

Физиология микроорганизмов. Метаболизм, питание, дыхание и размножение микроорганизмов. Принципы культивации микроорганизмов. Экология микроорганизмов. Микрофлора биосферы. Нормальная микрофлора организма человека. Влияние физических, химических и биологических факторов на микроорганизмы. Фаги

План лекции

1. Особенности физиологии, метаболизма, питания, дыхания и размножения микроорганизмов.

- Понятие о физиологии микроорганизмов
- Химический состав микроорганизмов
- Метаболизм бактерий (анаболизм и катаболизм)
- Типы питания микроорганизмов. Источники углерода, энергии, электронов, азота, факторы роста.
- Дифференциация микроорганизмов по типам питания (аутотрофы, гетеротрофы, фототрофы, хемотротрофы, литотрофы, органотрофы, аминоксаутотрофы, аминоксигетеротрофы, прототрофы, ауксотрофы, сапрофиты и паразиты). Механизм питания бактерий: пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт, транслокация.
- Энергетический метаболизм. Дыхание бактерий, типы дыхания (облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы, капнофилы, облигатные анаэробы).
- Продукты жизнедеятельности бактерий, ферменты, пигменты. Биологическое значение бактериальных ферментов. Конститутивные и индуцибельные ферменты. Эндо- и экзоферменты. Ферменты метаболизма и агрессии. Роль ферментов в обмене веществ и патогенезе инфекционных заболеваний. Значение определения ферментов в идентификации микроорганизмов.
- Размножение бактерий. Фазы размножения.
- Размножение спирохет, микоплазм и актиномицетов.
- Основные принципы культивации риккетсий, хламидий и вирусов. Принципы культивации бактерий.
- Методы индикации и идентификации вирусов.
- Питательные среды, их типы: основные (простые), специальные, селективные, дифференциально-диагностические, консервирующие (транспортные). Основные требования, предъявляемые к питательным средам.

2. Экология микроорганизмов.

Виды взаимоотношений между микроорганизмами. Симбиоз и его формы. Распространение микроорганизмов в окружающей среде. Санитарно-показательные микроорганизмы и их характеристика. Микрофлора почвы, воды, воздуха, их санитарно-показательные микроорганизмы. Роль микробов в круговороте веществ в природе.

Нормальная микрофлора организма человека, ее роль в физиологии и патологии. Дисбактериоз. Препараты, используемые для восстановления нормальной микрофлоры. Эубиотики и пробиотики.

3. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы

- действие различных физических факторов (температура, свет, высушивание, давление, облучение, ультразвук и др.) на микроорганизмы
- действие различных химических веществ на микроорганизмы, основные группы дезинфектантов (поверхностно-активные вещества, фенол, соли тяжелых металлов, кислоты, щелочи, спирты и др.)

- понятие о дезинфекции и стерилизации, понятие об асептике и антисептике
- методы стерилизации: физические, химические, механические
- основные группы дезинфектантов

4. Фаги, их природа, строение и особенности. Вирулентные и умеренные бактериофаги. Лизогения, ее механизмы, фаговая конверсия. Применение фагов в практике.

Физиология бактерий включает метаболизм бактерий, т.е. питание, получение энергии, рост и размножения 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. Выяснение физиологии патогенных и условно-патогенных бактерий важно для изучения патогенеза вызываемых ими инфекционных болезней, постановки микробиологического диагноза, лечения и профилактики инфекционных заболеваний, регуляции взаимоотношения человека с окружающей средой, а также для использования бактерий в биотехнологических процессах с целью получения биологически активных веществ.

Питание бактерий

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 механическую роль в обеспечении тургора, участвует в гидролитических реакциях. Удаление воды из клетки путем высушивания приводит к приостановке процессов метаболизма, прекращению размножения, а для многих микроорганизмов губительно. В то же время особый способ высушивания микроорганизмов в вакууме из замороженного состояния (лиофилизация) обеспечивает сохранение жизнеспособности большинства микроорганизмов. Лиофилизация используется для приготовления проб, пригодных для длительного хранения. В сухом веществе бактерий 52% составляют белки, 17% — углеводы, 9% — липиды, 16% — РНК, 3% — ДНК и 3% — минеральные вещества. Белки являются ферментами, а также составной частью клетки, входят в состав цитоглазматической мембраны (ЦПМ) и ее производных, клеточной стенки, жгутиков, спор и некоторых капсул. Некоторые бактериальные белки являются антигенами и токсинами бактерий. В состав белков бактерий входят отсутствующие у человека D-аминокислоты, а также диаминопимелиновая кислота. Углеводы представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди-, олигосахаров и полисахаридов, а также входят в состав комплексных соединений с белками, липидами и другими соединениями. Полисахариды входят в состав некоторых капсул, клеточной стенки; крахмал и гликоген являются запасными питательными веществами. Некоторые полисахариды принимают участие в формировании антигенов. Липиды или жиры входят в состав ЦПМ и ее производных, клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также служат запасными веществами, входят в состав эндотоксина грамотрицательных бактерий, в составе ЛПС формируют антигены. В бактериальных жирах преобладают длинноцепочечные (C14—C18) насыщенные жирные кислоты и ненасыщенные жирные кислоты, содержащие одну двойную связь. Сложные липиды представлены фосфатидил и инозитом, фосфатидил глицерином и фосфатидилэтаноламином. У некоторых бактерий в клетке находятся воски, эфиры миколовой кислоты. Микоплазмы — единственные

представители царства Procaryotae, имеющие в составе ЦПМ стеролы. Остальные бактерии в составе ЦПМ и ее производных не имеют стеролов. В бактериальной клетке присутствуют все типы РНК: иРНК, транспортная РНК (тРНК), рРНК, менее известная антисенс РНК (асРНК). Молекулы асРНК пока не обнаружены в клетках эукариот. Информация об асРНК записана в хромосоме, в так называемых антисенс-генах. АсРНК принимает активное участие в регуляции различных клеточных процессов, в том числе репликации ДНК бактерий, вирусов, плазмид и танспозонов. асРНК представляет собой короткую молекулу, комплементарную определенному участку иРНК, и, соединяясь с ней, блокирует процесс синтеза белка. При этом в клетке подобные комплексы могут накапливаться, и при диссоциации асРНК и иРНК одновременно начинается синтез белка на большом числе однотипных матриц. Искусственные молекулы асРНК пытаются использовать для борьбы с бактериями за счет угнетения ими синтеза в клетке определенных жизненно важных белков.

Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды — это те строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кроме того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав многих коферментов и служат для активации и переноса аминокислот, моносахаров, органических кислот.

ДНК выполняет в бактериальной клетке наследственную функцию. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепочек. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара дезоксирибозы и фосфатной группы (рис. 3.1, б). 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 связей между 5'-концом одного нуклеотида и 3'-концом другого. Соединение цепей обеспечивается водородными связями между комплементарными азотистыми основаниями: аденина с тимин, гуанина с цитозин. Нуклеотидные цепи антипараллельны: на каждом из концов линейной молекулы ДНК расположены 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи. Процентное содержание ГЦ-пар в ДНК определяет степень родства между бактериями и используется при определении таксономического положения бактерий.

Минеральные вещества обнаруживаются в золе, полученной после сжигания клеток. В большом количестве представлены N, S, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, а также микроэлементы Zn, Si, Co, Ba.

Азот входит в состав белков, нуклеотидов, коферментов. Сера входит в виде сульфгидрильных групп в структуру белков. Фосфор в виде фосфатов представлен в нуклеиновых кислотах, АТФ, коферментах. В качестве активаторов ферментов используются ионы Mg, Fe, Mn. Ионы K и Mg необходимы для активации рибосом. Са является составной частью клеточной стенки грамположительных бактерий. У многих бактерий имеются сидерохромы, которые обеспечивают транспортировку ионов Fe внутрь клетки в виде растворимых комплексных соединений.

Классификация бактерий по типам питания и способам получения энергии Основной целью метаболизма бактерий является рост, т.е. координированное увеличение всех компонентов клетки. Поскольку основными компонентами бактериальной клетки являются органические соединения, белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и липиды, остов которых построен из атомов углерода, то для роста требуется постоянный приток атомов углерода. В зависимости от источника усвояемого углерода

бактерии подразделяют на аутотрофы (от греч. *autos* — сам, *trophe* — питание), которые используют для построения своих клеток неорганический углерод, в виде CO_2 , и гетеротрофы (от греч. *heteros* — другой), которые используют органический углерод. Легкоусвояемыми источниками органического углерода являются гексозы, многоатомные спирты, аминокислоты, липиды. Белки, жиры, углеводы и нуклеиновые кислоты являются крупными полимерными молекулами, которые синтезируются из мономеров в реакциях поликонденсации, протекающих с поглощением энергии. Поэтому для восполнения своей биомассы бактериям, помимо источника углерода, требуется источник энергии. Энергия запасается бактериальной клеткой в форме молекул АТФ. Организмы, для которых источником энергии является свет, называются фототрофами. Те организмы, которые получают энергию за счет окислительно-восстановительных реакций, называются хемотрофами. Среди хемотрофов выделяют литотрофы (от греч. *lithos* — камень), способные использовать неорганические доноры электронов (H_2 , NH_3 , H_2S , Fe^{3+} и др.) и органотрофы, которые используют в качестве доноров электронов органические соединения. Бактерии, изучаемые медицинской микробиологией, являются гетерохемоорганотрофами. Отличительной особенностью этой группы является то, что источник углерода у них является источником энергии. Учитывая разнообразие микромира и типов метаболизма, далее изложение материала ограничено рассмотрением метаболизма у гетерохемоорганотрофов. Степень гетеротрофности у различных бактерий неодинакова. Среди бактерий выделяют сапрофиты (от греч. *sapros* — гнилой, *phyton* — растение), которые питаются мертвым органическим материалом и независимы от других организмов, и паразиты (от греч. *parasites* — нахлебник) — гетеротрофные микроорганизмы, получающие питательные вещества от макроорганизма.

Среди паразитов различают облигатные и факультативные. Облигатные паразиты полностью лишены возможности жить вне клеток макроорганизма. К ним относятся представители родов *Rickettsia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Chlamydia* и др., размножающиеся только внутри клеток макроорганизма. 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 питательных средах. Искусственные питательные среды должны отвечать следующим требованиям.

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 температуре 100°C , но при охлаждении остывает при температуре $45\text{—}50^\circ\text{C}$. Агар добавляют 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, селективные, минимальные, дифференциально-диагностические и комбинированные среды. По составу питательные среды могут быть простыми и сложными. К простым средам относятся пептонная вода, питательный бульон, мясопептонный агар. На основе простых сред готовят с/южные среды, например сахарный и сывороточный бульоны, кровяной агар.

В зависимости от назначения среды подразделяются на селективные, обогащения, дифференциально-диагностические. Под селективными

понимают среды, на которых лучше растет какой-то определенный микроорганизм. Например, щелочной агар, имеющий pH 9,0, служит для выделения холерного вибриона. Другие бактерии, в частности кишечная палочка, из-за высокого pH на этой среде не растут.

Среды обогащения — это среды, которые стимулируют рост какого-то определенного микроорганизма, ингибируя рост других. Например, среда, содержащая селенит натрия, стимулирует рост бактерий рода *Salmonella*, ингибируя рост кишечной палочки.

Дифференциально-диагностические среды служат для изучения ферментативной активности бактерий. Они состоят из простой питательной среды с добавлением субстрата, на который должен подействовать фермент, и индикатора, меняющего свой цвет в результате ферментативного превращения субстрата. Примером таких сред являются среды Гисса, используемые для изучения способности бактерий ферментировать сахара.

Комбинированные питательные среды сочетают в себе селективную среду, подавляющую рост сопутствующей флоры, и дифференциальную среду, диагностирующую ферментативную активность выделяемого микроба. Примером таких сред служат среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые при выделении патогенных кишечных бактерий. Обе эти среды ингибируют рост кишечной палочки.

Ферменты бактерий

В основе всех метаболических реакций в бактериальной клетке лежит деятельность ферментов, которые принадлежат к 6 классам: оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лигазы, лиазы, изомеразы. Ферменты, образуемые бактериальной клеткой, могут как локализоваться внутри клетки — эндоферменты, так и выделяться в окружающую среду — экзоферменты. Экзоферменты играют большую роль в обеспечении бактериальной клетки доступными для проникновения внутрь источниками углерода и энергии. Большинство гидролаз являются экзоферментами, которые, выделяясь в окружающую среду, расщепляют крупные молекулы пептидов, полисахаридов, липидов до мономеров и димеров, способных проникнуть внутрь клетки. Ряд экзоферментов, например гиалуронидаза, коллагеназа, являются ферментами агрессии. Некоторые ферменты локализованы в периплазматическом пространстве бактериальной клетки. Они участвуют в процессах переноса веществ в бактериальную клетку. Ферментативный спектр является таксономическим признаком, характерным для семейства, 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. Для идентификации бактерий разработаны специальные тест-системы, состоящие из набора дифференциально-диагностических сред.

Энергетический метаболизм

Энергия в бактериальной клетке накапливается в форме молекул АТФ. У хемоорганотрофных бактерий реакции, связанные с получением энергии в форме АТФ, — это реакции окисления-восстановления, сопряженные с реакциями фосфорилирования. Окисленный в этих реакциях углерод выделяется клеткой в виде СО₂. Для удаления отщепившегося в этих реакциях водорода, который находится в форме восстановленного НАД, разные бактерии используют различные возможности в зависимости от

конечного акцептора водорода (или электронов, что является 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 и конечные продукты этих реакций, которые используются при идентификации бактерий, а также условия культивирования бактерий.

При использовании в качестве источника углерода и энергии глюкозы или других гексоз начальные этапы окисления глюкозы являются общими, как при оксидативном, 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). Пируват, образовавшийся при расщеплении глюкозы, превращается при участии кофакторов в активированную уксусную кислоту или ацетилкоэнзим А. Последний окисляется в CO_2 с отщеплением водорода в цикле трикарбоновых кислот.

Цикл трикарбоновых кислот не только выполняет функцию конечного окисления питательных веществ, но и обеспечивает процессы биосинтеза многочисленными предшественниками: пируват сс-кетоглутаровая, щавелевая и янтарные кислоты — для синтеза аминокислот, щавелевоуксусная — для синтеза пиримидиновых нуклеотидов, малонат — для синтеза аминокислот, пиримидиновых нуклеотидов и жиров

Окислительный метаболизм. Бактерии, обладающие окислительным метаболизмом, энергию получают путем дыхания. Дыхание - процесс получения энергии в реакциях окисления—восстановления, сопряженных с реакциями окислительного фосфорилирования, при котором донорами электронов могут быть органические (у органотрофов) и неорганические (у литотрофов) соединения, а акцептором — только неорганические соединения.

У бактерий, обладающих окислительным метаболизмом, акцептором электронов (или водорода $[\text{H}^+]$) является молекулярный кислород. В этом случае пируват полностью окисляется в цикле трикарбоновых кислот до CO_2 . Цикл трикарбоновых кислот выполняет функции поставщика как предшественников для биосинтетических процессов, так и атомов водорода, который в форме восстановленного НАД переносится на молекулярный кислород через серию переносчиков, обладающих сложной структурно оформленной мультиферментной системой — дыхательной цепью. Дыхательная цепь у бактерий локализована в ЦПМ и во внутриклеточных мембранных структурах.

Электрохимическую энергию бактерии получают в процессе переноса электронов по окислительно-восстановительным цепям в мембране, в результате чего происходит неравномерное распределение H^+ по обеим ее сторонам. Переносчики электронов располагаются в мембране таким образом, что во внешней среде происходит накопление ионов водорода (при этом возникает подкисление среды), а в цитоплазме их число уменьшается, что сопровождается подщелачиванием среды. Неравномерное распределение положительно заряженных протонов (большее число на наружной и меньшее на внутренней поверхности плазматической мембраны) приводит к формированию расположенного поперек мембраны электрического поля, мембранного потенциала. В результате при переносе электронов возникает трансмембранный

электрохимический градиент ионов водорода, обозначаемый символом $\Delta\mu\text{H}^+$ и измеряемый в вольтах. Энергия мембранного потенциала используется для синтеза локализованной в мембране АТФазой АТФ. Типичная цепь выглядит следующим образом: ЦТК $\rightarrow$ НАД(H_2) $\rightarrow$ флавопротеид $\rightarrow$ хинон $\rightarrow$ цитохромы: $b \rightarrow c \rightarrow \text{O}_2$. Конечным этапом переноса электронов (протонов) по дыхательной цепи является восстановление итиохромов $a + a_3$ (цитохромоксидазы). Цитохромоксидаза является конечной оксидазой, передающей электроны на кислород. Образующиеся при окислении ФАД или хинонов протоны связываются ионами O_2^{2-} с образованием воды.

Аминокислоты и белки также могут выступать в качестве энергетических ресурсов. Их использование связано в первую очередь с определенными ферментативными преобразованиями подготовительного характера. Белки вначале вне клетки расщепляются протеолитическими ферментами на пептиды, которые поглощаются клеткой и расщепляются внутриклеточными пептидазами до аминокислот. Аминокислоты могут использоваться в конструктивном метаболизме, а могут у аммонифицирующих бактерий служить основным материалом в энергетических процессах при окислительном дезаминировании, в результате которого происходят выделение аммиака и превращение аминокислоты в кетокислоту, которая через цикл трикарбоновых кислот вступает в конструктивный метаболизм.

Процесс аммонификации известен как гниение, при этом происходит накопление продуктов, обладающих неприятным специфическим запахом образующихся при этом первичных аминов. Гнилостные бактерии осуществляют минерализацию белка, разлагая его до CO_2 , NH_3 , H_2S . К гнилостным бактериям относятся *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*. Анаэробное дыхание. Некоторые бактерии обладают способностью использовать в анаэробных условиях нитрат как конечный акцептор водорода. Восстановление нитрата может происходить двумя путями: аммонификацией, при которой нитрат превращается в аммиак, и денитрофикацией, при которой происходит восстановление нитрата до молекулярного азота или закиси азота. Этот процесс связан с деятельностью фермента нитратредуктазы. Сульфатное дыхание. Использовать сульфат как конечный акцептор водорода при анаэробном дыхании способна лишь небольшая группа бактерий, включающая только два рода: *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*. Эти бактерии являются строгими анаэробами, они обитают в сероводородном иле и не имеют значения в медицинской микробиологии. Они способны использовать в качестве донора электронов молекулярный водород, поэтому их относят к хемолитотрофам. Этим бактериям принадлежит ведущая роль в образовании сероводорода в природе.

Бродильный (ферментативный) метаболизм. Ферментация, или брожение, — процесс получения энергии, при котором отщепленный от субстрата водород переносится на органические соединения. Кислород в процессе брожения участия не принимает. Восстановленные органические соединения выделяются в питательную среду и накапливаются в ней. Ферментироваться могут углеводы, аминокислоты (за исключением ароматических), пурины, пиримидины, многоатомные спирты. Не способны сбраживаться ароматические углеводороды, стероиды, каротиноиды, жирные кислоты. Эти вещества разлагаются и окисляются только в

присутствии кислорода, в анаэробных условиях они стабильны. Продуктами брожения являются кислоты, газы, спирты.

При ферментации гексоз (глюкозы) пируват лишь частично окисляется в цикле трикарбоновых кислот. Последний выполняет только функции поставщика предшественников для биосинтетических процессов. Энергия в форме двух молекул АТФ образуется в результате субстратного фосфорилирования, протекающего при окислении триозофосфата в пируват. Отщепившийся от субстрата водород, находящийся в форме восстановленного НАД, переносится на пируват, превращая его в цепи реакций в этанол, кислоты, газы. Исходя из природы конечных продуктов, различают несколько типов брожения углеводов: спиртовое, молочнокислое, муравьинокислое, маслянокислое.

Спиртовое брожение встречается в основном у дрожжей. Конечными продуктами являются этанол и CO₂. Спиртовое брожение используется в хлебопекарной промышленности и виноделии.

Молочнокислое брожение происходит у *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *S. Salivarius*, а также у бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Продуктами этого типа брожения являются молочная кислота, этанол и уксусная кислота. Продукты молочнокислого брожения играют большую роль в формировании колонизационной резистентности бактериями рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, составляющих облигатную флору кишечника. Молочнокислые бактерии широко используются в молочной промышленности для получения молочнокислых продуктов, а также в создании пробиотиков.

Муравьинокислое (смешанное) брожение встречается у представителей семейств Enterobacteriaceae и Vibrionaceae. Различают два типа этого брожения. При первом происходит расщепление пирувата с образованием через цепь реакций муравьиной, янтарной и молочной кислот. Сильное кислотообразование можно выявить реакцией с индикатором метиленовым красным, который меняет окраску в сильноокислой среде. При втором типе брожения образуется целый ряд кислот, однако главным продуктом брожения являются ацетоин и 2,3-бутандиол, образующиеся через цепь реакций из двух молекул пирувата. Эти вещества при взаимодействии с а-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, валериановая, пальмитиновая, являются продуктами сбраживания углеводов сахаролитическими 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 пептолитическими. Пептолитическими являются некоторые клостридии, в частности *C. histolyticum* и *C. botulinum*. Пептолитические бактерии гидролизуют белки и сбраживают аминокислоты. Многие аминокислоты сбраживаются совместно с другими, при этом одна выполняет функцию донора, а другая — функцию акцептора водорода. Аминокислота-донор дезаминируется в кетокислоту, которая в результате окислительного декарбоксилирования превращается в жирную кислоту.

Конструктивный метаболизм

Основные органические компоненты бактериальной клетки, как уже было отмечено, синтезируются в реакциях полимеризации из строительных блоков: аминокислот, фосфатов, Сахаров, пуриновых и тиримидиновых оснований, органических кислот. Поставщиками этих строительных блоков являются промежуточные продукты основных путей энергетического метаболизма. Среди бактерий выделяется группа, называемая прототрофами, которые способны синтезировать все компоненты клетки из одного источника углерода и энергии. Если бактерии теряют способность образовывать какое-либо жизненно важное вещество (аминокислоту, витамин, фактор роста и др.), участвующее в биосинтетических процессах, то для их роста и размножения требуется его поступление в готовом виде. Такие вещества называют фактором роста, а бактерии, возникшие, как правило, в результате мутаций — ауксотрофами.

Факторами роста являются аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины, которые входят в состав простетических групп коферментов.

Биосинтез аминокислот и синтез белка. Большинство бактерий обладают способностью синтезировать все 20 аминокислот, из которых состоят белки. Белки в бактериальной клетке выполняют ферментативную функцию, а также являются составной частью структурных образований клетки: ЦПМ и ее производных, клеточной стенки, жгутиков, капсулы и спор у некоторых бактерий.

Углеродные скелеты аминокислот образуются из промежуточных продуктов обмена. Исходным материалом служат промежуточные продукты фруктозодифосфатного (ФДФ) и пентозофосфатного (ПФ) путей, цикл трикарбоновых кислот: пируват, кетоглутаровая кислота, оксалоацетат, фумарат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-4-фосфат. Аминогруппы вводятся в результате непосредственного аминирования или переаминирования. Перевод неорганического азота в органические соединения происходит всегда через аммиак. Нитраты и нитриты и молекулярный азот предварительно восстанавливаются в аммиак и только лишь после этого включаются в состав органических соединений. В результате прямого аминирования образуются лишь L-аланин, L-аспартат, L-глутамат и L-глутамин. Все остальные аминокислоты получают свою аминогруппу в результате переаминирования с одной из первичных аминокислот. Синтез белка осуществляется у бактерий так же, как в клетках эукариот.

Синтез белка происходит на рибосомах и обычно подразделяется на три процесса: инициацию, элонгацию и терминацию. Инициация синтеза белка заключается в связывании мет-тРНК с малой субъединицей рибосомы с последующим встраиванием иницирующего кодона иРНК. Элонгация происходит за счет поочередного присоединения аминокислотных остатков к растущей полипептидной цепи. Терминация наступает, когда синтез полипептида достигает стоп-кодона. У *E. coli* известны три таких кодона: УАА, УГА и УАГ. В результате действия факторов терминации происходят остановка синтеза белка и диссоциация молекулы иРНК и рибосомы. Скорость синтеза белка в микробной клетке очень велика, так как ДНК бактерий не ограничена мембраной от цитоплазмы, не содержит интронов (участков ДНК, не несущих информации) и соответственно у микробов отсутствуют вырезание их копий из иРНК и сшивание копий экзонов (участков, кодирующих белки). В результате в клетках прокариот не происходит физического разделения процессов синтеза иРНК (транскрипции) и трансляции, поэтому оба процесса часто

идут одновременно: трансляция начинается раньше, чем завершена транскрипция. Бактерии также способны одновременно синтезировать несколько идентичных молекул на одной матрице иРНК. При этом иРНК связывается с несколькими рибосомами с образованием комплекса, получившего название «полисомы».

Процесс синтеза белка представляет собой важную мишень для разнообразных антимикробных препаратов. При этом антибиотики имеют различные мишени и механизмы действия, например аминогликозиды и тетрациклины соединяются с малой, а макролиды и линкозамиды — с большой субъединицей рибосом. Белки, синтезируемые клеткой, могут использоваться внутри нее или выделяться в окружающую среду или периплазматическое пространство (грамотрицательные бактерии).

Многие годы считали, что после синтеза на рибосомах молекулы белков сами приобретают нужную форму (третичную структуру). Сейчас мы знаем, что большинство из них приобретают нужную конформацию молекулы с помощью специальных белков, получивших название шаперонов.

Молекулы шаперонов не только обеспечивают правильное складывание белков, но и препятствуют неправильному их закручиванию. Эти молекулы абсолютно необходимы для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки как эу-, так и прокариот. Процесс укладки белковых молекул является энергетически зависимым и сопровождается расходом энергии АТФ. Количество шаперонов резко возрастает, когда клетка подвергается стрессорному воздействию различных факторов внешней среды (температуры — тепловой шок, токсинов, нарушающих метаболические реакции и др.) При этом шапероны защищают многие белки, включая ДНК-полимеразы от разрушения. Еще одной важной функцией шаперонов является их участие в транспорте белков через мембраны.

Биосинтез нуклеотидов. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды — это те строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кроме того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав многих коферментов и служат для активации и переноса аминокислот, Сахаров, липидов в реакциях полимеризации. Исходным соединением для образования пентозной части нуклеотидов служит рибозо-5-фосфат, образующийся в ПФ-пути. **Биосинтез углеводов.** Углеводы представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди- и полисахаридов, а также комплексных соединений *Транспорт веществ*

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 поступление в клетку питательных веществ лежит на ЦПМ.

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 разновидности пассивного переноса: простую диффузию и облегченную диффузию. Простая диффузия — неспецифическое проникновение веществ в клетку, при этом решающее значение имеют величина молекул и липофильность. Скорость переноса незначительна. Облегченная диффузия протекает с участием белка-переносчика

транслоказы. 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 происходит затрата энергии. Имеется два типа активного транспорта. При первом типе активного транспорта небольшие молекулы (аминокислоты, некоторые сахара) накачиваются в клетку и создают концентрацию, которая может в 100—1000 раз превышать концентрацию этого вещества снаружи клетки. Вторым механизмом, получившим название «транслокация радикалов» (фосфотрансферный путь), обеспечивает включение в клетку некоторых Сахаров (например, глюкозы, фруктозы), которые в процессе переноса фосфорилируются, т.е. химически модифицируются. Для осуществления этих процессов в бактериальной клетке локализуется специальная фосфотрансферная система, составной частью которой является белок-переносчик, находящийся в активной фосфорилированной форме. Фосфорилированный белок связывает свободный сахар на наружной поверхности мембраны и транспортирует его в цитоплазму, где сахар освобождается в виде фосфата. Поступив в клетку, органический источник углерода и энергии вступает в цепь биохимических реакций, в результате которых образуются АТФ и ингредиенты для биосинтетических процессов. Биосинтетические (конструктивные) и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. Они тесно связаны между собой через общие промежуточные продукты, которые называются амфиболитами. Особый интерес для медицинской микробиологии представляет III путь секреции, возникший эволюционно у грамотрицательных бактерий для транспорта из клетки компонентов жгутиков. Показано, что он используется также для направленной доставки в клетку эукариот бактериальных белков. В результате действия последних в клетке возникают различные нарушения функций, приводящие в конечном счете к возникновению у человека заболеваний. В процесс выделения молекул из клетки данным способом вовлечено более 20 различных белков. Секреторная система третьего типа (ТТСС) представляет шприцеподобную структуру способную инъецировать эффекторные молекулы непосредственно в цитозоль клетки-хозяина. Белки ТТСС можно разделить на три группы: белки, формирующие «шприц» ТТСС; белки транслокационного комплекса, обеспечивающие транслокацию эффекторных молекул в цитоплазму клеток хозяина; эффекторные белки, которые непосредственно оказывают модулирующее действие на клетку-хозяина.

Рис. 3.4. Схема строения секреторной системы HI типа у *Salmonella*: PrgH, PrgK, InvG, H, J; PrgI — белки, формирующие шприц; Sip B, C, D — белки транслокационного комплекса; SopA, B, E SipA; Spt — эффекторные белки

Белки транслокационных комплексов формируют поры в мембране клетки-хозяина, создавая канал для доставки эффекторных молекул. Транслокация через сформировавшийся канал в клетку-хозяина эффекторных молекул происходит при участии белков-шоперонов.

Эффекторные белки вызывают реорганизацию цитоскелета клетки-хозяина, что способствует проникновению бактерии в клетку-хозяина, а также вызывают различные нарушения функций клеток хозяина, приводящие в конечном счете к возникновению патологического процесса.

Экспрессия генов ТТСС регулируется различными транскрипционными регуляторами, которые интегрируют сигналы окружающей среды, такие, как осмотическая концентрация, концентрация кислорода, pH, температура, концентрация

ионов Ca. ТТСС имеется у *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *P. aeruginosa*, *Chlamydia*, некоторых патогенных *E. coli*.

Выделение молекул из клетки также осуществляется с помощью белков-переносчиков и фосфотрансферазным путем. Одним из вариантов переносчиков можно считать белковые помпы, обеспечивающие выведение из клеток ряда антимикробных препаратов, например тетрациклинов. Фосфотрансферазный путь широко используется при выведении молекул, необходимых для построения различных структур бактерий, расположенных снаружи от плазматической мембраны, в частности клеточной стенки, капсулы и др. Некоторые из стадий подобного транспорта подавляются используемыми в практике антимикробными препаратами, например транспорт через мембрану N-ацетилглюкозамина блокируется гликопептидным антибиотиком ванкомицином. Особым типом транспорта веществ из клеток бактерий является недавно открытая секреция мембранных пузырьков.

Биосинтетические, пути, опосредованные индуцибельными ферментами, регулируются путем репрессии их синтеза конечным продуктом. Катаболические пути, опосредованные индуцибельными ферментами, регулируются индукцией синтеза ферментов и катаболической репрессией, а опосредованные конститутивными ферментами — посредством аллостерических воздействий на их активность. АТФ в этом случае является отрицательным эффектором, а аденозиндифосфат (АДФ) — положительным клеток. Эти молекулы представляют собой компоненты будущих внешних структур. Синтезированные молекулы различными путями переносятся через плазматическую мембрану. Компоненты пептидогликана, например, переносятся за счет фосфотрансферазного пути, некоторые белки — по II типу секреции. Компоненты жгутиков переносятся за счет специальных белков — транслоказ, являющихся компонентами III типа вывода белков из клетки. На поверхности мембраны перенесенные молекулы собираются в блоки, которые, в свою очередь, транспортируются к конечному месту своего расположения и формируют ту или иную внешнюю структуру.

Отношение к факторам окружающей среды

Отношение к температуре

По отношению к температуре роста бактерии принято разделять на три основные группы: психрофилы, мезофилы и термофилы. Психрофилы живут и размножаются при пониженных температурах (диапазон температур роста от +10 до —20 °С). При этом строгие (облигатные) психрофилы неспособны размножаться при температуре выше 20 °С, а факультативные имеют оптимум роста от 22 до 30 °С. Именно в группе факультативных психрофилов обнаружены возбудители болезней человека (например, возбудитель чумы — *Yersinia pestis*, иерсиниоза — *Yersinia enterocolitica*, гнойно-воспалительных процессов — *Aeromonas* spp.). Бактерии, растущие при низких температурах, содержат повышенное количество ненасыщенных жирных кислот и имеют ряд особенностей структуры ферментных белков, что позволяет им расти при низких температурах. Мезофилы включают бактерии, температурный диапазон роста которых находится между 10 и 45 °С, а диапазон оптимальных температур роста лежит между 30 и 40 °С. Именно к этой группе относится большинство возбудителей болезней человека, оптимальный рост которых возможен при 37 °С. Термофилы представляют группу микробов, способных расти при повышенных температурах. Различают термотолерантные формы, для которых

оптимальной температурой роста являются 37 °С, но возможность роста, в отличие от мезофилов, сохраняется до 60 °С. Факультативные термофилы проявляют максимальный рост при 50—60 °С, но также растут при 20—40 °С, в то время как облигатные термофилы не могут расти при температуре ниже 40 °С; оптимальная температура для их размножения 70 °С. Известны также экстремальные термофилы, размножающиеся при температуре выше 80 °С. Ряд микробов, являющихся экстремальными термофилами, относятся к доминиону Археи. В строении термофилов одним из важнейших факторов, обеспечивающих термоустойчивость, является структура их белков. Хотя среди термофилов пока не найдены возбудители болезней человека, продукты их жизнедеятельности используются в медицинской промышленности (протеазы, нанесенные на перевязочный материал, для инфицированных ран) и при изготовлении моющих средств (ферменты-биодобавки для очистки тканей от органических молекул).

Отношение к кислотности среды

Одним из важных факторов, определяющих возможности жизни бактерий, является кислотность среды (концентрация ионов водорода). Большинство возбудителей болезней человека живут при pH среды от 4,0 до 9,0 с оптимумом около 7,0. Вместе с тем известны микробы, предпочитающие щелочную среду pH от 9,0 и выше (алкалофильные бактерии). К их числу можно отнести возбудитель холеры — *Vibrio cholera*. Некоторые микробы растут только в кислой среде при pH 4,0 и ниже (ацидофильные бактерии). Представители этой группы микроорганизмов используются в пищевой промышленности для получения молочнокислых продуктов. Известны микробы, устойчивые к изменениям pH среды и способные сохранять жизнеспособность как в сильноокислой, так и в сильно щелочной средах. К таким бактериям относятся возбудители туберкулеза, проказы и микобактериозов (*Mycobacterium* spp), а также актиномицеты и нокардии.

Отношение к молекулярному кислороду

Кислород, широко распространенный в природе, находится в свободном и связанном состоянии. В клетках он находится в связанном состоянии в составе воды и органических соединений. В атмосфере он присутствует в свободном состоянии в виде молекулярной формы, объемная доля которого составляет 21%. По отношению к кислороду, а также по использованию его в процессах получения энергии микроорганизмы подразделяются на три группы: облигатные аэробы, облигатные анаэробы, факультативные анаэробы. Облигатные аэробы растут и размножаются только в присутствии кислорода, используют кислород для получения энергии путем кислородного дыхания. Энергию получают оксидативным метаболизмом, используя кислород как терминальный акцептор электронов в реакции, катализируемой цитохромоксидазой.

Облигатные аэробы подразделяются на строгие аэробы, которые растут при парциальном давлении воздуха, и микроаэрофилы, которые, используя кислород в процессах получения энергии, растут при его пониженном парциальном давлении. Это связано с тем, что у микроаэрофилов имеются ферменты, которые инактивируются при контакте с сильными окислителями и активны только при низких значениях парциального давления кислорода, например фермент гидрогеназа.

Облигатные анаэробы не используют кислород для получения энергии. Тип метаболизма у них бродильный, за исключением метаболизма у двух видов бактерий: *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*, которые относятся к

хемолитотрофам и обладают сульфатным дыханием. Облигатные анаэробы подразделяются на две группы: строгие анаэробы и аэротолерантные. Строгие анаэробы характеризуются тем, что молекулярный кислород для них токсичен: он убивает микроорганизмы или ограничивает их рост. Энергию строгие анаэробы получают маслянокислым брожением. К строгим анаэробам относятся, например, некоторые клостридии (*C. botulinum*, *C. tetani*), бактериоиды.

Аэротолерантные микроорганизмы не используют кислород для получения энергии, но могут существовать в его атмосфере. К ним относятся молочнокислые бактерии, получающие энергию гетеро-ферментативным молочнокислым брожением.

Факультативные анаэробы способны расти и размножаться как в присутствии, так и при отсутствии кислорода. Они обладают смешанным типом метаболизма. Процесс получения энергии у них может происходить кислородным дыханием в присутствии кислорода, а при его отсутствии переключаться на брожение. Для этих бактерий характерно наличие анаэробного нитратного дыхания.

Различное физиологическое отношение микроорганизмов к кислороду связано с наличием у них ферментных систем, позволяющих существовать в атмосфере кислорода. Следует отметить, что в окислительных процессах, протекающих в атмосфере кислорода, при окислении флавопротеидов образуются токсичные продукты: перекись водорода H_2O_2 и закисный радикал кислорода O_2^- — соединение, имеющее неспаренный электрон. Эти соединения вызывают перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот и окисление SH-групп белков.

Для нейтрализации токсичных форм кислорода микроорганизмы, способные существовать в его атмосфере, имеют защитные механизмы. У облигатных аэробов и факультативных анаэробов накоплению закисного радикала O_2^- препятствует фермент супероксиддисмутаза, расщепляющая закисный радикал на перекись водорода и молекулярный кислород. Перекись водорода у этих бактерий разлагается ферментом каталазой на воду и молекулярный кислород.

Аэротолерантные микроорганизмы не имеют супероксиддисмутазы, и ее функцию выполняет высокая концентрация ионов марганца, который, окисляясь под действием O_2^- , убирает тем самым супероксидный ион. Перекись водорода у этих микроорганизмов разрушается ферментом гетероксидазой в катализируемых ею реакциях окисления органических веществ.

Строгие анаэробы не имеют ни каталазы, ни пероксидазы. Однако супероксиддисмутаза встречается у многих строгих анаэробов, и наличие этого фермента коррелирует с их устойчивостью к кислороду. Некоторые строгие анаэробы (роды *Bacteroides*, *Fusobacterium*) не выносят присутствия даже незначительного количества молекулярного кислорода, тогда как некоторые представители рода *Clostridium* могут находиться в атмосфере кислорода. Для культивирования строгих анаэробов создаются условия, позволяющие удалять атмосферный кислород: использование специальных приборов, анаэроостатов и анаэробных боксов, добавление в питательные среды редуцирующих кислород веществ, например тиогликолята натрия, использование поглотителей кислорода.

Отношение к излучению

Важнейшим естественным источником излучения для Земли является солнечная радиация. Поверхности Земли достигают преимущественно

волны длиной от 300 нм и более, поскольку более короткие волны задерживаются атмосферой. Свет в диапазоне от 300 до 1000 нм, приходящийся в основном на видимый свет, оказывает заметное влияние на жизнь различных прокариотов, включая бактерии — возбудителей болезней человека. Излучение в этом диапазоне индуцирует в бактериальной клетке процессы фотореактивации, необходимые для поддержания постоянства состава ДНК и повышения выживаемости (световая репарация ДНК), а также синтез некоторых макромолекул. В медицине излучение используется для дезинфекции воздуха, различных поверхностей оборудования и материалов. В клетках приводит к повреждениям ДНК, сопровождающимся или появлением мутаций, или гибелью клеток и изменению и разрушению других органических макромолекул. Среди бактерий наиболее устойчивыми к действию солнечной радиации и обработке ультрафиолетовым (УФ) светом искусственного происхождения являются их споры.

Радиоактивное излучение в естественных условиях преимущественно связано с излучением горных пород и сильно варьирует в различных географических точках, а также городах и сельской местности.

Рост и размножение

Рост бактериальных клеток связан с синтезом и накоплением всех компонентов, входящих в ее состав, и увеличением размера, характерного для данного вида. В условиях, обеспечивающих рост микробов, происходит и процесс их деления. Для большинства бактерий характерно поперечное бинарное деление, приводящее к образованию двух дочерних клеток. У грамположительных бактерий при этом происходит синтез перегородки между делящимися клетками. Перегородка начинает формироваться на периферии и «движется» к центру клетки. Для грамотрицательных бактерий характерно первоначальное формирование перетяжки, отделяющей клетки. После ее образования окончательное разделение дочерних клеток сопровождается синтезом перегородки между ними.

Деление бактериальной клетки начинается спустя некоторое время после завершения цикла репликации хромосомы, которая у бактерий протекает по полу консервативному механизму. Это означает, что каждая из двух нитей ДНК хромосомы служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи ДНК. В процессе репликации бактериальной хромосомы участвует более 20 ферментов. Перед репликацией цепи родительской молекулы матричной цепи ДНК должны быть разделены. В этом процессе участвуют фермент хеликаза, которая в энергопоглощаемой реакции расплетает двойную спираль, и фермент топоизомераза (гираза), которая предотвращает образование вторичных завитков. 555-белок связывается с одноцепочечной ДНК, предотвращая повторное скручивание в двойную спираль. В результате образуется репликативная вилка (рис. 3.5). Синтез новых цепей ДНК осуществляется ферментом ДНК-полимеразой. ДНК-полимераза не способна инициировать новые цепи ДНК, а может присоединять комплементарные матрице нуклеотиды к свободному 3'-концу растущей цепи. Поэтому для осуществления реакции полимеризации нуклеотидов на матрице родительской цепи полимеразе требуется затравка, праймер (от англ. primer — запал). Праймер представляет собой короткую нуклеотидную цепочку РНК, комплементарную матричной цепи, со свободным 3'-концом. Дотравливание осуществляется присоединением к свободной 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 специальный фермент ДНК-праймаза, способная инициировать синтез РНК по одноцепочечной ДНК матрицы при отсутствии какой-либо затравки. После того как цепь ДНК начала синтезироваться, РНК-затравка удаляется, а удаляющиеся бреши застраиваются ДНК-полимеразой с высокой точностью. Сохранение высокой степени точности, необходимой при репликации, обеспечивается различными функциями ДНК-полимеразы. Кроме полимеразной активности она способна к проверке считывания. В ходе последней фермент проверяет, правильно ли осуществлено присоединение очередного нуклеотида. Если выявляется нарушение правила комплементарности, проявляется третья функция данного фермента — экзонуклеазная и происходит отщепление неправильно присоединенного нуклеотида. После его удаления вновь происходит полимеразная реакция с последующей проверкой ее правильности. В целом в благоприятных условиях синтез ДНК в клетке значительно опережает скорость ее деления. В реальных условиях одна микробная клетка содержит от 2 до 10 копий хромосом. Показано, что многие бактерии без повреждения клетки выделяют избыток ДНК в окружающую среду. Этот процесс играет важную роль в обмене генетической информацией между бактериями.

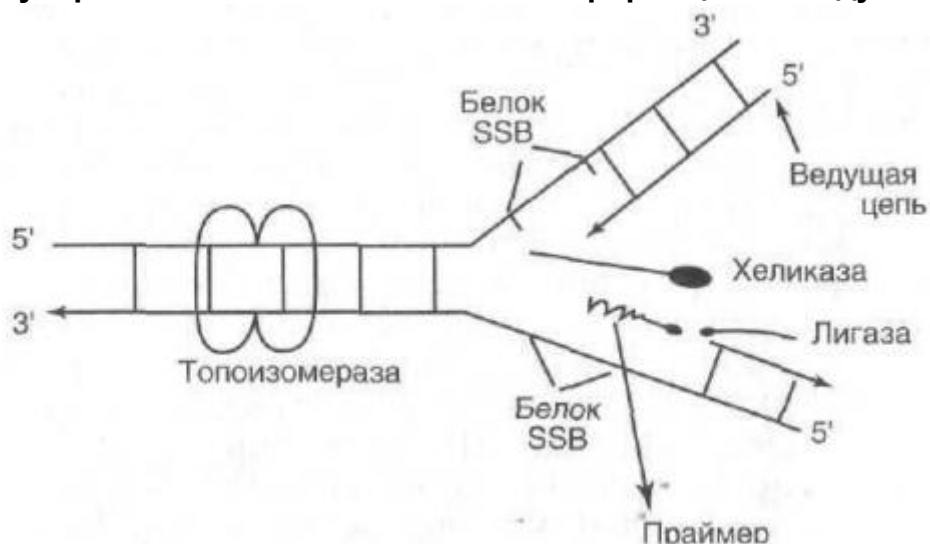


Рис. 3.5. Схема репликативной вилки

Процесс репликации ДНК бактерии продолжается до тех пор, пока не удвоится вся ДНК. Репликация начинается в одной избранной области, называемой *origin* (от англ. *origin* — начало), имеющей определенную последовательность нуклеотидов. На *origin* может возникать одна или две репликативные вилки. Последовательность нуклеотидов на *origin*-участке способствует необходимому для репликации ДНК расплетанию двойной спирали и служит местом «посадки» на ДНК комплекса ферментов, участвующих в репликации. Правильное распределение вновь синтезированных нитей ДНК по дочерним клеткам достигается у бактерий за счет прикрепления ДНК к мембране. Пространственная организация участка прикрепления и зоны роста мембраны и клеточной стенки обеспечивает автоматическое растаскивание двух копий реплицированной ДНК по дочерним клеткам. Размножение бактерий бинарным делением приводит к росту числа бактериальных 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 достигает минимума, после чего рост и размножение

прекращаются. Если на протяжении всего этого времени не прибавлять питательные вещества и не удалять конечные продукты обмена, то получаем статическую бактериальную культуру. Статическая (периодическая) культура бактерий ведет себя как многоклеточный организм с генетическим ограничением роста. Если построить график, по оси абсцисс 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 различить несколько фаз, сменяющих друг друга в определенной последовательности.

- Начальная — лаг-фаза (от англ. lag — отставать), охватывает промежуток времени между инокуляцией (посевом бактерий) и началом размножения. Ее продолжительность в среднем 2—5 ч и зависит от состава питательной среды и возраста засеваемой культуры. Во время лаг-фазы происходит адаптация бактериальных клеток к новым условиям культивирования, идет синтез индуцибельных ферментов.

- Экспоненциальная (логарифмическая) фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток. Эта скорость зависит от вида бактерий и питательной среды. Время удвоения клеток называется временем генерации, 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 постоянными. Бактериальная культура в этой фазе состоит из стандартных клеток.

- Стационарная фаза наступает тогда, когда число клеток перестает увеличиваться. Так как скорость роста зависит от концентрации питательных веществ, то при уменьшении содержания последних в питательной среде уменьшается и скорость роста. Снижение скорости роста происходит также из-за большой плотности бактериальных клеток, снижения парциального давления кислорода, накопления токсичных продуктов обмена. Продолжительность стационарной фазы составляет несколько часов и зависит от вида бактерий и особенностей их культивирования.

- Фаза отмирания наступает вследствие накопления кислых продуктов обмена или в результате аутолиза под влиянием собственных ферментов. Продолжительность этой фазы колеблется от десятка часов до нескольких недель.



Рис. 3.6. Кривая бактериального роста

Продолжительность жизни бактерий мало изучена. Известно, что мезофилы на питательной среде при комнатной температуре в условиях, когда размножение бактерий минимально, могут сохранять свою жизнеспособность в течение 1—2 лет. Очевидно, что биологическая смерть бактерий в большей степени связана с ограничением числа возможных делений. Считается, что большинство бактерий могут делиться около 50 раз, после чего клетка погибает. Механизмы гибели остаются не до конца изученными, но показано существование у бактерий генов, изменение активности которых специфически направлено на самоуничтожение клеток. Постоянное нахождение бактериальной популяции в логарифмической фазе роста наблюдается в непрерывной культуре, что достигается постепенным дозированием поступления питательных веществ, контролем плотности бактериальной суспензии и удалением метаболитов. Непрерывные бактериальные культуры используются в биотехнологических процессах.

Накопление бактериальной массы (числа бактерий) при культивировании зависит от многих факторов (качество питательных сред, посевная доза, температура выращивания, pH, наличие активирующих рост добавок и др.).

На жидких питательных средах рост и размножение бактерий проявляются в виде диффузного помутнения, образования придонного осадка или поверхностной пленки. Особенностью размножения бактерий роста *Leptospira* на жидких средах является отсутствие видимых проявлений роста.

На плотных питательных средах бактерии образуют скопление клеток — колонии, которые принято считать потомком одной клетки. Колонии различаются формой, размерами, поверхностью, прозрачностью, консистенцией и окраской. Колонии с гладкой блестящей поверхностью принято называть колониями в S-форме (от англ. smooth — гладкий). Колонии с матовой шероховатой поверхностью называют R-формами (от англ. rough — шероховатый).

Окраска колоний определяется способностью бактерий синтезировать пигменты. Пигменты различаются по цвету, химическому составу и растворимости. Пигменты предохраняют бактериальную клетку от УФ-лучей, обезвреживают токсичные кислородные радикалы, обладают

антибиотическими свойствами, принимают участие в реакциях, сопутствующих фотосинтезу в фототрофных бактериях.

Вид, форма, цвет и другие особенности колоний, а также характер роста на плотных питательных средах определяются как культуральные свойства бактерий и учитываются при их идентификации. Помимо бинарного деления, некоторые представители царства *Procaruotae* имеют иные способы размножения. Актиномицеты могут размножаться путем фрагментации гифов. Представители семейства *Streptomycetaceae* размножаются спорами. Микоплазмы являются полиморфными бактериями, что обусловлено особенностями их размножения. Помимо поперечного деления, если оно происходит синхронно с синтезом ДНК, микоплазмы могут размножаться почкованием. В этом случае основной морфологической репродуцирующейся единицей являются элементарные тельца сферической или овоидной формы, размножающиеся фрагментацией и почкованием. Хламидии не обладают способностью к бинарному делению. Они проходят через цикл развития, который предусматривает существование двух форм: внеклеточных инфекционных, малых размеров элементарных телец, не обладающих способностью к бинарному делению, и внутриклеточного, метаболически активного, крупных размеров ретикулярного тельца, способного к бинарному делению. В результате бинарного деления ретикулярного тельца формируются дочерние элементарные 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 состояние. В этом состоянии бактериальные клетки сохраняют свою метаболическую активность, но не способны к непрерывному клеточному делению, необходимому для роста на жидких и плотных питательных средах. При смене условий существования, в частности при попадании в организм человека или животных, клетки вновь приобретают способность к размножению и сохраняют свой патогенный потенциал. Переход в некультивируемое (покоящееся) состояние обеспечивает сохранение патогенных бактерий в межэпидемические и межэпизоотические периоды. При переходе в некультивируемую форму бактериальные клетки уменьшаются в размерах, приобретают сферическую форму, меняют вязкость ЦПМ. У них сохраняются транспорт электронов по дыхательной цепи и невысокий уровень метаболической активности. На переход в некультивируемую форму влияют температура, концентрация солей, свет, парциальное давление кислорода, содержание питательных веществ, а также метаболиты водорослей, находящихся в биоценозе с бактериями. Выявить наличие бактерий, находящихся в не культивируемой форме, можно с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (см. раздел 5.6.3) или красителей, меняющих окраску в окисленной и восстановленной формах. 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.

- **Наличие полноценной питательной среды.** Каждая питательная среда независимо от сложности состава и цели применения (см. главу 3.1) должна обладать водной основой, органическим источником углерода и энергии, определенным pH, осмотическим давлением.

- **Температура культивирования.** Температура влияет на скорость размножения. Для поддержания требуемой температуры используют специальные приборы — термостаты.

- **Атмосфера культивирования.** Для роста и размножения строгих аэробов необходим кислород. Аэробы хорошо растут на поверхности агара на чашках 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. Аэрирование осуществляется на специальных аппаратах — встряхивателях.

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

Микроаэрофилы размножаются при пониженном парциальном давлении кислорода. Этого можно достичь повышением парциального давления CO₂ в атмосфере культивирования до 1—5% против 0,03% CO₂ в атмосфере воздуха. Для этих же целей используют специальные CO₂ -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:

- добавлением к питательным средам редуцирующих кислород веществ: тиогликолевой и аскорбиновой кислот, цистеина, сульфидов;
- регенерацией от кислорода воздуха жидких питательных сред путем их кипячения с последующим плотным закупориванием сосудов, в которые налиты среды, резиновыми пробками;
- использованием поглотителей кислорода, щелочного пирогаллола, и других средств, помещая их в герметически закрываемые емкости газ-паки. Этот метод используется для культивирования аэротолерантных бактерий;
- механическим удалением кислорода воздуха с последующим заполнением емкости инертным газом (для этих целей используют анаэроостаты и анаэробные боксы).

Для культивирования хемо- и фотоавтотрофных бактерий создается атмосфера, насыщенная CO₂.

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

- **Освещение.** Для выращивания фототрофных микроорганизмов необходим свет. Некоторые условно-патогенные микобактерии в зависимости от освещенности образуют пигмент, что используется при их идентификации.

Культивирование абсолютных внутриклеточных паразитов, бактерий, относящихся к родам *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Coxiella*, *Chlamydia*, осуществляют на культурах клеток или в организме животных и членистоногих, а также в куриных эмбрионах (за исключением эрлихий). Куриные эмбрионы

используют также для культивирования бактерий, обладающих высоким уровнем гетеротрофности, например родов *Borrelia*, *Legionella*.

Физиология вирусов

Вирусы растут только внутриклеточно, т.е. являются облигатными внутриклеточными паразитами. В клетке они могут находиться в различных состояниях. Нарушения, вызываемые вирусами, весьма разнообразны: от продуктивной инфекции с образованием вирусного потомства и гибелью клетки до продолжительного взаимодействия вируса с клеткой в виде латентной инфекции или злокачественной трансформации клетки.

Инфицирование клетки вирусом может иметь следующие последствия:

- разрушение клетки (некроз) в результате цитотоксической инфекции, т.е. репродукция вируса приводит к цитотоксическому действию (в культуре клеток происходит цитопатический эффект — клетки округляются, отделяются от соседних клеток, образуются многоядерные гигантские клетки, вакуоли и включения);
- разрушение клетки (апоптоз) в результате инициации вирусом программированной клеточной гибели, при этом вирусный репликативный цикл часто прерывается;
- разрушение клетки в итоге не самим вирусом, а иммунными реакциями организма;
- вирус находится внутри клетки, но не разрушает ее (латентная инфекция);
- вирус трансформирует клетку организма в раковую клетку

Хорошо изучены три основных типа взаимодействия вируса с клеткой: продуктивный, abortивный и интегративный.

Продуктивный тип взаимодействия завершается воспроизводством вирусного потомства — многочисленных вирионов и гибелью зараженных клеток {цитотоксическое действие}. Некоторые вирусы выходят из клеток, не разрушая их (нецитотоксическое действие).

Abortивный тип взаимодействия не завершается образованием новых вирионов, поскольку инфекционный процесс в клетке прерывается на одном из этапов.

Интегративный тип взаимодействия, или вирогенеза, характеризуется встраиванием (интеграцией), вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки и их совместной репликацией.

Культивирование вирусов

Вирусы культивируют для лабораторной диагностики вирусных инфекций, изучения патогенеза и иммунитета при вирусных инфекциях, а также для получения вакцин и диагностических препаратов. Поскольку вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, их культивируют в организме лабораторных животных, развивающихся куриных эмбрионах и других птиц, а также на культурах клеток (тканей).

Присутствие вируса в исследуемом материале определяют с помощью методов индикации и идентификации. Индикация вирусов, т.е. неспецифическое обнаружение факта инфицирования, основано на выявлении биологических свойств вирусов и особенностей их взаимодействия с чувствительными клетками. Идентификация означает установление вида или типа вируса. Она осуществляется в основном с помощью иммунных реакций или молекулярно-генетических методов (ПЦР и др.).

Вирусы можно культивировать в организме восприимчивых к ним лабораторных животных (белые мыши, хомячки, кролики, обезьяны и др.), которых заражают вирусосодержащим материалом различными способами в

зависимости от тропизма вирусов (подкожно, внутримышечно, интраназально, интрацеребрально и т.д.). Наличие вирусов выявляют по развитию у животных клинических проявлений заболевания, патоморфологическим изменениям органов и тканей, а также на основании реакции гемагглютинации (РГА) с вирусосодержащим материалом. РГА основана на способности многих вирусов склеивать (агглютинировать) эритроциты своими гликопротеиновыми шипами (гемагглютиниринами).

Другой моделью культивирования вирусов являются куриные эмбрионы (5—12-дневные), которых заражают исследуемым материалом в различные полости и ткани зародыша. Таким образом можно культивировать вирусы гриппа, герпеса, натуральной оспы и др. Свидетельством репродукции вирусов в куриных эмбрионах являются специфические поражения оболочек и тела эмбриона (оспины, кровоизлияния), гибель эмбриона, положительная РГА с вирусосодержащей жидкостью, полученной из полостей зараженного зародыша.

Часто вирусы культивируют на культуре клеток. Метод культур клеток был впервые разработан в 1949 г. Дж. Эндерсом и соавт., получившими за разработку техники культивирования вируса полиомиелита Нобелевскую премию в 1954 г. Изолированные клетки, полученные из различных органов и тканей человека, животных, птиц и других биологических объектов, размножают на искусственных питательных средах в специальной лабораторной посуде. Широко распространены культуры клеток из эмбриональных и опухолевых (злокачественно перерожденных) тканей, обладающих по сравнению с нормальными клетками взрослого организма более активной способностью к росту и размножению. Культуры клеток обычно состоят из одного-двух основных типов клеток. Так, фибробласты имеют вытянутую форму, тогда как эпителиальные клетки имеют многоугольную форму.

Культуру клеток выращивают с соблюдением оптимальной температуры (36—38,5 °С) роста клеток и асептических условий в специальной лабораторной посуде (пробирки, флаконы, матрасы) или в реакторах для получения биотехнологической продукции. При этом используют сложную питательную среду Игла, среду 199 и другие среды, содержащие необходимые для роста клеток аминокислоты, минеральные соли, витамины, глюкозу, сыворотку крови животных или человека, буферные растворы для поддержания стабильного pH. Для подавления роста посторонней микрофлоры в среды для культивирования клеток добавляют антибиотики.

Различают однослойные, суспензионные и органные культуры клеток. Клетки однослойной культуры клеток прикрепляются и размножаются на поверхности лабораторной посуды в виде монослоя. Они получили наибольшее применение в вирусологии. Клетки суспензионных культур клеток размножаются во всем объеме питательной среды при постоянном ее перемешивании с помощью магнитной мешалки или вращающегося барабана. Метод применяют для получения большого количества клеток, например, при промышленном получении вирусных вакцин. Органные культуры применяются ограниченно. Они представляют собой цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие при культивировании исходную структуру.

По свойствам жизнеспособных генераций культуры клеток подразделяют на первичные, или первично-трипсинизированные, перевиваемые, или стабильные и полуперививаемые.

Первичные культуры клеток размножаются только в первых генерациях, т.е. выдерживают не более 5—10 пассажей после выделения из тканей. Их получают при обработке кусочков тканей (эмбриональных, опухолевых или нормальных) протеолитическими ферментами, которые разрушают межклеточные связи в тканях и органах с образованием изолированных клеток.

Перевиваемые, или стабильные, культуры клеток способны размножаться в лабораторных условиях неопределенно длительный срок (десятки лет), т.е. выдерживают многочисленные пассажи. Их получают преимущественно из опухолевых или эмбриональных тканей, обладающих большой потенцией роста. Перевиваемые культуры клеток имеют преимущества перед первичными культурами: продолжительность их культивирования, высокая скорость размножения опухолевых и эмбриональных клеток, меньшая трудоемкость, способность культур сохранять свои свойства в замороженном состоянии в течение многих лет, возможность использования международных линий культур 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 их нельзя применять в производстве вирусных вакцин.

Полуперививаемые культуры клеток имеют ограниченную продолжительность жизни и выдерживают 40—50 пассажей. Их обычно получают из диплоидных клеток эмбриона человека. В процессе пассажей эти культуры сохраняют диплоидный набор хромосом, характерный для соматических клеток исходной ткани, и не претерпевают злокачественную трансформацию. Поэтому полуперививаемые культуры клеток могут быть использованы как в диагностике, так и в производстве вакцин. О репродукции вирусов в культуре клеток, зараженных вирусосодержащим материалом, можно судить на основании следующих феноменов: цитопатогенного действия (ЦПД) вирусов, или цитопатического эффекта (ЦПЭ), образования внутриклеточных включений, образования бляшек, реакций гемадсорбции и гемагглютинации; цветной реакции.

ЦПД, или ЦПЭ, — видимые под микроскопом морфологические изменения клеток (вплоть до их отторжения от стекла), возникающие в результате внутриклеточной репродукции вирусов. В зависимости от особенностей репродуцирующихся вирусов ЦПД может различаться. В одних случаях быстро вакуолизируется цитоплазма, разрушаются митохондрии, округляются и гибнут клетки, в других формируются гигантские многоядерные клетки (так называемые симпласты) или наблюдается явление клеточной пролиферации, которое в итоге заканчивается деструкцией клеток. Таким образом, характер ЦПД позволяет использовать этот феномен не только для индикации вирусов, но и для их ориентировочной идентификации в культуре клеток. Другим проявлением ЦПЭ является образование внутриклеточных включений в ядре или цитоплазме зараженных клеток. Часто включения, представляют собой скопления вирионов или их компонентов, иногда они могут содержать клеточный материал. Выявляют включения с помощью светового или люминесцентного микроскопа после окрашивания зараженных клеток соответственно анилиновыми красителями или флюорохромами. Включения могут отличаться по величине (от 0,2 до 25 мкм), форме (округлые или неправильные) и численности (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.

Бляшки, или негативные, колонии представляют собой ограниченные участки разрушенных вирусами клеток в сплошном монослое культур клеток (рис. 3.8). Они видны невооруженным глазом в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток. Добавление агара в питательную среду ограничивает распространение вирусов по всему монослою после выхода из разрушенной клетки и обеспечивает взаимодействие вирусов только с соседними клетками. Каждая бляшка образуется потомством одного вириона. Подсчитав количество бляшек, можно определить концентрацию вирусов в исследуемом материале. Кроме того, бляшки разных групп вирусов отличаются по размеру, форме, срокам появления. Поэтому метод бляшек используют для дифференциации вирусов, а также для селекции штаммов и получения чистых линий вирусов. Однако не все вирусы могут вызывать цитопатический эффект, тогда их выявляют другими методами.

В основе реакции гемадсорбции лежит способность культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Целый ряд вирусов (гриппа, парагриппа и др.) обладают гемадсорбирующими свойствами, что позволяет использовать реакцию гемадсорбции для индикации этих вирусов даже при отсутствии выраженного ЦПД в культуре клеток. Механизмы реакции гемадсорбции и гемагглютинации сходны. Поэтому для обнаружения репродукции некоторых вирусов в культуре клеток можно использовать реакцию гемагглютинации с культуральной жидкостью, т.е. с питательной средой, содержащей размножившиеся вирусы.

Присутствие в культуре клеток популяции вирусов можно также выявить с помощью цветной реакции, которая регистрируется по цвету индикатора питательной среды для культур клеток. При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается (клетки гибнут) и среда сохраняет свой первоначальный цвет. Если же вирусы не размножаются в культуре клеток, то клетки, оставаясь жизнеспособными, в процессе метаболизма выделяют кислые продукты, изменяющие pH среды и соответственно цвета индикатора.

ЭКОЛОГИЯ МИКРОБОВ – МИКРОЭКОЛОГИЯ

Распространение микробов

Микроорганизмы распространены повсеместно. Они заселяют почву и воду, участвуя в круговороте веществ в природе, уничтожая остатки погибших животных и растений, повышая плодородие почвы и поддерживая устойчивое равновесие в биосфере. Многие из них формируют нормальную микрофлору человека, животных и растений, выполняя полезные функции для своих хозяев.

Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе

Вещества растительного и животного происхождения минерализуются микроорганизмами до углерода, азота, серы, фосфора, железа и других элементов.

Круговорот углерода. В круговороте углерода, кроме растений, водорослей и цианобактерий, активное участие принимают микроорганизмы, разлагающие ткани отмерших растений и животных с выделением CO₂. При аэробном разложении органических веществ образуются CO₂ и вода, а при анаэробном брожении — кислоты, спирты и

CO₂. Так, при спиртовом брожении дрожжи и другие микроорганизмы расщепляют углеводы до этилового спирта и диоксида углерода. Молочнокислое (вызываемое молочнокислыми бактериями), пропионовокислое (вызываемое пропионобактериями), маслянокислое и ацетонобутиловое (вызываемое клостридиями) брожение и других виды брожения сопровождаются образованием кислот и диоксида углерода. Круговорот азота. Клубеньковые бактерии и свободноживущие микроорганизмы почвы связывают атмосферный азот. Органические соединения растительных, животных и микробных остатков минерализуются микроорганизмами почвы, превращаясь в соединении аммония. Процесс образования аммиака при разрушении белка микроорганизмами получил название аммонификации, или минерализации азота. Белок разрушают псевдомонады, протей, бациллы и клостридии. При аэробном распаде белков образуются аммиак, сульфаты, диоксид углерода и вода, при анаэробном — аммиак, амины, диоксид углерода, органические кислоты, индол, скатол, сероводород. Уробактерии, выделяющиеся с мочой, растопляют мочевины до аммиака, диоксида углерода и воды. Аммонийные соли, образующиеся при ферментации бактериями органических соединений, используются высшими зелеными растениями. Но наиболее усвояемыми для растений являются нитраты — азотнокислые соли, которые образуются при распаде органических веществ в процессе окисления аммиака до азотистой, а затем азотной кислоты. Этот процесс называется нитрификацией, а микроорганизмы, его вызывающие, — нитрифицирующими. Нитрификация проходит в две фазы: первую фазу осуществляют бактерии рода *Nitrosomonas* и др., при этом аммиак окисляется до азотистой кислоты, образуются нитриты; во второй фазе участвуют бактерии рода *Nitrobacter* и др., при этом азотистая кислота окисляется до азотной и превращается в нитраты. Нитрифицирующие бактерии выделил и описал русский ученый С.Н. Виноградский. Нитраты повышают плодородие почвы, однако существует и обратный процесс: нитраты могут восстанавливаться в результате процесса денитрификации до выделения свободного азота, что снижает его запас в виде солей в почве, приводя к снижению ее плодородия.

Микрофлора почвы

Количество только бактерий в 1 г почвы достигает 10 млрд.

Микроорганизмы участвуют в почвообразовании и самоочищении почвы, кругообороте в природе азота, углерода и других элементов. В ней, кроме бактерий, обитают грибы, простейшие и лишайники, представляющие собой симбиоз грибов с цианобактериями. На поверхности почвы микроорганизмов относительно мало из-за губительного действия УФ-лучей, высушивания и других факторов. Пахотный слой почвы толщиной 10—15 см содержит наибольшее количество микроорганизмов. По мере углубления количество микроорганизмов уменьшается вплоть до их исчезновения на глубине 3—4 м. Состав микрофлоры почвы зависит от ее типа и состояния, состава растительности, температуры, влажности и т.д. Большинство микроорганизмов почвы способны развиваться при нейтральном pH, высокой относительной влажности, температуре 25-45 °C.

В почве живут спорообразующие палочки родов *Bacillus* и *Clostridium*. Непатогенные бациллы (*Bac. megaterium*, *Bac. subtilis* и др.) наряду с псевдомонадами, протеем и некоторыми другими бактериями являются аммонифицирующими, составляя группу гнилостных бактерий, осуществляющих минерализацию органических веществ. Почва является

также местом обитания азотфиксирующих бактерий, усваивающих молекулярный азот (*Azotobacter*, *Azomonas*, *Mycobacterium* и др.). Азотфиксирующие разновидности цианобактерий, или сине-зеленых водорослей, применяют для повышения плодородия рисовых полей. Патогенные спорообразующие палочки (возбудители сибирской язвы, ботулизма, столбняка, газовой гангрены) могут длительно сохраняться, даже размножаться в почве. Представители семейства кишечных бактерий (семейство *Enterobacteriaceae*) — кишечная палочка, возбудители брюшного тифа, сальмонеллезов и дизентерии, попав в почву с фекалиями, отмирают. В чистых почвах кишечная палочка и протей встречаются редко; обнаружение бактерий группы кишечной палочки (колиформные бактерии) в значительных количествах является показателем загрязнения почвы фекалиями человека и животных и свидетельствует об ее санитарно-эпидемиологическом неблагополучии из-за возможности передачи возбудителей кишечных инфекций. Количество простейших в почве колеблется от 500 до 500 000 на 1 г почвы. Питаясь бактериями и органическими остатками, простейшие вызывают изменения в составе органических веществ почвы. В почве находятся также многочисленные грибы, токсины которых, накапливаясь в продуктах питания человека, вызывают интоксикации — микотоксикозы и афлатоксикозы.

Микрофлора воды

В воде формируются определенные биоценозы с преобладанием микроорганизмов, адаптировавшихся к условиям местонахождения, т.е. физико-химическим условиям, освещенности, степени растворимости кислорода и углекислого газа- содержания органических и минеральных веществ и т.д. Микрофлора воды активно участвует в процессе самоочищения от органических отходов. Утилизация органических отходов связана с деятельностью постоянно обитающих в воде микроорганизмов, т.е. составляющих аутохтонную микрофлору. В пресных водоемах находятся различные бактерии: палочковидные (псевдомонады, аэромонады и др.), кокковидные (микрোকки), извитые и нитевидные (актиномицеты). На дне водоемов, в иле увеличивается количество анаэробов. При загрязнении воды органическими веществами появляется большое количество непостоянных (аллохтонных) представителей микрофлоры воды, которые исчезают в процессе самоочищения воды.

Вода — фактор передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний. Вместе с загрязненными ливневыми, талыми и сточными водами в озера и реки попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных (кишечная палочка, цитробактер, энтеробактер, энтерококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций (брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций, криптоспоридиоза и др.). Некоторые возбудители могут даже размножаться в воде (холерный вибрион, легионеллы). Вода артезианских скважин практически не содержит микроорганизмов, так как последние обычно задерживаются верхними слоями почвы.

Вода океанов и морей также содержит различные микроорганизмы, в том числе архебактерии, светящиеся и галофильные (солелюбивые) бактерии, например галофильные вибрионы, поражающие моллюски и некоторые виды рыб, при употреблении которых в пищу развивается пищевая токсикоинфекция. Кроме этого отмечено большое количество нанобактерий, например *Sphingomonas*, которые проходят через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

Микрофлора воздуха

В воздух попадают микроорганизмы из почвы, воды, а также с поверхности тела, из дыхательных путей и с каплями слюны человека и животных. Много микроорганизмов содержится в воздухе закрытых помещений, микробная обсемененность которых зависит от условий уборки помещения, уровня освещенности, количества людей в помещении, частоты проветривания и др. Больше количество микроорганизмов присутствует в воздухе крупных городов, меньшее — в воздухе сельской местности. Особенно мало микроорганизмов в воздухе над лесами, горами и морями. Здесь обнаруживаются кокковидные и палочковидные бактерии, бациллы, клостридии, актиномицеты, грибы и вирусы. Воздух рассматривают как фактор передачи респираторных инфекций, при которых возбудитель передается воздушно-капельным или воздушно-пылевым путем. Солнечные лучи и другие факторы способствуют гибели микрофлоры воздуха. Для снижения микробной обсемененности воздуха проводят влажную уборку помещения в сочетании с вентиляцией и очисткой (фильтрацией) поступающего воздуха. Применяют также аэрозольную дезинфекцию и обработку помещений лампами УФ-излучения (например, в микробиологических лабораториях и операционных блоках).

Микрофлора бытовых и медицинских объектов

В бытовых объектах встречаются микроорганизмы почвы, воды, воздуха, растений, выделений человека и животных. В формировании микрофлоры объектов медицинских учреждений может принимать участие патогенная и условно-патогенная микрофлора, выделяемая от больных или медицинского персонала, а также микрофлора, привносимая с перевязочным или другими материалами, лекарственными препаратами и т.д. В увлажненных участках (душевые, ванны, водосточные трубы, раковины и др.) могут размножаться возбудители сапронозных и оппортунистических инфекций — легионеллы, аэромонады, псевдомонады, клебсиеллы, протей.

Микрофлора организма человека

Микрофлора тела человека играет чрезвычайно важную роль в поддержании его здоровья на оптимальном уровне. Нормальная микрофлора представляет собой совокупность множества микробиоценозов (сообществ микроорганизмов), характеризующихся определенным составом и занимающих тот или иной биотоп (кожу и слизистые оболочки) в организме человека и животных, сообщающийся с окружающей средой. Организм человека и его микрофлора находятся в состоянии динамического равновесия (эубиоза) и являются единой экологической системой.

В любом микробиоценозе следует различать так называемые характерные виды (облигатные, аутохтонные, индигенные, резидентные). Представители этой части микрофлоры постоянно присутствуют в организме человека и играют важную роль в метаболизме хозяина и защите его от возбудителей инфекционных заболеваний. Вторая составляющая нормальной микрофлоры — транзиторная микрофлора (аллохтонная, случайная). Представители факультативной части микрофлоры достаточно часто встречаются у здоровых людей, но их качественный и количественный состав непостоянен и время от времени меняется. Количество характерных видов относительно невелико, зато численно они всегда представлены наиболее обильно.

Функции нормальной микрофлоры

- Создание колонизационной резистентности.
- Регуляция газового состава, редокс-потенциала кишечника и других полостей организма хозяина.
- Продукция ферментов, участвующих в метаболизме белков, углеводов, липидов, а также улучшение пищеварения и усиление перистальтики кишечника.
- Участие в водно-солевом обмене.
- Участие в обеспечении эукариотических клеток энергией.
- Детоксикация экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов преимущественно за счет гидролитических и восстановительных реакций.
- Продукция биологически активных соединений (аминокислоты, пептиды, гормоны, жирные кислоты, витамины).
- Иммуногенная функция.
- Морфокинетическое действие (влияние на структуру слизистой оболочки кишечника, поддержание морфологического и функционального состояния желез, эпителиальных клеток).
- Мутагенная или антимутагенная функция.
- Участие в канцеролитических реакциях (способность индигенных представителей нормальной микрофлоры нейтрализовать вещества, индуцирующие канцерогенез).

Важнейшей функцией нормальной микрофлоры является ее участие в создании колонизационной резистентности (сопротивляемость, устойчивость к заселению посторонней микрофлорой). Механизм создания колонизационной резистентности комплексный. Колонизационная резистентность обеспечивается способностью некоторых представителей нормальной микрофлоры адгезироваться на эпителии слизистой оболочки кишечника, образуя на ней пристеночный слой и тем самым препятствуя прикреплению патогенных и условно-патогенных возбудителей инфекционных заболеваний. Другой механизм создания колонизационной резистентности связан с синтезом индигенными микроорганизмами ряда веществ, подавляющих рост и размножение патогенов, прежде всего органических кислот, перекиси водорода и других биологически активных субстанций, а также с конкуренцией с патогенными микроорганизмами за источники питания.

Состав микрофлоры и размножение ее представителей контролируются прежде всего макроорганизмом (колонизационная резистентность, связанная с организмом хозяина) с помощью следующих факторов и механизмов:

- механических факторов (десквамация эпителия кожи и слизистых оболочек, удаление микробов секретами, перистальтикой кишечника, гидродинамической силой мочи в мочевом пузыре и т.д.);
- химических факторов — соляной кислоты желудочного сока, кишечного сока, желчных кислот в тонкой кишке, щелочного секрета слизистой оболочки тонкой кишки;
- бактерицидных секретов слизистых оболочек и кожи;
- иммунных механизмов — подавление адгезии бактерий на слизистых оболочках секреторными антителами класса IgA.

Различные области тела человека (биотопы) имеют свою характерную микрофлору, отличающуюся по качественному и количественному составу.

Микрофлора кожи. Основные представители микрофлоры кожи: коринеформные бактерии, плесневые грибы, спорообразующие аэробные

палочки (бациллы), эпидермальные стафилококки, микрококки, стрептококки и дрожжеподобные грибы рода *Malassezia*.

Коринеформные бактерии представлены грамположительными палочками, не образующими спор. Аэробные коринеформные бактерии рода *Corynebacterium* обнаруживаются в кожных складках — подмышечных впадинах, промежности. Другие аэробные коринеформные бактерии представлены родом *Brevibacterium*. Они чаще всего встречаются на стопах ног. Анаэробные коринеформные бактерии представлены прежде всего видом *Propionibacterium acnes* — на крыльях носа, головы, спины (сальные железы). На фоне гормональной перестройки они играют значительную роль в возникновении юношеских *acne vulgaris*.

Микрофлора верхних дыхательных путей. В верхние дыхательные пути попадают пылевые частицы, нагруженные микроорганизмами, большая часть которых задерживается и погибает в носо- и ротоглотке. Здесь растут бактериоиды, коринеформные бактерии, гемофильные палочки, лактобактерии, стафилококки, стрептококки, нейссерии, пептококки, пептострептококки и др. На слизистых оболочках респираторного тракта больше всего микроорганизмов и области носоглотки до надгортанника. В носовых ходах микрофлора представлена коринеформными, постоянно присутствуют стафилококки (резидентные *S. epidermidis*), встречаются также непатогенные нейссерии, гемофильные палочки.

Гортань, трахея, бронхи и альвеолы обычно стерильны.

Пищеварительный тракт. Качественный и количественный состав различных отделов пищеварительного тракта неодинаков.

Рот. В полости рта обитают многочисленные микроорганизмы. Этому способствуют остатки пищи во рту, благоприятная температура и щелочная реакция среды. Анаэробов больше, чем аэробов, и 10—100 раз. Здесь обитают разнообразные бактерии: бактериоиды, превотеллы, порфиромонады, бифидобактерии, зубобактерии, фузобактерии, лактобактерии, актиномицеты, гемофильные палочки, лептотрихии, нейссерии, спирохеты, стрептококки, стафилококки, пептококки, пептострептококки, вейлонеллы и др. Анаэробы обнаруживаются прежде всего в карманах десен и зубных бляшек. Они представлены родами *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* и др. Аэробы представлены *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp. Обнаруживаются также грибы рода *Candida* и простейшие (*Entamoeba gingivalis*, *Trichomonas tenax*). Ассоцианты нормальной микрофлоры и продукты их жизнедеятельности образуют зубной налет.

Антимикробные компоненты слюны, особенно лизоцим, антимикробные пептиды, антитела (секреторный IgA), подавляют адгезию посторонних микробов к эпителиоцитам. С другой стороны бактерии образуют полисахариды: *S. sanguis* и *S. mutans* преобразовывают сахарозу во внеклеточный полисахарид (глюканы, декстраны), участвующие в адгезии к поверхности зубов. Колонизации постоянной частью микрофлоры способствует фибронектин, покрывающий эпителиоциты слизистых оболочек (полный текст см. на диске).

Пищевод практически не содержит микроорганизмов.

Желудок. В желудке количество бактерий не превышает 10³ КОЕ в 1 мл. Размножение микроорганизмов в желудке происходит медленно из-за кислого значения pH окружающей среды. Чаще всего встречаются лактобактерии, поскольку они устойчивы в кислой среде. Нередки и другие грамположительные бактерии: микрококки, стрептококки, бифидобактерии.

Тонкая кишка. Проксимальные отделы тонкой кишки содержат небольшое количество микроорганизмов — не превышает 10³—10⁵ КОЕ/мл. Чаще всего встречаются лактобактерии, стрептококки и актиномицеты. Это обусловлено, по-видимому, низким значением pH желудка, характером нормальной двигательной активности кишечника, антибактериальными свойствами желчи.

В дистальных отделах тонкой кишки количество микроорганизмов увеличивается, достигая 10⁷—10⁸ КОЕ/г, при этом качественный состав сопоставим с таковым микрофлоры толстой кишки.

Толстая кишка. В дистальных отделах толстой кишки количество микроорганизмов достигает 10¹⁰—10¹² КОЕ/г, а количество встречающихся видов достигает 500. Преобладающими микроорганизмами являются облигатные анаэробы, их содержание в этом отделе пищеварительного тракта превышает таковое аэробов в 1000 раз.

Облигатная микрофлора представлена в основном бифидобактериями, зубактериями, лактобактериями, бактериоидами, фузобактериями, пропионобактериями, пептострептококками и, пептококками, клостридиями, вейлонеллами. Все они высокочувствительны к действию кислорода.

Аэробные и факультативно анаэробные бактерии представлены энтеробактериями, энтерококками и стафилококками.

В пищеварительном тракте микроорганизмы локализуются на поверхности эпителиальных клеток, в глубоком слое мукозного геля крипт, в толще мукозного геля, покрывающего кишечный эпителий, в просвете кишечника и в бактериальной биопленке.

Микрофлора желудочно-кишечного тракта новорожденных Известно, что желудочно-кишечный тракт новорожденного стерилен, но уже через сутки начинает заселяться микроорганизмами, попадающими в организм ребенка от матери, медицинского персонала и окружающей среды. Для детей первого года жизни характерны высокие популяционные уровни и частота выявления не только таких групп бактерий, как бифидобактерии, энтерококки, непатогенные эшерихии, но и бактерий, которые принято относить к условно-патогенным группам. Такими группами бактерий являются лецитиназоположительные клостридии, коагулазоположительные стафилококки, грибы рода *Candida*, цитратассимилирующие энтеробактерии и эшерихии с низкой биохимической активностью, а также со способностью к продукции гемолизина. К концу первого года жизни происходит частичная или полная элиминация условно-патогенных бактерий.

Характеристика основных представителей микрофлоры кишечника

Бифидобактерии — грамположительные, неспорообразующие палочки, облигатные анаэробы. Преобладают в толстой кишке с первых дней и на протяжении всей жизни. Бифидобактерии выделяют большое количество кислых продуктов, бактериоцинов, лизоцима, что позволяет им проявлять антагонистическую активность по отношению к патогенным микроорганизмам, поддерживать колонизационную резистентность, препятствовать транслокации условно-патогенных микроорганизмов.

Лактобактерии — грам положительны неспорообразующие палочки, микроаэрофилы. Являются представителями индигенной микрофлоры толстой кишки, полости рта и влагалища, обладают выраженной способностью к адгезии к эпителиоцитам кишечника, входят в состав мукозной флоры, участвуют в создании колонизационной резистентности, обладают иммуномодулирующим свойством, способствуют выработке

секреторных иммуноглобулинов. Количество в большей степени зависит от вводимых кисломолочных продуктов и составляет 10^6 — 10^8 в 1 г.

Эубактерии — грамположительные неспорообразующие палочки, строгие анаэробы. У детей, находящихся на грудном вскармливании, встречаются нечасто. Принимают участие в деконъюгации желчных кислот.

Клостридии — грамположительные, спорообразующие палочки, строгие анаэробы. Лецитиназоотрицательные клостридии появляются у новорожденных уже в конце 1-й недели жизни, а их концентрация достигает 10^6 — 10^7 КОЕ/г. Лецитиназоположительные клостридии (*C. perfringens*) встречаются у 15% детей раннего возраста. Эти бактерии исчезают при достижении ребенком возраста 1,5—2 лет. Бактероиды — грамотрицательные, неспорообразующие облигатно-анаэробные бактерии. В кишечнике преобладают бактероиды, относящиеся к группе *B. fragilis*. Это прежде всего *B. thelailaomicron*, *B. vulgatus*. Доминирующими в кишечнике ребенка эти бактерии становятся после 8—10 мес жизни: их количество достигает 10^{10} КОЕ/г. Участвуют в деконъюгации желчных кислот, обладают иммуногенными свойствами, высокой сахаралитической активностью, способны расщеплять углевод содержащие компоненты пищи, продуцируя большое количество энергии. Факультативно анаэробные микроорганизмы представлены эшерихиями и некоторыми другими энтеробактериями, а также грамположительными кокками (стафилококками, стрептококками и энтерококками) и грибами рода *Candida*. Эшерихии — грамотрицательные палочки, появляются в первые дни жизни и сохраняются на протяжении всей жизни в количестве 10^7 — 10^8 КОЕ/г. Эшерихии, отличавшиеся сниженными ферментативными свойствами, а также способностью к продукции гемолизина, как и другие бактерии (клебсиеллы, энтеробактеры, цитробактеры, протей и др.), составляют значительную часть как качественного, так и количественного состава энтеробактерий у детей первого года жизни, но в последующем к концу первого года жизни по мере созревания иммунной системы ребенка происходит частичная или полная элиминация условно-патогенных бактерий.

Стафилококки — грамположительные кокки, коагулазоотрицательные стафилококки колонизируют кишечник ребенка с первых дней жизни. Коагулазоположительные (*S. aureus*) в настоящее время обнаруживаются более чем у 50% детей в возрасте 6 мес и после 1,5—2 лет. Источником колонизации детей бактериями вида *S. aureus* является флора кожи людей, окружающих ребенка. Стрептококки и энтерококки — грамположительные кокки. Заселяют кишечник с первых дней жизни, количество достаточно стабильное на протяжении жизни — 10^6 — 10^7 КОЕ/г. Участвуют в создании колонизационной резистентности кишечника. Грибы рода *Candida* — транзитная микрофлора. У здоровых детей встречаются нечасто.

Микрофлора мочеполового тракта. Почки, мочеточники, мочевой пузырь обычно стерильны. В уретре встречаются коринеформные бактерии, эпидермальный стафилококк, сапрофитные микобактерии (*A. smegmatis*), неклостридиальные анаэробы (превотеллы, порфиромонады), энтерококки. Основными представителями микрофлоры влагалища у женщин репродуктивного возраста являются лактобактерии, их количество достигает 10^7 — 10^8 в 1 мл вагинального отделяемого. Колонизация влагалища лактобактериями обусловлена высоким уровнем эстрогенов у женщин детородного возраста. Эстрогены индуцируют накопление в вагинальном эпителии гликогена, являющегося субстратом для лактобактерии, и стимулируют образование рецепторов для лактобактерии

на клетках вагинального эпителия. Лактобактерии расщепляют гликоген с образованием молочной кислоты, которая поддерживает pH влагалища на низком уровне (4,4—4,6) и является важнейшим контролирующим механизмом, препятствующим колонизации патогенными бактериями этой экологической ниши. Продукция перекиси водорода, лизоцима, лактацинов способствует поддержанию колонизационной резистентности. Нормальная микрофлора влагалища включает бифидобактерии (встречаются редко), пептострептококки, пропионибактерии, превотеллы, бактероиды, порфиромонасы, коринеформные бактерии, коагулазоотрицательные стафилококки. Преобладающими микроорганизмами являются анаэробные бактерии, соотношение анаэробы/аэробы составляет 10/1. Примерно у 50% здоровых сексуально активных женщин обнаруживаются *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, а у 5% — бактерии рода *Mobiluncus*.

На состав микрофлоры влагалища оказывают влияние беременность, роды, возраст. Во время беременности количество лактобактерий повышается и достигает максимума в III триместре беременности. Доминирование лактобактерий у беременных снижает риск патологической колонизации при прохождении его через родовые пути.

Дисбактериоз

Это клинико-лабораторный синдром, возникающий при дефиците ряда заболеваний и клинических ситуаций, который характеризуется изменением качественного и количественного состава нормофлоры определенного биотопа, а также транслокацией определенных ее представителей в несвойственные биотопы с последующими метаболическими и иммунными нарушениями. При дисбиотических нарушениях, как правило, происходят снижение колонизационной резистентности, угнетение функций иммунной системы, повышается восприимчивость к инфекционным заболеваниям. Причины, приводящие к возникновению дисбактериозов:

- Длительная антибиотико-, химио- или гормонотерапия. Чаще всего дисбиотические нарушения возникают при использовании антибактериальных препаратов, относящихся к группе аминопенициллинов [ампициллин, амоксициллин, линкозаминов (клиндамицин и линкомицин)]. В этом случае наиболее тяжелым осложнением следует считать возникновение псевдомембранозного колита, ассоциированного с *Clostridium difficile*.
- Воздействие жесткого у-излучения (лучевая терапия, облучение).
- Заболевания желудочно-кишечного тракта инфекционной и неинфекционной этиологии (дизентерия, сальмонеллез, онкологические заболевания).
- Стрессовые и экстремальные ситуации:
- Длительное пребывание в стационаре (инфицирование госпитальными штаммами), в условиях замкнутого пространства (космические станции, подводные лодки).

При бактериологическом исследовании регистрируется снижение количества или исчезновение одного или нескольких видов микроорганизмов — представителей индигенной микрофлоры, прежде всего бифидобактерий, лактобактерий. При этом увеличивается количество условно-патогенных микроорганизмов, которые относятся к факультативной микрофлоре (цитратассимилирующие, энтеробактерии, протеи), при этом они могут распространяться за пределы характерных для них биотопов.

Различают несколько стадий дисбактериоза.

- I стадия компенсированная — фаза латентная (субклиническая). Происходит уменьшение количества одного из представителей индигенной микрофлоры без изменения других составляющих биоценоза. Клинически не проявляется — компенсированная форма дисбактериоза. При этой форме дисбактериоза рекомендуется диета.
- II стадия — субкомпенсированная форма дисбактериоза. Происходит снижение количества или элиминация отдельных представителей индигенной микрофлоры и увеличение содержания транзитной условно-патогенной микрофлоры. Для субкомпенсированной формы характерны дисфункция кишечника и местные воспалительные процессы, энтерит, стоматит. При этой форме рекомендуются диета, функциональное питание, а для коррекции — пре- и пробиотики.
- III стадия — декомпенсированная. Основные тенденции изменения микрофлоры нарастают, уело в но-патогенные микроорганизмы становятся доминирующими, и отдельные представители распространяются за пределы биотопа и появляются в полостях, органах и тканях, в которых они обычно не встречаются, например *E. coli* в желчных путях, *Candida* в моче. Развивается декомпенсированная форма дисбактериоза вплоть до тяжелых септических форм. Для коррекции этой стадии нередко приходится прибегать к так называемой селективной деконтаминации — назначению антибактериальных препаратов из группы фторхинолонов, монобактамов, аминогликозидов per os с последующей длительной коррекцией микрофлоры с помощью диетического питания, пре- и пробиотиков.

Существует несколько подходов в коррекции дисбиотических нарушений

— устранение причины, вызвавшей изменения микрофлоры кишечника; 144
Глава 4 — коррекция диеты (использование кисломолочных продуктов, продуктов питания растительного происхождения, диетических добавок, функционального питания);

— восстановление нормальной микрофлоры с помощью селективной деконтаминации

— назначению про-, пре- и синбиотиков.

Пробиотики — живые микроорганизмы (молочнокислые бактерии, иногда дрожжи), которые относятся к обитателям кишечника здорового человека, оказывают положительное воздействие на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма, через оптимизацию микрофлоры хозяина. В Российской Федерации зарегистрированы и широко используются следующие группы пробиотиков.

- Бифидосодержащие препараты. Их действующим началом являются живые бифидобактерии, обладающие высокой антагонистической активностью против широкого спектра патогенных и условно-патогенных бактерий. Эти препараты повышают колонизационную резистентность, нормализуют микрофлору кишечника. Например, бифидумбактерин, который содержит живые лиофильно высушенные бифидобактерии — *B. bifidum*,

- Лактосодержащие препараты. Действующим началом этих препаратов являются живые лактобактерии, обладающие широким спектром антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, за счет продукции органических кислот, перекиси водорода, лизоцима; например, препарат ацилакт, содержащий 3 штамма *L. acidophilus*.

- Колисодержащие препараты, например колибактерин. Имеются также поликомпонентные препараты: бификол (содержит бифидобактерии и *E. coli*; линекс, содержащий *B. infantis*, *L. acidophilus*, *E. faecium*).

Пребиотики — препараты немикробного происхождения, не способные адсорбироваться в верхних отделах пищеварительного тракта. Они способны стимулировать рост и метаболическую активность нормальной микрофлоры кишечника. Чаще всего вещества, составляющие основу пребиотика, являются низкомолекулярными углеводами (олигосахариды, фруктоолигосахариды), содержащиеся в грудном молоке и в некоторых пищевых продуктах.

Синбиотики — комбинация пробиотиков и пребиотиков. Эти вещества избирательно стимулируют рост и метаболическую активность индигенной микрофлоры. Например, препарат биовестинлакто содержит бифидогенные факторы и биомассу *B. bifidum*, *L. adolescentis*, *L. plantarum*.

При тяжелых нарушениях микробиоценоза используется селективная деконтаминация. Препаратами выбора при этом могут быть антибактериальные препараты, применение которых не нарушает колонизационную резистентность, — фторхинолоны, азренам, перорально аминогликозиды.

Уничтожение микробов в окружающей среде
Дезинфекция

Дезинфекция (от лат. *infectia* — инфекция и франц. отрицательной приставки *des*) — комплекс мероприятий по уничтожению во внешней среде не всех, а только определенных возбудителей инфекционных заболеваний. Различают механический, физический и химический способы дезинфекции.

Механический метод заключается в удалении микроорганизмов без их гибели путем встряхивания, выколачивания, влажной уборки и вентиляции помещений и т.д. Он не позволяет достигнуть полного обеззараживания обрабатываемых объектов, однако приводит к значительному уменьшению числа патогенных микроорганизмов во внешней среде. К механическому методу относится и использование мембранных фильтров (см. раздел 4.3.2).

Физический метод предполагает воздействие на микроорганизмы физических агентов — высокой температуры, УФ-излучения.

Кипячение применяют для дезинфекции хирургических инструментов, игл, резиновых трубок. Однако даже кипячение в течение 30 мин в специальных аппаратах-стерилизаторах не уничтожает споры и некоторые вирусы.

Пастеризация — это обеззараживание многих пищевых продуктов (вино, пиво, соки), при этом достигается только частичная стерильность; споры микроорганизмов и ряд вирусов не уничтожаются.

УФ-лучи применяют для дезинфекции воздуха в микробиологических лабораториях, боксах, операционных. Ее проводят, как правило, ртутными бактерицидными лампами различной мощности (БУВ-15, БУВ-30 и др.) с длиной волны излучения 253—265 нм. В настоящее время широко используют импульсные ксеноновые лампы, которые отличаются от ртутных тем, что при их разрушении в окружающую среду не попадают пары ртути.

В микробиологической практике широкое применение нашли способы химической дезинфекции рабочего места, отработанного патологического материала, градуированных и пастеровских пипеток, стеклянных шпателей, стекол.

Галогенсодержащие соединения. Хлорсодержащие вещества, такие, как гипохлориты (соли натрия или калия хлорноватистой кислоты), органические соединения хлора (хлорамин, дихлорризоциануровая кислота), хлороформ и другие, оказывают выраженное антимикробное действие на большинство бактерий, вирусов и простейших. Антимикробный эффект растворов хлорсодержащих веществ связан с наличием активного хлора, который вступает во взаимодействие с белками микробов, вызывая их повреждение. **Окислители.** Механизм антимикробного действия окислителей связан с выделением атомарного кислорода, который оказывает на микроорганизмы сильное повреждающее действие. Пероксид водорода (3% раствор) обладает относительно слабым антимикробным действием и используется в хирургической практике для обработки инфицированных ран в качестве антисептика. В более высокой концентрации пероксид водорода уничтожает практически все микроорганизмы и вирусы и может использоваться для химической стерилизации.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) — катионные, анионные и амфолиты, их антимикробный эффект связан с изменением проницаемости цитоплазматической мембраны и нарушением осмотического равновесия. ПАВ обладают выраженной активностью в отношении бактерий, грибов, вирусов и некоторых простейших.

Спирты. Чаще всего используются в медицине алифатические спирты (этанол и изопропанол) как антисептическое средство (70% спирт для обработки рук хирурга, 90—95% спирт для дезинфекции хирургических инструментов). Спирты вызывают коагуляцию белков микробной клетки, однако грибы, вирусы и споры бактерий обладают к спиртам выраженной устойчивостью.

Альдегиды характеризуются дезинфицирующими, антисептическими и химиотерапевтическими свойствами. Механизм бактерицидного действия связан с алкилированием amino-, сульфгидрильных и карбоксильных групп белков. Формалин (40% водный раствор формальдегида) используют для обработки рук и стерилизации инструментов (0,5—1% растворы), а также для дезинфекции белья, одежды и особенно обуви.

Фенолы. Механизм их антимикробной активности связан с денатурацией белков клеточной стенки. Одним из наиболее известных препаратов этой группы является карболовая кислота (в настоящее время применяется крайне редко). При оценке антимикробной активности новых антисептиков и дезинфектантов фенол используется в качестве эталона (фенольный коэффициент). Его применяют в виде 2—5% мыльно-карболовой смеси для дезинфекции одежды, выделений и предметов ухода за больным. Для консервации широко используют также эфиры п-гидроксибензойной кислоты (парабены). При испытании антимикробной активности дезинфектантов и антисептиков используют стандартные тест-культуры микроорганизмов (золотистый стафилококк, кишечная палочка, бациллы, микобактерии, грибы-трихофитоны и кандиды). Для определения вирулицидной активности применяют тест-вирусы гепатита А и полиомиелита.

Стерилизация

Стерилизация (от лат. *sterilis* — бесплодный) — освобождение от всего живого, полное уничтожение в материалах всех микроорганизмов и их спор. Различают физические, химические и механические способы стерилизации. Прокаливанием на пламени спиртовки стерилизуют металлические

инструменты, бактериологические петли, иглы, пинцеты, предметные стекла. Стерилизация сухим жаром применяется для обеспложивания стеклянной посуды, пробирок, колб, чашек Петри и пипеток. Для этой цели используют сухожаровые шкафы (печи Пастера), в которых необходимый эффект достигается при температуре 160 °С в течение 2 ч или при температуре выше 170 °С в течение 40 мин. Принципиальные преимущества сухого жара заключаются в том, что при его применении не происходит коррозии металлов и инструментов, не повреждаются стеклянные поверхности; он пригоден для стерилизации порошков и не содержащих воды нелетучих вязких веществ. К недостаткам данного метода относятся медленная передача тепла и продолжительность стерилизации; при использовании сухого жара более высокие температуры (выше 170 °С) могут неблагоприятно действовать на некоторые металлы, а также вызывать обугливание и возгорание ватных пробок и бумаги.

При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате окисления внутриклеточных компонентов. Споры бактерий более устойчивы к сухому жару, чем вегетативные клетки.

Стерилизация паром под давлением — один из наиболее эффективных методов, основанный на сильном гидролизующем действии насыщенного пара. Паром под давлением стерилизуют различные питательные среды (кроме содержащих нативные белки), жидкости, приборы, резиновые предметы, стеклянную посуду с резиновыми пробками. Для этой цели применяют паровые стерилизаторы (автоклав) с вертикальным или горизонтальным размещением котла.

Контроль режима стерилизации осуществляется с помощью химических термотестов и искусственных биотестов. Химические термотесты представляют собой вещества, изменяющие свой цвет или физическое состояние при стерилизации и имеющие разную температуру плавления.

Бактериологический контроль режима стерилизации заключается в том, что в стерилизационную камеру помещают полоски с нанесенными на них спорами одного или двух видов бактерий, со спорами известной численности, со спорами и определенным количеством культуральной среды, суспензиями спор и т.д.

Стерилизация текущим паром (дробная стерилизация) — это обеспложивание объектов, разрушающихся при температуре выше 100 °С (питательные среды с аммиачными солями, молоко, желатин, картофель, некоторые углеводы). Обеспложивание проводят в паровом стерилизаторе при открытом спускном кране и незавинченной крышке или в аппарате Коха по 15—30 мин в течение 3 дней подряд. При первой стерилизации погибают вегетативные формы микробов, некоторые споры при этом сохраняются и прорастают в вегетативные особи в процессе хранения питательных сред при комнатной температуре. Последующая стерилизация обеспечивает достаточно надежное обеспложивание объекта.

Тиндализация — это стерилизация материалов, легко разрушающихся при высокой температуре (сыворотки, витамины); стерильность достигается повторным прогреванием объекта при 60 °С по 1 ч ежедневно в течение 5—6 дней подряд.

Лучевая стерилизация осуществляется либо с помощью γ -излучения, либо с помощью ускоренных электронов, под влиянием которых повреждаются нуклеиновые кислоты. Проводится в промышленных условиях для стерилизации одноразовых инструментов и белья, лекарственных препаратов.

Химическая стерилизация предполагает использование токсичных газов: окиси этилена, смеси ОБ (смесь оксида этилена и бромистого метила в весовом соотношении 1:2,5) и формальдегида. Глутаровый альдегид после активирования буферными системами используется для химической стерилизации тех материалов, которые нельзя стерилизовать другими методами. Эти вещества являются алкилирующими агентами, способными инактивировать активные группы в ферментах, ДНК, РНК, приводя к гибели микробов. Стерилизация газами проводится в специальных камерах. Используется для стерилизации изделий из термолабильных материалов, снабженных оптическими устройствами. Метод безопасен для людей и окружающей среды, так как стерилизующие агенты остаются на объекте стерилизации.

Механические методы стерилизации. Фильтрование применяют в тех случаях, когда повышенная температура может резко повлиять на качество стерилизуемых материалов (питательные среды, сыворотки, антибиотики), а также для очистки бактериальных токсинов, фагов и различных продуктов жизнедеятельности бактерий. Как окончательный процесс оно менее надежно, чем стерилизация паром, из-за большой вероятности прохождения микроорганизмов через фильтры.

Фильтры задерживают микроорганизмы благодаря поровой структуре их материала. Существуют два основных типа фильтров — глубинные и мембранные.

Глубинные фильтры состоят из волокнистых или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в материале фильтра. Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру, получают их из нитроклетчатки, и захват ими частиц определяется в основном размером пор. Они пропускают вирусы и микоплазмы, поэтому фильтрование через мембранные фильтры относят к механическим методам дезинфекции.

Асептика и антисептика

Асептика, основоположником которой является Д. Листер (1867), — это комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания возбудителя инфекции в рану, органы больного при операциях, лечебных и диагностических процедурах. Асептику применяют для борьбы с экзогенной инфекцией, источниками которой являются больные и бактерионосители. Асептика включает стерилизацию и сохранение стерильности инструментов, перевязочного материала, операционного белья, перчаток и всего того, что приходит в соприкосновение с раной, а также дезинфекцию рук хирурга, операционного поля, аппаратуры, операционной и других помещений, применение специальной спецодежды, масок. К мерам асептики относятся также планировка операционных, систем вентиляции и кондиционирования воздуха. Методы асептики применяются также на фармацевтических и микробиологических производствах, в пищевой промышленности.

Антисептика — совокупность мер, направленных на уничтожение микробов в ране, патологическом очаге или организме в целом, на предупреждение или ликвидацию воспалительного процесса. Первые элементы антисептики были предложены И. Земмельвейном в 1847 г. Антисептику проводят механическими (удаление некротизированных тканей), физическими (дренирование ран, введение тампонов, введение гигроскопических повязок), биологическими (использование

протеолитических ферментов для лизиса нежизнеспособных клеток, применение бактериофагов и антибиотиков) и химическими (применение антисептиков) методами. Антисептические средства убивают или подавляют рост микроорганизмов, находящихся в контакте с поверхностью кожных покровов, слизистых оболочек и соприкасающихся с ними тканей (раны, полости тела). Разделение антимикробных средств на антисептики и дезинфицирующие вещества во многом условно. Так, некоторые антисептики (пероксид водорода и др.) в более высоких концентрациях могут использоваться для дезинфекции помещений, белья, посуды и др. В то же время некоторые дезинфектанты (хлорамин и др.) в невысоких концентрациях применяют для орошения и промывания ран, обработки рук хирургов и т.д. В качестве антисептиков используют следующие группы соединений.

Йодсодержащие соединения обладают широким спектром антимикробной активности. Они вызывают коагуляцию белков микроорганизмов и применяются только в качестве антисептиков. Спиртовой раствор йода (3—5%) используют для обработки операционного поля, мелких порезов и ссадин, раствор Люголя — для обработки слизистых оболочек гортани и глотки. Спирты. Как антисептическое средство используют 70% спирт для обработки рук хирурга.

Перманганат калия (0,04—0,5% растворы) применяют для полосканий, промываний и спринцеваний при воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей, в урологической и гинекологической практике.

Красители. В эту группу входят производные трифенилметана (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий и др.) и акридиновые красители (профлавин, аминоакрин). Их используют в основном как антисептические средства. Так, например, бриллиантовый зеленый применяют для обработки кожных покровов при небольших травмах, порезах и пиодермиях, метиленовый синий — для лечения циститов и уретритов.

Кислоты, щелочи и эфиры. Действие препаратов этой группы связано с резким изменением pH среды, оказывающим неблагоприятное действие на большинство микроорганизмов. Чаще всего применяют борную (для полоскания полости рта и зева, промывания глаз), уксусную (обладает хорошей активностью в отношении грамотрицательных бактерий, особенно псевдомонад), бензойную (характеризуется антибактериальным и фунгицидным эффектом) и салициловую (используют в клинике кожных болезней для лечения дерматомикозов) кислоты. Из щелочей наибольшее распространение получил 0,5% раствор аммиака, используемый для обработки рук хирурга.

Фенол и близкие к нему вещества входят в состав березового дегтя и ихтиола, назначаемых для лечения инфицированных ран, пролежней, ожогов. Производные фенола (резорцин, хлорофен, триклозан, тимол, салол) применяют в виде мазей, водных и спиртовых растворов при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний в дерматологии и хирургии.

Гексамин (метенамин) расщепляется в кислой среде очага воспаления с освобождением формальдегида. Этот препарат применяют внутрь и внутривенно для лечения заболеваний мочевыводящих путей, холециститов, менингитов. Соединения тяжелых металлов. Тяжелые металлы вызывают коагуляцию белков микробной клетки. В связи с аккумуляцией в организме эти соединения редко применяются в

медицинской практике. Соединения ртути (тиомерсаль, соли фенилртути) назначают при блефаритах и конъюнктивитах; нитрат серебра — при трахоме; протаргол и колларгол — при конъюнктивитах, циститах, уретритах и для обработки гнойных ран; окись цинка, пластырь свинцовый, ксероформ — как антисептические средства при гнойно-воспалительных (заболеваниях кожи. Сулема из-за высокой токсичности в настоящее время для лечения больных не используется.

Бактериофаги (вирусы бактерий)

Бактериофаги (от «бактерия» и греч. phagos — пожирающий) — вирусы, специфически проникающие в бактерии, использующие их биосинтетические системы для своей репродукции и вызывающие их лизис (растворение, разрушение клеток). Впервые явление самопроизвольного лизиса сибиреязвенных бактерий наблюдал один из основоположников отечественной микробиологии Н.Ф. Гамалея (1898). Английский бактериолог Ф. Туорт (1915) описал способность фильтрата стафилококков растворять свежую культуру этих же бактерий. Однако лишь французский ученый Ф. д'Эррель (1917) правильно оценил это явление, выделив фильтрующийся литический агент из испражнений больных дизентерией. Добавление литического агента к мутной бульонной культуре дизентерийных бактерий приводило к полному просветлению среды. Аналогичный эффект д'Эррель наблюдал и на плотных питательных средах, засеянных смесью литического агента с соответствующими бактериями. На фоне сплошного бактериального роста появлялись стерильные пятна круглой или неправильной формы — участки лизиса бактерий, названные негативными колониями, или бляшками. Предположив, что имеет дело с вирусами, д'Эррель выделил этот литический агент с помощью бактериальных фильтров и назвал его бактериофагом — пожирателем бактерий.

Бактериофаги широко распространены в природе. Они обнаружены в воде, почве, пищевых продуктах, различных выделениях из организма людей и животных (фекалии, моча, мокрота, гной и т.д.). Особенно большое количество бактериофагов выделяется в период выздоровления больного человека. В настоящее время эти вирусы выявлены у большинства бактерий, а также у некоторых других микроорганизмов, в частности у грибов. Поэтому бактериофаги в широком смысле слова часто называют просто фагами.

Бактериофаги принято обозначать буквами латинского, греческого или русского алфавита, часто с цифровым индексом, перед которым стоит название вида бактерий (например, фаги *E. coli* T2). Для обозначения группы родственных фагов используют родовые и видовые названия микробов, из которых выделены соответствующие фаги: колифаги, стафилофаги, актинофаги, микофаги и т.д.

Морфология и химический состав. Морфологию бактериофагов изучают с помощью электронной микроскопии. Фаги, как и просто организованные вирусы человека, состоят из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белковой оболочки — капсида. Однако между собой они в значительной степени различаются по морфологии. В зависимости от формы, структурной организации и типа нуклеиновой кислоты фаги подразделяют на несколько морфологических типов (рис. 3.9). К I типу относятся нитевидные ДНК-содержащие фаги, взаимодействующие с мужскими особями бактерий (см. раздел 2.2 и главу 5). Геном фагов представлен однопонитевой ДНК, заключенной в спиральный капсид. II тип включает мелкие РНК-содержащие и однопонитевые ДНК-содержащие фаги,

геном которых находится внутри икосаэдрического капсида (головки) с аналогом отростка. К III типу относятся икосаэдрические фаги с коротким отростком, содержащие двунитевую ДНК. IV и V типы — сложные по морфологии ДНК-содержащие фаги, имеющие форму сперматозоида: икосаэдрический капсид головки соединен с длинным хвостовым отростком. V тип фагов отличается от VI типа тем, что чехол их отростков способен к сокращению. Размеры фагов колеблются от 20 до 800 нм (нитевидный тип).

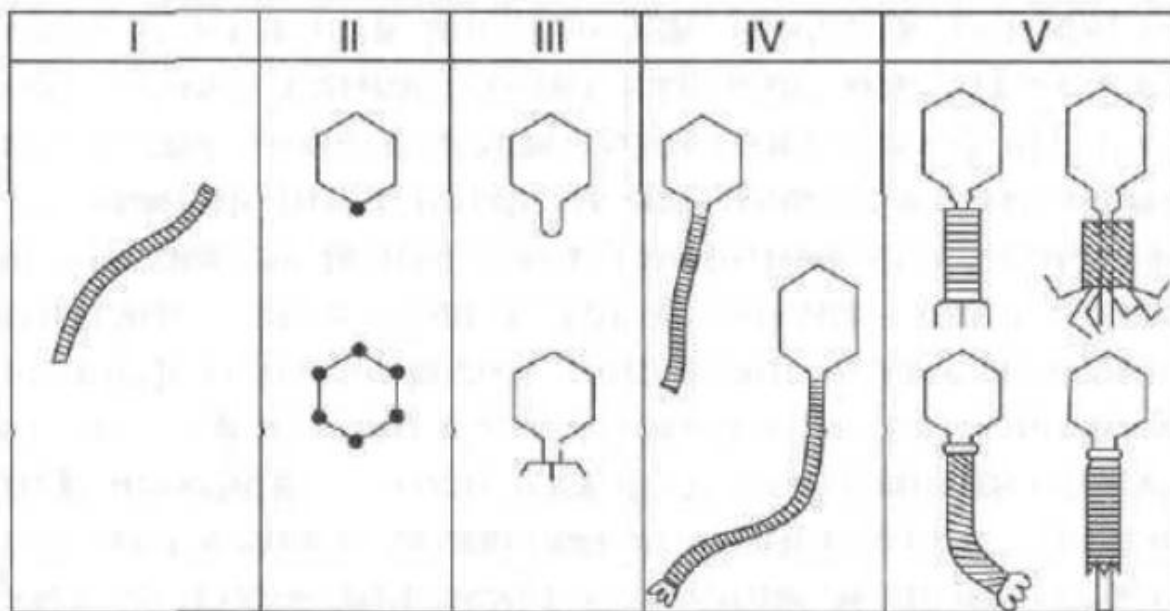


Рис. 3.9. Морфологические типы бактериофагов (объяснение в тексте)

Наиболее изучены крупные бактериофаги, имеющие форму сперматозоида и сокращающийся чехол отростка (рис. 3.10), например колифаги T2, T4, T6 (от англ. type — типовые). У этих фагов молекула двунитевой суперспирализованной ДНК находится внутри головки размером 65—100 нм и защищена капсидом. Капсид состоит из белковых молекул — идентичных полипептидных субъединиц, уложенных по икосаэдрическому (кубическому) типу симметрии. В состав головки также входит полипептид, состоящий из аспарагиновой, глутаминовой кислот и лизина. У некоторых фагов внутри головки находится внутренний гистонотипный белок, обеспечивающий суперспирализацию ДНК. Хвостовой отросток длиной более 100 нм имеет внутри полый цилиндрический стержень, сообщающийся с головкой, а снаружи — чехол (футляр), способный к сокращению наподобие мышцы. Чехол хвостового отростка образован белковыми субъединицами, уложенными по спиральному типу симметрии, содержит АТФ и ионы Ca . На дистальном конце отростка имеется шестиугольная базальная пластинка с шипами, от которых отходят нитевидные структуры — фибриллы.

У некоторых фагов (например, T2) в дистальной части отростка содержится фермент лизоцим.

Антигенные свойства. Бактериофаги содержат группоспецифические и типоспецифические антигены, обладают иммуногенными свойствами, вызывая синтез специфических антител в организме. Антитела, взаимодействуя с бактериофагами, могут нейтрализовать их литическую активность в отношении бактерий. По типоспецифическим антигенам фаги делят на серотипы.

Резистентность. По сравнению с вирусами человека бактериофаги более устойчивы к факторам окружающей среды. Они инактивируются под действием температуры 65-70 °С, УФ-облучения в высоких дозах, ионизирующей радиации, формалина и кислот. Длительно сохраняются при низкой температуре и высушивании.

Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой. Взаимодействие фагов с бактериями может протекать, как и у других вирусов, по продуктивному, abortивному и интегративному типам. При продуктивном типе взаимодействия образуется фаговое потомство, бактерии лизируются; при abortивном типе фаговое потомство не образуется и бактерии сохраняют свою жизнедеятельность, при интегративном типе геном фага встраивается в хромосому бактерии и сосуществует с ней. В зависимости от типа взаимодействия различают вирулентные и умеренные бактериофаги. Вирулентные бактериофаги взаимодействуют с бактерией по продуктивному типу. Проникнув в бактерию, они репродуцируются с образованием 200—300 новых фаговых частиц и вызывают лизис бактерий. Процесс взаимодействия с бактериями в достаточной мере изучен у бактериофагов, имеющих отросток с сокращающимся чехлом. Он состоит из последовательно сменяющих друг друга стадий и весьма схож с процессом взаимодействия вирусов человека и животных с клеткой хозяина. Однако имеются и некоторые особенности.

Специфическая адсорбция фагов происходит только при соответствии прикрепительных белков вирусом рецепторов бактериальной клетки липополисахаридной или липопротеиновой природы, находящихся в ее клеточной стенке. На бактериях, лишенных клеточной стенки (протопласты, сферопласты), бактериофаги не могут адсорбироваться. Фаги, имеющие хвостовой отросток, прикрепляются к бактериальной клетке свободным концом отростка (фибриллами базальной пластинки). В результате активации АТФ чехол хвостового отростка сокращается и стержень с помощью лизоцима, растворяющего прилегающий фрагмент клеточной стенки, как бы просверливает оболочку клетки. При этом ДНК фага, содержащаяся в его головке, проходит в форме нити через канал хвостового стержня и инъецируется в клетку, а капсидные оболочки фага остаются снаружи бактерии.

Инъецированная внутрь бактерии нуклеиновая кислота подавляет биосинтез компонентов клетки, заставляя ее синтезировать нуклеиновую кислоту и белки фага. Процесс синтеза вирусных белков и репликация фаговых геномов в бактериальной клетке аналогичны процессу репродукции других вирусов, содержащих двунитевую ДНК. РНК-полимераза клетки транскрибирует некоторые гены фаговой ДНК, в результате чего образуются ранние иРНК. Рибосомы клетки транслируют иРНК, при этом синтезируется целый ряд ферментов, включая те, которые необходимы для репликации фаговой ДНК. Репликация двунитевой ДНК фагов протекает в соответствии с общим механизмом репликации. После начала репликации фаговой ДНК начинается синтез поздних вирусных иРНК, в результате трансляции которых образуется второй набор вирусспецифических белков, в том числе капсидных белков фагов.

После образования компонентов фага происходит самосборка частиц: сначала пустотелые капсиды головок заполняются нуклеиновой кислотой, затем сформированные головки соединяются с хвостовыми отростками. При литической инфекции в клетке появляется еще один поздний вирусспецифический белок — фаговый лизоцим. Этот фермент

воздействует на пептидогликановый слой стенки бактерии, делая ее менее прочной. В конце концов под действием внутриклеточного осмотического давления оболочка клетки разрывается и фаговое потомство выходит в окружающую среду вместе с остальным содержимым бактериальной клетки. Весь литический цикл от адсорбции бактериофага на бактерии до его выхода из нее занимает 20—40 мин.

Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой характеризуется определенной степенью специфичности, что явилось основанием для подразделения их на поливалентные фаги, способные взаимодействовать с родственными видами бактерий, моновалентные фаги, взаимодействующие с бактериями определенного вида, и типовые фаги, взаимодействующие с отдельными типами (вариантами) данного вида бактерий.

Умеренные бактериофаги, в отличие от вирулентных, взаимодействуют с чувствительными бактериями либо по продуктивному, либо по интегративному типу. Продуктивный цикл умеренного фага идет в той же последовательности, что и у вирулентных фагов, и заканчивается лизисом клетки. При интегративном типе взаимодействия ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии, причем в строго определенную гомологическую область хромосомы, реплицируется синхронно с геномом размножающейся бактерии, не вызывая ее лизиса. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии, называется профагом, а культура бактерий, содержащих профаг, — лизогенной. Само же биологическое явление сосуществования бактерии и умеренного бактериофага носит название лизогении (от греч. *lysis* — разложение, *genesis* — происхождение). Профаг, ставший частью хромосомы размножающейся бактерии, передается по наследству от клетки к клетке неограниченному числу потомков.

Лизогенные бактерии не образуют структурные вирусные белки и, следовательно, фаговое потомство. В основе сдерживающего механизма репродукции фагов лежит образование в бактерии специфического репрессора — низкомолекулярного белка, подавляющего транскрипцию фаговых генов. Биосинтез репрессора детерминируется генами профага. Наличием репрессора можно объяснить способность лизогенных бактерий приобретать иммунитет (невосприимчивость) к последующему заражению гомологичными или близкородственными фагами. Под иммунитетом в данном случае понимается такое состояние бактерии, при котором исключаются процесс вегетативного размножения вышеуказанных фагов и лизис клетки. Однако термин «лизогения» отражает потенциальную возможность лизиса бактерии, содержащей профаг. Действительно, профаги некоторой части лизогенной культуры бактерий могут спонтанно (самопроизвольно) или направленно под действием ряда физических или химических факторов дерепрессироваться, исключаться из хромосомы и переходить в вегетативное состояние. Этот процесс заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий. Частота спонтанного лизиса бактерий в лизогенных культурах весьма незначительна. Частоту лизиса бактерий можно значительно увеличить, воздействуя на лизогенную культуру индуцирующими агентами: УФ-лучами, ионизирующим излучением, перекисными соединениями, митомицином С и др. Сам же феномен воздействия, приводящий к инаktivации репрессора, называется индукцией профага. Явление индукции используют в генетической инженерии. Однако спонтанный лизис лизогенных культур может нанести вред микробиологическому производству. Так, если микроорганизмы —

продуценты биологически активных веществ — оказываются лизогенными, существует опасность перехода фага в вегетативное состояние, что приведет к лизису производственного штамма этого микроба.

Геном профага может придавать бактерии новые, ранее отсутствовавшие у нее свойства. Этот феномен изменения свойств микроорганизмов под влиянием профага получил название фаговой конверсии (от лат. *conversion* — превращение). Конвертироваться могут морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие свойства бактерий. Например, только лизогенные культуры дифтерийной палочки способны вызвать болезнь (дифтерию), так как содержат в хромосоме профаг, ответственный за синтез белкового экзотоксина.

Умеренные фаги могут быть дефектными, т.е. неспособными образовывать зрелые фаговые частицы ни в естественных условиях, ни при индукции. Геном некоторых умеренных фагов (P1) может находиться в цитоплазме бактериальной клетки в так называемой плазмидной форме, не включаясь в ее хромосому. Такого рода умеренные фаги используют в качестве векторов в генетической инженерии.

Практическое применение фагов. Бактериофаги используют в лабораторной диагностике инфекций при внутривидовой идентификации бактерий, т.е. определении фаговара (фаготипа). Для этого применяют метод фаготипирования, основанный на строгой специфичности действия фагов: на чашку Петри с плотной питательной средой, засеянной «газоном» чистой культурой возбудителя, наносят капли различных диагностических типоспецифических фагов. Фаговар бактерии определяется тем типом фага, который вызвал ее лизис (образование стерильного пятна, бляшки или негативной колонии). Метод фаготипирования позволяет выявить источник инфекции и проследить путь возбудителя от источника до восприимчивого организма (эпидемиологическое маркирование).

По содержанию бактериофагов в объектах окружающей среды можно судить о присутствии в них соответствующих патогенных бактерий. Подобные исследования проводят при санитарномикробиологическом исследовании воды. Например, в системах из поверхностных источников воды перед подачей ее в распределительную сеть определяют наличие колифагов. Колифаги являются одними из санитарно-показательных микробов, характеризующих фекальное загрязнение воды.

Фаги применяют также для лечения и профилактики ряда бактериальных, чаще всего кишечных инфекций. Производят брюшнотифозный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый фаги и комбинированные препараты (кол и протейный, пиобактериофаги и др.). Бактериофаги назначают по показаниям перорально, парентерально или местно в виде жидких, таблетированных форм, свечей или аэрозолей. Отличительной чертой фагов является полное отсутствие у них побочного действия. Однако лечебный и профилактический эффект фагов умеренный, поэтому их необходимо применять в комплексе с другими лечебными и профилактическими мероприятиями. Бактериофаги широко применяют и генетической инженерии в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.