровяной агар.

Под *элективными* понимают среды, на которых лучше растет какой-то определенный микроорганизм. Например, щелочной агар, имеющий рН 9, слу-  
жит для выделения холерного вибриона. Другие бактерии, в частности кишеч-  
ная палочка, из-за высокого рН на этой среде не растут.

*Среды обогащения* стимулируют рост какого-то определенного микроорга-  
низма, ингибируя рост других. Например, среда, содержащая селенит натрия,   
стимулирует рост бактерий рода *Salmonella*, ингибируя рост кишечной палочки.

*Дифференциально-диагностические* среды служат для изучения фермен-  
тативной активности бактерий. Они состоят из простой питательной среды   
с добавлением субстрата, на который должен подействовать фермент, и инди катора, меняющего свой цвет в результате ферментативного превращения суб-  
страта. Примером служат среды Гисса, используемые для изучения способности бактерий ферментировать сахара.

*Комбинированные* питательные среды сочетают в себе элективную среду,   
подавляющую рост сопутствующей флоры, и дифференциальную среду, диа-  
гностирующую ферментативную активность выделяемого микроба. Примером   
служат среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые при выде-  
лении патогенных кишечных бактерий. Обе эти среды ингибируют рост кишеч-  
ной палочки

Ферменты бактерий

В основе метаболических реакций в бактериальной клетке лежит деятельность

ферментов, которые принадлежат к шести классам: оксиредуктазы, трансфера-

зы, гидролазы, лигазы, лиазы, изомеразы. Ферменты могут локализоваться как

внутри бактерии — эндоферменты, так и выделяться в окружающую среду —

экзоферменты. Экзоферменты играют большую роль в обеспечении бакте-

рий доступными для проникновения внутрь источниками углерода и энергии.

Большинство гидролаз — экзоферменты, которые, выделяясь в окружающую

среду, расщепляют крупные молекулы пептидов, полисахаридов, липидов

до мономеров и димеров, способных проникнуть внутрь бактерии. Ряд экзо-

ферментов, например гиалуронидаза, коллагеназа и др., являются ферментами

агрессии. Некоторые ферменты локализованы в периплазме бактериальной

клетки. Они участвуют в процессах переноса веществ в бактериальную клетку.

Ферментативный спектр — это таксономический признак, характерный для се-

мейства, рода и в некоторых случаях для видов. Поэтому определением спектра

ферментативной активности пользуются при установлении таксономического

положения бактерий. Наличие экзоферментов можно определить при помощи

дифференциально-диагностических сред.

Энергетический метаболизм

Энергия в бактериальной клетке накапливается в форме молекул АТФ. У хемо-  
органотрофных бактерий реакции, связанные с получением энергии в форме   
АТФ, — окислительно-восстановительные, сопряженные с реакциями фосфо-  
рилирования. Окисленный в этих реакциях углерод выделяется клеткой в виде   
СО2. Для удаления отщепившегося в этих реакциях водорода, который нахо-  
дится в форме восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД), раз-  
ные бактерии используют различные возможности в зависимости от конечного   
акцептора водорода (или электронов, протонов, что считается эквивалентным   
понятием). В зависимости от способа получения энергии у бактерий имеется   
несколько типов метаболизма: *окислительный*,или дыхание; *бродильный*, или ферментативный; смешанный. Тип метаболизма определяет не только реакции, в результате которых образуется АТФ, но также конечные продукты этих реакций, которые используются при идентификации бактерий, и условия культивирования бактерий.

При использовании в качестве источника углерода и энергии глюкозы или других гексоз начальные этапы окисления глюкозы общие как при окислитель-

ном, так и при бродильном метаболизме. К ним относятся пути превращения глюкозы в пируват (при использовании в качестве источника энергии отличных от глюкозы гексоз, или дисахаридов, они в результате химических превращений вступают в цепь реакций, превращающих глюкозу в пируват).

Расщепление глюкозы до пирувата у бактерий может происходить тремя пу-

тями:

1) через образование фруктозо-1,6-дифосфата (ФДФ-путем, или глико-

литическим путем, или по имени изучавших его исследователей — путем

Эмбдена—Мейергофа—Парнаса);

2) через пентозофосфатный путь (ПФ-путь), значение которого заклю-

чается в подготовке промежуточных веществ, необходимых для синтеза

нуклеиновых кислот, аминокислот, а также синтеза восстановленного ни-

котинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ); как единственный путь

расщепления глюкозы встречается у бактерий, у которых отсутствуют ос-

новные ферменты ФДФ-пути, — у Lactobacillus brevis;

3) КДФГ-путь (2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконовая кислота; путь Этне-

ра—Дудорова), специфичный только для бактерий, лишенных фосфоф-

руктокиназы (род Pseudomonas).

Глюкоза в бактериальной клетке сначала фосфорилируется до глюкозо-6-

фосфата (Г-6-Ф), который служит исходным соединением для любого из трех

указанных путей. Пируват, образовавшийся при расщеплении глюкозы, пре-

вращается при участии кофакторов в «активированную» уксусную кислоту или

ацетилкоэнзим А. Последний в цикле трикарбоновых кислот окисляется в СО2

с отщеплением водорода.

Цикл трикарбоновых кислот выполняет не только функцию конечного окис-

ления питательных веществ, но и обеспечивает процессы биосинтеза много-

численными предшественниками: пируват D-кетоглутаровая, щавелевая и ян-

тарные кислоты — для синтеза аминокислот; щавелевоуксусная — для синтеза пиримидиновых нуклеотидов, малонат — для синтеза аминокислот, пиримиди-

новых нуклеотидов и жиров (рис. 3.2).

Окислительный метаболизм. Бактерии, обладающие окислительным мета-

болизмом, энергию получают путем дыхания.

Дыхание — процесс получения энергии в реакциях окисления-восстанов-

ления, сопряженных с реакциями окислительного фосфорилирования,

при котором донорами электронов могут быть органические (у органотро фов) и неорганические (у литотрофов) соединения, а акцептором — толь-  
ко неорганические соединения.

У бактерий, обладающих окислительным метаболизмом, акцептором элек-  
тронов, или водорода (Н+), служит молекулярный кислород. В этом случае   
пируват полностью окисляется в цикле трикарбоновых кислот до СО2. Цикл   
трикарбоновых кислот выполняет функцию как поставщика предшественни-  
ков для биосинтетических процессов, так и атомов водорода, который в форме   
восстановленного НАД переносится на молекулярный кислород через ряд пе-  
реносчиков, обладающих сложной структурно оформленной мультифермент-  
ной системой — *дыхательной цепью.* Дыхательная цепьу бактерий локализована   
в цитоплазматической мембране и во внутриклеточных мембранных структурах-

Переносчики, осуществляющие транспорт электронов (водорода) на моле-  
кулярный кислород, относятся к четырем классам дегидрогеназ, кофермента-  
ми которых являются НАД, флавопротеины, хиноны и цитохромы. Электроны   
передвигаются от одного носителя к другому в направлении увеличивающего-  
ся окислительно-восстановительного потенциала. Среди бактериальных цито хромов различают цитохромы b, с, а, а3. Конечным этапом переноса электронов   
(протонов) по дыхательной цепи служит восстановление цитохромов а + а3 (ци-  
тохромоксидазы). Цитохромоксидаза — конечная оксидаза, передающая элек-  
троны на кислород. В процессе переноса электронов по цитохромам меняется   
валентность входящего в состав железопорфирированной группы железа. За-  
вершается перенос электронов реакцией О2 + 4F2+ o 2О2- + 4F3+. Образующи-  
еся при окислении ФАД или хинонов протоны связываются ионами О2- с обра-  
зованием воды.

Образование АТФ в дыхательной цепи связывают с хемоосмотическим про-  
цессом. Особая ориентация переносчиков в цитоплазматической мембране приводит к тому, что передача водорода происходит с внутренней поверхности мембраны на внешнюю, в результате чего создается градиент атомов водорода, проявляющийся в наличии мембранного потенциала. Энергия мембранного по-  
тенциала используется для синтеза АТФ.

Белки вначале вне клетки расщепляются протеолитическими ферментами   
на пептиды, которые поглощаются клеткой и расщепляются внутриклеточны-  
ми пептидазами до аминокислот. Аминокислоты могут использоваться в кон структивном метаболизме, а могут у аммонифицирующих бактерий служить основным материалом в энергетических процессах при *окислительном деза-*  
*минировании*,в результате которого происходит выделение аммиака и превра-  
щение аминокислоты в кетокислоту, которая через цикл трикарбоновых кислот вступает в конструктивный метаболизм:

Процесс аммонификации известен как *гниение*, при этом происходит нако-  
пление продуктов, обладающих неприятным специфическим запахом образу-  
ющихся при этом первичных аминов. Гнилостные бактерии осуществляют ми-  
нерализацию белка, разлагая его до СО2, NН3 и H2S. К гнилостным бактериям относятся *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus и др*.

Бродильный (ферментативный) метаболизм*.* Кислород в процессе бро-  
жения участия не принимает.

Ферментация, или брожение, — процесс получения энергии, при котором   
отщепленный от субстрата водород переносится на органические соеди-  
нения.

*Спиртовое брожение* встречается в основном у дрожжей. Конечными продуктами являются этанол и СО2. Сбраживание глюкозы происходит по ФДФ-пути в анаэробных условиях. При доступе кислорода процесс брожения ослабевает, на смену ему приходит дыхание. Подавление спиртового брожения кислородом называется эффектом Пастера.

Спиртовое брожение используется в пищевой промышленности: хлебо-  
пекарной, виноделии.

*Молочнокислое брожение* подразделяется на два типа: гомоферментатив-  
ное и гетероферментативное. При *гомоферментативном* типе расщепление

глюкозы проходит по ФДФ-пути. Водород от восстановленного НАД пере-  
дается на пируват при помощи лактатдегидрогеназы, при этом образуется мо-  
лочная кислота. Гомоферментативное молочнокислое брожение происходит   
у стрептококков (*S. pyogenes*, *E. faecalis*, *S. salivarius*), у некоторых видов рода   
*Lactobacillus: L. dulgaricus*, *L. lactis.* *Гетероферментативным* молочнокислым   
брожением обладают бактерии, у которых отсутствует ряд ферментов ФДФ-пу-  
ти. Расщепление глюкозы происходит по ПФ-пути с образованием фосфогли-  
церинового альдегида, который превращается далее в пируват по ФДФ-пути.   
Дополнительными продуктами этого типа брожения являются также этанол,   
уксусная кислота. Гетероферментативное молочнокислое брожение встречается   
у представителей бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

Продукты молочнокислого брожения играют большую роль в формирова-  
нии колонизационной резистентности бактериями родов *Lactobacillus* и *Bifido-*  
*bacterium*, составляющих облигатную флору кишечника. Молочнокислые бактерии широко используются в молочной промышленности для получения молочно-  
кислых продуктов, а также в создании пробиотиков.

*Муравьинокислое* (*смешанное*) *брожение* встречается у представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Vibrionaceae*. Глюкоза расщепляется по ФДФ-пу-  
ти, а глюконат — по КДФГ-пути. В зависимости от продуктов брожения, выде-  
ляющихся в анаэробных условиях, различают два процесса:

1) происходит расщепление пирувата с образованием ацетилкофермента А   
 и муравьиной кислоты, которая, в свою очередь, может расщепляться на   
 двуокись углерода и молекулярный водород (другими продуктами броже-  
 ния являются этанол, янтарная и молочная кислоты\*);

2) при другом процессе брожения образуется целый ряд кислот, однако   
 главным продуктом брожения являются ацетоин и 2,3-бутандиол. При   
 последующем восстановлении ацетоина образуется 2,3-бутандиол. Эти   
 вещества при взаимодействии с нафтолом в щелочной среде вызывают   
 образование окраски бурого цвета, что выявляется *реакцией Фогеса—*   
 *Проскауэра*, используемой при идентификации бактерий.   
 *Маслянокислое брожение.* Масляная кислота, бутанол, ацетон изопропанол и ряд других органических кислот, в частности уксусная, капроновая, вале-  
рьяновая, пальмитиновая, являются продуктами сбраживания углеводов саха-  
ролитическими строгими анаэробами. Спектр этих кислот, определяемый при помощи газожидкостной хроматографии, используется как экспресс-метод при идентификации анаэробов.

*Ферментация белков.* Если для бактерий с бродильным метаболизмом   
источником энергии служат белки, то такие бактерии называются *пептоли-*  
*тическими.* Пептолитическимиявляютсянекоторыеклостридии, в частности

*C. histolyticum*, *C. botulinum.* Пептолитическиебактериигидролизуютбелки исбраживаютаминокислоты*.*

Некислородное дыхание. Некоторые бактерии обладают способностью ис-  
пользовать в анаэробных условиях нитрат как конечный акцептор водорода (*ни-*  
*тратное дыхание*). Восстановление нитрата может происходить двумя путями:

1) *аммонификацией*,при которой нитрат превращается в аммиак;

2) *денитрофикацией*, при которой происходит восстановление нитрата до   
 молекулярного азота или закиси азота; этот процесс связан с деятельно-  
 стью фермента нитратредуктазы.

Использовать сульфат как конечный акцептор водорода при анаэробном   
дыхании (*сульфатное дыхание*) способна лишь небольшая группа бактерий   
(представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*),которыеявляются стро-  
гими анаэробами, литотрофами, обитающими в сероводородном иле. Они спо-  
собны использовать в качестве донора электронов молекулярный водород, поэ-  
тому их относят к хемолитотрофам. Этим бактериям принадлежит ведущая роль   
в образовании сероводорода в природе. Некоторые представители *Desulfovibrio*   
обнаружены в полости рта и в кале.

Конструктивный метаболизм

Основные органические компоненты бактериальной клетки синтезируют-  
ся в реакциях полимеризации из строительных блоков: аминокислот, фосфа-  
тов сахаров, пуриновых и пиримидиновых оснований, органических кислот.   
Поставщиками этих строительных блоков являются промежуточные продукты   
основных путей энергетического метаболизма (см. рис. 3.2). Среди бактерий   
выделяется группа *прототрофов*, способная синтезировать все компоненты   
клетки из одного источника углерода и энергии. Если бактерии теряют способ-  
ность к синтезу какого-нибудь фермента, участвующего в биосинтетических   
процессах, то для их роста и размножения требуется наличие недостающего ве-  
щества, которое называется *фактором роста*, а такие бактерии — *ауксотро-*  
*фами*. Факторами роста могут служить аминокислоты, пуриновые и пирими-  
диновые основания, витамины, которые входят в состав простетических групп   
коферментов.

Биосинтез аминокислот. Большинство бактерий обладают способностью   
синтезировать все 20 аминокислот, из которых состоят белки. Углеродные ске-  
леты аминокислот образуются из промежуточных продуктов обмена. Исходным   
материалом служат промежуточные продукты фруктозодифосфатного (ФДФ)   
и пентозофосфатного (ПФ) путей, цикла трикарбоновых кислот: пируват, кето-  
глутаровая кислота, оксалоацетат, фумарат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-4-фос-  
фат. Аминогруппы вводятся в результате непосредственного аминирования или   
переаминирования. Перевод неорганического азота в органические соединения   
происходит всегда через аммиак. Нитраты, нитриты и молекулярный азот пред-  
варительно восстанавливаются в аммиак и только лишь после этого включают-  
ся в состав органических соединений.

Биосинтез нуклеотидов. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды — это те строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кро-  
ме того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав многих ко-  
ферментов и служат для активации и переноса аминокислот, сахаров, липидов в реакциях полимеризации.

Исходным соединением для образования пентозной части нуклеотидов слу-  
жит рибозо-5-фосфат, образующийся в ПФ-пути. Углеродный скелет пирими-  
динов происходит из аспартата, который образуется в цикле трикарбоновых кислот. Атомы азота и аминогруппы пуринов и аминосодержащих пиримиди-  
нов происходят из аспартата и глутамина.

Биосинтез жиров. Ключевым промежуточным продуктом для синтеза жир-  
ных кислот является ацетилкоэнзим А, а для синтеза фосфолипидов — продукт ФДФ-пути: диоксиацетилфосфат, восстанавливающийся в глицерол-3-фосфат, который соединяется с остатками жирных кислот.

Биосинтез углеводов. Синтез глюкозы происходит из пирувата, за счет об-  
ратных реакций, путей распада глюкозы. Для обхода реакций, идущих только   
в одном направлении, имеются обходные пути, например глиоксилатный цикл.

Транспорт веществ в бактериальную клетку

Для того чтобы питательные вещества могли подвергнуться превращениям   
в цитоплазме клетки, они должны проникнуть в клетку через пограничные   
слои, отделяющие клетку от окружающей среды. Ответственность за поступле-  
ние в клетку питательных веществ лежит на цитоплазматической мембране.

Существует два типа переноса веществ в бактериальную клетку: пассивный и активный.

При пассивном переносе вещество проникает в клетку только по градиенту   
концентрации. Затрат энергии при этом не происходит. Различают две разно-  
видности пассивного переноса: простую и облегченную диффузию. *Простая*   
*диффузия —* неспецифическое проникновение веществ в клетку, при этом ре-  
шающее значение имеет величина молекул и липофильность. Скорость пере-  
носа незначительна. *Облегченная диффузия* протекает с участием белка-пе-  
реносчика. Скорость этого способа переноса зависит от концентрации вещества   
в наружном слое.

При *активном переносе* вещество проникает в клетку против градиента   
концентрации при помощи белка-переносчика — пермеазы. При этом проис-  
ходят затраты энергии. Имеется два типа активного транспорта. При первом   
небольшие молекулы (аминокислоты, некоторые сахара) «накачиваются»   
в клетку и создают концентрацию, которая может в 100-1000 раз превышать   
концентрацию этого вещества снаружи клетки. Второй тип, получивший назва ние *транслокация радикалов*, обеспечивает включение в клетку некоторых   
сахаров (например, глюкозы, фруктозы), которые в процессе переноса фосфо-  
рилируются, т.е. химически модифицируются. Для осуществления этих про-  
цессов в бактериальной клетке локализуется специальная фосфотрансферная   
система.

Поступив в клетку, органический источник углерода и энергии вступает   
в цепь биохимических реакций, в результате которых образуются АТФ и ингре-  
диенты для биосинтетических процессов. Биосинтетические (конструктивные)   
и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. Они тесно свя-  
заны между собой через общие промежуточные продукты, которые называются   
*амфиболитами*.

На плотных питательных средах бактерии образуют скопление клеток — *ко-*  
*лонии*, которые принято считать потомками одной клетки. Колонии различа-  
ются формой, размерами, поверхностью, прозрачностью, консистенцией и окра-  
ской. Колонии с гладкой блестящей поверхностью принято называть колониями   
в *S-форме* (от англ. *smooth* — гладкий). Колонии с матовой шероховатой по-  
верхностью называют *R-формами* (от англ. *rough* — шероховатый). Окраска   
колоний определяется способностью бактерий синтезировать пигменты.

Пигменты различаются по цвету, химическому составу и растворимости.   
Среди продуцируемых бактериями пигментов встречают:   
 x каротиноиды — жирорастворимые пигменты красного, желтого и оран-

жевого цветов. Они встречаются у представителей рода *Mycobacterium*, *Micrococcus*;

x пирроловые — к ним относится спирторастворимый пигмент продигио-  
 зан, встречающийся у *Serratia marcescens*;

x фенозиновые — к этой группе относится водорастворимый пигмент *Pseu-*  
 *domonas aeruginosa* пиоцианин, который, выделяясь в питательную среду,   
 окрашивает ее;

x меланины — нерастворимые пигменты черного и коричневого цветов   
 (у бактерий рода *Porphyromonas*).

Пигменты предохраняют бактериальную клетку от УФ-лучей, обезврежива-  
ют токсичные кислородные радикалы, обладают антибиотическими свойства-  
ми, принимают участие в реакциях, сопутствующих фотосинтезу в фототроф-  
ных бактериях.

Рост и способы размножения бактерий

Под ростом бактериальной клетки понимают согласованное увеличение коли-  
чества всех ее компонентов. После достижения критических размеров клетка   
подвергается делению. Большинство бактерий делится поперечным делением   
надвое.

Деление бактериальной клетки начинается спустя некоторое время после   
завершения цикла репликации хромосомы, которая у бактерий протекает по   
полуконсервативному механизму: каждая из двух нитей ДНК хромосомы слу-  
жит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи ДНК. В реплика-  
ции бактериальной хромосомы участвует более 20 ферментов. Так как нативная   
бактериальная ДНК двуспиральная, перед репликацией цепи родительской мо-  
лекулы ДНК должны быть разделены. В этом процессе участвуют ферменты   
*хеликаза*, которая в энергопоглощаемой реакции расплетает двойную спираль,   
и *топоизомераза* (*гираза*), которая предотвращает образование вторичных   
завитков. SSB-белок связывается с одноцепочечной ДНК, предотвращая по-  
вторное ее скручивание в двойную спираль. В результате образуется реплика-  
тивная вилка (рис. 3.4). Синтез новых цепей ДНК осуществляется ферментом   
*ДНК-полимеразой*. Особенностью функционирования ДНК-полимеразы яв ляется ее способность присоединять комплементарные матрице нуклеотиды   
к свободному 3’-концу растущей цепи. Поэтому для осуществления реакции   
полимеризации нуклеотидов на матрице родительской цепи полимеразе требу-  
ется затравка, праймер (от англ. *primer* — запал). Праймер представляет собой   
короткую нуклеотидную цепочку РНК, комплементарную матричной цепи, со   
свободным 3’-концом. Достраивание осуществляется присоединением к свобод-  
ной гидроксильной группе 3’-конца затравки нового нуклеотида. Расплетенные   
цепи ДНК всегда содержат на 5’-конце несколько рибонуклеотидов, т.е. синтез   
ДНК начинается с синтеза РНК. РНК-затравку для синтеза ДНК образует фер-  
мент ДНК-праймаза, способная инициировать синтез РНК по одноцепочечной   
ДНК-матрице в отсутствие какой-либо затравки. После того как цепь ДНК на-  
чала синтезироваться, РНК-затравка удаляется, а удаляющиеся бреши застраи-  
ваются ДНК-полимеразой с высокой точностью. Так как цепи ДНК в дуплексе   
антипараллельны, то направление расплетания двойной цепи совпадает лишь   
с направлением синтеза ДНК на одной матрице, которая называется ведущей   
и на которой протекает непрерывный синтез ДНК. На комплементарной цепи   
ДНК синтезируется короткими *фрагментами Оказаки*, которые впослед-  
ствии сшиваются ДНК-лигазами в одну ковалентно связанную непрерывную   
цепь ДНК.

Процесс репликации ДНК бактерии продолжается до тех пор, пока не удво-  
ится вся ДНК. Репликация начинается в одной избранной области, называемой   
origin (от англ. — начало), на которой могут возникать одна или две реплика-  
тивные вилки. Последовательность нуклеотидов на origin-участке способству-  
ет расплетанию двойной спирали ДНК и служит местом «посадки» на ДНК комплекса ферментов, участвующих в репликации. Правильное распределение вновь синтезированных нитей ДНК по дочерним клеткам достигается у бак-  
терий за счет прикрепления ДНК к мембране. Пространственная организация участка прикрепления и зоны роста мембраны, и клеточной стенки обеспечи-  
вает растаскивание двух копий реплицированной ДНК по дочерним клеткам. Размножение бактерий бинарным делением приводит к росту числа бактери-  
альных клеток в геометрической прогрессии.

При внесении бактерий в питательную среду они растут и размножаются до   
тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых компонентов среды   
не достигнет минимума, после чего рост и размножение прекращаются. Если   
на протяжении всего этого времени не прибавлять питательных веществ и не   
удалять конечных продуктов обмена, то получаем *статическую* (*периодиче-*  
*скую*) *бактериальную культуру*, ведущую себя как многоклеточный орга-  
низм, с генетическим ограничением роста. Если построить график, по оси аб-  
сцисс которого отложить время, а по оси ординат — число клеток, то получим   
кривую, описывающую зависимость числа образующихся клеток от времени   
размножения, которая называется *кривой роста*.

На кривой роста бактерий в жидкой питательной среде можно выделить   
нескольких фаз (рис. 3.5), сменяющих друг друга в определенной последова-  
тельности(лаг-фаза, экспоненциальная, стационарная и фаза отмирания).

. *Лаг-фаза* (от англ. *lag* — отставать) — начальная фаза, которая охваты-  
вает промежуток времени между посевом бактерий и началом размножения.   
Ее продолжительность составляет в среднем 2-5 ч и зависит от состава пита-  
тельной среды и возраста засеваемой культуры. Во время лаг-фазы бактерии   
адаптируются к новым условиям культивирования, идет синтез индуцибель-  
ных ферментов.

. *Экспоненциальная* (*логарифмическая*) *фаза* характеризуется посто-  
янной максимальной скоростью деления клеток, которая зависит от вида бак-  
терий и питательной среды. Период удвоения клеток называется *временем ге-*  
*нерации*, которое варьирует от вида бактериальной культуры: у бактерий рода   
*Pseudomonas* оно равняется 14 мин, а у *Mycobacterium* — 24 ч. Величина клеток   
и содержание белка в них во время экспоненциальной фазы остаются постоян-  
ными. Бактериальная культура в этой фазе состоит из стандартных клеток.

3. *Стационарная фаза* наступает тогда, когда число клеток перестает уве-  
личиваться. Так как скорость роста зависит от концентрации питательных ве-  
ществ, то при уменьшении содержания последних в питательной среде умень-  
шается и скорость роста. Снижение происходит также из-за большой плотности   
бактериальных клеток, снижения парциального давления кислорода, накопле-  
ния токсических продуктов обмена. Продолжительность стационарной фазы   
составляет несколько часов и зависит от вида бактерий и особенностей их куль-  
тивирования.

4. *Фаза отмирания* наступает вследствие накопления кислых продуктов об-  
мена или в результате автолиза под влиянием собственных ферментов. Про-  
должительность этой фазы колеблется от десятка часов до нескольких недель.

Постоянное нахождение бактериальной популяции в логарифмической фазе роста наблюдается в *непрерывной культуре*, что достигается постепенным дозированием поступления питательных веществ, контролем плотности бакте-  
риальной суспензии и удалением метаболитов. Непрерывные бактериальные культуры используются в биотехнологических процессах

Помимо бинарного деления некоторые представители прокариот имеют иные   
способы размножения: актиномицеты могут размножаться путем фрагментации   
гифов; представители семейства *Streptomycetaceae* — спорами. Микоплазмы яв-  
ляются полиморфными бактериями, что обусловлено особенностями их размно-  
жения. Помимо поперечного деления микоплазмы могут размножаться почкова-  
нием. В этом случае основной морфологической репродуцирующейся единицей   
служат элементарные тельца сферической или овоидной формы, размножаю-  
щиеся фрагментацией и почкованием. Хламидии проходят через цикл развития,   
который предусматривает существование двух форм: внеклеточных инфекци-  
онных, малых размеров *элементарных телец*, не обладающих способностью   
к бинарному делению, и внутриклеточного, метаболически активного, крупных   
размеров *ретикулярного тельца*, способного к бинарному делению. В резуль-  
тате бинарного деления ретикулярного тельца формируются дочерние элемен-  
тарные тельца, которые выделяются из клетки. Некоторые спирохеты, например   
*Treponema pallidum*, способны образовывать в неблагоприятных условиях цисты,   
которые, распадаясь на зерна, дают потомство новым бактериальным клеткам.

Некультивируемые формы бактерий. Некоторые неспорообразующие   
бактерии способны переживать неблагоприятные для размножения условия   
окружающей среды, переходя в некультивируемое (покоящееся) состояние.   
В этом состоянии бактериальные клетки сохраняют свою метаболическую ак-  
тивность, но не способны к непрерывному клеточному делению, необходимому   
для роста на жидких и плотных питательных средах. При смене условий су-  
ществования, в частности при попадании в организм человека или животных,   
клетки вновь приобретают способность к размножению и сохраняют свой па-  
тогенный потенциал. Переход в некультивируемое состояние обеспечивает со-  
хранение патогенных бактерий в межэпидемические и межэпизоотические пе-  
риоды. Выявить наличие бактерий, находящихся в некультивируемой форме,   
можно с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или применением кра сителей, меняющих окраску в окисленной и восстановленной форме. Возврат способности к размножению и росту находящихся в покоящейся форме клеток могут вызвать естественные факторы: простейшие, обитатели почв и водоемов, фитогормоны, выделяемые корневыми волосками растений.

Условия культивирования бактерий

Для культивирования бактерий необходимо соблюдать ряд условий.

1. *Наличие полноценной питательной среды.* Питательная среда незави-  
симо от сложности состава и цели применения должна обладать водной осно-  
вой, органическим источником углерода и энергии, определенными рН и осмо-  
тическим давлением.

2. *Температура культивирования.* По этому показателю бактерии делятся на мезофилы, термофилы и психрофилы:

x мезофилы размножаются в диапазоне температур 20-40 qС (к мезофи-  
 лам относится большинство болезнетворных для человека бактерий); x термофилы растут при температуре 40-60 qС (например, актиномицеты,   
 некоторые спороносные бациллы);

x психрофилы размножаются в диапазоне температур 0-20 qС.

3. *Атмосфера культивирования.* Для роста и размножения *строгих аэро-*  
*бов* необходим кислород. Аэробы хорошо растут на поверхности агара в чаш-  
ках Петри или в тонком верхнем слое жидкой среды. Для обеспечения роста   
и размножения строгих аэробов в глубинных слоях жидкой среды необходимо   
диффузное распределение кислорода по всему объему питательной среды. Это   
достигается непрерывным перемешиванием или встряхиванием питательной   
среды, т.е. аэрированием, которое осуществляется на специальных аппаратах —   
встряхивателях.

Для культивирования *факультативных анаэробов* используют те же методы, так как при наличии кислорода у них преобладает оксидативный метаболизм над ферментацией как наиболее энергетически выгодный.

*Микроаэрофилы* размножаются при пониженном парциальном давлении кис-  
лорода. Этого можно достичь повышением в атмосфере культивирования пар-  
циального давления СО2 до концентрации 1-5% против 0,03% СО2 в атмосфере   
воздуха. Для этих же целей используют специальные СО2-инкубаторы, или же   
посевы помещают в эксикаторы, в которых устанавливают горящую свечу.

*Облигатные анаэробы* для своего роста и размножения требуют исключения   
доступа кислорода воздуха. Это достигается следующими мерами:   
 x добавлением к питательным средам редуцирующих кислород веществ

(тиогликолевой кислоты, аскорбиновой кислоты, цистеина, сульфидов); x путем кипячения (освобождение от кислорода воздуха) жидких питатель-  
 ных сред с последующим плотным закупориванием резиновыми пробка-  
 ми сосудов со средами;

x использование поглотителей кислорода (щелочного пирогаллола и др.),   
 помещая их в герметически закрываемые емкости «газ-паки». Этот метод   
 используется для культивирования *аэротолерантных* *бактерий*;   
x механическим удалением кислорода воздуха с последующим заполне-  
 нием емкости инертным газом (для этих целей используют анаэростаты   
 и анаэробные боксы).

4. *Время культивирования* зависит от времени генерации. Большинство бактерий культивируют для получения видимого роста в течение 18-48 ч. Для культивирования возбудителя коклюша требуется 5 суток, а для культивирова-  
ния *M. tuberculosis* — 3-4 недели.

5. *Освещение.* Для выращивания фототрофных микроорганизмов необхо-  
дим свет. Некоторые условно-патогенные микобактерии в зависимости от осве-  
щенности образуют пигмент, что используется при их идентификации.

Культивирование облигатных внутриклеточных бактерий, относящихся   
к родам *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Coxiella* и *Chlamydia*, осуществляют на культурах   
клеток или в организме животных и членистоногих, а также в куриных эмбрио-  
нах (за исключением эрлихий). Куриные эмбрионы используют также для куль-  
тивирования бактерий, обладающих высоким уровнем гетеротрофности, напри-  
мер родов *Borrelia*, *Legionella.*

В промышленных условиях биомассу бактерий или грибов (для получения антибиотиков, вакцин, диагностических препаратов и пробиотиков) получают культивированием в ферментерах при строгом соблюдении оптимальных пара-  
метров роста и размножения культур.

Особенности физиологии грибов и простейших

Грибы по типу питания — гетеротрофы, по отношению к кислороду — аэробы   
и факультативные анаэробы. Растут в широких диапазонах температур (опти-  
мальная температура 25-30 qС), имеют половой и бесполый способы размно-  
жения. Поэтому грибы широко распространены в окружающей среде, особенно   
в почве. Грибы вместе с сине-зелеными водорослями образуют симбиоз в виде   
*лишайника*. В этом симбиозе грибы поглощают воду и растворимые в ней веще-  
ства, а сине-зеленые водоросли поставляют грибам органические соединения.   
Другой вид взаимоотношений — *микориза —* симбиоз грибов и корней высших   
растений.

Грибы культивируют в течение нескольких суток на сусле-агаре или жидком сусле, среде Сабуро, Чапека и др. Для этой цели можно также использовать ла-  
бораторных животных.

Некоторые грибы обладают *диморфизмом*, т.е. способностью принимать   
нитчатые и дрожжевые формы в зависимости от условий роста. Дрожжеподоб-  
ные формы часто образуются *in vivo*,т.е. при инфицировании человека грибами

Физиология вирусов -

Вирусы — облигатные внутриклеточные паразиты, способные только к внутри-  
клеточному размножению. В вирусинфицированной клетке возможно пребы-  
вание вирусов в различных состояниях, что приводит к следующим эффектам:

1) разрушение клетки в результате *некроза* или *апоптоза* (по типу програм-  
 мированной клеточной гибели) в результате чего наблюдается «цитопати-  
 ческий эффект» — клетки округляются, отделяются от соседних клеток,   
 образуются многоядерные гигантские клетки, вакуоли и включения;

2) разрушение клеток не самим вирусом, а иммунными реакциями организма;

3) вирус, находясь внутри клетки, не разрушает ее (латентная инфекция)   
 или трансформирует клетку организма в раковую клетку.   
Различают следующие типы взаимодействия вируса с клеткой.

1. *Продуктивный тип* взаимодействия завершается воспроизводством ви-  
русного потомства — многочисленных вирионов — и гибелью зараженных кле-  
ток (*цитоцидное* «взрывное» *действие*,вызванное простыми вирусами).Слож-  
ные вирусы выходят из клеток почкованием, не разрушая их (*нецитоцидное*   
*действие*).

2. *Абортивный тип* — не завершается образованием новых вирионов, по-  
скольку инфекционный процесс в клетке прерывается на одном из этапов.

3. *Интегративный тип*, или вирогения, характеризуется встраиванием (интеграцией) вирусной ДНК в виде *провируса* в хромосому клетки и их со-  
вместным сосуществованием (совместная репликация).

4. Пребывание в клетке вирусных кольцевых нуклеиновых кислот, напоми-  
нающих плазмиды бактерий.

Репродукция вирусов

Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой, т.е. *репродукция* вируса   
(от лат. *re* — повторение, *productio* — производство), проходит в несколько стадий

1) адсорбция вириона на клеточной мембране;

2) проникновение вириона в клетку, «раздевание» и высвобождение вирус-  
 ного генома (депротеинизация вируса);

3) синтез вирусных компонентов;

4) формирование вирионов (сборка реплицированной нуклеиновой кисло-  
 ты и новых капсидных белков);

5) выход вирионов из клетки.

У различных вирусов эти стадии отличаются

Адсорбция вирусов. Первая стадия репродукции вирусов — адсорбция, т.е.   
прикрепление вириона к поверхности клетки. Она протекает в две фазы. Пер-  
вая фаза — неспецифическая, вызванная ионным притяжением между вирусом   
и клеткой, включая и другие механизмы. Вторая стадия — фаза адсорбции — вы-  
сокоспецифическая, обусловленная гомологией, комплементарностью рецепто-  
ров чувствительных клеток и «узнающих» их белковых лигандов вирусов. Бел-  
ки на поверхности вирусов, узнающие специфические клеточные рецепторы   
и взаимодействующие с ними, называются *прикрепительными* (в основном   
это гликопротеины в составе липопротеиновой оболочки).

Специфические рецепторы клеток имеют различную природу, являясь бел-  
ками, липидами, углеводными компонентами белков, липидов и др.

Наличие специфических рецепторов лежит в основе избирательности пора-  
жения вирусами определенных клеток, тканей и органов. Это так называемый   
*тропизм* (от греч. *tropos —* поворот, направление). Например, вирусы, репроду-  
цирующиеся преимущественно в клетках печени, называются гепатотропными,   
в нервных клетках — нейротропными, в иммунокомпетентных клетках — имму-  
нотропными и т.д.

Проникновение вирусов в клетку происходит рецепторзависимым эндоци-  
тозом или в результате слияния оболочки вируса с клеточной мембраной (см. рис. 3.6). Возможно сочетание этих механизмов.

*Эндоцитоз* происходит в результате захватывания и поглощения вириона   
клеткой: клеточная мембрана с прикрепленным вирионом впячивается с об-  
разованием эндосомы (внутриклеточной вакуоли). Эндоцитоз вирусов осу-  
ществляется с помощью везикул, покрытых клатрином («ямки, окаймленные   
клатрином»), — *клатринопосредованный эндоцитоз*. Содержимое эндосомы   
закисляется, что приводит к слиянию липопротеиновой оболочки сложного   
вируса с мембраной эндосомы и выходу вирусного нуклеокапсида в цитозоль   
клетки. Эндосомы объединяются с лизосомами, которые разрушают оставшиеся вирусные компоненты. Другим путем попадания вируса может быть *кавеоло-*  
*опосредованный эндоцитоз*. Он начинается с формирования различных ве-  
зикул, включая *кавеолы* (кавеолярный эндоцитоз), представляющих собой   
бутылкообразные структуры размером от 50 до 100 нм, направленные внутрь   
клетки. В результате проникновение вируса в цитозоль может происходить на

уровне плазматической мембраны, эндосомы, кавеосомы и эндоплазматическо-  
го ретикулума. Также стали известны новые альтернативные пути соединения вируса с эндосомами. Одним из них может быть *макропиноцитоз* с образова-  
нием крупной вакуоли, окруженной плазматической мембраной, наполненной по большей части жидкостью.

*Слияние вириона с клеточной мембраной* характерно только для некото-  
рых оболочечных вирусов (герпес-вирусов, парамиксовирусов, ретровирусов),   
в составе которых имеются *белки слияния.* В результате взаимодействия этих   
белков с липидами клеточной мембраны вирусная липопротеиновая оболочка   
интегрирует с клеточной мембраной, а внутренний компонент вируса попадает   
в цитозоль клетки.

Простые (безоболочечные) вирусы могут проникать в клетку тремя спосо-  
бами:

1) *мембранный прокол* (вирион образует пору в мембране, через которую ге-  
 ном попадает в цитозоль, а капсид в него не попадает);

2) *перфорация* (капсид переносится через мембрану без основного лизиса   
 мембраны);

3) *лизис* (вирионы индуцируют поломку мембраны цитоплазматических ор-  
 ганелл, что способствует проникновению вируса и его компонентов в ци-  
 тозоль).

Выход простых вирусов из эндосомы в цитозоль изучен недостаточно.

«Раздевание» (депротеинизация) вирусов. В результате депротеиниза-  
ции удаляются поверхностные структуры вируса и высвобождается его вну-  
тренний компонент, способный вызывать инфекционный процесс. Первые   
этапы депротеинизации вируса начинаются в процессе его проникновения   
в клетку путем слияния вирусных и клеточных мембран или же при выходе ви-  
руса из эндосомы в цитозоль. Последующие этапы «раздевания» вируса тесно   
взаимосвязаны с их внутриклеточным транспортом к местам депротеинизации.   
Для разных вирусов существуют свои специализированные участки «раздева-  
ния» в клетке: для пикорнавирусов — в цитоплазме с участием лизосом, аппара-  
та Гольджи; для герпес-вирусов — околоядерное пространство или поры ядер-  
ной мембраны; для аденовирусов — сначала структуры цитоплазмы, а затем   
ядро клетки. Конечными продуктами «раздевания» могут быть нуклеиновая   
кислота, нуклеопротеин (нуклеокапсид) или сердцевина вириона. Так, конеч-  
ным продуктом «раздевания» пикорнавирусов является нуклеиновая кислота,   
ковалентно связанная с одним из внутренних белков. А у многих оболочечных   
РНК-содержащих вирусов конечными продуктами «раздевания» могут быть   
нуклеокапсиды или сердцевины, которые не только не препятствуют экспрес-  
сии вирусного генома, но, более того, защищают его от клеточных протеаз и ре-  
гулируют последующие биосинтетические процессы.

Следующая стадия репродукции — синтез вирусных компонентов (белков   
и нуклеиновых кислот) вируса, который разобщен во времени и пространстве.

Синтез осуществляется в разных частях клетки, поэтому такой способ размно-  
жения вирусов называется *дизъюнктивным* (от лат. *disjunctus —* разобщенный).   
 Синтез вирусных белков.В зараженной клетке вирусный геном кодирует синтез двух групп белков: неструктурных белков, обслуживающих внутрикле-  
точную репродукцию вируса на разных его этапах; структурных белков, кото-  
рые входят в состав вириона (геномные, связанные с геномом вируса, капсидные и суперкапсидные белки). К *неструктурным белкам* относятся: 1) ферменты синтеза РНК или ДНК (РНК- или ДНК-полимеразы), обеспечивающие транс-  
крипцию и репликацию вирусного генома; 2) белки-регуляторы; 3) предше-  
ственники вирусных белков, отличающиеся своей нестабильностью в результа-  
те быстрого нарезания на структурные белки; 4) ферменты, модифицирующие вирусные белки, например протеиназы и протеинкиназы.

Синтез белков в клетке осуществляется в соответствии с хорошо известны-  
ми процессами *транскрипции* (от лат. *transcriptio* — переписывание) путем «пе-  
реписывания» генетической информации с нуклеиновой кислоты в нуклеотид-  
ную последовательность информационной РНК (иРНК) и *трансляции* (от лат.   
*translatio* — передача) — считывания иРНК на рибосомах с образованием бел-  
ков. Передача наследственной информации в отношении синтеза иРНК у раз-  
ных групп вирусов неодинакова.

*ДНК-содержащие вирусы* реализуют генетическую информацию так же,

как и клеточный геном, по схеме: геномная ДНК вируса o транскрип-  
ция иРНК o трансляция белка вируса. Причем ДНК-содержащие виру-  
сы используют для этого процесса клеточную полимеразу (вирусы, геномы

которых транскрибируются в ядре клетки, — аденовирусы, паповавирусы,   
 герпес-вирусы) или собственную РНК-полимеразу (вирусы, геномы кото-  
 рых транскрибируются в цитоплазме, например поксвирусы).   
x *Плюс-нитевые РНК-содержащие вирусы* (например, пикорнавирусы,   
 флавивирусы, тогавирусы) имеют геном, выполняющий функцию иРНК;   
 он распознается и транслируется рибосомами. Синтез белков у этих ви-  
 русов осуществляется без акта транскрипции по схеме: геномная РНК   
 вируса o трансляция белка вируса.

x *Минус-однонитевые РНК-содержащие вирусы* (ортомиксовирусы, па-

рамиксовирусы, рабдовирусы) имеют геном, выполняющий роль матри-  
цы, с которой транскрибируется иРНК при участии РНК-полимеразы,   
связанной с нуклеиновой кислотой вируса. Синтез белка у них происхо-  
дит по схеме: геномная РНК вируса o транскрипция иРНК o транс-  
ляция белка вируса.

x *Ретровирусы* (вирусы иммунодефицита человека, онкогенные ретрови-

русы) имеют уникальный диплоидный геном, состоящий из двух иден-  
тичных молекул РНК. В составе ретровирусов есть особый вирусоспеци-  
фический фермент — обратная транскриптаза, или ревертаза, с помощью   
которой осуществляется процесс обратной транскрипции, т.е. на матри це геномной РНК синтезируется комплементарная однонитевая ДНК   
(кДНК). Комплементарная нить ДНК копируется с образованием двуни-  
тевой комплементарной ДНК, которая интегрируется в клеточный геном   
и в его составе транскрибируется в иРНК с помощью клеточной ДНК-за-  
висимой РНК-полимеразы. Синтез белков для этих обратнотранскриби-  
рующихся вирусов осуществляется по схеме: геномная РНК вируса o   
комплементарная ДНК o транскрипция иРНК oтрансляция белка   
вируса.

Репликация вирусных геномов,т.е. синтез вирусных нуклеиновых кислот,   
приводит к накоплению в клетке копий исходных вирусных геномов, которые   
используются при сборке вирионов. Способ репликации генома зависит от типа   
нуклеиновой кислоты вируса, наличия вирусоспецифических или клеточных   
полимераз, а также от способности вирусов индуцировать образование поли-  
мераз в клетке. Механизм репликации отличается у вирусов, имеющих: 1) дву-  
нитевую ДНК; 2) однонитевую ДНК; 3) плюс-однонитевую РНК; 4) минус-  
однонитевую РНК; 5) двунитевую РНК; 6) идентичные плюс-нитевые РНК   
(ретровирусы).

1.  *Двунитевые ДНК-вирусы*. Репликация двунитевых вирусных ДНК происходит обычным полуконсервативным механизмом: после расплетения нитей ДНК к ним комплементарно достраиваются новые нити. Каждая вновь синтезированная молекула ДНК состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной нити. В репликации вирусных геномов участвуют вирусные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы (у аденовирусов, герпес-вирусов и поксви-  
русов) или клеточные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы (у папилломавиру-  
сов, полиомавирусов и анелловирусов). У этих вирусов, кроме поксвирусов, транскрипция вирусного генома происходит в ядре.

Уникальный механизм репликации характерен для гепаднавирусов (виру-  
са гепатита В), геном которого представлен неполной двунитевой кольцевой   
ДНК, одна нить которой короче (неполная плюс-нить) другой — минус-нити   
(см. рис. 3.7).

2. *Однонитевые ДНК-вирусы*. Единственными представителями однони-  
тевых ДНК-вирусов являются парвовирусы, которые используют клеточные ДНК-полимеразы для создания двунитевого вирусного генома, так называе-  
мой репликативной формы последнего. При этом на исходной вирусной ДНК (плюс-нить) комплементарно синтезируется минус-нить ДНК, служащая ма-  
трицей для синтеза плюс-нити ДНК нового вириона. Параллельно синтезиру-  
ется иРНК, происходит трансляция вирусных пептидов.

3. *Плюс-однонитевые РНК-вирусы* включают пикорнавирусы, флавиви-  
русы и тогавирусы (см. рис. 3.8), у которых геномная плюс-нить РНК выпол-  
няет функцию иРНК — матрицы для синтеза белка. Вирусная РНК-полимераза транскрибирует геномную плюс-нить РНК в минус-нить РНК, на матрице ко-  
торой синтезируется геномная плюс-нить РНК.

4. *Минус-однонитевые РНК-вирусы* (аренавирусы, борнавирусы, раб-  
довирусы, парамиксовирусы, ортомиксовирусы, филовирусы) имеют геном-  
ную минус-нить РНК, которая трансформируется вирионной РНК-зависимой   
РНК-полимеразой в неполные и полные плюс-нити РНК. Полные копии яв-  
ляются матрицей (промежуточная стадия) для синтеза минус-нитей геномной   
РНК потомства (см. рис. 3.9).

5. *Двунитевые РНК-вирусы* (реовирусы и ротавирусы) сходны по репли-  
кации с минус-однонитевыми РНК-вирусами. Образовавшиеся в процессе   
транскрипции плюс-нити функционируют не только как иРНК, но и участвуют   
в репликации: они служат матрицами для синтеза минус-нитей РНК. Послед-  
ние в комплексе с плюс-нитями РНК образуют геномные двунитевые РНК ви-  
рионов. Репликация вирусных нуклеиновых кислот этих вирусов происходит   
в цитоплазме клеток.

6.  *Вирусы с обратной транскрипцией* (ретровирусы и гепаднавиру-  
сы). Ретровирусы, частности ВИЧ, являются плюс-нитевыми диплоидными РНК-содержащими вирусами. Вирионная обратная транскриптаза ретровиру-  
сов синтезирует (на матрице РНК-вируса) минус-нить ДНК, с которой копиру-  
ется плюс-нить ДНК с образованием двойной нити ДНК, замкнутой в кольцо (рис. 3.10). Далее двойная нить ДНК интегрирует с хромосомой клетки, об-  
разуя *провирус*. Многочисленные вирионные РНК образуются в результате транскрипции одной из нитей интегрированной ДНК при участии клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Другой пример обратнотранскрибирующе-  
гося вируса —вирус гепатита В

Формирование вирусов. Вирионы формируются путем самосборки: со-  
ставные части вириона транспортируются в места сборки вируса — участки ядра   
или цитоплазмы клетки. Соединение компонентов вириона обусловлено нали-  
чием гидрофобных, ионных, водородных связей и стерического соответствия.

Существуют следующие общие принципы сборки вирусов.

x Формирование вирусов — многоступенчатый процесс с образованием   
 промежуточных форм, отличающихся от зрелых вирионов по составу по-  
 липептидов.

x Сборка простых вирусов заключается во взаимодействии вирусных ну-  
 клеиновых кислот с капсидными белками и в образовании нуклеокапси-  
 дов.

x У сложных вирусов сначала формируются нуклеокапсиды, которые вза-  
 имодействуют с модифицированными мембранами клеток (будущей ли-  
 попротеиновой оболочкой вируса). Причем сборка вирусов, реплициру-  
 ющихся в ядре клетки, происходит с участием мембраны ядра, а сборка   
 вирусов, репликация которых идет в цитоплазме, осуществляется с уча-  
 стием мембран эндоплазматической сети или плазматической мембраны,   
 куда встраиваются гликопротеины и другие белки оболочки вируса.   
x У ряда сложных минус-нитевых РНК-вирусов (ортомиксовирусов, пара-  
 миксовирусов) в сборку вовлекается так называемый матриксный белок

(М-белок), который расположен под модифицированной клеточной мем-  
браной. Обладая гидрофобными свойствами, он выполняет роль посред-  
ника между нуклеокапсидом и вирусной липопротеиновой оболочкой.

x Сложные вирусы в процессе формирования включают в свой состав неко-  
 торые компоненты клетки хозяина, например липиды и углеводы.   
 Выход вирусов из клетки. Полный цикл репродукции вирусов заверша-  
ется через 5-6 ч (вирус гриппа и др.) или через несколько суток (вирус кори

и др.). Процесс репродукции вирусов заканчивается выходом их из клетки, ко-  
торый происходит взрывным путем или почкованием, экзоцитозом.   
 x *Взрывной путь:* из погибающей клетки одновременно выходит большое

количество вирионов. По взрывному пути выходят из клетки простые ви-  
русы, не имеющие липопротеиновой оболочки.

x *Почкование*, *экзоцитоз* присущи вирусам с липопротеиновой оболоч-  
 кой, которая является производной от клеточных мембран. Сначала об-  
 разовавшийся нуклеокапсид или сердцевина вириона транспортируются   
 к клеточным мембранам, в которые уже встроены вирусоспецифические   
 белки. Затем в области контакта нуклеокапсида или сердцевины вириона   
 с клеточной мембраной начинается выпячивание этих участков. Сформи-  
 ровавшаяся почка отделяется от клетки в виде сложного вируса. При этом   
 клетка способна длительно сохранять жизнеспособность и продуцировать   
 вирусное потомство.

Почкование вирусов, формирующихся в цитоплазме, может происходить либо через плазматическую мембрану (например, тогавирусы, парамиксовиру-  
сы — см. рис. 3.8, 3.9), либо через мембраны эндоплазматической сети с после-  
дующим их выходом на поверхность клетки (буньявирусы).

Вирусы, формирующиеся в ядре клетки (например, герпес-вирусы), почку-  
ются в перинуклеарное пространство через модифицированную ядерную мем-  
брану, приобретая таким образом липопротеиновую оболочку. Затем они пере-  
носятся в составе цитоплазматических везикул на поверхность клетки.

Абортивный тип взаимодействия вирусов с клеткой

Этот тип взаимодействия не завершается образованием вирусного потомства и может возникать при следующих обстоятельствах:

1) заражение чувствительных клеток *дефектными вирусами* или дефек-  
 тными вирионами;

2) заражение стандартным вирусом генетически резистентных к нему клеток;

3) заражение стандартным вирусом чувствительных клеток в непермиссив-  
 ных (неразрешающих) условиях.

Различают дефектные вирусы и дефектные вирионы.

x *Дефектные вирусы* существуют как самостоятельные виды, которые ре-  
 продуцируются лишь при наличии вируса-помощника (например, вирус   
 гепатита D репродуцируется только при наличии вируса гепатита B). x *Дефектные вирионы* обычно лишены части генетического материала и мо-  
 гут накапливаться в популяции многих вирусов при множественном зара-  
 жении клеток.

x *Дефектные интерферирующие частицы* (ДИ-частицы) интерферируют   
 с репродукцией стандартного вируса и подавляют воспроизводство ви-  
 русного потомства.

Абортивный тип взаимодействия чаще наблюдается при заражении нечув-  
ствительных клеток стандартным вирусом. Механизм генетически обусловлен-  
ной резистентности клеток к вирусам широко варьирует.

Интегративный тип взаимодействия вирусов с клеткой (вирогения)

Интегративный тип взаимодействия характерен для умеренных ДНК-содер-  
жащих бактериофагов, онкогенных вирусов и некоторых инфекционных виру-  
сов, как ДНК- (например, вирус гепатита В), так и РНК-содержащих (например,   
вирус иммунодефицита человека). Для интеграции с геномом клетки необходи-  
мо наличие кольцевой формы двунитевой ДНК-вируса. Геном ДНК-содержащих   
вирусов в кольцевой форме прикрепляется к клеточной ДНК в месте гомологии   
нуклеотидных последовательностей и встраивается в определенный участок хро-  
мосомы при участии ряда ферментов (рестриктаз, эндонуклеаз, лигаз).

У РНК-содержащих вирусов (ВИЧ) процесс интеграции более сложный.   
Он начинается с механизма обратной транскрипции, который заключается   
в синтезе комплементарной нити ДНК на матрице вирусной РНК с помощью   
вирусоспецифического фермента обратной транскриптазы (ревертазы). После   
образования двунитевой ДНК и замыкания ее в кольцо происходит интеграция   
ДНК-транскрипта в хромосому клетки (см. рис. 3.10). Встроенная в хромосому   
клетки ДНК вируса называется *провирусом*, или провирусной ДНК. Провирус   
реплицируется в составе хромосомы и переходит в геном дочерних клеток, т.е.   
состояние вирогении наследуется. Однако под влиянием некоторых физических   
или химических факторов провирус может исключаться из хромосомы клетки   
и переходить в автономное состояние с развитием продуктивного типа взаимо-  
действия с клеткой.

Латентная инфекция поддерживается в инфицированной клетке в виде   
вирусной ДНК, интегрированной в геном клетки, или в виде множественных   
копий ковалентно замкнутой циркулярной ДНК вируса

Культивирование вирусов

Вирусы культивируют на трех биологических моделях: в организме лабораторных животных, в развивающихся эмбрионах птиц (чаще на куриных эмбрионах) и культурах клеток (тканей).

Выращенные вирусы определяют с помощью методов индикации и иденти-  
фикации. *Индикация* вирусов, т.е. обнаружение факта их репродукции, основа-  
на на выявлении различных биологических свойств вирусов и особенностей их   
взаимодействия с чувствительными клетками. *Идентификация* (определение   
вида, типа) вирусов осуществляется в основном с помощью иммунологических   
реакций, основанных на взаимодействии антигенов вирусов и соответствую-  
щих им антител.

*Лабораторных животных* (взрослых или новорожденных белых мышей, хо-  
мяков, кроликов, обезьян и др.) заражают исследуемым вируссодержащим ма-  
териалом различными способами (подкожно, внутримышечно, интраназально,   
интрацеребрально и т.д.) в зависимости от тропизма вирусов

О репродукции вирусов в организме животных судят по развитию у них   
видимых клинических проявлений заболевания, патоморфологическим изме-  
нениям органов и тканей, а также на основании *реакции гемагглютинации*   
(РГА) с суспензией из органов, содержащих вирусы. РГА основана на способ- ности многих вирусов вызывать склеивание (агглютинацию) эритроцитов че-  
ловека, птиц и млекопитающих в результате взаимодействия вирусных белков (гемагглютининов) с рецепторами эритроцитов.

*Куриные эмбрионы* (5-12-дневные) заражают путем введения исследуемого   
материала в различные полости и ткани зародыша. Таким образом можно куль-  
тивировать вирусы гриппа, герпеса, натуральной оспы и др. Достоинствами   
модели являются: возможность накопления вирусов в больших количествах;   
отсутствие скрытых вирусных инфекций; доступность для любой лаборатории.   
О репродукции вирусов в куриных эмбрионах свидетельствуют: специфиче-  
ские поражения оболочек и тела эмбриона (оспины, кровоизлияния); гибель   
эмбриона; положительная РГА с вируссодержащей жидкостью, полученной из   
полостей зараженного зародыша.

*Культуру клеток* (*тканей*) наиболее часто применяют для культивирования   
вирусов. Метод культур клеток разработан в 50-х годах ХХ в. Дж. Эндерсом   
и соавт., получившими за это открытие Нобелевскую премию. Клетки, получен-  
ные из различных органов и тканей человека, животных, птиц и других биоло-  
гических объектов, размножают вне организма на искусственных питательных   
средах в специальной лабораторной посуде. Большое распространение получи-  
ли культуры клеток из эмбриональных и опухолевых (злокачественно перерож-  
денных) тканей, обладающих по сравнению с нормальными клетками взрослого   
организма более активной способностью к росту и размножению.

В зависимости от техники приготовления различают однослойные, суспен-  
зионные и органные культуры клеток.

x *Однослойные культуры клеток.*  Клетки способны прикрепляться   
 и размножаться на поверхности химически нейтрального стекла лабора-  
 торной посуды в виде монослоя. Они получили наибольшее применение   
 в вирусологии.

x *Суспензионные культуры клеток.* Клетки размножаются во всем объ-  
 еме питательной среды при постоянном ее перемешивании с помощью   
 магнитной мешалки или во вращающемся барабане. Их используют для   
 получения большого количества клеток, например при промышленном   
 получении вирусных вакцин.

x *Органные культуры —* цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие   
 исходную структуру вне организма (применяются ограниченно).   
 Культуры клеток в процессе их культивирования способны проходить десят-  
ки генераций. По числу жизнеспособных генераций культуры клеток подразде-  
ляют на: 1) первичные, или первично-трипсинизированные; 2) перевиваемые, или стабильные; 3) полуперевиваемые.

*Первичные культуры клеток* способны размножаться только в первых ге-  
нерациях, т.е. выдерживают не более 5-10 пассажей после выделения из тканей. В основе получения первичных культур лежит обработка кусочков тканей (эм-  
бриональных, опухолевых или нормальных) протеолитическими ферментами, например трипсином, который разрушает межклеточные связи в тканях и орга-  
нах с образованием изолированных клеток.

*Перевиваемые* (*стабильные*) *культуры клеток* способны размножаться   
в лабораторных условиях неопределенно длительный срок (десятки лет), т.е.   
выдерживают многочисленные пассажи. Их получают главный образом из опу-  
холевых или эмбриональных тканей, обладающих большой потенцией роста.   
Перевиваемые культуры клеток имеют преимущества перед первичными куль-  
турами. К ним относятся: продолжительность их культивирования, высокая   
скорость размножения опухолевых и эмбриональных клеток, меньшая трудоем-  
кость, способность культур сохранять свои свойства в замороженном состоянии   
в течение многих лет, возможность использования международных линий куль-  
тур во многих лабораториях мира. Однако злокачественный характер клеток   
и соматические мутации, претерпеваемые нормальными клетками в процессе   
многочисленных генераций, ограничивают использование этого вида культур,   
в частности невозможно их применение в производстве вирусных вакцин.

*Полуперевиваемые культуры клеток* имеют ограниченную продолжи-  
тельность жизни и выдерживают 40-50 пассажей. Их обычно получают из   
диплоидных клеток эмбриона человека. В процессе пассажей эти культуры со-  
храняют диплоидный набор хромосом, характерный для соматических клеток   
исходной ткани, и не претерпевают злокачественной трансформации. Поэтому   
полуперевиваемые культуры клеток могут быть использованы как в диагности-  
ке, так и в производстве вакцин.

О репродукции вирусов в культуре клеток, зараженных вируссодержащим материалом, можно судить на основании следующих феноменов: цитопатоген-  
ного действия вирусов, или цитопатического эффекта, образования внутрикле-  
точных включений; образования «бляшек»; реакций гемадсорбции и гемагглю-  
тинации; «цветной» реакции*.*

*Цитопатогенное действие* (ЦПД) —патологические изменения морфоло-  
гии клеток, вплоть до их гибели, возникающие в результате репродукции ви-  
русов и наблюдаемые под микроскопом

Некоторые вирусы можно обнаружить и идентифицировать по внутрикле-  
точным *включениям*, которые образуются в ядре или цитоплазме зараженных   
клеток (рис. 3.12). Часто включенияпредставляют собой скопления вирусных   
частиц или отдельных компонентов вирусов, иногда могут содержать клеточ-  
ный материал.

*«Бляшки»*, или *«негативные колонии»*, *—* ограниченные участки разрушен-  
ных вирусами клеток в сплошном монослое культуры клеток, культивируемых   
на питательной среде под агаровым покрытием. Они видны невооруженным   
глазом в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток

*Реакция гемадсорбции* основана наспособности культур клеток, инфици-  
рованных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Целый   
ряд вирусов (гриппа, парагриппа и др.) обладают гемадсорбирующими свой-  
ствами, что позволяет использовать реакцию гемадсорбции для индикации этих   
вирусов даже без выраженного ЦПД в культуре клеток. Механизмы реакции   
гемадсорбции и гемагглютинации сходны. Поэтому для обнаружения репро-  
дукции некоторых вирусов в культуре клеток можно использовать реакцию   
гемагглютинации с культуральной жидкостью, т.е. с питательной средой, содер-  
жащей размножившиеся вирусы.

О репродукции вирусов в культуре клеток можно также судить по так называ-  
емой «*цветной» реакции.* Она регистрируется по изменению цвета индикатора находящегося в питательной среде для культур клеток. Если вирусы не размно-  
жаются в культуре клеток, то живые клетки в процессе своего метаболизма вы-  
деляют кислые продукты, изменяющие рН среды и соответственно цвет инди-  
катора. При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается   
(клетки гибнут), и среда сохраняет первоначальный цвет индикатора.

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

Микроорганизмы обнаруживаются в почве, воде, воздухе, на растениях, в ор-  
ганизме человека и животных и даже в космосе. Они — составная часть *биоце-*  
*ноза*, т.е. совокупности животных, растений и микроорганизмов, заселяющих   
*биотоп —* участок суши или водоема с однородными условиями жизни. Сооб-  
щество микроорганизмов, обитающих на определенных участках среды, назы-  
вается *микробиоценозом.*

Распространение микробов в окружающей среде

Микрофлора почвы

Почва заселена разнообразными микроорганизмами, которые принимают уча-  
стие в процессах почвообразования и самоочищения почвы, кругооборота в при-  
роде 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 микро-  
организмов относительно мало, так как на них губительно действуют УФ-лучи,   
высушивание и другие факторы

Наибольшее число микроорганизмов содержится в верхнем слое почвы тол-  
щиной до 10 см. По мере углубления количество микроорганизмов уменьшает-  
ся, и на глубине 3-4 м они практически отсутствуют.

В почве живут азотфиксирующие бактерии, способные усваивать моле-  
кулярный азот (*Azotobacter*, *Azomonas*, *Mycobacterium* и др.). Азотфиксирующие   
разновидности цианобактерий, или сине-зеленых водорослей, применяют для   
повышения плодородия рисовых полей. Непатогенные бациллы (*Вас.*   
*megaterium*, *Вас. subtilis* и др.) наряду с псевдомонадами, протеем и некоторыми   
другими бактериями являются аммонифицирующими, составляя группу гни-  
лостных бактерий, осуществляющих минерализацию органических веществ

Кишечные бактерии (сем. *Enterobacteriaceae*) *—* кишечная палочка, возбу-  
дители брюшного тифа, сальмонеллезов, дизентерии — могут попадать в почву   
с фекалиями

Обнаружение бактерий группы кишечной палочки (колиформных бак-  
терий) в значительных количествах служит показателем загрязнения почвы   
фекалиями человека и животных и свидетельствует об ее санитарно-эпидемио-  
логическом неблагополучии из-за возможности передачи возбудителей кишеч-  
ных инфекций.

Микрофлора воды

Микрофлора воды отражает микробный пейзаж почвы

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.

В микрофлоре воды океанов и морей также представлены различные микро-  
организмы, в том числе архебактерии, светящиеся и галофильные (солелюби-  
вые), например галофильные вибрионы, поражающие моллюсков и некоторые   
виды рыб, при употреблении которых в пищу развивается пищевая токсикоин-  
фекция.

Вода артезианских скважин практически не содержит микроорганизмов, так как последние обычно задерживаются верхними слоями почвы.

Вместе с загряз-  
ненными ливневыми, талыми и сточными водами в озера и реки попадают   
представители нормальной микрофлоры человека и животных (индикаторы   
фекального загрязнения — кишечная палочка, цитробактер, энтеробактер, энте-  
рококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций (брюшного тифа, па-  
ратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций и др.).

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 дру-  
гие факторы способствуют гибели микрофлоры воздуха. Большее количество   
микроорганизмов присутствует в воздухе крупных городов, меньшее — в возду-  
хе 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, ко-  
личества людей в помещении, частоты проветривания и др.

Микрофлора продуктов питания

Пищевые продукты могут обсеменяться различными микроорганизмами. В слу-  
чае продуктов животного происхождения различают первичное (прижизненное)   
загрязнение собственной микрофлорой, присущей животному, и вторичное возникающее в результате попадания микроорганизмов при забое животных, до-  
ении коров, отлове рыбы, при переработке и хранении продуктов

Пищевые продукты, загрязненные микроорганизмами, могут обусловливать   
самые разнообразные пищевые токсикоинфекции и интоксикации, а также та-  
кие инфекционные болезни, как сибирская язва, бруцеллез, туберкулез и др.

Мясные блюда (студни, салаты из мяса, блюда из мясного фарша) могут   
стать причиной заболеваний, связанных с размножившимися в них сальмонел-  
лами, шигеллами, диареягенными кишечными палочками, протеем, энтероток-  
сигенными штаммами стафилококков, энтерококками, *Closlridium perfringens*   
и *Bacillus cereus.*

Молоко и молочные продукты могут быть фактором передачи возбудителей   
бруцеллеза, туберкулеза и шигеллеза. Возможно также развитие пищевых от-  
равлений в результате размножения в молочных продуктах сальмонелл, шигелл   
и стафилококков.

Яйца, яичный порошок и меланж при эндогенном первичном инфицирова-  
нии сальмонеллами яиц, особенно утиных, являются причиной сальмонеллез-  
ной токсикоинфекции.

Рыба и рыбные продукты чаще оказываются загрязненными бактериями   
*Closlridium botulinum* и *Vibrio parahaemolylicus —* возбудителями пищевых токси-  
коинфекций. Эти заболевания наблюдаются и при употреблении рыбных про-  
дуктов, загрязненных большим количеством сальмонелл, протея, *Bacillus cereus*,   
*Closlridium perfringens.*

Овощи и фрукты, как правило, загрязняются и обсеменяются шигеллами,   
диареегенными кишечными палочками, протеем, энтеропатогенными штамма ми стафилококков. Соленые огурцы могут быть причиной токсикоинфекции, вызванной *V. parahаemolyticus.*

Микрофлора организма человека

Микробы находятся в состоянии   
равновесия (эубиоза) друг с другом и организмом человека. Большинство из   
них являются комменсалами, не причиняющими вреда человеку. Организм че-  
ловека проявляет пероральную (оральную, региональную) толерантность   
к собственной нормальной микрофлоре. Различают посто-  
янную и транзиторную микрофлору. Постоянная микрофлора (резидентная,   
индигенная, или автохтонная) представлена микробами, постоянно присутству-  
ющими в организме. Транзиторная микрофлора (непостоянная, или алло-  
хтонная) не способна к длительному существованию в организме. Постоянную   
микрофлору можно разделить на облигатную и факультативную. Облигатная   
микрофлора (бифидобактерии, лактобактерии, бактероиды, кишечные палоч-  
ки 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

Кожа. На коже и в ее более глубоких слоях (волосяных 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 коагулазо-  
отрицательные стафилококки, микрококки, стрептококки,пептострептококки, *Dermabacter hominis*),а такженекоторые грамотрицательные бактерии(рода *Acinetobacter* и др.) и дрожжеподобные грибы рода *Malassezia.*

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

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

Рот. Ассоцианты нормальной микрофлоры и продукты их жизнедеятельно-  
сти образуют зубной налет (бляшки). В 1 мл слюны обитает до 108 бактерий,   
чему способствуют остатки пищи во рту, благоприятная температура (37 qС)   
и щелочная реакция среды. Анаэробов больше, чем аэробов, в 10 и более раз.

Пищевод практически не содержит микроорганизмы.

В желудке имеются лактобациллы, дрожжи, единичные кокки и грамотри-  
цательные бактерии. Концентрация бактерий меньше 103 клеток на 1 мл, так   
как желудочный сок имеет низкое значение рН, неблагоприятное для многих   
микробов.

Тонкая кишка содержит 104-107 микробов на 1 мл содержимого. Здесь обна-  
руживаются бифидобактерии, лактобактерии, клостридии, эубактерии, энтеро-  
кокки, анаэробные кокки, порфиромонады, превотеллы.

Толстая кишка содержит больше бактерий (1010-1012 на 1 г фекалий), чем   
тонкая кишка*.* Около 95% всех видов микробов составляют анаэробные бакте-  
рии.

Основными представителями микрофлоры толстой кишки являются:

x анаэробные грамположительные палочки (бифидобактерии, лактобацил-  
 лы, эубактерии); грамположительные спорообразующие анаэробные па-  
 лочки (*Clostridium perfringens* и др.); энтерококки;

x анаэробные грамположительные (руминококки, пептострептококки, пеп-  
 тококки, гемеллы) и грамотрицательные (аккермансии) кокки;   
x анаэробные грамотрицательные палочки (бактероиды, превотеллы, пор-  
 фиромонады);

x факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки (кишечные па-  
 лочки и сходные с ними бактерии семейства *Enterobacteriaceae* — цитро-  
 бактер, энтеробактер, клебсиеллы, протей и др.);

x метанококки и другие метанопродуцирующие археи (архебактерии); x на эпителии успешно растут спирохеты.

Мочеполовой тракт. Почки, мочеточники, мочевой пузырь, матка, простата   
обычно стерильны. Микрофлора наружныхгениталий представлена эпидер-  
мальными стафилококками, коринеформными бактериями, зеленящими стреп-  
тококками, сапрофитическими микобактериями (*Mycobacterium smegmatis*),   
кандидами и энтеробактериями. На слизистой оболочке передней уретры встре-  
чаются в норме стафилококки, непатогенные нейссерии, коринеформные бакте-  
рии, сапрофитные трепонемы и др.

Влагалище включает лактобактерии, бифидобактерии, бактероиды, про-  
пионибактерии, порфириномонады, превотеллы, пептострептококки, кори-  
неформные бактерии и др. Преобладают анаэробы: соотношение анаэробы/   
аэробы составляет 10:1. В репродуктивный период жизни преобладают грам-  
положительные бактерии, а в период менопаузы она заменяется грамотри-  
цательными бактериями.

Дисбактериоз и дисбиоз

Дисбактериоз и дисбиоз — состояния, развивающиеся в результате утраты   
нормальных функций микрофлоры*.* Эти нарушения определяются как клини ко-лабораторный синдром

При *дисбактериозе* происходят количественные и ка-  
чественные 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.).

Диагностика нарушений микробиоценоза проводится с помощью бактери-  
ологического метода, ПЦР-диагностики, хроматомасс-спектрометрии и иссле-  
дования метаболитов. Перспективен метод газожидкостной хроматографии, ос-  
нованный на определении короткоцепочечных жирных кислот — метаболитов,   
в основном анаэробов.

Для восстановления нормальной микрофлоры проводят селективную декон-  
таминацию и назначают *per os* различные препараты:

x пребиотики — вещества немикробного происхождения или компонен-  
 ты микробов, стимулирующие рост нормальной микрофлоры человека;   
 обычно основой пребиотика служат низкомолекулярные углеводы (оли-  
 госахариды, фруктоолигосахариды), содержащиеся в грудном молоке   
 и в некоторых пищевых продуктах;

пробиотики (эубиотики) — препараты, содержащие живые бактерии, пред-  
 ставителей нормальной микрофлоры кишечника, оказывающие нормализи-  
 рующее действие на организм человека и его микрофлору: бифидобактерии   
 (бифидумбактерин), кишечные палочки (колибактерин), лактобактерии   
 (лактобактерин) и др. Другая группа пробиотиков — самоэлиминирую-  
 щиеся антагонистические микроорганизмы, в норме не обитающие в ор-  
 ганизме человека (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Saccharomyces boulardii*); x синбиотики — комбинированные препараты, состоящие из пробиотиков   
 и пребиотиков;

x энтеросорбенты — препараты, удаляющие из кишечника токсичные ме-  
 таболиты и условно-патогенные бактерии (активированный уголь, энте-  
 росгель и др.).

. Уничтожение микробов в окружающей среде

Посторонние микробы, содержащиеся на различных предметах и в материалах, уничтожают с помощью стерилизации и дезинфекции.

Стерилизация

Стерилизация (от лат. *sterilis* — бесплодный) — полное уничтожение   
микробов или полное их удаление (элиминация) из объекта. Различают   
тепловую, химическую, лучевую стерилизацию и стерилизацию фильтро-  
ванием.

Тепловая стерилизация основана на чувствительности микробов к высо-  
кой температуре. При 60 qС вегетативные формы микробов погибают, а споры, содержащие воду в связанном состоянии и обладающие плотными оболочками, инактивируются при 160-170 qС. Для тепловой стерилизации применяют в ос-  
новном сухой жар и пар под давлением.

Стерилизацию сухим жаром производят в воздушных стерилизаторах (су-  
хожаровых шкафах, или печах Пастера) при 180 qC — 60 мин; 160 qC — 150 мин.   
Сухим жаром стерилизуют лабораторную посуду, инструменты, силиконовую   
резину и другие объекты, которые не теряют своих качеств при высокой темпе-  
ратуре. Возможны и другие режимы: 180 qС — 40 мин, 200 qС — 30 мин. Пред-  
меты, не выдерживающие подобной обработки, обеззараживают в паровых сте-  
рилизаторах.

Стерилизацию паром проводят в паровых стерилизаторах (автоклавах)   
под давлением (121 qC, 15 мин; 134 qC, 3-5 мин). Повышенное атмосферное   
давление приводит к увеличению температуры кипения (табл. 1). Под дей-



ствием высокой температуры и пара споры погибают уже при 121 qC в течение   
15-20 мин (они могут выдерживать температуру 100 qC до 5 ч).   
 Гипертермофильные формы архебактерий размножаются при температуре 100 qC и выше, поэтому они могут выдерживать автоклавирование при 121 qC в течение одного часа. Эти экстремальные жизненные формы, наряду с приона-  
ми, не поддаются стандартной стерилизации. Для инактивации прионов требу-  
ется иной режим, например автоклавирование при 121 qC в течение 4 ч или при 134 qC в течение 30 минут.

В паровом стерилизаторе стерилизуют перевязочный материал, металли-  
ческие инструменты, питательные среды, растворы, инфекционный материал,   
белье и т.д.

*Таблица 1*

Зависимость температуры воды от атмосферного давления

|  |  |
| --- | --- |
| Атмосферное давление, атм | Температура воды, qС |
| 0,5 | 80 |
| 1 | 100 |
| 2 | 121 |
| 3 | 136 |

Дробная стерилизация (тиндализация) проводится нагреванием объектов при 70-80 qC в течение 30-60 мин для уничтожения вегетативных форм микро-  
бов. Процедуру повторяют три дня подряд, причем после каждого прогревания объект выдерживают в термостате для прорастания спор. Метод применяют для обработки материалов, не выдерживающих температуру выше 100 qC, например питательных сред с углеводами.

Химическая стерилизация основана на использовании токсичных газов: оксида этилена, смеси ОБ (смеси оксида этилена и бромистого метила) и фор-  
мальдегида. Эти вещества являются алкилирующими агентами, инактивирую-  
щими активные группы в ферментах, других белках, а также нуклеиновые кис-  
лоты, что приводит к гибели микроорганизмов.

Стерилизация осуществляется паром при температуре от 20 до 60 qC   
в специальных камерах. Газ обладает высокой проницаемостью. В больницах   
используют формальдегид, в промышленных условиях оксид этилена и смесь   
ОБ. Химическую стерилизацию используют для объектов, которые могут быть   
повреждены нагреванием (например, оптические приборы, электронная аппа-  
ратура, предметы из нетермостойких полимеров, питательные среды с белком   
и т.п.).

Для стерилизации изделий из термолабильных материалов, снабженных   
оптическими устройствами, например эндоскопов, применяют обезврежива-  
ние с помощью химических растворов (стериллянтов). Простерилизованный



и отмытый от стерилизующего раствора объект высушивают и помещают в сте-  
рильную емкость, соблюдая асептические условия. Стерилизованные объекты   
хранят не более 3 суток. Формальдегид (HCHO) — основной альдегид, исполь-  
зуемый в специальной аппаратуре для стерилизации. Другой альдегид — глюта-  
ральдегид. Их используют также как основу фиксаторов и консервантов.

Лучевая стерилизация позволяет обрабатывать сразу большое количество предметов (например, одноразовых шприцев, инструментов, систем для пе-  
реливания крови и т.д.). Она основана на использовании J-излучения (источ-  
ник — радиоактивные изотопы) или ускоренных электронов. Гибель микробов под действием J-лучей и ускоренных электронов происходит в результате по-  
вреждения нуклеиновых кислот.

Стерилизация фильтрованием осуществляется с помощью различных   
фильтров (нитроцеллюлозных, керамических, асбестовых, стеклянных). Она   
позволяет освободить жидкости (питательные среды, сыворотку крови, лекар-  
ства) от микробов. Лучшими из всех известных типов являются мембранные   
фильтры.

В настоящее время все более широкое применение находят современные ме-  
тоды стерилизации, созданные на основе новых технологий, с использованием ионизированной плазмы, озона и др.

Контроль стерилизации проводится:

x микробиологическим методом путем посева части объекта стерилизации   
 на среды для аэробных и анаэробных бактерий, а также грибов (в повсед-  
 невной практике не производится);

x по изменению окраски химических индикаторов (либо индикаторных бу-  
 мажек, либо порошков, жидкостей — бензойной кислоты, мочевины, запа-  
 янных в ампулы), которые помещают на поверхности и в глубине стери-  
 лизуемого объекта;

x с помощью биотестов, например из термоустойчивых штаммов спорооб-  
 разующих бацилл (*Вас. stearothermophilus*, *Вас. licheniformis*), помещаемых   
 внутрь стерилизуемых предметов;

x путем технического контроля аппаратуры соответствующей службой.

Дезинфекция

Дезинфекция (от франц. приставки *des* и позднелат. *infectio* — заражение) —   
уничтожение и удаление возбудителей инфекции (патогенов) из объектов окру-  
жающей среды. При дезинфекции погибает большая часть микробов (в том числе   
все патогенные), но споры бактерий и некоторые резистентные микробы могут   
остаться в жизнеспособном состоянии. Различают *профилактическую дезинфек-*  
*цию* в эпидемическом очаге для предупреждения распространения различных   
болезней; *текущую дезинфекцию* при возникновении эпидемического очага; *за-*  
*ключительную дезинфекцию* (после окончания эпидемиологической вспышки).



Существуют три основных метода дезинфекции: тепловой, химический и УФ-облучение, выбор которых зависит от дезинфицируемого материала.   
 Тепловая дезинфекция. Эффективно действие горячей воды и насыщен-  
ного пара. Примером тепловой дезинфекции служит применение автоматиче-  
ских моечных машин (промывание в холодной, а затем в теплой воде с детер-  
гентом, с последующим отмыванием и дезинфекцией в дистиллированной воде при 90 qC). Обычная стирка белья, приготовление пищи и кипячение питьевой воды — примеры использования дезинфекции в быту.

Температура 100 qС убивает вегетативные формы бактерий и вирусы в тече-  
ние 5 мин. Уничтожению спор способствует добавление в воду 2% натрия гидро-  
карбоната (NaHCO3).

Для дезинфекции применяют также сухое тепло, например *прокаливание*.   
 Разновидностью тепловой дезинфекции является *пастеризация* — метод, созданный Л. Пастером и используемый для обработки в основном молока, а также соков, вина и пива:

x низкотемпературная пастеризация: 61,5 qC, 30 мин; 71 qC, 15 с;

x высокотемпературная пастеризация: кратковременная (секунды) при 80-

85 qC;

x ультравысокотемпературная пастеризация: при 130-150 qC в течение не-  
 скольких секунд.

Ультрафиолетовое облучение (УФ-лучи с длиной волны 250-280 нм) осу-  
ществляется с помощью специальных бактерицидных ламп для обеззаражива-  
ния воздуха, различных поверхностей в операционных, перевязочных, микро-  
биологических лабораториях, предприятиях пищевой промышленности и т.д.   
УФ-лучи разрушают ДНК микробов в результате образования тиминовых ди-  
меров.

Химическая дезинфекция проводится с помощью различных дезинфи-  
цирующих веществ, которые растворяют липиды мембран (детергенты) или   
разрушают белки и нуклеиновые кислоты (денатураты, оксиданты) микробов.   
Химической дезинфекции подвергаются поверхность операционного стола,   
стены процедурного кабинета, кожа, отработанный патологический материал,   
вода (хлорирование воды), некоторые инструменты, которые невозможно об-  
работать теплом. Дезинфекцию стремятся проводить в герметичных условиях.   
Наиболее распространенные дезинфицирующие средства: хлорсодержащие,   
фенольные, четвертичные аммониевые и перекисные соединения. К неоргани-  
ческим хлорсодержащим соединениям относят хлорную известь, белильную   
известь, гипохлорид кальция, гипохлорит натрия. В группу органических хлор-  
содержащих соединений входят хлорамин Б, дезам, дихлор-1, сульфохлоран-  
тин, хлорцин, хлордезин. Фенольными соединениями являются лизол и хлор-  
E-нафтол, гексахлорофен и др. Перспективную группу дезинфицирующих   
соединений составляют поверхностно-активные вещества, относящиеся к чет-  
вертичным аммониевым соединениям и амфолитам, обладающие бактерицид-



ными, моющими свойствами и низкой токсичностью (ниртан, амфолан и др.).   
К перекисным соединениям относят пергидроль (30% водный раствор переки-  
си водорода) и дезоксон-1. Для дезинфекции применяются также детергенты   
(хлоргексидин и др.), кислоты (например, 40% раствор уксусной кислоты для   
противогрибкового обеззараживания обуви), альдегиды (формальдегид, глюта-  
ральдегид и др.).

Для дезинфекции помещений, а также оборудования и аппаратуры исполь-  
зуют газовую смесь из оксида этилена с метилбромидом.

Перечисленные химические вещества можно разделить по механизму дей-  
ствия на следующие основные группы:

1) деструктивный механизм с литическим или денатурирующим эффектом;

2) окислительный механизм (перекись водорода, перманганат калия, гало-  
 гены);

3) мембраноатакующий механизм (например, детергенты, нарушающие про-  
 ницаемость мембран);

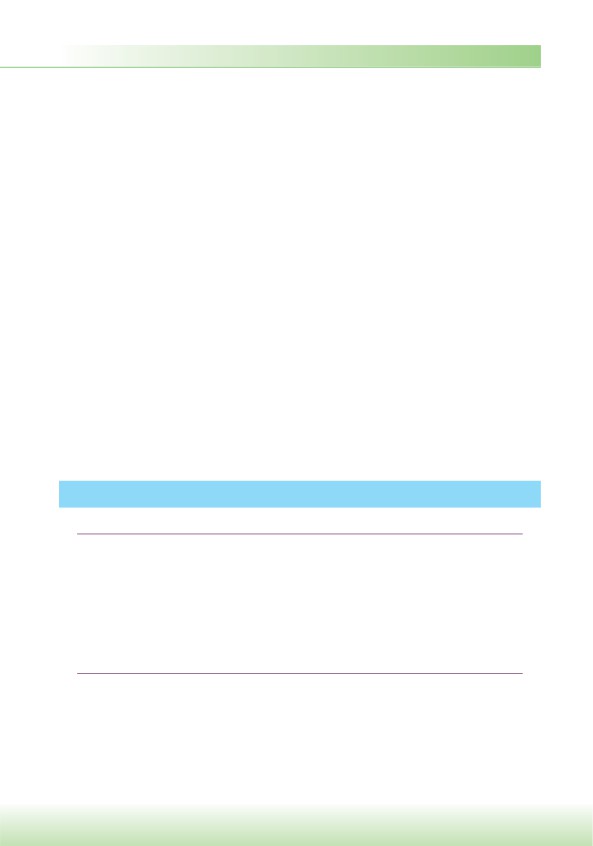
4) антиферментный механизм (например, соли тяжелых металлов, 8-окси-  
 хинолины и др.).

Асептика и антисептика

Асептика — предотвращение контаминации (загрязнения) объектов или ран микробами. Основоположником асептики является Д. Листер (1867). Асептика направлена на предупреждение попадания возбудителя инфекции в рану, орга-  
ны больного при операциях, лечебных и диагностических процедурах. Методы асептики находят также применение на микробиологических производствах, на предприятиях пищевой промышленности и др.

Асептика предусматривает меры защиты от микробов путем сохранения сте-  
рильности перевязочного материала, операционного белья, перчаток, инстру-  
ментов, материала для обработки раны, а также дезинфекцию рук врача, опе-  
рационного поля, аппаратуры, операционной и других помещений, применение масок и специальной одежды. К системе асептических мероприятий относится также планировка лечебных учреждений операционных («боксирование», вен-  
тиляция, кондиционирование воздуха и т.п.).

Антисептика — мероприятия, направленные на уничтожение микробов   
в патологическом очаге, ране или в другом объекте. Антисептика включает раз-  
личные методы или комплекс этих методов: механические (удаление инфици-  
рованных некротизированных тканей, инородных тел и т.д.); физические (дре-  
нирование ран, введение тампонов, наложение гигроскопических повязок);   
биологические (применение ферментов для лизиса нежизнеспособных клеток,   
бактериофагов и антибиотиков); химические, основанные на применении ан-  
тимикробных веществ — антисептиков, которые резко снижают численность   
микробов в ране, на поверхности организма. По химическому составу различа-



ют следующие антисептики: *галогены* — препараты йода (спиртовой раствор   
йода, раствор Люголя, йодоформ, йодинол, йодопирин), хлора (хлорамины,   
хлориты); *окислители* (перекись водорода, калия перманганат, обладающие,   
как и галогены, окислительными свойствами); *кислоты и их соли* (уксусная,   
борная, салициловая, тетраборат натрия), щелочи (аммиак и его соли, бура);   
*спирты* (70-80q этанол и др.); *альдегиды* (формальдегид, гексаметилен-тетра-  
мин, E-пропиолактон); *детергенты* (декамин, хлоргексидин. этоний и др.);   
*производные 8-оксихинолина* (хинозол, интестопан, нитроксолин), 4-хинолона   
(оксолиновая кислота), хиноксалина (хиноксидин, диоксидин); *производные*   
*нитрофурана* (фурацилин, фурагин, фуразолидон); *производные фенолов* (ре-  
зорцин, трикрезол, фенил-резорцин, фенилсалицилат), дегги (деготь березо-  
вый, ихтиол и др.); *красители* (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий,   
этакридина лактат); *соединения тяжелых металлов* (дихлорид и оксицианид   
ртути, нитрат серебра, колларгол, протаргол, сульфат цинка, сульфат меди,   
окись цинка).

Для предотвращения роста микроорганизмов в лекарственных средствах применяют консерванты: *альдегиды* (формальдегид, ронгалит); *гуанидина про-*  
*изводные* (хлоргексидина диацетат, хлоргексидина дигидрохлорид); *кислоты неорганические и их соли* (борная кислота, натрия метабисульфат); *кислоты ор-*  
*ганические и их натриевые соли* (бензойная кислота, дегидроацетовая кислота); *ртути органические соединения* (мертиолят/тимеросал, фенилртуть азотнокис-  
лая, фенилртуть борнокислая, фенилртуть уксуснокислая).

Санитарная микробиология

Санитарная микробиология — раздел медицинской микробиологии,   
изучающий микроорганизмы, содержащиеся в окружающей среде и спо-  
собные оказывать неблагоприятное воздействие на состояние здоровья   
человека. Она разрабатывает микробиологические показатели гигиениче-  
ского нормирования, методы контроля за эффективностью обеззаражива-  
ния объектов окружающей среды, а также выявляет в объектах окружаю-  
щей среды патогенные, условно-патогенные и санитарно-показательные   
микроорганизмы.

Обнаружение *патогенных микроорганизмов* позволяет дать оценку эпиде-  
миологической ситуации и принять соответствующие меры по борьбе и профи-  
лактике инфекционных заболеваний.

*Условно-патогенные микроорганизмы* способны вызывать гнойно-воспа-  
лительные процессы в ослабленном организме. Кроме того, они могут попадать   
в продукты питания, быстро размножаться с накоплением большого количества



микробных клеток и их токсинов, вызывая у людей пищевые отравления ми-  
кробной этиологии.

*Санитарно-показательные микроорганизмы* используют в основном для   
косвенного определения возможного присутствия в объектах окружающей сре-  
ды патогенных микроорганизмов. Их наличие свидетельствует о загрязнении   
объекта выделениями человека и животных, так как они постоянно обитают   
в тех же органах, что и возбудители заболеваний, и имеют общий путь выделе-  
ния в окружающую среду. Например, возбудители кишечных инфекций име-  
ют общий путь выделения (с фекалиями) с такими санитарно-показательными   
бактериями, как бактерии группы кишечной палочки (БГКП) — колиформные   
палочки (в эту группу, кроме кишечной палочки, входят сходные по свойствам   
бактерии родов *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*), энтерококки, клостридии   
перфрингенс. Возбудители воздушно-капельных инфекций имеют общий путь   
выделения с бактериями (кокками), постоянно обитающими на слизистой обо-  
лочке верхних дыхательных путей, выделяющимися в окружающую среду (при   
кашле, чиханье, разговоре), поэтому в качестве санитарно-показательных бак-  
терий для воздуха закрытых помещений предложены золотистые стафилокок-  
ки и гемолитические стрептококки.

Санитарно-показательные микроорганизмы должны отвечать следующим основным требованиям:

x обитают только в организме людей или животных и постоянно обнаружи-  
 ваются в их выделениях;

x не должны размножаться или обитать в почве и воде;

x сроки их выживания и устойчивость к различным факторам после выде-  
 ления из организма в окружающую среду равны или превышают таковые   
 у патогенных микробов;

x их свойства типичны и легко выявляемые для их дифференциации;

x методы их обнаружения и идентификации просты, методически и эконо-  
 мически доступны;

x встречаются в окружающей среде в значительно больших количествах,   
 чем патогенные микроорганизмы;

x в окружающей среде не должно быть близкосходных обитателей — микро-  
 организмов.

Кроме выявления патогенных, условно-патогенных и санитарно-показа-  
тельных микроорганизмов, в практике санитарно-микробиологических ис-  
следований используется определение общего *микробного числа*, т.е. общего   
количества микроорганизмов в определенном объеме или массе исследуемого   
материала (вода, почва, продукты питания, лекарственная форма и др.). В част-  
ности, определяют МАФАМ — мезофильные аэробные и факультативно ана-  
эробные микроорганизмы, выросшие в виде видимых колоний на плотной пи-  
тательной среде после инкубации при37 qС в течение 24 ч.

Культивирование вирусов

Культивирование вирусов человека и животных проводят в целях лабораторной диагностики вирусных инфекций, для изучения патогенеза и иммунитета при вирусных инфекциях, а также для получения диагностических и вакцинных препаратов. Вирусы культивируют на трех биологических моделях: в организме лабораторных животных, в развивающихся эмбрионах птиц (чаще на куриных эмбрионах) и культурах клеток (тканей).

Выращенные вирусы определяют с помощью методов индикации и иденти-  
фикации. *Индикация* вирусов, т.е. обнаружение факта их репродукции, основа-  
на на выявлении различных биологических свойств вирусов и особенностей их   
взаимодействия с чувствительными клетками. *Идентификация* (определение   
вида, типа) вирусов осуществляется в основном с помощью иммунологических   
реакций, основанных на взаимодействии антигенов вирусов и соответствую-  
щих им антител.

*Лабораторных животных* (взрослых или новорожденных белых мышей, хо-  
мяков, кроликов, обезьян и др.) заражают исследуемым вируссодержащим ма-  
териалом различными способами (подкожно, внутримышечно, интраназально,   
интрацеребрально и т.д.) в зависимости от тропизма вирусов. Использование   
животных для культивирования вирусов в диагностических целях весьма огра-  
ничено из-за видовой невосприимчивости животных ко многим вирусам чело-  
века, контаминации животных посторонними микробами, а также по экономи-  
ческим и этическим соображениям.

О репродукции вирусов в организме животных судят по развитию у них   
видимых клинических проявлений заболевания, патоморфологическим изме-  
нениям органов и тканей, а также на основании *реакции гемагглютинации*   
(РГА) с суспензией из органов, содержащих вирусы. РГА основана на способ-



ности многих вирусов вызывать склеивание (агглютинацию) эритроцитов че-  
ловека, птиц и млекопитающих в результате взаимодействия вирусных белков (гемагглютининов) с рецепторами эритроцитов.

*Куриные эмбрионы* (5-12-дневные) заражают путем введения исследуемого   
материала в различные полости и ткани зародыша. Таким образом можно куль-  
тивировать вирусы гриппа, герпеса, натуральной оспы и др. Достоинствами   
модели являются: возможность накопления вирусов в больших количествах;   
отсутствие скрытых вирусных инфекций; доступность для любой лаборатории.   
О репродукции вирусов в куриных эмбрионах свидетельствуют: специфиче-  
ские поражения оболочек и тела эмбриона (оспины, кровоизлияния); гибель   
эмбриона; положительная РГА с вируссодержащей жидкостью, полученной из   
полостей зараженного зародыша.

Методику культивирования вирусов в развивающихся эмбрионах птиц ис-  
пользуют при промышленном выращивании вирусов. Однако многие вирусы   
не размножаются в эмбрионах птиц; почти неограниченные возможности для   
культивирования вирусов появились после открытия метода культур клеток.

*Культуру клеток* (*тканей*) наиболее часто применяют для культивирования   
вирусов. Метод культур клеток разработан в 50-х годах ХХ в. Дж. Эндерсом   
и соавт., получившими за это открытие Нобелевскую премию. Клетки, получен-  
ные из различных органов и тканей человека, животных, птиц и других биоло-  
гических объектов, размножают вне организма на искусственных питательных   
средах в специальной лабораторной посуде. Большое распространение получи-  
ли культуры клеток из эмбриональных и опухолевых (злокачественно перерож-  
денных) тканей, обладающих по сравнению с нормальными клетками взрослого   
организма более активной способностью к росту и размножению.

При выращивании культур клеток необходимо выполнение ряда условий:

1) соблюдение правил асептики;

2) использование лабораторной посуды из нейтрального стекла (пробирки,   
 флаконы, матрасы) или специальных реакторов для получения биотехно-  
 логической продукции;

3) использование сложных питательных сред (среда 199, Игла), содержащих   
 минеральные соли, аминокислоты, витамины, глюкозу, сыворотку крови   
 животных или человека и буферные растворы, стабилизирующие рН;

4) добавление антибиотиков к питательной среде для подавления роста по-  
 сторонних микробов;

5) соблюдение оптимальной температуры (36-38,5 qС) роста клеток.

В зависимости от техники приготовления различают однослойные, суспен-  
зионные и органные культуры клеток.

x *Однослойные культуры клеток.*  Клетки способны прикрепляться   
 и размножаться на поверхности химически нейтрального стекла лабора-  
 торной посуды в виде монослоя. Они получили наибольшее применение   
 в вирусологии.



еме питательной среды при постоянном ее перемешивании с помощью   
 магнитной мешалки или во вращающемся барабане. Их используют для   
 получения большого количества клеток, например при промышленном   
 получении вирусных вакцин.

x *Органные культуры —* цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие   
 исходную структуру вне организма (применяются ограниченно).   
 Культуры клеток в процессе их культивирования способны проходить десят-  
ки генераций. По числу жизнеспособных генераций культуры клеток подразде-  
ляют на: 1) первичные, или первично-трипсинизированные; 2) перевиваемые, или стабильные; 3) полуперевиваемые.

*Первичные культуры клеток* способны размножаться только в первых ге-  
нерациях, т.е. выдерживают не более 5-10 пассажей после выделения из тканей. В основе получения первичных культур лежит обработка кусочков тканей (эм-  
бриональных, опухолевых или нормальных) протеолитическими ферментами, например трипсином, который разрушает межклеточные связи в тканях и орга-  
нах с образованием изолированных клеток.

*Перевиваемые* (*стабильные*) *культуры клеток* способны размножаться   
в лабораторных условиях неопределенно длительный срок (десятки лет), т.е.   
выдерживают многочисленные пассажи. Их получают главный образом из опу-  
холевых или эмбриональных тканей, обладающих большой потенцией роста.   
Перевиваемые культуры клеток имеют преимущества перед первичными куль-  
турами. К ним относятся: продолжительность их культивирования, высокая   
скорость размножения опухолевых и эмбриональных клеток, меньшая трудоем-  
кость, способность культур сохранять свои свойства в замороженном состоянии   
в течение многих лет, возможность использования международных линий куль-  
тур во многих лабораториях мира. Однако злокачественный характер клеток   
и соматические мутации, претерпеваемые нормальными клетками в процессе   
многочисленных генераций, ограничивают использование этого вида культур,   
в частности невозможно их применение в производстве вирусных вакцин.

*Полуперевиваемые культуры клеток* имеют ограниченную продолжи-  
тельность жизни и выдерживают 40-50 пассажей. Их обычно получают из   
диплоидных клеток эмбриона человека. В процессе пассажей эти культуры со-  
храняют диплоидный набор хромосом, характерный для соматических клеток   
исходной ткани, и не претерпевают злокачественной трансформации. Поэтому   
полуперевиваемые культуры клеток могут быть использованы как в диагности-  
ке, так и в производстве вакцин.

Внедрение в вирусологию метода культур клеток позволило выделить   
и идентифицировать многочисленные ранее неизвестные вирусы, так как почти   
к каждому вирусу можно подобрать соответствующие чувствительные клетки,   
в которых он способен репродуцироваться. Метод дал возможность изучать вза-  
имодействие вирусов с клеткой на молекулярном уровне, получать высококаче-



ственные вакцинные и диагностические препараты, проводить вирусологиче-  
ские исследования в стандартных условиях.

О репродукции вирусов в культуре клеток, зараженных вируссодержащим материалом, можно судить на основании следующих феноменов: цитопатоген-  
ного действия вирусов, или цитопатического эффекта, образования внутрикле-  
точных включений; образования «бляшек»; реакций гемадсорбции и гемагглю-  
тинации; «цветной» реакции*.*

*Цитопатогенное действие* (ЦПД) —патологические изменения морфоло-  
гии клеток, вплоть до их гибели, возникающие в результате репродукции ви-  
русов и наблюдаемые под микроскопом (рис. 3.11). В зависимости от особен-  
ностей репродуцирующихся вирусов ЦПД может отличаться. В одних случаях   
быстро вакуолизируется цитоплазма, разрушаются митохондрии, округляются   
и гибнут клетки, а в других — формируются гигантские многоядерные клетки   
(так называемые симпласты), или наблюдается явление клеточной пролифера-  
ции, которое в итоге заканчивается деструкцией клеток. Таким образом, харак-  
тер ЦПД позволяет использовать этот феномен не только для индикации виру-  
сов, но и для их ориентировочной идентификации в культуре клеток.

Рис. 3.11. Однослойная культура клеток, зараженная вирусом, — ЦПД вируса

Некоторые вирусы можно обнаружить и идентифицировать по внутрикле-  
точным *включениям*, которые образуются в ядре или цитоплазме зараженных   
клеток (рис. 3.12). Часто включенияпредставляют собой скопления вирусных   
частиц или отдельных компонентов вирусов, иногда могут содержать клеточ-  
ный материал. Выявляют включения с помощью светового или люминесцент-  
ного микроскопа после окрашивания зараженных клеток соответственно ани-  
линовыми красителями или флюорохромами. Включения могут отличаться   
по величине (от 0,2 до 25 мкм), форме (округлые или неправильные) и чис-  
ленности (одиночные и множественные). Характерные цитоплазматические   
включения формируются в клетках, инфицированных вирусом натуральной



оспы (тельца Гварниери), бешенства (тельца Бабеша—Негри), а внутриядерные включения — при заражении аденовирусами или вирусами герпеса.

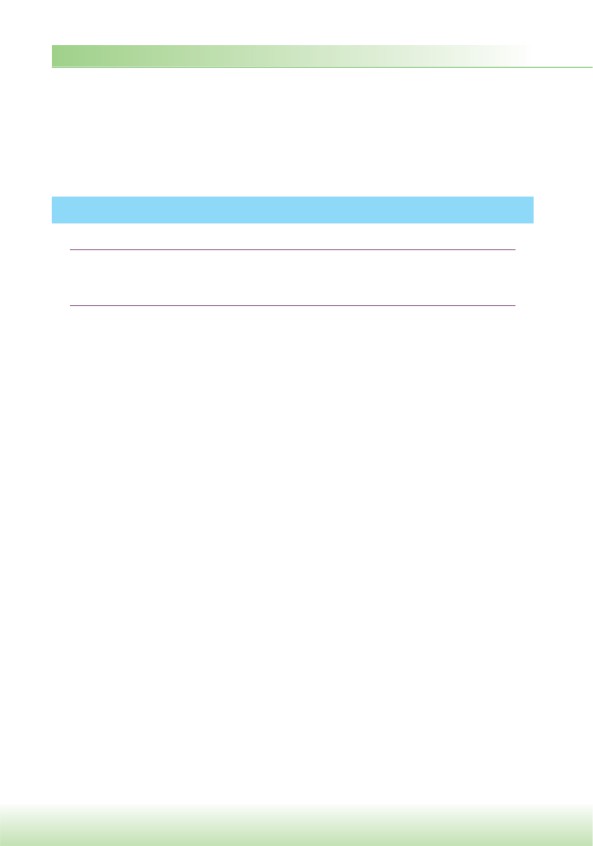
Рис. 3.12. Цитоплазматические включения — тельца Гварниери

*«Бляшки»*, или *«негативные колонии»*, *—* ограниченные участки разрушен-  
ных вирусами клеток в сплошном монослое культуры клеток, культивируемых   
на питательной среде под агаровым покрытием. Они видны невооруженным   
глазом в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток   
(рис. 3.13). Добавление агара в питательную среду ограничивает распростра-  
нение вирусов по всему монослою после выхода их из разрушенной клетки   
и обеспечивает взаимодействие вирусов только с соседними клетками. Каждая   
«бляшка» образуется потомством одного вириона. Подсчитав количество «бля-  
шек», можно определить концентрацию вирусов в исследуемом материале. Кро-  
ме того, «бляшки» разных групп вирусов отличаются по размеру, форме, срокам   
появления. Поэтому данный метод используют для дифференциации вирусов,   
а также для селекции штаммов и получения чистых линий вирусов.

Рис. 3.13. «Бляшки»(«негативные» колонии») вирусов в культуре клеток

*Реакция гемадсорбции* основана наспособности культур клеток, инфици-  
рованных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Целый   
ряд вирусов (гриппа, парагриппа и др.) обладают гемадсорбирующими свой-  
ствами, что позволяет использовать реакцию гемадсорбции для индикации этих   
вирусов даже без выраженного ЦПД в культуре клеток. Механизмы реакции   
гемадсорбции и гемагглютинации сходны. Поэтому для обнаружения репро-  
дукции некоторых вирусов в культуре клеток можно использовать реакцию   
гемагглютинации с культуральной жидкостью, т.е. с питательной средой, содер-  
жащей размножившиеся вирусы.

О репродукции вирусов в культуре клеток можно также судить по так называ-  
емой «*цветной» реакции.* Она регистрируется по изменению цвета индикатора,



находящегося в питательной среде для культур клеток. Если вирусы не размно-  
жаются в культуре клеток, то живые клетки в процессе своего метаболизма вы-  
деляют кислые продукты, изменяющие рН среды и соответственно цвет инди-  
катора. При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается   
(клетки гибнут), и среда сохраняет первоначальный цвет индикатора.



5.1. Строение генома бактерий

Бактериальный геном состоит из генетических элементов, способных к само-  
стоятельной репликации (воспроизведению), т.е. репликонов. *Репликонами*   
являются бактериальная хромосома и плазмиды. Наследственная инфор-  
мация у бактерий хранится в форме последовательности нуклеотидов ДНК   
(см. рис. 3.1), которые определяют последовательность аминокислот в белке.   
Каждому белку соответствует свой ген, т.е. дискретный участок на ДНК, отли-  
чающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов.

5.1.1. Бактериальная хромосома

Бактериальная хромосома состоит из одной двухцепочечной молекулы ДНК, ко-  
торая может быть как кольцевой (*E. coli*), так и линейной формы (*B. burgdorferi*).   
Некоторые бактерии, в частности бруцеллы, *V. cholerae* имеют по две хромосо-  
мы. Размеры бактериальной хромосомы у различных представителей прокари-  
от варьируют от 3 u 108 до 2,5 u 109 Да, что соответствует 3,2 u 106 нуклеотидных   
пар (н.п.). Например, у *E. coli* бактериальная хромосома содержит 5 u 106 н.п.   
Для сравнения: размеры ДНК вирусов составляют порядка 103 н.п., дрож-  
жей — 107 н.п., а суммарная длина хромосомных ДНК человека — 3 u 109 н.п.   
Бактериальная хромосома обладает гаплоидным набором генов, кодирующих   
жизненно важные для бактериальной клетки функции. Она формирует ком-  
пактный нуклеоид бактериальной клетки.

5.1.2. Плазмиды бактерий

*Плазмиды* представляют собой двухцепочечные молекулы ДНК разме-  
ром от 103 до 106 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 плаз-  
мидами, можно выделить следующие: 1) устойчивость к антибиотикам; 2) об-  
разование 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 (см. разд. 3.8 и рис. 3.5) 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 бактериаль-  
ной 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.

Для характеристики плазмидных репликонов их принято разбивать на груп-  
пы совместимости*. Несовместимость* плазмид связана с неспособностью двух   
плазмид стабильно сохраняться в одной и той же бактериальной клетке. Не-  
совместимость свойственна тем плазмидам, которые обладают высоким сход-  
ством репликонов, поддержание которых в клетке регулируется одним и тем же   
механизмом.

Некоторые плазмиды могут обратимо встраиваться в бактериальную хромо-  
сому и функционировать в виде единого репликона. Такие плазмиды называют-  
ся *интегративными*, или эписомами.

Ряд бактериальных плазмид способны передаваться из одной клетки в дру-  
гую, иногда даже принадлежащую иной таксономической единице. Такие плаз-  
миды называются *трансмиссивными* (син.: *конъюгативными*), Трансмиссив-  
ность 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 трансмиссив-  
ную плазмиду, по которой плазмидная ДНК передается в новую клетку. Этот процесс называется *конъюгацией* (см. разд. 5.4.1).

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*, а сам про-  
цесс — мобилизацией нетрансмиссивнойплазмиды.

Особое значение в медицинской микробиологии имеют плазмиды, обеспечи-  
вающие устойчивость бактерий к антибиотикам, получившие название R-плаз-  
мид, а также плазмиды, отвечающие за продукцию факторов патогенности, спо-  
собствующие развитию инфекционного процесса.

*R-плазмиды* (от англ. *resistance* — противодействие) содержат гены, де-  
терминирующие синтез ферментов, разрушающих антибактериальные препараты (например, антибиотики).

В результате наличия такой плазмиды бактериальная клетка становится   
устойчивой (резистентной) к действию целой группы лекарственных веществ,   
а иногда и к нескольким. Многие R-плазмиды, будучи трансмиссивными   
и распространяясь в популяции бактерий, делают ее недоступной к воздей-  
ствию антибактериальных препаратов. Бактериальные штаммы, несущие   
R-плазмиды, часто являются этиологическими агентами внутрибольничных   
инфекций.

Плазмиды, детерминирующие синтез факторов патогенности, обнаружены у многих бактерий — возбудителей инфекционных заболеваний человека. Пато-  
генность возбудителей шигеллезов, иерсиниозов, чумы, сибирской язвы, иксо-  
дового бореллиоза, кишечных эшерихиозов связана с наличием и функциони-  
рованием у них плазмид патогенности. Первыми из этой группы плазмид были определены *Еnt-плазмида*, определяющая синтез энтеротоксина, и *Hly-плаз-*  
*мида*, детерминирующая синтез гемолизина у *E. coli.*

Некоторые бактериальные клетки содержат плазмиды, детерминирующие   
синтез бактерицидных по отношению к другим бактериям веществ. Например,   
некоторые *E. coli* владеют *Col-плазмидой*, определяющей синтез колицинов,   
оказывающих микробоцидное действие на колиформные бактерии. Бактери-  
альные клетки, несущие такие плазмиды, обладают преимуществами при засе-  
лении экологических ниш.

Плазмиды используются в практической деятельности человека, в частности   
в генной инженерии, при конструировании специальных рекомбинантных бак-  
териальных штаммов, вырабатывающих в больших количествах биологически   
активные вещества.

5.1.3. Подвижные генетические элементы

В состав бактериального генома, как в бактериальную хромосому, так и в плаз-  
миды, входят *подвижные генетические элементы*, к которым относятся вста-  
вочные последовательности и транспозоны.

Вставочные (инсерционные) последовательности, IS-элементы (от англ. *insertion sequences*) — это участки ДНК, способные как целое пере-  
мещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами. IS-элементы имеют размеры ~1000 н.п. и содержат лишь те гены, которые необ-  
ходимы 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 репрес-  
сора, который регулирует весь процесс перемещения.

Отличительная особенность IS-элементов — наличие на концах вставочной   
последовательности *инвертированных повторов* (рис. 5.1), которые узна-  
ет транспозаза, осуществляющая одноцепочечные разрывы цепей ДНК, рас-  
положенных по обе стороны от подвижного элемента. Оригинальная копия IS-элемента остается на прежнем месте, а ее реплицированный дупликат пере-  
мещается на новый участок.

Перемещение подвижных генетических элементов принято называть репли-  
кативной или незаконной рекомбинацией. Однако в отличие от бактериальной хромосомы и плазмид подвижные генетические элементы не являются самосто-  
ятельными репликонами, так как их репликация — составной элемент реплика-  
ции ДНК репликона, в составе которого они находятся.

Известно несколько разновидностей IS-элементов, которые различаются по   
размерам и по типам и количеству инвертированных повторов.   
 Транспозоны *—* этосегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но имеющие структурные гены (см. рис. 5.1), т.е. гены, обеспечи-  
вающие синтез молекул, обладающих специфическим биологическим свойством, например токсичностью, или обеспечивающих устойчивость к антибиотикам.   
 Перемещаясь по репликону или между ними, подвижные генетические эле-  
менты вызывают:

1) инактивацию генов тех участков ДНК, куда они, переместившись, встраи-  
 ваются;

2) образование повреждений генетического материала;

3) слияние репликонов, т.е. встраивание плазмиды в хромосому;

4) распространение генов в популяции бактерий, что может приводить к из-  
 менению биологических свойств популяции, смене возбудителей инфек-  
 ций и эволюционным процессам среди микробов.

5.1.4. Интегроны и острова патогенности

Помимо плазмид и подвижных генетических элементов у бактерий существует

еще одна система, способствующая распространению генов, — система интегро-

нов. Интегроны захватывают посредством сайт-специфической рекомбинации

малые элементы ДНК, называемые генными кассетами, и экспрессируют их.

Интегроны могут располагаться как на хромосоме, так и на плазмидах. Поэтому

возможно перемещение кассет с одного интегрона на другой как в пределах од-

ной бактериальной клетки, так и по популяции бактерий. Один интегрон может

захватывать несколько кассет антибиотикорезистентности.

Острова патогенности — участки ДНК протяженностью не менее

10 000 пар нуклеотидов, которые отличаются по составу Г-Ц-пар нуклеотидов

от основного генома бактерий и ответственны за синтез факторов патогенно-

сти, обеспечивающих развитие патологического процесса в организме хозя-

ина. Острова патогенности могут быть локализованы в составе хромосомы

(Salmonella), плазмид (Shigella) и геноме конвертирующего фага (V. cholerae).

5.2. Мутации у бактерий

Мутации — это изменения в последовательности отдельных нуклео-

тидов ДНК, которые ведут к изменениям морфологии бактериальной клетки, возникновению потребностей в факторах роста (например, в ами-

нокислотах, 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 аберрации. В последнем случае могут наблюдаться выпадения нескольких пар нуклеотидов, которые называются делецией, добавление нуклеотидных пар, т.е. дупликация, перемещение фрагментов хромосомы, транслокация, и переста-

новки нуклеотидных пар — инверсии.

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

Точечные спонтанные мутации возникают в результате ошибок при репли-

кации ДНК, что связано с таутомерным перемещением электронов в азотистых

основаниях.

Спонтанные хромосомные аберрации появляются вследствие перемеще-

ния подвижных генетических элементов.

Индуцированные мутации происходят под влиянием внешних факторов,

которые называются мутагенами. Мутагены бывают физическими (УФ-лучи, J-радиация), химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований,

азотистая кислота и ее аналоги и другие соединения) и биологическими —

транспозоны.

Аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, например 2-аминопурин, 5-бромурацил, включаются в нуклеотиды, а следовательно, и в ДНК, но при этом они значительно чаще в силу таутомерных превращений спариваются с «неправильными» партнерами, в результате вызывая за-

мену пурина другим пурином (А-Г) или пиримидина другим пиримидином (Т-Ц). Замена пурина на пурин, а пиримидина на пиримидин называется транзицией.

Азотистая кислота и ее аналоги вызывают дезаминирование азотистых оснований, результа-

том чего являются ошибки при спаривании и как следствие возникновение транзиции. Аденин

в результате дезаминирования превращается в гипоксантин, который спаривается с цитозином,

что приводит к возникновению транзиции АТ-ГЦ. Гуанин же при дезаминировании превращается

в ксантин, который по-прежнему спаривается с цитозином; таким образом, дезаминирование гуа-

нина не сопровождается мутацией.

Акридин и профлавин внедряются между соседними основаниями цепи ДНК, вдвое увели-

чивая расстояние между ними. Это пространственное изменение при репликации может приве-

сти как к утрате нуклеотида, так и включению дополнительной нуклеотидной пары, что приводит к сдвигу рамки считывания тРНК. Начиная с того места, где произошло выпадение или включение нуклеотида, информация считывается неправильно.

УФ-облучение затрагивает преимущественно пиримидиновые основания, при этом два сосед-

них остатка тимина ДНК могут оказаться ковалентно связанными.

На бактериях, подвергнутых УФ-облучению, было показано, что повреж-

дения в бактериальных ДНК, вызванные облучением, могут частично исправ-

ляться благодаря наличию репарационных систем. У различных бактерий

имеется несколько типов репарационных систем. Один тип репарации проте-

кает на свету, он связан с деятельностью фотореактивирующегося фермента,

который расщепляет тиминовый димер. При темновой репарации дефектные

участки цепи ДНК удаляются, и образовавшаяся брешь достраивается при по-

мощи ДНК-полимеразы на матрице сохранившейся цепи и соединяется с цепью

лигазой (рис. 5.2).

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 пря-

мой реверсией. Если мутация восстанавливает фенотип, не восстанавливая гено-

тип, то такая мутация называется супрессорной. Супрессорные мутации могут

возникать как в пределах того самого гена, в котором произошла первичная мута-

ция, так и в других генах или могут быть связаны с мутациями в тРНК.

5.3. Рекомбинация у бактерий

Генетическая рекомбинация — это взаимодействие между двумя ге-  
номами, т.е. между двумя ДНК, обладающими различными генотипами, которое приводит к образованию рекомбинантной ДНК, формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей.

Отсутствие полового размножения и мейоза, в процессе которых у высших   
организмов происходит рекомбинация, а также гаплоидный набор генов и опре-  
деляют особенности рекомбинации у бактерий. В процессе рекомбинации   
бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический   
материал, и клетки-реципиенты, которые воспринимают его. В клетку-реципи-  
ент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, что приводит   
к формированию неполной зиготы — *мерозиготы*. В результате рекомбинации   
в мерозиготе образуется только один рекомбинант, генотип которого представ-  
лен в основном генотипом реципиента с включенным в него фрагментом хромо-  
сомы донора. Реципрокные рекомбинанты не образуются.

По молекулярному механизму генетическая рекомбинация у бактерий де-  
лится на три вида: гомологичную, сайт-специфическую и незаконную.

Гомологичная рекомбинация. При гомологичной рекомбинациивпроцессеразрываи вос-  
соединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью   
гомологии. Гомологичная рекомбинация происходит через образование промежуточного соедине ния, крестообразной структуры Холидея, в которой осуществляется комплементарное спаривание между одноцепочечными участками, принадлежащими разным родительским молекулам ДНК. Процесс гомологичной рекомбинации находится под контролем генов, объединенных в *REC-*  
*систему*, состоящуюизгенов *recA*,*B*,*C*,*D.* Продукты этих генов производят расплетание нитей ДНК и их переориентацию с образованием структуры Холидея, а также разрезают структуру Холидея для завершения процесса рекомбинации.

Сайт-специфическая рекомбинация происходит в определенных участках генома и не тре-  
бует высокой степени гомологии ДНК. Этот тип рекомбинации не зависит от функционирования генов *recA*,*B*,*C*,*D*. Примером может служить встраивание плазмиды в хромосому бактерий, ко-  
торое происходит между идентичными IS-элементами хромосомы и плазмиды, интеграция ДНК фага в хромосому *E. coli.* Сайт-специфическая рекомбинация, происходящая в пределах одного ре-  
пликона, участвует также в переключении активности генов. Например, у сальмонелл следствием этого процесса являются фазовые вариации жгутикового Н-антигена.

Незаконная или репликативная рекомбинация не зависит от функционирования генов *recА*,*B*,*C*,*D*. Примером ее является транспозиция подвижных генетических элементов по репли-  
кону или между ними, при этом, как уже было отмечено в разд. 5.1.3, транспозиция подвижного генетического элемента сопровождается репликацией ДНК.

5.4. Передача генетической информации у бактерий

Рекомбинация у бактерий — это конечный этап передачи генетического ма-  
териала 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) (рис. 5.3).

5.4.1. Конъюгация

*Конъюгация* — передача генетического материала от клетки-донора   
в клетку-реципиент путем непосредственного контакта клеток. Впервые   
была обнаружена Дж. Ледербергом и Э. Тейтумом в 1946 г. Необходимым   
условием для конъюгации является наличие в клетке-доноре трансмис-  
сивной плазмиды.

Трансмиссивные плазмиды кодируют половые пили, образующие конъюга-  
ционную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой   
плазмидная ДНК передается в новую клетку. Механизм передачи плазмидной   
ДНК из клетки в клетку заключается в том, что специальный белок, кодиру-  
емый tra-опероном, «узнает» определенную последовательность в ДНК плаз-  
миды (называемую *origin*), вносит в эту последовательность одноцепочечный   
разрыв и ковалентно связывается с 5’-концом. Затем цепь ДНК, с которой свя-  
зан белок, 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. Бе-

лок, связанный с 5’-концом перенесенной цепи, способствует замыканию плаз-  
миды в реципиентной клетке в кольцо. Примером служит перенос в реципи-  
ентную 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 находится в клетке-до-  
норе в автономном состоянии, то в результате скрещивания (F+- и F--клетки)   
клетка-реципиент приобретает донорские свойства (см. рис. 5.3).

Если F-фактор или другая трансмиссивная плазмида встраиваются в хро-  
мосому клетки-донора, то плазмида и хромосома начинают функционировать   
в виде единого трансмиссивного репликона, что делает возможным перенос бактериальных генов в бесплазмидную клетку-реципиент, т.е. процесс конъ-  
югации. Штаммы, в которых плазмида находится в интегрированном состо-  
янии с хромосомой, переносят свои хромосомные гены бесплазмидным клет-  
кам с высокой частотой и поэтому называются Hfr (от англ. *high* *frequency of recombination* — высокая частота рекомбинации).

Процесс переноса хромосомных генов в случае скрещивания Hfr- и F--кле-  
ток всегда начинается с расщепления ДНК в одной и той же точке, месте инте-  
грации F-фактора или другой трансмиссивной плазмиды. Одна нить донорской   
ДНК передается через конъюгационный мостик в реципиентную клетку. Про-  
цесс сопровождается достраиванием комплементарной нити до образования   
двунитчатой структуры. Перенос хромосомных генов при конъюгации всегда   
имеет одинаковую направленность, противоположную встроенной плазмиде.   
Сама трансмиссивная плазмида передается последней. Переданная в реципи-  
ентную клетку и достроенная до двунитчатой структуры, нить ДНК донора   
рекомбинирует с гомологичным участком реципиентной ДНК с образованием   
стабильной генетической структуры. Вследствие хрупкости конъюгационного   
мостика F-фактор редко передается в клетку-реципиент, поэтому образовав-  
шийся рекомбинант донорскими функциями, как правило, не обладает.

Вследствие направленности передачи генов конъюгация используется для картирования генома бактерий и построения генетической карты.

5.4.2. Трансдукция

Трансдукция — передача бактериальной ДНК посредством бактериофага.

Это явление было открыто в 1951 г. Н. Циндером и Дж. Ледербергом. В про-  
цессе 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 бак-  
териальной хромосомы. Она происходит вследствие того, что бактериальная   
ДНК фрагментируется после фаговой инфекции и кусочек бактериальной ДНК   
того же размера, что и фаговая ДНК, проникает в вирусную, формируя дефек-  
тную фаговую частицу с частотой приблизительно 1 на 1000 фаговых частиц.   
При инфицировании клетки-реципиента дефектной фаговой частицей ДНК   
клетки-донора «впрыскивается» в нее и рекомбинирует гомологичной реком-  
бинацией с гомологичным участком хромосомы-реципиента с образованием   
стабильного рекомбинанта. Этим типом трансдукции обладают Р-фаги.

Специфическая трансдукция наблюдается в том случае, когда фаговая   
ДНК интегрирует в бактериальную хромосому с образованием профага. В про-  
цессе исключения ДНК-фага из бактериальной хромосомы в результате случай-

ного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК   
фрагмент бактериальной хромосомы, становясь дефектным фагом (см. рис. 5.3).   
Так как большинство умеренных бактериофагов интегрирует в бактериальную   
хромосому в специфических участках, для таких бактериофагов характерен   
перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК клет-  
ки-донора. ДНК дефектного фага рекомбинирует с ДНК клетки-реципиента   
сайт-специфической рекомбинацией. Рекомбинант становится меродиплои-  
дом по привнесенному гену. В частности, бактериофаг передает специфической   
трансдукцией gal-ген у *E. coli.*

5.4.3. Трансформация

Трансформация — передача бактерии фрагмента бактериальной высоко-  
полимеризованной ДНК из разрушенной бактерии.

Феномен трансформации впервые был описан в 1928 г. Ф. Гриффитсом, обна-  
ружившим превращение бескапсульного R-штамма пневмококков (*Streptococcus*   
*pneumoniae*) в штамм, образующий капсулу S-формы. Гриффитс ввел мышам   
одновременно небольшое количество авирулентных R-клеток и убитых нагре-  
ванием S-клеток. R-клетки были получены от штамма, капсульное вещество   
которого принадлежало к типу S II, а убитые нагреванием S-штаммы принад-  
лежали к типу S III. Из крови погибших мышей были выделены вирулентные   
пневмококки с капсулой S III. Природу трансформирующего фактора в 1944 г.   
установили О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти, которые показали, что   
ДНК, экстрагированная из инкапсулированных пневмококков, может транс-  
формировать некапсулированные пневмококки в инкапсулированную форму.   
Таким образом, было доказано, что именно ДНК является носителем генетиче-  
ской информации.

Процесс трансформации может самопроизвольно происходить в природе у некоторых видов бактерий, чаще у грамположительных, когда ДНК, выделен-  
ная из погибших клеток, захватывается реципиентными клетками.

Процесс трансформации зависит от компетентности клетки-реципиента   
и состояния донорской трансформирующей ДНК. *Компетентность* — это спо-  
собность бактериальной клетки поглощать ДНК. Она зависит от присутствия   
особых белков в клеточной мембране, обладающих специфическим аффините-  
том к ДНК. Состояние компетентности у грамположительных бактерий связа-  
но с определенными фазами кривой роста. 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 освобожде-  
нием энергии, которая необходима для проникновения в клетку сохранившейся

нити. Высокий молекулярный вес трансформирующей ДНК увеличивает шанс   
рекомбинации, так как внутри клетки трансформирующая нить ДНК подвер-  
гается воздействию эндонуклеаз. Интеграция с хромосомой требует наличия   
гомологичных с ней участков у трансформирующей ДНК. Рекомбинация про-  
исходит на одной нити, в результате чего образуется гетеродуплексная молеку-  
ла, одна нить которой имеет генотип реципиента, а другая — рекомбинантный   
генотип. Рекомбинантные трансформанты формируются только после цикла   
репликации.

В настоящее время это основной метод генной инженерии, используемый при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.

5.5. 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 ну-  
клеиновой кислоты вируса, а также под влиянием тех же внешних факторов   
и мутагенов, что и у бактерий. Фенотипически мутации вирусного генома прояв-  
ляются изменениями в антигенной структуре, неспособностью вызывать продук-  
тивную инфекцию в чувствительной клетке, чувствительностью продуктивного   
цикла к температуре, а также изменением формы и размера бляшек, которые об-  
разуют вирусы в культуре клеток под агаровым покрытием (см. разд. 3.4).

Свойства вирусов могут изменяться при одновременном заражении несколь-  
кими вирусами чувствительной клетки. Причем изменения свойств при таких   
условиях могут происходить как в результате обмена между материалами ну-  
клеиновых кислот, принадлежащих разным вирусам (генетическая рекомбина-  
ция и генетическая реактивация), так и в результате процессов, не сопровожда-  
ющихся обменом генетического материала (комплементация и фенотипическое   
смешивание).

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

*Генетическая реактивация* наблюдается между геномами родственных ви-  
русов, имеющих мутации в разных генах. В результате перераспределения гене-  
тического 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 от-  
сутствие у мутантного вируса.

*Фенотипическое смешивание* наблюдается в том случае, если при смешан-  
ном заражении чувствительной клетки двумя вирусами часть потомства при-  
обретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, при сохранении неизменности генотипа.

5.6. Применение генетических методов в диагностике   
 инфекционных болезней

5.6.1. Рестрикционный анализ

Данный метод основан на применении ферментов *рестриктаз*, которые пред-  
ставляют собой эндонуклеазы, расщепляющие молекулы ДНК путем разрыва   
фосфатных связей в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое   
значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые уз-  
нают последовательности, обладающие центральной симметрией и считываю-  
щиеся 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 таксономи-  
ческой единицы находится строго определенное (генетически задетерминиро-  
ванное) число участков узнавания для определенной рестриктазы.

Если выделенную из конкретного микроба ДНК обработать определенной   
рестриктазой, то это приведет к образованию строго определенного количества   
фрагментов ДНК фиксированного размера. Размер каждого типа фрагментов   
можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле: мелкие фрагменты   
перемещаются в геле быстрее, чем более крупные, и длина их пробега больше.   
Гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в УФ-излучении. Таким   
образом можно получить рестрикционную карту определенного вида микробов.

Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенных из различных штаммов,   
можно определить их генетическое родство, выявить принадлежность к опреде-  
ленному виду или роду, а также обнаружить участки с мутациями. Этот способ   
используется также как начальный этап метода определения последовательно-  
сти нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.

5.6.2. Метод молекулярной гибридизации

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

Метод основан на способности двухцепочечной ДНК при повышенной тем-  
пературе (90 qС) в щелочной среде денатурировать, т.е. расплетаться на две   
нити, а при понижении температуры на 10 qС вновь восстанавливать исходную   
двухцепочечную структуру. Метод требует наличия молекулярного зонда. Зон-  
дом называется одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, меченная ра-  
диоактивными нуклидами, с которой сравнивают исследуемую ДНК.

Для проведения молекулярной гибридизации исследуемую ДНК расплета-  
ют указанным выше способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре,   
который затем помещают в раствор, содержащий радиоактивный зонд. Созда-  
ются условия, благоприятные для образования двойных спиралей. В случае   
наличия комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют   
между собой двойную спираль.

Молекулярная гибридизация составляет основу *микрочипа*, который пред-  
ставляет собой стеклянную пластинку с присоединенными в определенных   
локусах молекулярными ДНК-зондами (от 100 до 1000), специфичными для   
некоторой таксономической единицы. Из исследуемого образца выделяют об-  
щую ДНК, амплифицируют по стабильной последовательности 16S РНК-гена.   
Выделенную ДНК метят флуорохромом или ферментом и обрабатывают ею ми-  
крочип, создавая условия для гибридизации. После отмывают несвязавшуюся   
ДНК и определяют локализацию молекулярных гибридов постановкой ИФА   
или денситометрией.

5.6.3. Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет обнаружить микроб   
в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по на-  
личию 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. Об-  
наружение гена осуществляют его накоплением. Для этого необходимо иметь   
праймеры комплементарного 3’-концам ДНК исходного гена. Накопление (ам-  
плификация) гена выполняется следующим образом. Выделенную из иссле-  
дуемого материала ДНК нагревают, и она распадается на две нити. Добавляют   
праймеры. Смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры при нали-  
чии в смеси ДНК искомого гена связываются с его комплементарными участка-  
ми. Затем к смеси ДНК и праймера добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды.   
Устанавливают температуру, оптимальную для функционирования ДНК-по-  
лимеразы. В этих условиях в случае комплементарности ДНК гена и праймера   
происходит присоединение нуклеотидов к 3’-концам праймеров, в результате   
чего синтезируются две копии гена. После этого цикл повторяется снова, при

этом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз вдвое (рис. 5.4). Проводят реакцию в специальных приборах — амплификаторах. ПЦР применя-  
ется для диагностики вирусных и бактериальных инфекций.

*ПЦР в реальном времени* — это ускоренный метод, при котором ампли-  
фикация и определение продукта амплификации проводятся одновременно. Методика основана на том, что в амплификационную пробирку вводят моле-  
кулярный зонд, который в случае связывания с амплифицированной цепью ге-  
нерирует флюоресцентный сигнал определенной длины волны. Реакция про-  
водится в автоматическом режиме. ПЦР в реальном времени проводит полный анализ пробы в течение 20-60 мин. Метод позволяет обнаружить даже одну молекулу ДНК или РНК в пробе. Используется для определения вирусной на-  
грузки, проведения молекулярного типирования.

5.6.4. Риботипирование и опосредованная транскрипцией амплификация рибосомальной РНК

Последовательность нуклеотидных оснований в оперонах, кодирующих рРНК,   
отличается консервативностью, присущей каждому виду бактерий. Эти опероны   
представлены на бактериальной хромосоме в нескольких копиях. Фрагменты   
ДНК, полученные после обработки ее рестриктазами, содержат последователь-  
ности генов рРНК, которые могут быть обнаружены методом молекулярной   
гибридизации с меченой рРНК соответствующего вида бактерий. Количество   
и локализация копий оперонов рРНК и рестрикционный состав сайтов как вну-  
три рРНК-оперона, так и по его флангам варьируют у различных видов бак-  
терий. На основе этого свойства построен метод *риботипирования*, который   
позволяет производить мониторинг выделенных штаммов и определение их   
вида. В настоящее время риботипирование проводится в автоматическом режи-  
ме в специальных приборах.

Опосредованная транскрипцией амплификация рРНК используется для   
диагностики смешанных инфекций. Этот метод основан на обнаружении с по-  
мощью молекулярной гибридизации амплифицированных рРНК, специфич-  
ных для определенного вида бактерий. Исследование проводится в три этапа:

1) амплификация пула рРНК на матрице выделенной из исследуемого мате-  
 риала ДНК при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы;

2) гибридизация накопленного пула рРНК с комплементарными видоспе-  
 цифическим рРНК олигонуклеотидами, меченными флюорохромом или   
 ферментами;

3) определение продуктов гибридизации методами денситометрии, ИФА.

Реакция проводится в автоматическом режиме в установках, в которых од-  
номоментное определение рРНК, принадлежащих различным видам бактерий, достигается разделением амплифицированного пула рРНК на несколько проб, в которые вносятся комплементарные видоспецифическим рРНК меченые оли-  
гонуклеотиды для гибридизации.

*Биотехнология.Генетическая* *инженерия*

Биотехнология (от греч. *bios* — жизнь, *tecen* — искусство, *logos* — наука) пред-  
ставляет собой область знаний, которая возникла и оформилась на стыке ми-  
кробиологии, молекулярной биологии, генетической инженерии, иммунологии, химической технологии и ряда других наук.

По определению академика А.А. Воробьева, биотехнология — наука, ко-  
торая на основе изучения процессов жизнедеятельности живых организ-  
мов, главным образом микроорганизмов, животных и растительных кле-  
ток, использует эти биологические процессы, а также сами биологические   
объекты для промышленного производства продуктов, необходимых для   
жизни человека или воспроизведения биоэффектов, не проявляющихся   
в естественных условиях.

Рождение биотехнологии обусловлено потребностями общества в принци-  
пиально новых технологиях, более дешевых продуктах для народного хозяй-  
ства, в том числе для медицины и ветеринарии. Целью биотехнологии является   
получение продуктов из биологических объектов или с их применением, а так-  
же воспроизведение биоэффектов, не встречающихся в природе. В качестве   
биологических объектов чаще используются одноклеточные микроорганизмы,   
животные и растительные клетки, а также органы животных, человека или рас-  
тения. Выбор этих объектов обусловлен следующими причинами.

1. Клетки являются своего рода «биофабриками», вырабатывающими в про-  
цессе жизнедеятельности разнообразные ценные продукты: белки, жиры, углево-  
ды, витамины, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, фер-  
менты, спирты и т.д. Многие из этих продуктов, крайне необходимых в жизни   
человека, пока недоступны для получения небиотехнологическими способами.

2. Клетки чрезвычайно быстро воспроизводятся. Так, бактериальная клетка   
делится через каждые 20-60 мин, дрожжевая — через 1,5-2 ч, животная — через

24 ч, что позволяет за относительно короткое время в промышленных масшта-  
бах искусственно нарастить на сравнительно дешевых и недефицитных пита-  
тельных средах огромные количества биомассы микробных, животных или рас-  
тительных клеток.

3. Биосинтез сложных веществ, таких как белки, антибиотики, антигены, ан-  
титела и др., значительно экономичнее и технологически доступнее, чем дру-  
гие виды химического синтеза. При этом исходное сырье для биосинтеза, как   
правило, проще, дешевле и доступнее, чем сырье для других видов синтеза. Для   
этого используются отходы сельскохозяйственной, рыбной продукции, пище-  
вой промышленности, растительное сырье, например рыбная мука, меласса,   
дрожжи, древесина и др.

4. Биотехнологический процесс возможно реализовать в промышленных масштабах при наличии соответствующего технологического оборудования, доступного сырья, технологий переработки и т.д.

Биотехнология использует следующие продукты одноклеточных:

а) сами клетки как источник целевого продукта;

б) крупные молекулы, которые синтезируются клетками в процессе выращи-  
 вания (ферменты, токсины, антигены, антитела, пептидогликаны и др.);

в) первичные метаболиты — низкомолекулярные вещества (молекулярная   
 масса менее 1500 Да), необходимые для роста клеток (аминокислоты, ви-  
 тамины, нуклеотиды, органические кислоты и др.);

г) вторичные метаболиты — низкомолекулярные и макромолекулярные сое-  
 динения, не требующиеся для роста клеток: антибиотики, алкалоиды, ток-  
 сины, гормоны и др.

Биотехнология использует эту продукцию клеток как сырье, которое в ре-  
зультате технологической обработки превращается в конечный, пригодный для использования продукт.

На Земле существует свыше 100 000 видов бактерий, не считая многочислен-  
ных грибов (250 000 видов), вирусов и простейших. Однако в биотехнологии   
используют около 100 видов микробов, так как остальные мало изучены.

Из бактерий в биотехнологии чаще всего используются: род *Acetobacter* — для   
превращение этанола в уксусную кислоту, в углекислый газ и воду; род *Bacillus* —   
для получения ферментов (*В. subtilis*), средств защиты растений (*В. thuringiensis*);   
род *Clostridium* — для сбраживания сахаров в ацетон, этанол, бутанол; молочно-  
кислые бактерии (*Lactobacillus* и др.); псевдомонады, например *P. denitrificans*, —   
для получения витамина В12; коринебактерии (*C. gentamicum*) — для получения   
аминокислот и др.

Из грибов для получения разнообразных антибиотиков применяют *Penicilium chrysogenium*, *Cefalosporum acremonium*, *Streptomyces spp.* и др. Пре-  
параты дрожжей используют в хлебопечении, пивоварении, виноделии, полу-  
чении соков, кормового белка, питательных сред для выращивания бактерий и культур животных клеток.

Широкое применение в получении диагностикумов, вакцин, иммуноглобу-  
линов, пробиотиков, фагов и других микробных препаратов находят патоген-  
ные и вакцинные штаммы болезнетворных микробов, а также условно-патоген-  
ные микробы.

Многие микробы (бактерии, дрожжи, вирусы) используются в качестве ре-  
ципиентов чужеродного генетического материала в целях получения рекомби

нантных штаммов — продуцентов биотехнологической продукции. Так, полу-  
чены рекомбинантные штаммы *Е. сoli*, продуцирующие интерфероны, инсулин,   
гормоны роста, разнообразные антигены; штаммы *В. subtilis*, вырабатывающие   
интерферон; дрожжи, продуцирующие интерлейкины, антигены вируса гепати-  
та В; рекомбинантные вирусы осповакцины, синтезирующие антигены гепати-  
та В и др.

Из культур клеток растений (так же как и из растений) можно получать   
разнообразные соединения, используемые в медицине (алкалоиды, противовос-  
палительные вещества, противоопухолевые, противобактериальные, сердечные   
и мочегонные средства, ферменты, опиаты, витамины и др.), сельском хозяй-  
стве, химической и других отраслях промышленности. Например, разработано   
и освоено в крупномасштабном производстве выращивание клеток женьшеня,   
обладающего биологическим действием, присущим природному растению.

Животные клетки используют как для получения продукции, синтезиру-  
емой клетками, так и для выращивания в клетках вирусов в целях создания из них вакцин и диагностических препаратов. Для этого используют перевивае-  
мые и первичные (первично-трипсинизированные) клетки человека и живот-  
ных, полученные из различных нормальных органов (легких, кожи, почки, кост-  
ного мозга, соединительной ткани) или опухолевых тканей. Штаммы животных и растительных клеток поддерживаются в специальных сложных условиях (за-  
мороженные в жидком азоте) и как можно реже подвергаются пересевам, так как они могут претерпевать генетические изменения.

Технология получения продуктов микробного и клеточного синтеза принци-  
пиально сводится к нескольким типовым стадиям: выбор продуктивного штамма;   
подбор оптимальной для роста экономичной питательной среды; культивирова-  
ние; выделение целевого продукта, его стандартизация и придание лекарствен-  
ной формы препарату. Перечисленные стадии и процессы осуществляются   
в промышленной биотехнологии на соответствующем оборудовании и аппа-  
ратуре в крупных масштабах при получении многих медицинских препаратов.

6.3. Генетическая инженерия и область

ее применения в биотехнологии

Генетическая инженерия является основой биотехнологии. Она, по существу,   
сводится к генетической рекомбинации, т.е. к обмену генами между двумя хро-  
мосомами, который приводит к возникновению клеток или организмов с двумя   
и более наследственными детерминантами (генами), по которым родители раз-  
личались между собой. Метод рекомбинации *in vitro* или генетической инжене-  
рии заключается в: а) выделении или синтезе ДНК из отличающихся друг от   
друга организмов или клеток; б) получении гибридных молекул ДНК; в) введе

нии рекомбинантных (гибридных) молекул в живые клетки; г) создании усло-  
вий для экспрессии и секреции продуктов, кодируемых генами.   
 Гены, кодирующие те или иные структуры, или выделяют (клонируют) как таковые (хромосомы, плазмиды), или прицельно выщепляют из этих гене-  
тических образований с помощью ферментов рестрикции. Эти ферменты, а их уже известно более тысячи, способны резать ДНК по многим определенным связям, что является важным инструментом генной инженерии. В последнее время обнаружены ферменты, расщепляющие по определенным связям РНК, наподобие рестриктаз ДНК. Эти ферменты названы рибозимами.   
 Сравнительно небольшие гены могут быть получены с помощью химическо-  
го синтеза. Для этого вначале расшифровывают число и последовательность аминокислот в белковой молекуле вещества, а затем по этим данным узнают очередность нуклеотидов в гене, поскольку каждой аминокислоте соответству-  
ют три нуклеотида (кодон). С помощью синтезатора создают химическим путем ген, аналогичный природному гену. Полученный целевой ген с помощью фер-  
ментов лигаз сшивают с другим геном, который используется в качестве векто-  
ра для встраивания гибридного гена в клетку. Вектором могут служить плазми-  
ды, бактериофаги, вирусы человека, животных и растений.

Для РНК-содержащих вирусов передача генетической информации возмож-  
на с помощью ревертазы (обратной транскриптазы), которая передает инфор-  
мацию о структуре белка от РНК к ДНК.

Экспрессируемый ген в виде рекомбинантной ДНК (плазмида, фаг, вирус-  
ная ДНК) встраивается в бактериальную или животную клетку, которая приоб-  
ретает новое свойство — продуцировать несвойственное этой клетке вещество, кодируемое экспрессируемым геном.

В качестве реципиентов экспрессируемого гена чаще всего использу-  
ют *Е. соli*, *В. subtilis*, псевдомонады, дрожжи, вирусы. Реципиента подбирают   
не только с учетом возможности встройки чужеродного гена, но и уровня вы-  
раженности (экспрессии) синтеза вещества, кодируемого геном, возможности   
его секреции в окружающую среду, легкости и доступности массового культи-  
вирования, экологической безопасности. Некоторые штаммы рекомбинантных   
бактерий способны переключать на синтез чужеродного вещества, экспресси-  
руемого геном, до 50% своей синтетической возможности. Такие штаммы-су-  
перпродуценты целевых продуктов применяются в биотехнологической про-  
мышленности.

Некоторые штаммы микробов хорошо экспрессируют чужеродные гены,   
но плохо секретируют продукт в окружающую среду. В таких случаях прихо-  
дится прибегать к дезинтеграции (разрушению) клетки в целях высвобождения   
из нее синтезированного продукта. Иногда, несмотря на наличие экспрессии   
и секреции продукта клеткой, его не удается получить, вернее, собрать, из-за   
разрушения в процессе синтеза или после него протеазами и другими ингиби-  
торами. В некоторых случаях в целях повышения уровня секреции целевого

белка к гену целевого белка присоединяют ген-индикатор, т.е. ген, кодирующий легкоузнаваемый белок, в результате этой манипуляции получают химерный белок, а из него — целевой белок. В качестве индикатора может быть, например, E-галактозидаза, можно использовать ген интерферона и т.д.

Методом генетической инженерии созданы сотни препаратов медицинского   
и ветеринарного назначения, получены рекомбинантные штаммы-суперпроду-  
центы, многие из которых нашли практическое применение. Уже используют-  
ся в медицине полученные методом генетической инженерии вакцины против   
гепатита В, интерлейкины, инсулин, гормоны роста, интерфероны, фактор не-  
кроза опухолей, пептиды тимуса, миелопептиды, тканевой активатор плазми-  
ногена, эритропоэтин, антигены ВИЧ, фактор свертываемости крови, монокло-  
нальные антитела и многие антигены для диагностических целей.

Разработаны и в ближайшие годы будут использованы в практике: генно-ин-  
женерные вакцины против малярии, ВИЧ-инфекции, сифилиса, клещевого эн-  
цефалита, холеры, бруцеллеза, гриппа, бешенства и других инфекций; пептиды   
тимуса, колониестимулирующие факторы, эпидермальный фактор роста, атри-  
альный пептид, фактор тромбоцитов, рекомбинантные антигены многих бакте-  
рий и вирусов, нейропептиды и другие поведенческие пептиды, рецепторы кле-  
ток, ферменты, метаболиты, тканевые антигены, антигены опухолей и др.

Быстрому внедрению их в практику препятствуют следующие преодолимые обстоятельства.

Во-первых, длительное время к генно-инженерным препаратам и рекомби-  
нантным штаммам микроорганизмов относились настороженно и даже с опа-  
ской, боясь, что может произойти неуправляемое распространение экологи-  
чески опасных рекомбинантных микробов, а в препаратах может содержаться   
нежелательная для организма генетическая информация. Однако эти опасения   
практически сняты, так как доказана безопасность при соблюдении определен-  
ных правил и самих рекомбинантных штаммов, и препаратов, полученных на их   
основе.

Во-вторых, использование рекомбинантных штаммов-продуцентов предус-  
матривает разработку сложных технологических процессов по получению и вы-  
делению целевых продуктов. На разработку технологии обычно затрачивается значительно больше средств, чем на получение штамма.

В-третьих, при получении препаратов генно-инженерным способом всегда   
возникает вопрос об идентичности активного начала, вырабатываемого реком-  
бинантным штаммом-продуцентом, природному веществу, т.е. требуется прове-  
дение исследовательских работ, направленных на доказательство их идентично-  
сти, а также иногда для решения дополнительных задач по приданию продукту   
природного характера.

Тем не менее генно-инженерный способ относится к числу перспективней-  
ших при получении многих белковых биологических веществ, ценных для ме-  
дицины.