

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

В.В. Лысак
Е.И. Игнащенко

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Рекомендовано
Учебно-методическим объединением
по естественнонаучному образованию
в качестве учебно-методического пособия
для студентов учреждений высшего образования,
обучающихся по специальности
1-31 01 03 «Микробиология»*

МИНСК
БГУ
2016

УДК 579.22(075.8)

ББК 28.4я73

Л88

Рецензенты:

доктор биологических наук *З. М. Алещенкова*;

кандидат биологических наук *Д. А. Новиков*

Лысак, В. В.

Л88 Физиология микроорганизмов : учеб.-метод. пособие / В. В. Лысак, Е. И. Игнатенко. — Минск : БГУ, 2016. — 80 с.
ISBN 978-985-566-286-1.

Приводятся рекомендации для выполнения лабораторных работ по курсу «Физиология микроорганизмов», формы контроля управляемой самостоятельной работы студентов, программа курса.

Предназначено для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1-31 01 03 «Микробиология».

УДК 579.22(075.8)

ББК 28.4я7

ISBN 978-985-566-286-1

© Лысак В. В.,
Игнатенко Е. И., 2016
© БГУ, 2016

ВВЕДЕНИЕ

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

Исследование физиологических процессов, присущих микроорганизмам, имеет важное значение, так как они оказывают активное воздействие на окружающую среду, живой и неживой мир.

Знание физиологии микроорганизмов позволяет целенаправленно использовать их полезные свойства в практической деятельности человека, успешно вести борьбу с вредными микроорганизмами.

Воздействие микроорганизмов на окружающую среду связано с обменом веществ, в процессе которого из внешней среды поступают необходимые организму соединения, а из клеток во внешнюю среду выделяются продукты их жизнедеятельности. В результате этого обеспечивается рост и развитие микроорганизмов. Основными процессами обмена веществ организма являются питание и дыхание.

Процесс питания микроорганизмов имеет ряд особенностей: во-первых, поступление питательных веществ происходит через всю поверхность клетки; во-вторых, микробная клетка обладает исключительно высокой скоростью метаболических реакций; в-третьих, микроорганизмы способны довольно быстро адаптироваться к изменяющимся условиям среды обитания.

Сущность обмена веществ составляют два противоположных и вместе с тем взаимозависимых процесса: ассимиляция (анаболизм – превращение простых веществ в ходе реакций промежуточного обмена в более сложные низкомолекулярные соединения, из которых далее могут синтезироваться полимерные макромолекулы) и диссимиляция (катаболизм – распад сложных питательных веществ на более простые).

В процессе ассимиляции происходит усвоение питательных веществ и использование их для синтеза клеточных структур. При диссимиляции

питательные вещества разлагаются (окисляются). При этом выделяется энергия, необходимая для жизни микробной клетки. Образующиеся низкомолекулярные вещества могут частично выводиться из клетки или использоваться ею для синтетических реакций, включаться в процессы ассимиляции.

Процессы синтеза и распада питательных веществ происходят с участием ферментов. Микроорганизмы содержат набор ферментов (биологических катализаторов), благодаря которым осуществляется функция обмена веществ. По химическому строению, свойствам и механизму действия ферменты микробов сходны с ферментами, образующимися в клетках и тканях животных и растительных организмов. Ферменты микробной клетки локализуются в цитоплазме, периплазматическом пространстве или секретируются в окружающую среду.

РАЗДЕЛ I

ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для роста и размножения микроорганизмов, а следовательно, для их питания необходимы различные химические соединения, растворенные в воде. По количественному вкладу в построение клетки различают макро- и микроэлементы. К макроэлементам относят 10 элементов таблицы Менделеева: углерод, водород, кислород, азот, серу, калий, кальций, фосфор, магний, железо. Микроэлементы нужны микроорганизмам в очень малых (следовых) количествах. Они представлены марганцем, молибденом, цинком, медью, кобальтом, никелем, хлором, бромом и некоторыми другими металлами и неметаллами. Большинство из них содержится в виде примесей в солях макроэлементов или может попадать в питательные среды из стеклянной посуды, воды или воздуха. Все указанные элементы образуют органические и неорганические вещества, входящие в состав микробной клетки.

Как и другие организмы, микроорганизмы состоят из воды, белков, липидов, нуклеиновых кислот, углеводов и минеральных веществ.

На долю воды приходится до 85 % веса микроорганизмов. Она служит средой, в которой протекают все химические реакции, происходящие в клетке. Недостаток воды приводит к нарушению обмена веществ в клетке, а затем к ее гибели.

Белки являются важнейшей составной частью органических веществ, содержащихся в микробной клетке. На долю белков приходится 50 % и более сухого веса микроорганизмов. Белкам принадлежит решающая роль в жизнедеятельности организма, ибо без них немислима сама жизнь.

Липидов в составе бактериальной клетки немного, примерно 5 % сухого веса. Некоторые микроорганизмы содержат липидов значительно больше – до 40 % (например, *Mycobacterium tuberculosis*). Липиды входят в состав цитоплазматической мембраны и ее производных, а также клеточной стенки бактерий, например наружной мембраны, где кроме

бислоя липидов имеются липополисахариды. Липиды могут выполнять в цитоплазме роль запасных веществ. Липиды бактерий представлены фосфолипидами, жирными кислотами и глицеридами. Общее количество их зависит от вида и возраста микроорганизмов. В клетках микроорганизмов липиды могут быть связаны с углеводами и белками, составляя сложный комплекс, определяющий токсические свойства микроорганизмов.

Углеводов бактерии содержат до 30 % от сухого вещества клетки, значительно больше их у грибов — до 60 %. Углеводы используются для построения клеточных стенок, входят в состав тейхоевых кислот, характерных для грамположительных бактерий, и являются энергетическим материалом клетки. У некоторых бактерий могут быть цитоплазматические включения, такие как гликоген, крахмал, гранулоза и др., играющие роль запасных веществ в клетке.

Содержание нуклеиновых кислот в бактериальной клетке зависит от вида бактерий, питательной среды и колеблется в диапазоне 10–30 % сухого вещества. Нуклеиновые кислоты бактерий выполняют функции, аналогичные нуклеиновым кислотам эукариотических клеток: молекулы ДНК в виде хромосом и плазмид отвечают за наследственность, рибонуклеиновые кислоты (матричная, транспортная и рибосомальная) участвуют в биосинтезе белков.

Минеральные вещества — фосфор, натрий, калий, магний, сера, железо, хлор и другие — в среднем составляют 2–14 % сухого вещества. Минеральные вещества играют важную роль в жизнедеятельности микробной клетки: от них зависит величина осмотического давления внутри клетки, состояние цитоплазмы и протекание многих биохимических реакций. Недостаток в питательной среде какого-либо минерального элемента приводит к нарушению обмена веществ в микробной клетке, она прекращает развиваться и погибает.

По потребности в углеводе бактерии делятся на две большие группы: *автотрофы* и *гетеротрофы*.

Микроорганизмы-автотрофы способны получать энергию путем окисления неорганических соединений, они, как правило, используют CO_2 как основной источник, содержащий углерод в наиболее окисленной форме. Поэтому при культивировании автотрофов необходимо обеспечить клетки диоксидом углерода, так как концентрация CO_2 в воздухе не превышает 0,03 % и ее поступление в среду за счет диффузии недостаточно для роста микроорганизмов. В питательные среды для культивирования автотрофов вносят карбонат кальция (CaCO_3), бикарбонат натрия (NaHCO_3) или через питательную среду продувают воздух, обогащенный 1–5 % CO_2 .

Микроорганизмы-гетеротрофы получают углерод из органических соединений. В зависимости от индивидуальных особенностей микроорганизмов источником углерода могут быть различные органические соединения — спирты, углеводы, ароматические соединения, органические кислоты и др.

Гетеротрофы в свою очередь подразделяются на **сапротрофов (метатрофы)**, живущих за счет органических соединений, поступающих в бактериальную клетку из внешней среды, и **паразитов (паратрофы)**, способных утилизировать только продукты метаболизма внутри живого организма. Сапротрофами являются многие бактерии, плесневые грибы и дрожжи. Они способны разлагать различные органические вещества в почве и воде, вызывать порчу пищевых продуктов. К числу паразитов относятся микроорганизмы — возбудители различных заболеваний человека, животных и растений.

Для роста микроорганизмов также необходим азот, который входит в состав органических соединений или солей в разной степени восстановления. Это могут быть соли аммония, нитраты или отдельные аминокислоты. Для удовлетворения потребности бактерий в азоте применяют также продукты неполного расщепления белков животного происхождения: гидролизаты, пептоны и сложные белковые смеси — нативную сыворотку животных, асцитическую жидкость и др.

Большинство сапротрофов в качестве источников азота используют различные белковые вещества, а в отдельных случаях — неорганические азотистые соединения. Паразиты особенно требовательны к источникам азота, они могут существовать лишь за счет белков того организма, в котором паразитируют.

Существуют бактерии, источником азота для которых служит молекулярный азот. Такие бактерии называются азотфиксирующими. В процессе азотфиксации они восстанавливают молекулярный азот до аммиака.

Некоторые микроорганизмы получают минеральные элементы (фосфор, серу, калий, магний, железо) из минеральных солей, другие лучше усваивают эти элементы из органических веществ. Вода и прочие питательные вещества служат источником кислорода и водорода. Источником микроэлементов (меди, цинка, никеля, марганца и других) для микроорганизмов является обычно тот же субстрат, из которого они получают все другие элементы питания.

Кроме углерода, азота и других химических элементов многие бактерии нуждаются в факторах роста, к которым относятся витамины, азотистые основания, аминокислоты и другие биологически активные вещества. По этому признаку микроорганизмы можно разделить на две

группы: *ауксотрофы*, для которых в среде необходимо наличие одного или нескольких факторов роста, и *прототрофы*, не нуждающиеся в них.

В среде обитания бактерий кроме биосинтетического должен находиться и энергетический материал. По способу получения энергии бактерии принято делить на две группы: *хемотрофы* и *фототрофы*. Хемотрофы используют энергию окисления различных соединений. В зависимости от окисляемого субстрата среди хемотрофных организмов выделяют *хемолитотрофы* (окисляют неорганические вещества) и *хемоорганотрофы* (окисляют органические вещества). Фототрофы для удовлетворения энергетических потребностей используют энергию света.

Изучение и практическое применение микроорганизмов связано с необходимостью их выращивания в искусственных условиях. Для этого в лабораториях или на предприятиях разрабатывают питательные среды.

Универсальной питательной среды нет, так как создать питательный субстрат, пригодный для всех микроорганизмов, невозможно в силу специфичности требований различных микроорганизмов.

Лабораторная работа 1 **ИЗУЧЕНИЕ ЗНАЧЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАНИЯ** **ДЛЯ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ** **(на примере гриба *ASPERGILLUS NIGER*)**

З а н я т и е 1. Расчет содержания компонентов в средах **для культивирования гриба *Aspergillus niger***

Для проведения эксперимента используется 11 вариантов питательной среды.

В 1-м варианте (контрольная среда) в состав среды входят все элементы питания, необходимые для грибов (кроме микроэлементов).

Во 2–8-м вариантах исключен какой-либо один элемент питания.

В 9–11-м вариантах добавлен один из микроэлементов.

Варианты питательных сред следующие:

1. Полная питательная среда без микроэлементов (в %):

- сахароза – 10,0;
- NH_4NO_3 – 0,3;
- KH_2PO_4 – 0,2;
- MgSO_4 – 0,05;
- FeSO_4 – 0,01.

2. **Та же среда без углерода.** Исключена сахароза. Для компенсации осмотической активности среды можно внести соответствующее по осмотическому эквиваленту количество хлорида натрия (NaCl), который не оказывает влияния на развитие гриба.

3. **Та же среда без азота.** Исключен NH_4NO_3 .

4. **Та же среда без фосфора.** Исключен KH_2PO_4 , он заменен другой солью, содержащей эквивалентное количество калия, например KCl. При замене одной соли на другую катион замещается калием, анион – хлором; хлор не оказывает влияния на развитие гриба.

5. **Та же среда без калия.** Исключен KH_2PO_4 , он заменен эквивалентным количеством NaH_2PO_4 .

6. **Та же среда без серы.** MgSO_4 и FeSO_4 заменены эквивалентными количествами MgCl_2 и FeCl_3 , закисную соль железа можно заменить окисной.

7. **Та же среда без магния.** MgSO_4 заменяют эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

8. **Та же среда без железа.** FeSO_4 заменен эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

9–11. **Та же среда с добавлением микроэлементов.** В 9-м варианте в состав среды вводят ZnSO_4 , в 10-м – MnSO_4 , в 11-м – H_3BO_3 . Концентрация соли, содержащей микроэлементы, во всех трех случаях – 0,01 %.

Перед составлением питательных сред необходимо рассчитать эквивалентный процент замещающего вещества (для вариантов 4–8).

Если в каждом из вариантов (4–8) исключить какую-либо соль, то одновременно удаляются два элемента питания вместо одного. Например, в варианте 4 (среда без фосфора) при удалении KH_2PO_4 одновременно исключаются фосфор и калий. Поэтому калий необходимо внести в среду в эквивалентном количестве в виде KCl.

Для вариантов 9–11 нужно рассчитать количества вносимых микроэлементов.

Пример расчета. Вариант 4 (среда без фосфора):

KH_2PO_4 (0,2 % в среде) заменяют KCl.

Молекулярная масса KH_2PO_4 – 136 (39 + 2 + 31 + 64), а KCl – 74 (39 + 35).

Сначала определяют содержание (в %) калия в среде (x):

136 г KH_2PO_4 составляют 0,2 %;

39 г К составляют x:

$$x = \frac{39 \cdot 0,2}{136} = 0,06 \text{ (\%)}$$

Затем устанавливают количество KCl (в %) (y), эквивалентное изъятому количеству KH_2PO_4 , по пропорции:

39 г К соответствуют 0,06 % К;

74 г KCl соответствуют y KCl:

$$y = \frac{0,06 \cdot 74}{39} = 0,1 \text{ (\%)}$$

Aspergillus niger – аэробный организм, поэтому при культивировании для создания лучших условий аэрации используют колбы Эрленмейера объемом 250 мл, где содержится 100 мл среды.

Далее необходимо рассчитать количество каждого вещества в граммах в 100 мл среды, зная их процентное содержание.

При проведении расчетов следует учитывать, что многие соли бывают как безводными, так и в виде кристаллогидратов, в которых содержание рассчитываемого элемента ниже.

Пример расчета. Необходимо создать раствор, концентрация KH_2PO_4 в котором составляет 0,2 %, а используемая соль имеет формулу $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Молекулярная масса безводной соли – 136, а кристаллогидрата – 172. Следовательно, кристаллогидрата нужно взять

$$\frac{0,2 \cdot 172}{136} = 0,25 \text{ (\%)}$$

Таким же образом рассчитывают навески всех остальных компонентов среды.

Поскольку навески в большинстве своем очень малы, что затрудняет взвешивание, удобнее использовать готовые растворы:

- 20 % раствор сахарозы;
- 1 % раствор микроэлементов;
- 10 % раствор всех остальных солей.

Для этого нужно определить, сколько миллилитров каждого раствора следует взять, чтобы внести соответствующую навеску.

Пример расчета для NH_4NO_3 :

100 мл 10 % раствора NH_4NO_3 содержит 10 г NH_4NO_3 ;

y мл 10 % раствора NH_4NO_3 содержит 0,3 г NH_4NO_3 ;

$$y = \frac{100 \cdot 0,3}{10} = 3 \text{ (мл)}$$

Подобным образом рассчитывают все ингредиенты (в мл) для каждого из вариантов сред.

Суммируют объемы растворов в каждом варианте и вычитают полученные суммы из 100, рассчитывают количество дистиллированной воды, которое необходимо добавить в каждую колбу. Данные вносят в табл. 1.

Таблица 1

**Соотношение компонентов питательной среды
для культивирования гриба *Aspergillus niger***

Компо- ненты среды		Вариант среды										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Навеска соли, г	NH ₄ NO ₃	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
	KH ₂ PO ₄	+	+	+			+	+	+	+	+	+
	MgSO ₄	+	+	+	+	+			+	+	+	+
	FeSO ₄	+	+	+	+	+		+		+	+	+
	NaCl		+									
	KCl				+							
	NaH ₂ PO ₄					+						
	MgCl ₂						+					
	FeCl ₃						+					
	Na ₂ SO ₄							+	+			
	ZnSO ₄									+		
	MnSO ₄										+	
	H ₃ BO ₃											+
Объем соответствующего раство- ра при составлении среды, мл	сахароза	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	NH ₄ NO ₃	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
	KH ₂ PO ₄	+	+	+			+	+	+	+	+	+
	MgSO ₄	+	+	+	+	+			+	+	+	+
	FeSO ₄	+	+	+	+	+		+		+	+	+
	NaCl		+									
	KCl				+							
	NaH ₂ PO ₄					+						
	MgCl ₂						+					

Компоненты среды		Вариант среды										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Объем соответствующего раствора при составлении среды, мл	FeCl ₃						+					
	Na ₂ SO ₄							+	+			
	ZnSO ₄									+		
	MnSO ₄										+	
	H ₃ BO ₃											+
Объем вносимой H ₂ O (конечный объем среды 100 мл)												

Примечание: в графе «Навеска соли, г» отсутствует сахароза, так как ее масса учитывается только при приготовлении 20 % раствора; «+» — обозначены компоненты, входящие в состав соответствующего варианта среды.

Занятие 2. Приготовление питательных сред для культивирования и посев гриба *Aspergillus niger*

Для составления питательных сред, в которых будут культивировать гриб *Aspergillus niger*, необходимо приготовить:

- 20 % раствор сахарозы;
- 1 % раствор микроэлементов (ZnSO₄, MnSO₄, H₃BO₃);
- 10 % растворы всех остальных солей (NH₄NO₃, KH₂PO₄, KCl, NaH₂PO₄, MgSO₄, MgCl₂, FeSO₄, FeCl₃, NaCl, Na₂SO₄).

Потребуется также колбы на 250 мл, цилиндры на 100 мл, пипетки. Сначала взвешивают все необходимые навески и растворяют их в соответствующих объемах дистиллированной воды.

Затем, зная состав среды и необходимые объемы компонентов, смешивают их в экспериментальных колбах. Все необходимые соли и сахарозу добавляют стеклянными градуированными или автоматическими пипетками.

В колбы со средой вносят споры гриба *Aspergillus niger*. Каждую колбу закрывают ватной пробкой и указывают вариант среды.

Среды перед внесением спор гриба можно не стерилизовать, так как высокая концентрация сахара и кислая реакция за счет кислых солей калия, магния и железа препятствуют росту бактерий.

Для каждого варианта эксперимента желательна двукратная повторность. Опытные колбы помещают в термостат при 28–30 °С.

Результаты эксперимента учитывают спустя 7 суток культивирования.

З а н я т и е 3. Учет результатов культивирования гриба *Aspergillus niger* в питательных средах, содержащих различные компоненты

После 7 суток культивирования гриба *Aspergillus niger* анализируют характер его роста.

По результатам эксперимента составляют табл. 2, где отмечают потребность гриба в различных питательных элементах.

Таблица 2

Характеристика потребности гриба *Aspergillus niger* в различных компонентах питательной среды

№ п/п	Тип питательной среды	Характер роста гриба <i>Aspergillus niger</i>	Вывод о потребности гриба в соответствующем элементе питания
1	Полная питательная среда <i>без микроэлементов</i>		
2	Та же среда <i>без углерода</i>		
3	Та же среда <i>без азота</i>		
4	Та же среда <i>без фосфора</i>		
5	Та же среда <i>без калия</i>		
6	Та же среда <i>без серы</i>		
7	Та же среда <i>без магния</i>		
8	Та же среда <i>без железа</i>		
9	Та же среда <i>с добавлением ZnSO₄</i>		
10	Та же среда <i>с добавлением MnSO₄</i>		
11	Та же среда <i>с добавлением H₃BO₃</i>		

Пленку гриба из первого варианта опыта, характеризующую интенсивность роста гриба, используют в качестве эталона, с которым сравнивают рост во всех остальных вариантах сред.

Рост гриба оценивают визуально. Для получения количественных данных пленку гриба из каждого варианта можно высушить при 105 °С до постоянной массы и взвесить. Вес пленки гриба из колбы с первым вариантом среды принимают за 100 %.

На средах, где исключен тот или иной элемент питания, особенно при большой потребности в нем, гриб не растет или растет очень слабо. В тех случаях, когда элемент требуется в небольших количествах (например, $\text{FeSO}_4 - 0,01 \%$), исключение его из среды мало сказывается на росте клеточной массы, так как гриб может использовать примеси этого элемента, имеющиеся в реактивах. При полном удалении из питательной среды одного из необходимых элементов гриб развиваться не будет.

Лабораторная работа 2 **ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ** **УГЛЕРОДА, АЗОТА, ВИТАМИНОВ** **И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ**

З а н я т и е 1. Изучение влияния различных **источников углерода, азота, витаминов** **и микроэлементов на рост микроорганизмов** **с помощью метода ауксаногрaмм**

Для изучения способности микроорганизма усваивать определенное вещество удобно применять метод ауксаногрaмм, основанный на том, что исследуемое вещество вносят в синтетическую питательную среду, лишенную определенных элементов питания.

Например, при изучении утилизации источников азота используют среду, не содержащую азота, и т. д. Сравнивают интенсивность роста микроорганизма на контрольной среде и на среде, содержащей изучаемое вещество.

Для проведения эксперимента используют следующие питательные среды, растворы исследуемых веществ, материалы и микроорганизмы:

Среда для ауксаногрaммы углеводов (г/л):

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 5 \text{ г};$
- $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1 \text{ г};$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,5 \text{ г};$
- агар – 20 г;
- H_2O дистиллированная – до 1 л.

Среда для ауксанограммы источников азота (г/л):

- глюкоза – 20 г;
- KH_2PO_4 – 1,5 г;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25 г;
- агар – 20 г;
- H_2O дистиллированная – до 1 л.

Среда для изучения усвоения витаминов и микроэлементов (г/л):

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5 г;
- KH_2PO_4 – 1 г;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г;
- глюкоза – 20 г;
- H_2O дистиллированная – до 1 л.

Готовую среду разливают в пробирки по 5 мл.

Суточные культуры микроорганизмов *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*. Из них готовят взвесь с концентрацией $1 \cdot 10^5$ кл/мл.

10 % растворы исследуемых веществ:

- глюкоза, сахароза, лактоза, крахмал, глицерин, лимонная кислота, аминокислоты, пептон, мочевины и т. д.;
- растворы витаминов B_1 , B_2 , B_6 , C в концентрации 0,05 мг/мл;
- растворы микроэлементов ZnSO_4 , MnSO_4 , CoSO_4 , H_3BO_3 в концентрации 5 мг/мл.

Диски из фильтровальной бумаги диаметром 10 мм (стерилизуют в автоклаве в чашках Петри).

Стерильные чашки Петри, пипетки, пинцеты, трафарет (для укладки дисков).

Ауксанограмма источников углерода и азота

Взвесь культуры исследуемых микроорганизмов вносят в расплавленный и охлажденный до 50°C питательный агар из расчета 1 мл взвеси на 10 мл среды. Разливают в чашки Петри по 20 мл. Диски из фильтровальной бумаги смачивают растворами изучаемых веществ. Подсушивают 15 мин в термостате при 37°C . Используя трафарет, раскладывают диски на чашки с соответствующей питательной средой. На каждую чашку укладывают по 6 дисков. Чашки инкубируют при 28°C в течение 5–7 дней, ежедневно отмечая результаты эксперимента. Об усвоении определенного вещества судят по появлению видимого роста микроорганизмов вокруг диска.

Изучение влияния витаминов и микроэлементов на рост культуры

В пробирки с жидкой питательной средой вносят по 0,1 мл раствора изучаемого вещества и по 0,1 мл взвеси исследуемого микроорганизма. Для каждого вещества используют по 2 параллельные пробирки. Две пробирки оставляют в качестве контрольных: их засевают, не внося никаких дополнительных компонентов. Пробирки выдерживают в термостате при температуре 28 °С 5–7 дней. Интенсивность роста культуры на всех средах оценивают нефелометрически. Оптическую плотность определяют на колориметре фотоэлектрическом концентрационном КФК-2, используя 5-миллиметровые кюветы при длине волны 600 нм.

3 а н я т и е 2. Учет результатов. Анализ роста исследуемых микроорганизмов на различных по составу средах

После 7 суток культивирования исследуемых микроорганизмов на экспериментальных средах анализируют характер их роста.

Результаты экспериментов вносят в табл. 3 и 4, где отмечают потребность исследуемых микроорганизмов в различных источниках углерода, азота, витаминов и микроэлементов.

Таблица 3

Ауксанограмма источников углерода и азота

Исследуемое вещество	Используемые микроорганизмы	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Sarcina lutea</i>
Источники углерода					
глюкоза					
сахароза					
лактоза					
крахмал					
глицерин					
лимонная кислота					
Источники азота					
мочевина (CH ₄ N ₂ O)					
пептон ферментативный					

Окончание табл. 3

Исследуемое вещество	Используемые микроорганизмы	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Sarcina lutea</i>
NH_4NO_3					
глутамин					
аспарагин					
аргинин					

Примечание: «+» – наличие зоны роста вокруг диска; «-» – отсутствие зоны роста вокруг диска.

Таблица 4

Влияние витаминов и микроэлементов на рост микроорганизмов

Используемые микроорганизмы	Исследуемое вещество	Интенсивность роста культуры (ОП)		
		пробирка 1	пробирка 2	среднее значение
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	витамин В ₁			
	витамин В ₂			
	витамин В ₆			
	витамин С			
	ZnSO ₄			
	MnSO ₄			
	CoSO ₄			
	H ₃ BO ₃			
	контроль			
<i>Candida utilis</i>	витамин В ₁			
	витамин В ₂			
	витамин В ₆			
	витамин С			
	ZnSO ₄			
	MnSO ₄			
	CoSO ₄			
	H ₃ BO ₃			
	контроль			

Используемые микроорганизмы	Исследуемое вещество	Интенсивность роста культуры (ОП)		
		пробирка 1	пробирка 2	среднее значение
<i>Escherichia coli</i>	витамин В ₁			
	витамин В ₂			
	витамин В ₆			
	витамин С			
	ZnSO ₄			
	MnSO ₄			
	CoSO ₄			
	H ₃ BO ₃			
	контроль			
<i>Sarcina lutea</i>	витамин В ₁			
	витамин В ₂			
	витамин В ₆			
	витамин С			
	ZnSO ₄			
	MnSO ₄			
	CoSO ₄			
	H ₃ BO ₃			
	контроль			

Вопросы для самоконтроля

1. Какие типы питания характерны для микроорганизмов?
2. Какие вещества относятся к факторам роста?
3. На какие группы делятся микроорганизмы по отношению к молекулярному кислороду?
4. Назовите физиологические группы бактерий и их представителей.
5. Дайте определение сидерофорам и укажите их роль в жизнедеятельности бактерий.
6. Какие источники азота могут использоваться микроорганизмами?

РАЗДЕЛ II

МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Метаболизм – совокупность биохимических процессов, протекающих в клетке и обеспечивающих ее жизнедеятельность. Клеточный метаболизм складывается из двух процессов: энергетического метаболизма (катаболизма) и конструктивного метаболизма (анаболизма).

Энергетический метаболизм (катаболизм) – совокупность реакций окисления различных восстановленных органических и неорганических соединений, сопровождающихся выделением энергии восстановительных эквивалентов (атомов водорода, электронов и гидрид-ионов).

Конструктивный метаболизм (анаболизм) – совокупность реакций биосинтеза, в результате которых за счет веществ, поступающих извне, и промежуточных продуктов (амфиболитов), образующихся при катаболизме, синтезируется вещество клеток. Данный процесс связан с потреблением свободной энергии, запасенной в молекулах АТФ или других богатых энергией соединениях, а также восстановительных эквивалентов.

Метаболизм прокариот, как энергетический, так и конструктивный, отличается чрезвычайным разнообразием. Это является результатом использования бактериями в качестве источников энергии и углерода самого широкого набора органических и неорганических соединений. Такая способность обусловлена различиями в наборе клеточных ферментов, катализирующих все жизненно необходимые реакции.

Лабораторная работа 3 ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы. Некоторые из них состоят исключительно из белка. В состав других ферментов кроме белка входит и небелковая часть (простетическая группа), спо-

собная содержать ион металла или органические соединения, имеющие свойства витаминов. Микробная клетка, подобно клеткам высших организмов, оснащена достаточно активным ферментативным аппаратом. Ферменты микроорганизмов обладают теми же свойствами и функциями, что и ферменты высших организмов.

Несмотря на малые размеры микробной клетки, распределение в ней ферментов строго упорядочено. Ферменты энергетического обмена и транспорта питательных веществ локализованы в цитоплазматической мембране и ее производных. Ферменты биосинтеза пептидогликана и других компонентов клеточной стенки локализованы на внешней поверхности цитоплазматической мембраны или в периплазматическом пространстве грамотрицательных бактерий. Многие ферменты не связаны с определенными структурами клетки, а находятся в цитоплазме в растворенном виде.

Ферменты бактерий подразделяются на экзо- и эндоферменты. Эндоферменты функционируют только внутри клетки. Они катализируют реакции биосинтеза и энергетического обмена. Экзоферменты выделяются клеткой в среду и катализируют реакции гидролиза сложных органических соединений до более простых, доступных для ассимиляции микробной клеткой. К ним относятся гидролитические ферменты, играющие исключительно важную роль в питании микроорганизмов. Некоторые экзоферменты являются факторами вирулентности патогенных микроорганизмов. К таким ферментам относятся плазмокоагулаза, нейраминидаза, коллагеназа, лецитиназа, гиалуронидаза и др. Например, гиалуронидаза стрептококков расщепляет гиалуроновую кислоту в мембранах клеток соединительных тканей макроорганизма, что способствует распространению возбудителей и их токсинов в организме, обуславливая высокую инвазивность этих бактерий. Плазмокоагулаза является главным фактором вирулентности стафилококков, так как участвует в превращении протромбина в тромбин, который вызывает образование фибриногена, в результате чего каждая бактерия покрывается пленкой, предохраняющей ее от фагоцитоза.

В зависимости от условий образования ферментов их разделяют на конститутивные и индуцибельные. **Конститутивными** называют ферменты, синтезируемые клеткой вне зависимости от субстрата, на котором развиваются бактерии, например ферменты гликолиза. **Индукцибельные** ферменты синтезируются только при наличии в среде необходимого для клетки субстрата-индуктора. Индуцированный синтез ферментов происходит до тех пор, пока в среде присутствует индуктор. При этом ферменты синтезируются заново во всех клетках одновременно. Индукторами биосинтеза являются многие питательные вещества. К индуцибельным относится большинство гидролитических ферментов.

Известны также ферменты, получившие название *аллостерических*. Кроме активного центра у них имеется регуляторный или аллостерический центр, который в молекуле фермента пространственно разделен с активным центром. Аллостерическим (от греч. *allos* – иной, чужой) он называется потому, что молекулы, связывающиеся с этим центром, по строению (стерически) не похожи на субстрат, но оказывают влияние на связывание и превращение субстрата в активном центре, изменяя его конфигурацию. Молекула фермента может иметь несколько аллостерических центров. Вещества, связывающиеся с аллостерическим центром, называют *аллостерическими эффекторами*. Они влияют на функцию активного центра через аллостерический центр: или облегчают ее, или затрудняют. Соответственно, аллостерические эффекторы называются положительными (активаторы) или отрицательными (ингибиторы). Аллостерические ферменты играют важную роль в тонкой регуляции метаболизма бактерий. Поскольку практически все реакции в клетке катализируются ферментами, регуляция метаболизма сводится к регуляции интенсивности ферментативных реакций.

В начале XX в. предложили называть ферменты по названию субстрата с добавлением суффикса -аза (*amylum* – амилаза, *lipos* – липаза, *protein* – протеиназа). В 1961 г. Международный совет биохимиков (IUB) предложил называть и классифицировать ферменты по типу химической реакции и ее механизму. Согласно действующей номенклатуре ферментов кроме названия введено обозначение ферментов четырьмя цифрами, разделенными точками (например, каталаза – 1.11.1.6). Цифры указывают на классификацию ферментов. Первая цифра обозначает класс фермента (тип катализируемой ферментом реакции), вторая – подкласс (соединения, на которые действует фермент), третья – подподкласс, четвертая – индивидуальный номер фермента.

В соответствии с катализируемыми реакциями все ферменты разделяют на шесть перечисленных ниже классов.

Оксидоредуктазы – ферменты, осуществляющие окислительно-восстановительные реакции. К данному классу ферментов принадлежат различные дегидрогеназы, которые могут окислять спирты в альдегиды или кетоны; некоторые дегидрогеназы способны окислять альдегиды в кислоты. Если в реакции принимает участие кислород, активируемый во время реакции, ферменты называются оксидазами. К ним относятся медьсодержащий фермент аскорбинат-оксидаза и железосодержащие ферменты – гидрогеназы, каталазы, пероксидазы. Гидрогеназы используют молекулярный водород для восстановления различных веществ. Под влиянием каталаза перекись водорода разлагается на воду и молекулярный кислород.

Этим обезвреживается токсическое действие перекисей. При действии пероксидаз происходит окисление ароматических аминов, фенолов и других веществ и расщепление перекиси водорода до воды.

Трансферазы – ферменты, переносящие отдельные функциональные группы веществ в реакциях между молекулами, например метильную группу – CH_3 , аминогруппы – NH_2 (важно в белковом обмене), альдегидные или кетонные остатки (их роль велика в обмене углеводов, они катализируют взаимопревращение сахаров), группы, содержащие фосфор. Так, фермент гексокиназа катализирует реакцию фосфорилирования глюкозы, фруктозы и маннозы у шестого углеродного атома, что играет большую роль в углеводном обмене.

Гидролазы – ферменты, гидролизующие жиры, углеводы и белки с присоединением воды.

Гидролазы, действующие на сложноэфирные связи, называются эстеразами (от *эстер* – эфир). Примером эстераз может служить фермент липаза, катализирующая гидролиз жиров на глицерин и жирные кислоты. Под влиянием эстераз жиры, масла и воск расщепляются на жирные кислоты и спирты.

Гидролазы фосфомоноэфиров называются фосфатазами, сюда же относится образуемая многими микроорганизмами дезоксирибонуклеаза (ДНКаза).

Наиболее обширная и важная группа гидролаз – это гидролазы, действующие на гликозильные соединения. Они осуществляют гидролиз сложных углеводов (крахмала, других полисахаридов, трисахаридов и дисахаридов) до более простых. Амилазы катализируют гидролиз крахмала, причем в зависимости от получаемых конечных продуктов они подразделяются: на α -амилазу, которая гидролизует крахмал в основном до декстринов с небольшой примесью мальтозы; β -амилазу – расщепляет крахмал до мальтозы и небольшого количества декстринов; глюкоамилазу – расщепляет крахмал до глюкозы. Хитиназа расщепляет азотсодержащий полисахарид хитин до хитозана, вискозина и N-ацетилглюкозамина. Хитиназу образуют грибы *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Ascosphaera apis*. В местах скопления насекомых (пасеки) количество хитинорасщепляющих микроорганизмов возрастает, некоторые из них усиливают свои патогенные свойства.

Гидролазы, действующие на пептидные связи, относятся к пептидазам. Они осуществляют разложение белков и пептидов до аминокислот. Сюда относятся все протеолитические ферменты: аминопептидазы, карбоксипептидазы, протеиназы.

Лиазы – ферменты, отщепляющие от субстрата различные группировки негидролитическим путем с образованием двойной связи или присоединяющие группу к двойной связи. У микроорганизмов широко рас-

пространены декарбоксилазы, отщепляющие карбоксильную группу от оксикислот или аминокислот, в результате чего происходит укорочение углеродной цепи. Так, под действием пируватдекарбоксилазы от пирувиновой кислоты отщепляется молекула углекислоты, при этом образуется уксусный альдегид.

Изомеразы – ферменты, осуществляющие внутримолекулярные структурные перестройки в субстратах (например, превращают фосфат глюкозы в фосфат фруктозы).

Существует пять подклассов изомераз в зависимости от типа реакций, которые они катализируют:

- рацемазы и эпимеразы – катализируют превращения стереоизомеров;
- цис-транс-изомеразы – катализируют геометрическую изомеризацию;
- внутримолекулярные оксидоредуктазы – катализируют реакции окисления;
- внутримолекулярные трансферазы – катализируют перенос функциональных групп и молекулярных остатков с одной молекулы на другую;
- внутримолекулярные лиазы – катализируют обратимые реакции образования и разрыва различных химических связей.

Все изомеразы играют очень важную роль в обмене веществ.

Рацемазы аминокислот необходимы бактериям для синтеза из L-изомеров D-аланина и D-глутаминовой кислоты, входящих в состав пептидогликанов. Среди других изомераз, катализирующих превращения аминокислот, хорошо изучена диаминопимелинаэпимераза, катализирующая превращение 2,6-L,L-диаминопимелиновой кислоты в мезо-форму.

В группе эпимераз, катализирующих превращения углеводов, наиболее изучена альдоза-1-эпимераза, участвующая во взаимопревращении α - и β -моносахаридов.

Цис-транс-изомеразы катализируют изомеризацию при двойных связях. Так, малеинат-цис-транс-изомераза катализирует превращение малеиновой кислоты в фумаровую. Внутримолекулярные оксидоредуктазы катализируют окисление одной части молекулы с одновременным восстановлением другой. Некоторые из этих изомераз используют в качестве кофермента, например восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН). Поскольку в результате реакции окисленные продукты не образуются, эти ферменты не причисляются к классу оксидоредуктаз. К изомеразам этой группы относятся ферменты, катализирующие взаимопревращения альдоз и кетоз.

Внутримолекулярные трансферазы катализируют перемещение групп из одного положения молекулы в другое. Относительно хорошо изученный

фермент этой группы фосфоглицерат-фосфомутаза, которая катализирует превращение D-глицерин-2-фосфата в D-глицерин-3-фосфат. Механизм реакции включает гидролитическое расщепление фосфоэфирной связи в положении 2 с образованием фосфорилированного фермента и фосфорилирование глицерина в положение 3 («пинг-понг» механизм). Ряд ферментов этой группы катализирует перемещение аминокрупп. Многие из них в качестве кофактора используют коферментные формы витамина B₁₂.

Внутримолекулярные лиазы катализируют реакции, в которых группа, отделяемая от одной части молекулы, остается в результате превращения ковалентно связанной с другой частью этой же молекулы.

Лигазы (синтетазы) – ферменты, катализирующие присоединение друг к другу двух молекул с образованием ковалентной связи. Этот процесс сопряжен с разрывом фосфоэфирной связи в молекуле АТФ (или других нуклеозидтрифосфатов – гуанозин- или цитозинтрифосфата) или с разрывом макроэргических связей других соединений. В первом случае (при использовании энергии гидролиза АТФ) такие ферменты называют лигазами. В случае, когда источником энергии служит любое другое макроэргическое соединение (не АТФ), ферменты называют синтазами.

Существует пять подклассов лигаз в зависимости от типа связей, которые образуются в результате реакции.

Ферментные способности микроорганизмов широко используются в быту, сельском хозяйстве и промышленности. С помощью микроорганизмов уничтожают вредных насекомых, удобряют почвы, получают молочнокислые продукты (сметана, кефир, ацидофилин, кумыс и др.), сохраняют сельскохозяйственные продукты (квашение капусты, томатов, огурцов и др., силосование кормов для животных), получают ацетон, бутанол, уксусную, молочную, щавелевую, лимонную, масляную кислоты. Их также используют в хлебопечении, виноделии, пивоварении и т. п.

Ферменты микроорганизмов, такие как лигазы и рестриктазы, нашли широкое применение в биотехнологии, в том числе в генетической инженерии.

З а н я т и е 1. Изучение продукции гидролитических ферментов бактериями родов *Escherichia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Sarcina*

Для выявления гидролитической активности микроорганизмов в лабораторной практике используют специальные методы. Микроорганизмы выращивают в питательной среде, содержащей макромолекулярное

соединение. Если клетки образуют экзоферменты, гидролизующие такое соединение, то вокруг колоний формируется зона расщепления субстрата.

Для изучения продукции гидролитических ферментов необходимо приготовить следующие среды и растворы:

Полноценный питательный бульон (г/л):

- питательный бульон — 15 г;
- NaCl — 3 г;
- H₂O дистиллированная — до 1 л.

Компоненты взвешивают, растворяют в 1 л воды, устанавливают рН 7,2. Среду стерилизуют при 1,5 атм в течение 30 мин.

Пептоно-дрожжевой агар (г/л):

- пептон ферментативный — 10 г;
- дрожжевой экстракт — 5 г;
- NaCl — 8 г;
- агар-агар — 15 г;
- H₂O дистиллированная — до 1 л.

Все компоненты, кроме агар-агара, взвешивают и растворяют в дистиллированной воде при нагревании. Устанавливают рН 7,2. Жидкую основу разливают во флаконы по 300 мл и добавляют по 4,5 г агар-агара. Среду стерилизуют при 1,5 атм в течение 30 мин.

2 % водный агар:

- агар-агар — 6 г;
- H₂O дистиллированная — до 300 мл.

Агар-агар взвешивают, вносят во флакон и добавляют 300 мл дистиллированной воды. Среду стерилизуют при 1,5 атм в течение 30 мин.

Солевой концентрат (4х) (г/л):

- NH₄Cl — 20 г;
- NH₄NO₃ — 4 г;
- Na₂SO₄ · 10H₂O — 8 г;
- K₂HPO₄ · 3H₂O — 15,7 г;
- KH₂PO₄ · 3H₂O — 5,6 г;
- MgSO₄ · 7H₂O — 0,4 г;
- H₂O дистиллированная — до 1 л.

Соли последовательно растворяют в небольшом объеме воды, затем растворы в том же порядке сливают и доводят конечный объем до 1 л. Устанавливают рН 7,2–7,4. Раствор стерилизуют при 1,5 атм в течение 30 мин.

Минимальная глюкозо-солевая среда (мл):

- 2 % водный агар — 300 мл;
- солевой концентрат (4х) — 100 мл;
- 20 % раствор глюкозы — 4 мл.

12 % мясо-пептонная желатина:

- полноценный питательный бульон – 100 мл;
- желатина – 12 г.

К жидкой полноценной среде добавляют сухую желатину, размачивают до набухания, затем смесь нагревают на водяной бане до полного растворения желатины и разливают в пробирки по 5–8 мл. Пробирки стерилизуют при 0,5 атм 15 мин.

20 % раствор глюкозы. Стерилизуют при 0,5 атм 15 мин или кипячением на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания воды.

5 % раствор обезжиренного молока. Стерилизуют при 0,5 атм 15 мин или кипячением на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания воды.

2 % раствор крахмала. Стерилизуют при 0,5 атм 15 мин или кипячением на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания воды.

1 % раствор полипектата натрия. Стерилизуют при 0,5 атм 15 мин или кипячением на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания воды.

2 % раствор карбоксиметилцеллюлозы. Стерилизуют при 0,5 атм 15 мин или кипячением на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания воды.

1 М раствор CaCl₂. Раствор стерилизуют при 1,5 атм в течение 30 мин.

0,2 М фосфатный буфер рН 7,6. Раствор стерилизуют при 1,5 атм в течение 30 мин.

Подсолнечное масло. Стерилизуют при 0,5 атм 15 мин.

Кусочки вареного куриного белка. Стерилизуют при 0,5 атм 15 мин.

Определение протеолитической активности заключается в выявлении протеаз, которые катализируют расщепление белков на поли- и олигопептиды. Активность последних определяют, используя в качестве субстратов желатину, казеин и другие белки.

Разжижение желатины. С помощью бактериологической петли биомассу исследуемого микроорганизма засевают уколом в питательную мясопептонную желатину, разлитую в пробирки по 5–8 мл. Посев производят после застывания столбиков, инкубируют при оптимальной температуре 24–72 ч.

Разные виды бактерий определенным образом изменяют «столбик» желатины в пробирке с посевом. Так, при росте холерного вибриона разжижение «столбика» желатины принимает форму гвоздя, при росте стафилококка – чулка, при росте синегнойной палочки наблюдается послойное разжижение среды. Разжижение желатины регистрируют визуально, отмечая при этом интенсивность и характер разжижения (по-

слоистое, мешковидное, пузыристое, в виде ели, повернутой верхушкой вниз, и т. д.).

О наличии протеолитических ферментов может свидетельствовать и *гидролиз казеина*. В этом случае исследуемый микроорганизм засевают в 5 % раствор обезжиренного молока. Посевы инкубируют при оптимальной температуре 24–72 ч. О наличии протеолитической активности судят по образованию сгустка, осадка и др.

Можно использовать агаризованную минимальную глюкозо-солевую среду, содержащую в качестве субстрата обезжиренное молоко. Исследуемые микроорганизмы засевают при помощи петли «медальонами». Посевы инкубируют при оптимальной температуре 24–72 ч. О наличии протеолитической активности судят по образованию зон протеолиза (зон просветления) вокруг колоний исследуемых микроорганизмов.

Для обнаружения протеаз можно использовать мясо-пептонный бульон с кусочком *стерильного куриного белка*. Для этого в пробирку со стерильным мясо-пептонным бульоном (рН 7,2–7,4) прибавляют кусочки вареного куриного белка, нарезанные в форме кубиков с гранями 6–8 мм. Белок куриного яйца нарезают в стерильной посуде и затем стерилизуют в течение 20 мин при температуре 120 °С. Простерилизованные кубики коагулированного белка прибавляют к стерильному бульону, соблюдая асептические условия. Затем в эту же пробирку вносят исследуемую культуру микроорганизма. Посевы просматривают ежедневно в течение 5–7 дней. Протеолитически активные микроорганизмы расщепляют коагулированный яичный белок; кусочки белка, содержащиеся в среде, заметно уменьшаются в размере, превращаясь в крошкообразную массу или полностью растворяясь.

Определение амилолитической активности проводят путем посева микроорганизмов «медальонами» на поверхность полноценной питательной среды, содержащей 0,2 % растворимого крахмала. Через 3–5 суток инкубирования на поверхность среды в чашках Петри наносят раствор Люголя. При отрицательной реакции поверхность остается синей. Если бактерии гидролизуют крахмал, то питательная среда не окрашивается.

Определение целлюлолитической активности заключается в посеве исследуемых микроорганизмов «медальонами» на поверхность минимальной глюкозо-солевой среды, содержащей 0,2 % карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Через 3–5 суток инкубирования на поверхность среды в чашках Петри на 10 мин наносят 0,1 % водный раствор Конго красного. Затем краситель сливают, а чашки несколько раз промывают 8 % раствором NaCl (для вымывания красителя). О наличии целлюлолитической активности судят по размерам светлых зон вокруг макроколоний.

Определение пектолитической активности. На поверхность агаризованной полноценной питательной среды, содержащей ионы Ca^{2+} (для этого к 100 мл среды добавляют 3 мл 1 М раствора CaCl_2), наслаивают 3,5–4 мл 1 % раствора полипектата натрия. После его полимеризации на поверхность образовавшегося геля «медальонами» засевают исследуемые микроорганизмы. О наличии пектолитической активности судят по формированию зон разжижения полипектата натрия.

Определение липолитической активности. Смешивают равные объемы 0,2 М фосфатного буфера pH 7,6 и горячего 3 % (или 2 %) водного агара, добавляют 0,1 % подсолнечного масла, перемешивают 1 мин в гомогенизаторе и разливают в чашки Петри. После застывания и высушивания среды на ее поверхность «медальонами» засевают исследуемые микроорганизмы. Об активности фермента судят по образованию зоны просветления вокруг колонии микроорганизма за счет гидролиза масла.

З а н я т и е 2. Учет результатов. Анализ характера роста и ферментативных активностей исследуемых микроорганизмов на различных субстратах

После 5–7 суток культивирования исследуемых микроорганизмов на экспериментальных средах учитывают характер их роста.

Результаты эксперимента вносятся в табл. 5. На основании полученных данных делают вывод о ферментативной активности исследуемых микроорганизмов.

Таблица 5

Физиолого-биохимические особенности бактерий

Тест или свойство	Наличие ферментативной активности у бактерий родов							
	<i>Escherichia</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Наличие окислительно-восстановительных ферментов</i>								
каталаза								
оксидаза								
дегидрогеназа								
нитратредуктаза								

Тест или свойство	Наличие ферментативной активности у бактерий родов							
	<i>Escherichia</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Протеолитическая активность</i>								
разжижение желатины								
створаживание молока								
образование зон протеолиза								
расщепление коагулированного яичного белка								
образование сероводорода								
образование аммиака								
образование индола								
<i>Амилитическая активность</i>								
<i>Целлюлитическая активность</i>								
<i>Пектолитическая активность</i>								
<i>Липолитическая активность</i>								
<i>Рост на средах Гисса, содержащих</i>								
глюкозу								
лактозу								
сахарозу								
мальтозу								
маннит								

Примечание: «+» или «-» – положительная или отрицательная реакция; «к» – образование кислоты при сбраживании; «г» – выделение газа при сбраживании.

З а н я т и е 3. Получение препаратов амилазы плесневых грибов *Aspergillus niger* и бактерий *Bacillus subtilis*. Проверка их активности

Получение препарата амилазы из плесневых грибов *Aspergillus niger*

Гриб *Aspergillus niger*, синтезирующий амилазу, культивируют в течение 5–6 дней в жидкой среде Чапека при 25–28 °С.

Затем грибную массу отделяют фильтрованием, высушивают в тонком слое на поверхности стекла при 37 °С. Воздушно-сухую массу растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком. 2 г полученного порошка смешивают с 50 мл воды при 37 °С, тщательно перемешивают и настаивают в течение 2 ч при этой же температуре, затем отфильтровывают. В фильтрате содержится комплекс грибных амилаз.

Получение препарата амилазы бактерий *Bacillus subtilis*

Бактерии *Bacillus subtilis* культивируют с аэрацией при 25–28 °С в течение 24–48 ч в жидкой питательной среде Лурия-Бертани (LB), содержащей 1 % растворимого крахмала. Клетки отделяют центрифугированием при 7 тыс. об/мин 5 мин, надосадочную культуральную жидкость используют как источник бактериальных амилаз.

Определение активности фермента

В пробирке смешивают 1 мл полученной надосадочной жидкости *Bacillus subtilis* (или фильтрата *Aspergillus niger*) с 2 мл 1 % раствора крахмала. 20 мкл смеси с помощью автоматической пипетки помещают на предметное стекло, добавляют 20 мкл раствора Люголя. Наблюдают интенсивно синее окрашивание.

Пробирку с реакционной смесью помещают на водяную баню при 40 °С и через каждые 2 мин повторяют отбор проб. По мере расщепления крахмала пробы с иодом будут окрашиваться в различные цвета вследствие образования декстринов разной степени сложности:

- амилаза, присутствующая в крахмале, дает синее окрашивание с иодом (м. м. до 500 000);
- амилодекстрины – сине-фиолетовое (м. м. около 10 000);
- эритродекстрины – красно-бурое (м. м. 4000–6000);
- декстрины, имеющие низкий молекулярный вес, не окрашиваются иодом.

Результаты эксперимента вносят в табл. 6.

Скорость гидролиза крахмала бактериальной (грибной) амилазой

Время гидролиза (мин)	Окрашивание пробы	Продукты гидролиза
0	синее	нет
2		
4		
6		
8		
10		
12		

З а н я т и е 4. Изучение влияния температуры на активность амилазы, продуцируемой микроорганизмами

Влияние температуры на активность амилазы микроорганизмов

Концентрацию раствора амилазы предварительно подбирают таким образом, чтобы в условиях эксперимента полный гидролиз крахмала проходил в течение 10–12 мин.

Для изучения влияния температуры на активность амилазы микроорганизмов используют следующие материалы и оборудование:

- 0,5 % раствор крахмала;
- раствор Люголя;
- 0,1 н ацетатный буферный раствор pH 5,0;
- предметные стекла;
- автоматические пипетки;
- наконечники;
- пробирки;
- стеклянные пипетки;
- водяную баню.

В четыре пробирки наливают по 1 мл буферного раствора и по 0,5 мл раствора крахмала. Одну пробирку ставят на водяную баню при 60 °С, вторую – при 40 °С, третью – при комнатной температуре и четвертую – в ледяную воду. Через 10 мин, когда содержимое пробирок примет заданную температуру, во все пробирки вносят по 0,5 мл раствора фермента, перемешивают и оставляют в тех же условиях. Наблюдение за ходом

гидролиза крахмала ведут по реакции с иодом. Для этого на предметное стекло наносят 20 мкл раствора Люголя и смешивают их с 20 мкл гидролизующей смеси из каждой пробирки, отбирая пробы через 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 мин. Результаты наблюдений вносят в табл. 7.

Таблица 7

**Влияние температуры на скорость гидролиза крахмала
бактериальной (грибной) амилазой**

Температура, °С	Реакция с раствором Люголя по истечении заданного времени, мин									
	1	2	4	6	8	10	12	14	16	
60										
40										
20										
0										

Анализируя полученные данные, делают вывод об оптимальной для активности микробной амилазы температуре.

**З а н я т и е 5. Изучение влияния pH,
активаторов и ингибиторов на активность амилазы,
продуцируемой микроорганизмами**

Влияние pH на активность амилазы микроорганизмов

Для изучения влияния pH на активность амилазы микроорганизмов используют следующие материалы и оборудование:

- 0,5 % раствор крахмала;
- раствор Люголя;
- 0,1 н ацетатный буферный раствор pH 3,0;
- 0,1 н ацетатный буферный раствор pH 5,0;
- 0,1 н фосфатный буферный раствор pH 6,0;
- 0,1 н фосфатный буферный раствор pH 7,0;
- 0,1 н фосфатный буферный раствор pH 8,0;
- предметные стекла;
- автоматические пипетки;
- наконечники;
- пробирки;
- стеклянные пипетки;
- водяную баню.

В пять пробирок вносят по 1 мл буферных растворов и по 0,5 мл раствора крахмала и фермента. Содержимое пробирок перемешивают и помещают на водяную баню при 40 °С. Из каждой пробирки с помощью автоматической пипетки через каждые 2 мин отбирают по 20 мкл пробы и по окрашиванию с иодом судят о степени расщепления крахмала. Наблюдения продолжают до тех пор, пока не исчезнет синяя окраска. Полученные результаты выражают графически: по оси абсцисс наносят значение рН, а по оси ординат – время расщепления крахмала при соответствующем значении рН. Делают вывод об оптимуме рН для данного фермента.

Действие активаторов и ингибиторов на микробную амилазу

Для изучения действия активаторов и ингибиторов на активность амилазы микроорганизмов используют следующие материалы и оборудование:

- 1 % раствор $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- 1 % растворы $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- 0,5 % раствор крахмала;
- 0,1 н ацетатный буферный раствор рН 5,0;
- раствор Люголя;
- предметные стекла;
- автоматические пипетки;
- наконечники;
- пробирки;
- стеклянные пипетки;
- водяную баню.

В три пробирки вносят по 1 мл буферного раствора рН 5,0 по 0,5 мл раствора амилазы. Затем в пробирку 1 добавляют 0,5 мл раствора $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, в пробирку 2 – 0,5 мл $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и в пробирку 3 – 0,5 мл воды (контроль). Далее во все пробирки вносят по 0,5 мл раствора крахмала, ставят их на водяную баню при 40 °С и наблюдают ход гидролиза крахмала по реакции с иодом, отбирая пробы каждые 2 мин. Результаты эксперимента вносят в табл. 8. Анализируя полученные данные, делают вывод о влиянии активатора и ингибитора на скорость ферментативной реакции.

Таблица 8

**Влияние $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
на скорость ферментативного гидролиза крахмала**

Эффектор	Реакция с раствором Люголя по истечении заданного времени, мин									
	1	2	4	6	8	10	12	14	16	
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$										
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$										
H_2O										

З а н я т и е 6. Изучение продукции окислительно-восстановительных ферментов бактериями родов *Escherichia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Sarcina*

Окислительно-восстановительные ферменты осуществляют перенос водорода и кислорода в процессе дыхания. Вещество, отдающее водород, называется донором водорода, а вещество, принимающее водород, — акцептором. Отдающее водород (электрон) вещество окисляется, получающее водород (электрон) — восстанавливается. Для этого типа реакции характерно то, что окисление какого-либо одного вещества всегда сопровождается восстановлением другого. Акцептором водорода чаще всего является кислород воздуха, однако им могут быть также многие органические соединения, способные легко окисляться и восстанавливаться. Из окислительно-восстановительных ферментов дегидрогеназы активизируют водород и переносят его от одной молекулы органического вещества к другой. Оксидазы активизируют молекулярный кислород.

Окислительно-восстановительные ферменты — дегидрогеназу, оксидазу, нитратредуктазу — определяют по изменению органического красителя — акцептора водорода. Каталазу — по способности разлагать субстрат с выделением газа.

Каталаза — фермент класса оксидоредуктаз; катализирует разложение токсичного для живых клеток пероксида водорода на воду и кислород.

Выявление каталазы проводят на предметном стекле в капле 5 % перекиси водорода. Стерильной бактериологической петлей вносят исследуемую культуру и тщательно перемешивают. При наличии каталазы происходит разложение перекиси водорода с выделением пузырьков кислорода.

Оксидазы — группа ферментов из класса оксидоредуктаз, катализирующая реакцию переноса электрона с субстрата на молекулярный кислород, активируя его. Характерны для аэробов и отсутствуют у анаэробов и большинства факультативных анаэробов.

Выявление оксидазы также проводят на предметном стекле. Бактериальную культуру снимают с агаризованной среды деревянной палочкой и вносят в каплю 1 % раствора дигидрохлорида тетраметил-п-фенилендиамина. При положительной реакции в течение 1 мин развивается розово-красная окраска.

Для выявления у микроорганизмов **цитохромоксидазы** на поверхность 18–20-часовой агаровой культуры наносят каплю 1 % водного раствора

пара-диметилфенилендиамина и добавляют каплю 1 % спиртового раствора а-нафтола. При положительной реакции через 1–3 мин появляется ярко-синее окрашивание, обусловленное образованием индофенола синего.

Дегидрогеназы – ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие отщепление водорода от органических веществ. Встречаются во всех живых клетках, участвуя в реакциях углеводного и жирового обмена, а также биологического окисления.

Для выявления дегидрогеназ в пробирку вносят 1 мл суспензии бактерий, добавляют 0,5 мл 3 % раствора 2, 3, 5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). Смесь помещают в термостат на 30 мин. В случае если дегидрогеназы восстанавливают ТТХ, то развивается красное окрашивание трифенилформаза.

С целью выявления ферментов дегидрогеназ и определения их активности в практике микробиологических исследований используют метод, основанный на введении в питательную среду органической краски, выполняющей роль акцептора водорода. В результате присоединения водорода краситель восстанавливается, превращаясь в бесцветное соединение, называемое лейкобазой. При обильном доступе кислорода оно может вновь окислиться и приобрести прежний цвет.

В качестве акцептора водорода используют метиленовый синий, лакмусовую настойку, малахитовый зеленый, индиго-кармин, нейтральный красный и др. Для выявления редуцирующих свойств микроорганизмов указанные красители добавляют к обычным питательным средам (мясопептонному бульону, мясо-пептонному агару, обезжиренному молоку).

Для определения редуцирующей способности дегидрогеназ в 5 мл молока с метиленовым синим засевают петлей исследуемую культуру с плотной питательной среды или 0,1 мл 18-часовой бульонной культуры. Инкубируют 24 ч при оптимальной температуре, учитывая результаты роста. При положительной реакции на редукцию метиленового синего среда из голубой становится кремового цвета, а при слабоположительной – приобретает зеленоватое окрашивание.

Для приготовления молока с метиленовым синим к 100 мл 5 % раствора обезжиренного молока добавляют 2 мл 1 % водного раствора метиленового синего. Приготовленную среду разливают по 5 мл в стерильные пробирки и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин. Среда после остывания имеет насыщенно голубой цвет.

Для определения редуцирующей способности также используют среду Минкевича (лакмусовое молоко – к 100 мл 5 % раствора обезжиренного молока добавляют 5 мл лакмусовой настойки. Разливают по пробир-

кам по 5 мл, стерилизуют 20 мин при температуре 115 °С). В пробирки с лакмусовым молоком засевают петлей исследуемую культуру с плотной питательной среды или 0,1 мл 18-часовой бульонной культуры. Посевы инкубируют в термостате в течение 10 дней, ежедневно наблюдая за изменением цвета среды. Редукция лакмуса проявляется полным обесцвечиванием молока, имеющего до посева розовато-сиреневый цвет. Среда Минкевича позволяет также выявлять кислото- или щелочеобразование, выражающееся соответственно в покраснении или посинении молочной среды.

В результате роста различных видов бактерий лакмусовое молоко изменяет окраску неодинаково. Изменение среды отмечают, пользуясь условными обозначениями:

Н – рост бактерий, не сопровождающийся изменением реакции среды и, следовательно, изменением ее цвета.

К – кислотообразование в среде с четко выраженным ее порозовением.

НК – слабовыраженное кислотообразование, вызывающее изменение оттенка среды, улавливаемое только при сопоставлении опытной пробирки с контрольной (незасеянная среда).

Щ – щелочеобразование, сопровождающееся явно выраженным посинением среды.

НЩ – слабовыраженное щелочеобразование, сопровождающееся изменением оттенка среды, улавливаемое только при сопоставлении ее с цветом контрольной пробирки.

Р – редукция лакмуса, проявляющаяся полным обесцвечиванием лакмуса.

Нитратредуктазы – молибденсодержащие ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие восстановление нитратов до нитритов в процессе ассимиляции нитрата. Ферменты находятся в цитоплазме клетки, их синтез индуцируется в том случае, если нитрат оказывается единственным источником азота в питательной среде. Нитратредуктазы имеются также у анаэробных и факультативно анаэробных бактерий, осуществляющих нитратное дыхание.

Для выявления нитратредуктазы в пробирку с суточной бульонной культурой бактерий вносят 0,1 % калия азотнокислого. После 1 ч инкубирования при температуре 37 °С в пробирку добавляют 0,5 мл реактива Грисса. В положительных случаях среда сразу же окрашивается в красный цвет.

После постановки всех тестов по определению окислительно-восстановительных ферментов результаты экспериментов вносят в табл. 5.

Лабораторная работа 4

УТИЛИЗАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА И ОРГАНИЧЕСКИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

Микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать для поддержания своей жизнедеятельности различные источники углерода. Чтобы выяснить возможность развития микроорганизма за счет тех или иных углеродсодержащих веществ, исследуемые культуры высевают на среды, содержащие в качестве единственного источника углерода различные моно-, ди- и полисахариды, многоатомные спирты, органические кислоты, углеводороды. Из углеводов и многоатомных спиртов изучают, как правило, следующие соединения: глюкозу, фруктозу, арабинозу, ксилозу, рамнозу, маннозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, глицерин, маннит и т. п.

Большинство гетеротрофных микроорганизмов могут усваивать азот органических соединений (белки, пептоны и др.). В процессе ферментативного гидролиза белка выделяются аминокислоты, которые используются клеткой при анаболизме, а также подвергаются расщеплению в результате аэробного окисления или брожения до более простых соединений. В результате этого разложение белков микроорганизмами сопровождается выделением побочных продуктов:

- аммиака – при дезаминировании аминокислот;
- сероводорода – при использовании серосодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин);
- индола – при утилизации триптофана.

Обнаружение подобных продуктов свидетельствует об использовании вышеперечисленных соединений.

З а н я т и е 1. Изучение утилизации микроорганизмами источников углерода и органических азотсодержащих соединений

Определение способности микроорганизмов утилизировать углеводы и спирты на дифференциально-диагностических средах Гисса

В состав сред Гисса входят:

- основной фон (пептон, K_2HPO_4);
- индикатор (бромтимоловый синий, бромкрезоловый пурпурный, феноловый красный);
- исследуемый углевод или спирт.

Основной сред, применяемых для определения ферментации углеводов, является пептонная вода. Мясной бульон для этой цели непригоден, так как он содержит различные углеводы, что может привести к получению неправильных результатов. Среды Гисса используются в жидком или полужидком состоянии. В последнем случае к среде добавляют 0,5 % агара. Готовую среду разливают по 5 мл в пробирки, стерилизуют 30 или 20 мин при температуре 112 °С. Среды Гисса с индикатором Андреде имеют соломенно-желтый цвет, с индикатором бромтимоловым синим – болотно-зеленый (рН 7,0–7,2). В результате роста бактерий, сопровождающегося расщеплением углевода с образованием кислых продуктов распада, цвет среды изменяется: в первом случае она приобретает ярко-розовый цвет; во втором – желтый. Образование газа определяют по появлению на поверхности среды пены или разрывов и пузырьков в толще среды.

С помощью бактериологической петли уколом исследуемый микроорганизм засевают в среду Гисса в пробирках. Инкубируют в течение 3–7 суток при оптимальной температуре. Рост бактерий в полужидкой среде отмечают в месте укола или на поверхности, также регистрируют образование газа и органических кислот. Полученные результаты сравнивают с характером роста в контрольной (фоновой) среде, не содержащей исследуемого соединения.

Определение способности микроорганизмов утилизировать углеводы на агаризованных синтетических средах

На поверхность агаризованной среды с углеводом или спиртом с помощью петли засевают штрихом исследуемые микроорганизмы. Чашки инкубируют при оптимальной для роста температуре. Результаты учитывают по наличию роста культур в сравнении с ростом на контрольной чашке, не содержащей испытуемых соединений.

Данный метод удобен тем, что позволяет одновременно проверить способность нескольких микроорганизмов использовать тот или иной источник углерода. В этом случае дно чашки Петри с наружной стороны разделяют маркером на отдельные сектора, куда засевают петлей каждую из культур микроорганизмов.

Утилизация микроорганизмами органических азотсодержащих веществ

Определение образования индола может быть проведено несколькими способами. Общий принцип заключается в определении одного из промежуточных продуктов разложения триптофана – индола. После выра-

щивания бактерий в течение 7 суток в жидкой полноценной среде, содержащей 0,01 % триптофана, на ее поверхность наслаивают 1–2 мл реактива Эрлиха (пара-диметиламинобензальдегид, растворенный в этаноле и соляной кислоте). При положительной реакции образуется красное кольцо на границе раздела сред (бульонной культуры и реактива Эрлиха).

В качестве индикатора может выступать и фильтровальная бумага, пропитанная насыщенным раствором щавелевой кислоты, которую помещают под пробку. Индикаторная бумага изменяет цвет (с розового на красный) при образовании индола.

Определение образования сероводорода проводят с использованием индикаторной бумаги, пропитанной раствором уксуснокислого свинца. Исследуемую культуру микроорганизмов засевают в пробирку с мясопептонным бульоном. Затем под пробку пробирки закрепляют пропитанную уксуснокислым свинцом полоску индикаторной бумаги для определения сероводорода. При утилизации серосодержащих аминокислот образующийся сероводород вступает в реакцию с бесцветным уксуснокислым свинцом и превращается в сульфид свинца, который придает индикаторной бумаге черно-бурую окраску.

Определение образования аммиака проводят после культивирования бактерий в жидкой полноценной питательной среде с помощью закрепленной под пробкой индикаторной бумаги, пропитанной реактивом Крупа. Об образовании аммиака свидетельствует покраснение бумаги.

Окончательный учет результатов по определению образования индола, аммиака и сероводорода проводят на 7–10-й день после посева, так как процесс ферментативного расщепления белка и образования конечных продуктов распада происходит иногда в течение длительного времени.

После постановки всех тестов результаты вносят в табл. 5.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте ферменты микроорганизмов, обеспечивающие утилизацию питательных веществ.
2. Что такое эндо- и экзоферменты?
3. Приведите примеры конститутивных и индуцибельных ферментов микроорганизмов.
4. Как осуществляется сбраживание аминокислот микроорганизмами?
5. Как осуществляется сбраживание пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами?
6. Какие группы ферментов участвуют в разложении целлюлозы, гемицеллюлозы, крахмала и пектиновых веществ микроорганизмами?

Лабораторная работа 5

ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ВНУТРЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Поступление воды и питательных веществ из окружающей среды и выделение продуктов метаболизма у микроорганизмов происходит через всю поверхность клеток. Транспортируемые вещества должны обладать растворимостью в воде или в липидах, поскольку они могут проникать внутрь микробной клетки только в растворенном виде; продукты метаболизма выводятся из клетки также в растворенном состоянии. Белки, полисахариды и другие биополимеры вначале расщепляются экзоферментами до более простых соединений, которые транспортируются внутрь клетки.

Транспорт минеральных солей в клетку во многом зависит от степени диссоциации их на ионы, рН среды, заряда на поверхности цитоплазматической мембраны (ЦПМ). Если ЦПМ несет положительный заряд, то легче будут проникать отрицательно заряженные ионы.

Основными структурами, регулирующими поступление веществ в бактериальную клетку, являются клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана. Капсулы и слизистые чехлы – очень рыхлые структуры, которые не оказывают значительного влияния на транспорт. Клеточная стенка грамположительных бактерий – барьер для макромолекул (белков, полисахаридов, полинуклеотидов и т. д.), но легко пропускает мономеры. Это связано с величиной пор клеточной стенки.

Получается, что основным осмотическим барьером клетки является полупроницаемая ЦПМ, через которую вода проникает лучше, чем соли; мембрана также обладает избирательной проницаемостью для различных растворенных веществ.

Условно выделяют четыре механизма транспорта веществ внутрь бактериальной клетки: простую диффузию, облегченную диффузию, активный транспорт, транслокацию группы.

Простая (пассивная) диффузия – наиболее простой механизм транспорта, при котором вещества поступают в клетку за счет диффузии по градиенту концентрации, т. е. вследствие того, что концентрация веществ различается по обе стороны цитоплазматической мембраны. Молекулы воды, некоторых газов (O_2 , H_2 , N_2), ионы, концентрация которых во внешней среде выше, чем в клетке, перемещаются через ЦПМ внутрь клетки таким путем. Пассивный перенос осуществляется до тех пор, пока концентрация веществ по обе стороны ЦПМ не станет одинаковой. Это основная механизм поступления воды внутрь клетки.

Облегченная диффузия – также происходит по градиенту концентрации, но с участием ферментов-переносчиков, так называемых пермеаз.

Этот фермент присоединяет к себе молекулы вещества на внешней стороне цитоплазматической мембраны и отдает его на внутренней стороне в неизменном виде. Затем свободный переносчик перемещается снова к наружной стороне мембраны, где связывает новые молекулы вещества. При этом каждая пермеаза обладает строгой специфичностью, т. е. переносит какое-то определенное вещество. Поэтому в клетку проникают только те вещества, для которых есть переносчик. В этом проявляется избирательность транспорта через ЦПМ.

Два данных механизма переноса не требуют энергетических затрат, и вещества перемещаются от зоны более высокой концентрации к более низкой.

Однако клетке необходимо накапливать вещества, что связано с транспортом против градиента концентрации и затратами энергии.

Активный транспорт также происходит с участием пермеаз, причем осуществляется против градиента концентрации. Микробная клетка может накапливать вещества в концентрациях, в тысячи раз превышающих их содержание во внешней среде. Такой процесс требует затрат энергии, которая расходуется на модификацию переносчика, что снижает его сродство к субстрату и препятствует его выводу из клетки.

Активный транспорт может осуществляться системами, генерирующими трансмембранный электронный потенциал (ТЭП) (дыхательная и фотосинтетическая цепи, декарбоксилазы, H^+ -АТФазы и др.), и системами, использующими ТЭП при транспорте органических и неорганических субстратов. Вторые системы распространены шире и работают по трем основным механизмам:

- **унипорт** — катионы поступают в клетку по градиенту электрического потенциала;
- **симпорт** — незаряженные соединения поступают в клетку совместно с катионами H^+ или Na^+ ;
- **антипорт** — анионы поступают в клетку, присоединяя такое количество катионов, при котором комплекс становится заряженным. При этом анионы внешней среды могут обмениваться на внутриклеточные.

Транслокация группы — это активный перенос с участием пермеаз, который сопряжен с химической модификацией транспортируемых молекул, приводящей к неспособности модифицированного вещества взаимодействовать с белком-переносчиком на внутренней стороне мембраны. Например, ряд углеводов, поступающих в бактериальную клетку, фосфорилируется. Источником фосфатной группы выступает фосфоенолпируват, от которого фосфат через систему белков-переносчиков попадает на транспортируемый сахар или многоатомный спирт. Фосфорилирование сопряжено с энергетическими затратами, но это все равно выгодно для бактериальной клетки.

Выход веществ из клетки происходит путем пассивной или облегченной диффузии с участием пермеаз.

При культивировании микроорганизмов питательные среды могут содержать несколько различных источников углерода и энергии, однако это не приводит к синтезу всех ферментов, необходимых для их катаболизма. Сначала утилизируется наиболее энергетически выгодный субстрат, который поддерживает максимальную скорость роста. Для многих микроорганизмов это глюкоза.

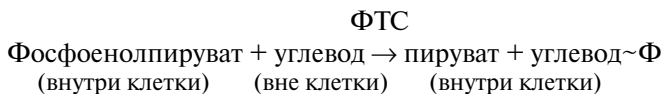
В клетках существуют определенные механизмы, обеспечивающие первоочередной транспорт и утилизацию глюкозы. Одновременно глюкоза может влиять на утилизацию других субстратов, вызывая катаболитную репрессию или исключение индуктора, что в свою очередь обуславливает диауксию – двухфазный рост на средах, содержащих в качестве источников углерода и энергии пару каких-нибудь соединений, например глюкозу и лактозу. В этом случае клетки сначала утилизируют глюкозу, обеспечивающую максимальную скорость роста, а после ее истощения – лактозу.

Явление катаболитной репрессии играет важную роль в промышленной микробиологии. Синтез многих ферментов и антибиотиков подвержен репрессии легко усваиваемыми субстратами. Поэтому получение мутаций, сообщающих клеткам устойчивость к катаболитной репрессии, имеет большое практическое значение.

Рассмотрим явление катаболитной репрессии на примере бактерий *E. coli*.

У представителей семейства Enterobacteriaceae, к которым относятся и *E. coli*, транспорт ряда сахаров и их производных осуществляется фосфоенолпируватзависимой фосфотрансферазной системой (ФТС). ФТС-сахарами являются глюкоза, фруктоза, манноза, гекситолы, β-глюкозиды, N-ацетилглюкозамин, сорбоза, сахароза, трегалоза и целлобиоза. Не ФТС-сахара – лактоза, мелибиоза, глицерин, рамноза, ксилоза и интермедиаты цикла Кребса.

ФТС транспортирует углеводы внутрь клетки, одновременно их фосфорилируя. Условно процесс транспорта можно выразить следующей схемой:



Белки-переносчики передают фосфат от фосфоенолпирувата на углевод. Отсутствие транспортируемого углевода может приводить к накопле-

нию фосфорилированных белков-переносчиков, которые, взаимодействуя с клеточными белками, влияют на их активность. Поэтому наличие или отсутствие субстрата ФТС может оказывать воздействие на такие процессы, как хемотаксис, индукция катаболитных оперонов, метаболизм азота, компетентность и вирулентность.

ФТС представлена ферментом I (EI), HPr (histidine protein) и ферментом II (EII). EII обычно состоит из трех-четырех субъединиц (обозначаемых EIIA, EIIB, EIIC и EIID), которые могут быть либо доменами одного белка, либо отдельными белками. У *E. coli*. EII состоит из трех субъединиц A, B и C. EIIA растворен в цитоплазме, EIIB и EIIC «заякорены» в цитоплазматической мембране таким образом, что EIIC пронизывает мембрану, а EIIB повернут в цитоплазму. Белок EII является субстратспецифичным и обеспечивает транспорт конкретных углеводов. За распознавание субстрата отвечает субъединица EIIC, она является пермеазой.

Белки EI и HPr растворены в цитоплазме, они обеспечивают транспорт всех ФТС-сахаров и поэтому являются общими белками ФТС. Схема транспорта углеводов приведена на рисунке.

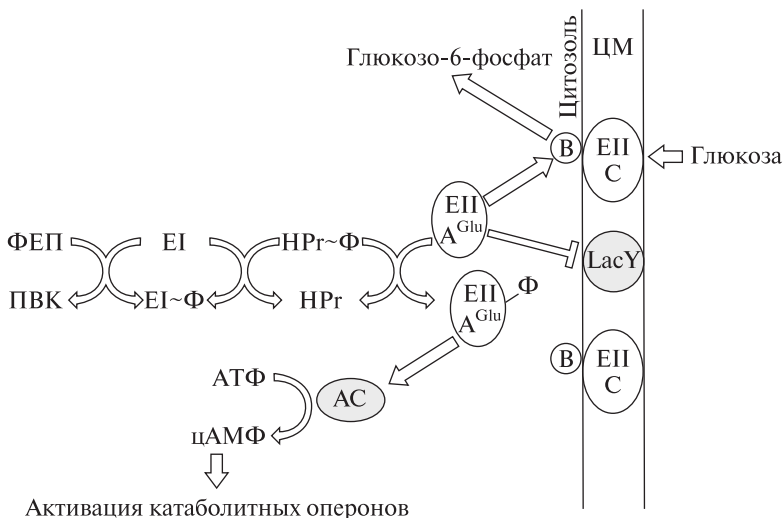


Схема транспорта, сопряженного с фосфорилированием, на примере фосфонолпивируватзависимой фосфотрансферной системы бактерий *E. coli*:

АС – аденилатциклаза; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат (по Е. А. Николаичуку, 2007)

Транспорт ФТС-сахаров начинается с димеризации и автофосфорилирования белка EI по His-189 (гистидиновый аминокислотный остаток, являющийся 189-м с N-конца белка EI). Донором фосфата выступает фосфоенолпируват, превращающийся в пировиноградную кислоту. Далее EI~P фосфорилирует HPr по остатку His-15, после чего фосфорилированный белок HPr~P передает фосфат на один из сахар-специфических белков (или доменов) ЕПА так же по гистидиновому остатку, откуда фосфат переносится на цистеин (Cys) мембранного белка ЕПВ, который уже передает фосфат на транспортируемую глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата.

Пермеаза ЕПС с высокой частотой связывает и транспортирует свой субстрат. Если ЕПВ не фосфорилирован, то субстрат очень медленно может передаваться через мембрану путем облегченной диффузии.

Экспериментально доказано, что процесс фосфорилирования белков-переносчиков обратим, так как он не связан с затратами энергии. Энергия расходуется при передаче фосфата на транспортируемый сахар непосредственно после его проникновения в цитоплазму, что делает весь процесс необратимым и «удерживает» сахар внутри клетки.

Гены, кодирующие общие компоненты ФТС, объединены в *pts*-оперон, а гены, отвечающие за синтез субстратспецифических белков, как правило, объединены с генами соответствующих катаболических ферментов, обеспечивающих утилизацию конкретного субстрата. Чаще всего субстрат является индуктором всего оперона.

В состав *pts*-оперона *E. coli* входят три гена: *ptsH* (кодирует HPr), *ptsI* (EI), *crr* (ЕПАGlu). Экспрессия оперона возрастает в три раза при росте на субстратах ФТС и зависит от наличия комплекса белка-активатора катаболизма (БАК) с цАМФ. Анаэробный рост также усиливает экспрессию оперона и свидетельствует о том, что ФТС — основной механизм транспорта углеводов в условиях анаэробнозиса.

Доказано, что ФТС обладает не только транспортной, но и регуляторной функцией. Это связано со степенью фосфорилирования ЕПАGlu, который может быть в фосфорилированной или дефосфорилированной форме. Степень фосфорилирования этого белка зависит от наличия глюкозы в среде. Поскольку процесс фосфорилирования обратим, то при наличии глюкозы в среде культивирования концентрация дефосфорилированного белка ЕПАGlu будет выше, чем фосфорилированного ЕПАGlu~P, так как фосфат активно передается на транспортируемый сахар. В таком состоянии ЕПАGlu связывается с некоторыми ферментами, обеспечивающими метаболизм углеводов (например, переносчиками лактозы и мелибиозы, глицеролкиназой). ЕПАGlu взаимодействует с белком-переносчиком в тот момент, когда он распознает субстрат. Это приводит

к конформационным изменениям транспортера, что в свою очередь препятствует транспорту и последующей утилизации субстрата. Такое явление называется «исключение индуктора».

При отсутствии глюкозы в клетке накапливается ЕПАGlu~P, который участвует в активации аденилатциклазы, что приводит к повышению уровня цАМФ в клетке, а цАМФ в комплексе с БАК необходим для активации транскрипции многих катаболитных оперонов. Таким образом, регулируя уровень цАМФ, белок ЕПАGlu~P может влиять на синтез ферментов, обеспечивающих катаболизм различных углеводов.

Возникает вопрос: если регуляторной функцией обладает только один белок ФТС – ЕПАGlu, то как другие ФТС-сахара ингибируют утилизацию не ФТС-сахаров? При росте *E. coli* на неФТС-сахарах общие белки ФТС будут находиться в фосфорилированном состоянии, так как не могут передавать фосфат на транспортируемый сахар. Добавление ФТС-субстрата вызовет дефосфорилирование общих белков ФТС с последующим переносом фосфата от ЕПАGlu~P к специфическим транспортерам, поскольку реакция фосфорилирования обратима. В результате повысится уровень ЕПАGlu, что приведет к ингибированию транспорта не ФТС-сахаров вследствие исключения индуктора, а активность катаболитных оперонов снизится из-за понижения уровня цАМФ, так как понизится активность аденилатциклазы.

З а н я т и е 1. Изучение катаболитной репрессии на примере представителей семейства Enterobacteriaceae бактерий *Dickeya dadantii*

Для изучения явления катаболитной репрессии используются три штамма фитопатогенных бактерий *Dickeya dadantii*, обладающих способностью синтезировать пектолитические ферменты:

- *Dickeya dadantii* ENA49 – штамм дикого типа, чувствительный к катаболитной репрессии;
- *Dickeya dadantii* ENA49/50 – мутантный штамм, дефектный по гену *ptsI* (кодирует EI), нечувствительный к катаболитной репрессии;
- *Dickeya dadantii* ENA 49/50(R'*ptsI*⁺) – *ptsI*-мутант, несущий в составе плазмиды pULB113 *ptsI*⁺-ген *E. coli*. Чувствителен к катаболитной репрессии.

Микроорганизмы, используемые в эксперименте, параллельно засевают на три среды:

1. Способность исследуемых микроорганизмов утилизировать глюкозу проверяют на среде ЕМВ, состоящей из полноценной агаризованной

среды, в которую добавлены по 1 мл 1 % раствора эозинового красного и метиленового синего и 20 % раствора глюкозы. Бактерии засевают «медальонами», культивируют 24–48 ч при оптимальной температуре. Колонии бактерий, утилизирующих глюкозу, окрашиваются в темно-фиолетовый металлически блестящий цвет, а если бактерии не утилизируют сахар, то колонии вырастают розовыми.

2. Способность исследуемых микроорганизмов синтезировать пектатлиазы проверяют на полноценной питательной среде, содержащей ионы Ca^{2+} (для этого к 100 мл среды добавляют 3 мл 1 М раствора CaCl_2), на поверхность которой наслаивают 3,5–4 мл 1 % раствора полипектата натрия. Бактерии засевают «медальонами», культивируют 24–48 ч при оптимальной температуре. О наличии пектолитической активности судят по появлению зон разжижения полипектата натрия.

3. Для определения влияния глюкозы на экспрессию генов, обеспечивающих синтез пектатлиаз, используют среду с наложенным полипектатом натрия и избыточным содержанием глюкозы (1 %). Исследуемые микроорганизмы засевают «медальонами», культивируют 24–48 ч при оптимальной температуре. О наличии катаболитной репрессии судят по отсутствию зон разжижения полипектата натрия вокруг колоний чувствительных микроорганизмов.

3 а н я т и е 2. Учет результатов. Выявление штаммов, чувствительных к катаболитной репрессии

После культивирования исследуемых микроорганизмов на экспериментальных средах анализируют характер их роста.

Результаты эксперимента вносят в табл. 9, делают вывод о влиянии глюкозы на способность синтезировать пектатлиазы у исследуемых микроорганизмов.

Таблица 9

Изучение катаболитной репрессии у бактерий *Dickeya dadantii*

Штамм \ Свойство	Среда ЕМВ	pel	pel + glu
<i>Dickeya dadantii</i> ENA49			
<i>Dickeya dadantii</i> ENA49/50			
<i>Dickeya dadantii</i> ENA 49/50(R'ptsI ⁺)			

Примечание: в графе «среда ЕМВ» указывается цвет колоний; в графах «pel» и «pel + glu» указывается диаметр зоны разжижения полипектата натрия.

Вопросы для самоконтроля

1. Опишите индуцибельный и репрессибельный механизмы контроля оперонов на примере лактозного и триптофанового оперонов бактерий *E. coli*.
2. Рассмотрите явление катаболитной репрессии, диауксию, роль белка БАК и цАМФ в регуляции работы индуцибельных оперонов.
3. Предложите способы повышения выхода целевого продукта – аминокислот, ферментов, вторичных метаболитов и т. д. – на уровне оперона.

Лабораторная работа 6 ИЗУЧЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА МОЛОЧНУЮ КИСЛОТУ. МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Молочнокислые бактерии относятся к семействам *Lactobacillaceae* и *Streptococcaceae*. Хотя эта группа морфологически гетерогенна (включает длинные и короткие палочки, а также кокки), но в физиологическом отношении она достаточно однородна. Относящиеся к ней бактерии грамположительны, не образуют спор (за исключением *Sporolactobacillus inulinus*) и в подавляющем большинстве неподвижны. Все они используют в качестве источника энергии углеводы и выделяют молочную кислоту. В отличие от представителей семейства *Enterobacteriaceae*, тоже образующих лактат, молочнокислые бактерии не могут синтезировать АТФ за счет дыхания, они способны только к брожению, так как не содержат гемопротеины, такие как цитохромы и каталаза. Несмотря на это, молочнокислые бактерии могут расти при наличии кислорода воздуха, будучи факультативными анаэробами. Если бактерии растут в аэробных условиях, но не образуют каталазу, их с большой вероятностью можно отнести к молочнокислым бактериям.

Еще один отличительный признак молочнокислых бактерий – это их потребность в факторах роста. Ни один представитель этой группы не может расти на среде с глюкозой и солями аммония. Большинство из них нуждаются в витаминах (лактофлавин, тиамин, пантотеновая, никотиновая и фолиевая кислоты, биотин) и аминокислотах, а также в пуринах и пиримидинах. Культивируют эти бактерии преимущественно на сложных средах, содержащих относительно большое количество дрожжевого экстракта, томатного сока, молочной сыворотки и даже крови.

С одной стороны, молочнокислые бактерии – это своего рода «метаболические инвалиды», которые, вероятно, в результате своей специали-

зации (рост в молоке и других средах, богатых питательными и ростовыми веществами), утратили способность к синтезу многих метаболитов. С другой стороны, большинство из них обладают способностью, которой нет у большинства других микроорганизмов: они могут использовать молочный сахар (лактозу). В этом они сходны со многими кишечными бактериями (например, *E. coli*). Лактоза в растительном царстве, по-видимому, не встречается; она образуется у млекопитающих, выделяется с молоком и соответственно с ним же поглощается. Таким образом, способность использовать лактозу можно считать приспособлением к среде, характерной для кишечника млекопитающих.

Отличительная физиологическая особенность молочнокислых бактерий — их высокая устойчивость к кислоте, что является следствием характерного для них энергетического метаболизма. Способность молочнокислых бактерий образовывать и переносить довольно высокие концентрации молочной кислоты имеет важное селективное значение, поскольку такое свойство дает им возможность успешно конкурировать с большинством других бактерий в средах, богатых питательными веществами.

Молочнокислые бактерии можно разделить на две физиолого-биохимические подгруппы, различающиеся по продуктам, которые образуются из глюкозы в результате брожения.

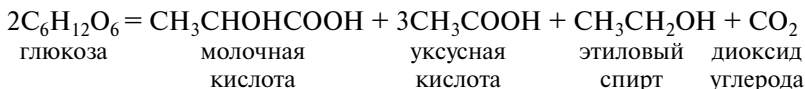
Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют практически только молочную кислоту (она составляет не менее 90 % всех продуктов брожения). К ним относятся бактерии видов *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* и др.

Уравнение реакции:



Гетероферментативные молочнокислые бактерии образуют смесь молочной кислоты (около 60–70 %), этанола и CO_2 , а иногда и уксусной кислоты. К ним относятся *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum*, *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *Bifidobacterium bifidum* и др.

Уравнение реакции:



Согласно современным представлениям гомо- и гетероферментативные молочнокислые палочки отличаются по механизму расщепления углеводов. Гомоферментативные виды содержат фермент альдозу, но лишены пентозофосфокетолазы. В связи с этим молочнокислое бро-

жение у них протекает по гликолитическому пути. У гетероферментативных культур, наоборот, нет альдолазы и триозофосфатизомеразы, но есть пентозофосфокетолаза, поэтому расщепление углеводов здесь происходит исключительно по пентозофосфатному пути.

Распространение молочнокислых бактерий в природе определяется их сложными потребностями в питательных веществах и способом получения энергии (только брожение). Эти бактерии почти никогда не обнаруживаются в почве или водоемах. В естественных условиях они встречаются:

а) в молоке, местах его переработки и молочных продуктах (*Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Lactococcus lactis*, *Streptococcus diacetilactis* и др.);

б) на поверхности растений как эпифитная микробиота и на разлагающихся растительных остатках (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Lactococcus lactis*; *Leuconostoc mesenteroides* и др.);

в) в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных как представители нормальной микробиоты (*Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium bifidum*; *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *S. bovis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* и др.).

Если нестерильный раствор, содержащий наряду с сахарами сложные источники азота и факторы роста, оставить без доступа воздуха или просто налить в сосуд достаточно большое количество такого раствора, то вскоре в нем появятся молочнокислые бактерии. Они снижают pH до значений меньше 5 и тем самым подавляют рост других анаэробных бактерий, которые не могут развиваться в кислой среде. Благодаря своему стерилизующему и консервирующему действию, основанному на подкислении среды, молочнокислые бактерии используются в сельском и домашнем хозяйстве, в молочной промышленности.

Приготовление силоса. Молочнокислые бактерии, обитающие на растениях, играют большую роль при запасании впрок кормов для скота. Для приготовления силоса используют листья сахарной свеклы, кукурузу, картофель, травы и люцерну. Растительную массу прессуют и прибавляют к ней мелассу для повышения отношения C/N и муравьиную или какую-либо неорганическую кислоту, чтобы заранее обеспечить преимущественный рост лактобацилл и стрептококков. В таких условиях происходит контролируемое молочнокислое брожение.

Приготовление кислой капусты. В приготовлении кислой капусты тоже участвуют молочнокислые бактерии. В мелко нарезанной, посыпанной солью (2–3 %) и спрессованной белокочанной капусте при исключении доступа воздуха начинается спонтанное молочнокислое брожение, в котором принимает участие сначала *Leuconostoc mesenteroides* (с образованием CO₂), а затем *Lactobacillus plantarum*.

Молочнокислые продукты. Молочнокислые бактерии, образующие молочную кислоту и придающие продуктам определенный вкус, находят широкое применение в молочной промышленности. Стерилизованное или пастеризованное молоко или же сливки сбраживают, прибавляя в качестве закваски чистые («стартовые») культуры молочнокислых бактерий. Кисломолочное масло готовят из сливок, сквашенных с помощью *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* и *Leuconostoc cremoris*. Образующийся в процессе брожения диацетил придает маслу специфический аромат. Закваски, содержащие *Lactococcus lactis* или *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, вызывают свертывание казеина в процессе приготовления творога и немецких сыров (гарцский и майнцский). При изготовлении твердых сыров (в отличие от сыров из кислого молока) для свертывания казеина пользуются сычужным ферментом. Молочнокислые бактерии (*Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*) вместе с пропионовокислыми участвуют лишь на стадии созревания сыров. Йогурт получают из пастеризованного гомогенизированного цельного молока, инокулированного *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*. Кефир принадлежит к молочнокислым продуктам, содержащим кислоты и этанол; его получают из молока (коровье, овечье или козье). Закваску готовят на так называемых кефирных зернах, содержащих лактобациллы, стрептококки, микрококки и дрожжи.

Чистую молочную кислоту, используемую для различных целей в пищевой, текстильной, фармацевтической промышленности, а также в качестве добавки к пищевым продуктам, получают в результате брожения. Молоко или сыворотку сбраживают при помощи *Lactobacillus casei* или *L. bulgaricus*. Для сбраживания глюкозы и мальтозы применяют *L. delbrueckii*, *L. leichmannii* или *Sporolactobacillus inulinus*. Источником необходимых факторов роста служат меласса и солод.

Образование молочной кислоты в кислом тесте, которая применяется для его подъема, тоже обеспечивается молочнокислыми бактериями, в частности *Lactobacillus plantarum* и *L. coryneformis*.

Чистые культуры лактобацилл и микрококков используются также для приготовления сыровяленых и сырокопченых колбас (салями, сервелат). Образуя молочную кислоту и снижая рН, молочнокислые бактерии предохраняют от порчи те виды колбас, которые не подвергаются варке.

Молочнокислые бактерии могут играть и отрицательную роль, вызывая порчу пива, фруктовых соков, мяса и других продуктов. В эту группу входят и патогенные для человека и животных бактерии. Они растут на средах сложного состава с сывороткой или эритроцитами (сывороточный или кровяной агар).

З а н я т и е 1. Получение накопительной культуры молочнокислых бактерий

При изучении молочнокислого брожения лучшая питательная среда — молоко. В нем есть все необходимые для развития молочнокислых бактерий питательные элементы. Благодаря образованию больших количеств молочной кислоты, к которой сами они в значительной степени толерантны, молочнокислые бактерии при подходящих условиях могут довольно быстро размножаться, вытесняя другие микроорганизмы. «Естественные накопительные культуры» этих бактерий содержатся в кислом молоке и молочных продуктах, кислом тесте, кислой капусте, силосе и т. п.

Критические значения рН среды для развития разных групп бактерий следующие:

- молочнокислые — 4,0–3,5;
- маслянокислые — 5,0–4,7;
- гнилостные — 5,5–5,0.

Молоко разливают в колбы Эрленмейера на 250 мл приблизительно по 100 мл и закрывают ватными пробками.

Параллельно выполняют второй вариант эксперимента. Разливают молоко в колбы, закрывают их ватными пробками, ставят на асбестовые сетки и доводят до кипения.

Колбы с кипяченым и некипяченым молоком помещают в термостат при 30 °С. Через 10–12 ч свежее (некипяченое) молоко скисает. В колбе образуется ровный плотный сгусток без следов газа, если в эксперименте используют хорошее молоко. Сгусток получается вследствие того, что молочная кислота реагирует с казеинатом кальция и казеиновая кислота выпадает в осадок.

Молочнокислые бактерии не образуют спор, поэтому в кипяченом молоке они погибают, споры же маслянокислых бактерий сохраняются. При инкубировании в термостате эти споры прорастают, и вегетативные клетки осуществляют маслянокислое сбраживание лактозы. В результате реакции масляной кислоты с казеинатом кальция в этом варианте также выпадает в осадок казеиновая кислота, которая в дальнейшем подвергается пептонизации. В итоге сыворотка приобретает кремовый цвет, неприятный запах масляной кислоты (запах пота) и прогорклый вкус.

Для выделения молочнокислых бактерий можно использовать пептонно-дрожжевой агар с добавлением 2–3 % CaCO_3 . Исследуемые образцы засевают шпателем на поверхность агаризованной среды. В связи с образованием большого количества молочной кислоты питательная среда для молочнокислых бактерий должна быть хорошо забуферена. Чаше

всего с этой целью используют карбонат кальция. Получают так называемый меловой агар. На этой среде образование кислоты молочнокислыми бактериями обнаруживается по прозрачным ореолам вокруг колоний.

З а н я т и е 2. Микроскопирование молочнокислых бактерий

Если простокваша долго сохраняется при комнатной температуре, то на ее поверхности появляется белая бархатистая морщинистая пленка. Такая же пленка обычно бывает на поверхности рассола при квашении огурцов, капусты и других овощей. Это молочная плесень – *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), которая всегда сопутствует молочнокислому брожению, являясь его нежелательным спутником. Окисляя молочную кислоту, образуемую молочнокислыми бактериями, до CO_2 и H_2O , молочная плесень снижает кислотность. В результате в среде развиваются гнилостные бактерии, а кисломолочные и квашенные продукты начинают портиться.

Молочная плесень – аэробный микроорганизм, поэтому она бывает только на поверхности. Для этого вида характерен многоклеточный мицелий, который распадается на отдельные клетки, так называемые оидии, по форме напоминающие дрожжи и служащие для размножения.

Для микроскопических наблюдений за молочнокислыми бактериями готовят препарат из прокисшего молока. Бактериологическую петлю вводят в ступок и, повернув вокруг оси, извлекают, прикасаясь ею и к пленке. Ступок размазывают на предметном стекле очень тонким слоем без воды. Высушивают на воздухе и фиксируют смесью спирта с эфиром (приблизительно 1 : 1), несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, и параллельно эфиром извлекается и удаляется жир, что необходимо вследствие того, что капли жира на препарате мешают окраске и микроскопированию.

Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим 2–3 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

Метиленовый синий – лучший краситель для молочнокислых бактерий молока, так как он слабо окрашивает основной фон (казеин) и хорошо – клетки. Препараты получаются четкими. Под микроскопом на них видно преобладание мелких округлых клеток *Lactococcus lactis*, соединенных в короткие цепочки. Этот микроорганизм – возбудитель естественного скисания молока в средних широтах. Оптимальная температура для

его развития – 30 °С. В результате жизнедеятельности молочного стрептококка накапливается до 1 % молочной кислоты.

Нередко в препарате видны тонкие палочки рода *Lactobacillus* разных размеров, иногда содержащие зерна волютина. Чаще встречается *L. bulgaricus* – возбудитель естественного скисания молока в южных широтах. Оптимальная температура его развития – 40 °С, он кислотоустойчив, накапливает до 3,5 % молочной кислоты в кисломолочных продуктах. На плотных средах этот микроорганизм образует мелкие характерные колонии в виде комочков ваты, как правило, выпуклые, непрозрачные, непигментированные.

Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень, и ее четырехугольные или овальные клетки отличаются от клеток молочнокислых бактерий большими размерами.

Для приготовления препаратов используются также колонии, выросшие на меловом агаре.

Можно приготовить и фиксированные препараты из кисломолочных продуктов (йогурт, кефир, ряженка) и зарисовать доминирующие формы.

З а н я т и е 3. Качественные и количественные реакции на молочную кислоту

Кислотность молока (количество молочной кислоты) устанавливают по разности между объемами 0,1 н раствора NaOH, пошедшего на титрование молока в конце и начале опыта.

Для титрования берут 10 мл свежего или прокисшего молока, помещают в колбу Эрленмейера на 100 мл, добавляют 20 мл дистиллированной воды, одну-две капли фенолфталеина и титруют 0,1 н раствором NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски (не исчезает в течение 1 мин). Если на поверхности прокисшего молока образовалась пленка, то, прежде чем взять сгусток, ее сдвигают пипеткой или стеклянной палочкой в сторону, затем разбивают сгусток, постукивая колбой о ладонь.

Кислотность молока выражают в градусах Тернера (°Т) или процентах молочной кислоты. Так, 1 °Т соответствует 1 мл 0,1 н раствора щелочи, пошедшей на титрование 100 мл молока. Следовательно, если на титрование 10 мл молока пошло x мл щелочи, то для выражения кислотности молока в °Т нужно значение x умножить на 10.

Основные показатели кислотности молочной продукции приведены в табл. 9.

Чтобы выразить кислотность в процентах молочной кислоты, количество 0,1 н раствора NaOH (в мл), потраченное на титрование 100 мл молока, умножают на 0,009, так как 1 мл 0,1 н NaOH нейтрализует эквивалентное количество молочной кислоты. Молекулярная масса молочной кислоты составляет 90. Для приготовления 1 л 1 н раствора требуется 90 г кислоты. В 1 л 0,1 н раствора содержится 9 г, а в 1 мл – 0,009 г молочной кислоты.

Таблица 9

**Показатели качества молочной продукции
(по кислотности)**

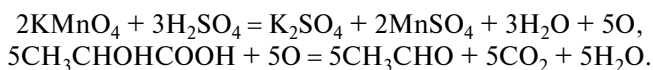
Продукт	Кислотность, °Т
Молоко	16–22
Сливки	17–18
Простокваша	75–120
Ацидофилин	75–130
Ряженка	85–150
Варенец	75–120
Йогурт	85–150
Мацони	75–120
Кефир	70–120
Творог жирный	240
Творог полужирный	240
Сметана	60–100
Кумыс	60–120

После определения титруемой кислотности оставшееся скисшее молоко отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр. Фильтрат используют для качественной реакции на молочную кислоту.

Для проведения реакции «серебряное зеркало» молочную кислоту превращают в уксусный альдегид. Реакция происходит в кислой среде при температуре кипения в присутствии KMnO_4 . При взаимодействии уксусного альдегида с аммиачным раствором серебра образуется металлическое серебро, что проявляется в возникновении серебристого окрашивания.

Реакцию проводят следующим образом. В коническую колбу на 100 мл добавляют пипеткой 5 мл фильтрата, 2 мл концентрированной серной кислоты и нагревают на асбестовой сетке при взбалтывании до начала кипения. Затем, продолжая кипячение и помешивание, пипеткой по каплям приливают 5 мл 5 % раствора KMnO_4 , который при этом обесцвечивается. В результате реакции молочная кислота переходит в уксусный альдегид.

Происходящую при этом химическую реакцию можно выразить следующими уравнениями:



Для распознавания уксусного альдегида быстро покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой или часовым стеклом, смоченными аммиачным раствором AgNO_3 .

Аммиачный раствор нитрата серебра готовят следующим образом: к 1–2 мл 10 % раствора AgNO_3 в пробирке добавляют по каплям аммиак; сначала появляется осадок Ag_2O , который затем растворяется в избытке аммиака.

Аккуратно, чтобы не разорвать, фильтровальную бумагу прижимают к краям горла колбы и продолжают нагревание. Уксусный альдегид улетучивается и, реагируя с аммиачным раствором AgNO_3 , вызывает почернение бумаги, имеющее серебристый оттенок, — это выделяется металлическое серебро.

Другой качественной реакцией на молочную кислоту служит *реакция с тиофеном*. Для ее проведения в пробирку к 1–2 мл фильтрата добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и 0,5 мл насыщенного раствора CuSO_4 . Смесь взбалтывают, нагревают 5 мин на водяной бане при 100°C и после охлаждения добавляют несколько капель 0,2 % спиртового раствора тиофена. В присутствии молочной кислоты появляется вишнево-красное окрашивание. Реакция очень чувствительна и специфична.

Вопросы для самоконтроля

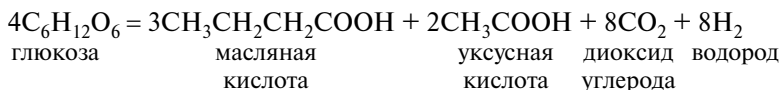
1. Перечислите места обитания молочнокислых бактерий в природе.
2. Назовите основных представителей группы молочнокислых бактерий.
3. Охарактеризуйте типы метаболизма молочнокислых бактерий и биохимию этих процессов.
4. Каково практическое применение молочнокислых бактерий?

Лабораторная работа 7
ИЗУЧЕНИЕ МАСЛЯНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ.
КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА МАСЛЯНУЮ КИСЛОТУ.
МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
МАСЛЯНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Маслянокислое брожение представляет собой процесс анаэробного разложения углеводов, пептонов, белков, жиров с образованием в основном масляной кислоты. Разновидностью маслянокислого брожения является ацетонобутиловое брожение, которое используется в микробиологической промышленности для получения ацетона и бутанола. Маслянокислое брожение применяют также в промышленности для получения масляной кислоты из крахмала, которую затем применяют в производстве косметики.

Маслянокислые бактерии широко распространены в почве (как правило, содержатся в 90 % почвенных образцов), навозе, загрязненных водоемах, на разлагающихся растительных остатках, в молоке, на поверхности растений, в рубце жвачных животных и т. д.

Процесс маслянокислого брожения протекает по следующей схеме:



В процессе брожения кроме масляной образуется уксусная кислота, а при смещении реакции в кислую сторону (до рН 5,5) – бутиловый спирт и ацетон в большом количестве. По преобладанию тех или иных конечных продуктов маслянокислое брожение подразделяют на классическое (брожение глюкозы, крахмала), ацетонобутиловое и брожение пектиновых веществ.

Энергетическим материалом для маслянокислых бактерий служат крахмал, водорастворимые углеводы (декстрины, ди- и моносахариды), органические кислоты (молочная и пировиноградная) и спирты (маннит и глицерин). В качестве источника азота бактерии используют самые различные азотистые соединения: пептон, аминокислоты, аммиачные соли, а некоторые из них – даже атмосферный азот.

Возбудители маслянокислого брожения – группа бактерий, входящих в род *Clostridium*, который насчитывает более 100 видов. Принадлежность к роду определяется на основании трех признаков: 1) способности образовывать эндоспоры; 2) облигатно анаэробного характера энергетического метаболизма; 3) неспособности осуществлять диссимиляционное восстановление сульфата.

За исключением *C. coccoides*, вегетативные клетки бактерий из рода *Clostridium* имеют форму прямых или слегка изогнутых палочек с закругленными концами, они грамположительны, большинство видов подвижны. Движение осуществляется с помощью перитрихально расположенных жгутиков. По мере старения в процессе цикла развития клетки теряют подвижность, накапливают гранулезу (запасное вещество типа крахмала) и переходят к спорообразованию. Образующиеся споры овальной или сферической формы. Их диаметр, как правило, превышает диаметр вегетативной клетки, поэтому, если формирующаяся спора расположена в центре клетки, последние меняют форму, становясь веретеновидными; если же споры образуются у одного из клеточных полюсов, клетки приобретают форму барабанных палочек. Род включает психрофильные, мезофильные и термофильные виды. Температурный оптимум для роста многих мезофильных видов лежит в диапазоне 30–40 °С. Для термофильных видов температурный оптимум составляет 60–75 °С. Оптимальная реакция среды для клостридий – нейтральная или слабощелочная.

Хемоорганогетеротрофы. Клостридии – облигатные анаэробы. Однако спектр их чувствительности к молекулярному кислороду достаточно широк, что связано с обнаружением в клетках большинства клостридий супероксиддисмутазы, которая позволяет нейтрализовать токсические эффекты O_2 и его производных. Именно при работе с клостридиями Л. Пастер в 1861 г. открыл форму жизни без кислорода.

В зависимости от вида сбраживаемого субстрата выделяют несколько физиологических групп клостридий.

Сахаролитические клостридии. Субстратами для сбраживания у сахаролитических клостридий являются такие моносахара, как глюкоза, фруктоза, ксилоза и др. Некоторые виды могут использовать крахмал, целлюлозу, пектин, хитин, предварительно гидролизуемые соответствующими экзоферментами. В группу входят бактерии, вызывающие маслянокислое и ацетонобутиловое брожения. Типичными представителями сахаролитических клостридий, осуществляющих классическое маслянокислое брожение, выступают *C. butyricum*, *C. pasteurianum* и др. К этой группе можно отнести и ряд видов – высокоспециализированных агентов анаэробного разрушения целлюлозы, причем главными конечными продуктами брожения являются этанол, ацетат и сукцинат, CO_2 и H_2 .

Из группы сахаролитических клостридий иногда выделяют *пектолитические*. Субстратом для сбраживания служит пектин. Это полимер метил-D-галактуроновой кислоты, который имеет сложное строение и при воздействии на нее пектиновыми ферментами гидролизуется на ряд сахаров, кислот и метиловый спирт. Клостридии, принадлежащие к виду *C. felsineum*, содержат активную пектиназу и поэтому могут получать энер-

гию, осуществляя маслянокислое брожение пектиновых веществ. Этот вид играет важную роль в процессе мацерации волокон при мочке льна.

C. felsineum обладают сравнительно высоким температурным оптимумом. Они сбраживают пектиновые вещества с образованием преимущественно уксусной кислоты и совершенно не продуцируют масляной.

C. pectinovorum при сбраживании пектиновых веществ накапливают масляную и уксусную кислоты, водород и углекислый газ. При соответствующих условиях кроме основных продуктов брожения могут вырабатывать бутиловый спирт и ацетон.

Кроме описанных представителей известны еще и некоторые другие, которые, разлагая пектиновые вещества, сбраживают продукты гидролиза — галактуронат, арабинозу, галактозу и др. — по типу маслянокислого или ацетонобутилового брожения.

Брожение пектиновых веществ нашло применение в хозяйственно-технической деятельности человека, в частности, для получения прядильных волокон из льна, конопли и других лубоволокнистых растений путем мочки их в естественных водоемах. Для ускорения и улучшения процесса освобождения волокон мочку сырья производят в бассейнах. При этом способе применяют специально выращенные культуры бактерий. Процесс ведут при температуре 26–28 °С в течение 5 суток вместо 1,5–2 недель в естественных водоемах.

К **протеолитическим клостридиям** относятся клостридии, имеющие активные протеолитические ферменты и поэтому способные использовать в качестве субстратов белки и пептиды, гидролизую их до аминокислот и подвергая затем последние сбраживанию. Рост микроорганизмов в средах с белком сопровождается образованием аммиака, CO₂, H₂, жирных кислот и большого количества летучих соединений с неприятным запахом. В эту группу входят *C. putrificum*, *C. histolyticum*, *C. sporogenes* и другие сапрофитные виды. Близки к этим видам и некоторые патогенные формы: *C. botulinum* — продуцент ботулинического токсина, являющегося одним из самых сильных биологических ядов; *C. tetani* — столбнячная палочка, образующая в организме человека столбнячный токсин. К протеолитическим клостридиям примыкают виды, использующие в качестве источника углерода и энергии ограниченное число свободных аминокислот. Например, *C. cochlearum* растет только на среде с глутаминовой кислотой, глутамином и гистидином; *C. sticklandii* может сбраживать лизин, аргинин, фенилаланин, серин, а *C. propionicum* — треонин, аланин, серин, цистеин.

Пуринолитические клостридии специфически приспособлены к сбраживанию азотсодержащих гетероциклических соединений — пуринов и пиримидинов.

Среди клостридий существуют виды, обладающие довольно широкими возможностями (субстратами брожения служат как углеводы, так и белки), и узкоспециализированные виды, способные использовать в качестве источника энергии и углерода только небольшое число соединений.

С жизнедеятельностью клостридий связаны различные процессы, протекающие в природе: разложение (гниение) азотсодержащих соединений – белков, нуклеиновых кислот – в анаэробных условиях; анаэробное разложение растительных материалов, таких как клетчатка, хитин; анаэробная азотфиксация.

Наиболее распространенное углеродное соединение в природе – целлюлоза. Она составляет от 15 до 60 % массы растений, а в хлопке и льне до 80–95 %. Разложение целлюлозы микроорганизмами является самым большим по масштабам естественным деструкционным процессом, звеном круговорота углерода, обеспечивающего возврат фиксированного в процессе фотосинтеза углерода в атмосферу в виде CO_2 .

Целлюлолитические клостридии осуществляют разложение волокон целлюлозы в анаэробных условиях. При этом образуется много органических кислот (масляная, уксусная, янтарная, молочная, муравьиная), этиловый спирт, углекислый газ и водород. В отличие от анаэробного разложения целлюлозы, которое осуществляется только бактериями, в аэробных условиях клетчатку разлагают многие микроорганизмы, относящиеся к бактериям и грибам.

Еще в конце XX в. было обнаружено, что некоторые клостридии патогенны, т. е. вызывают заболевания человека и животных. В основе патогенности клостридий лежит их способность синтезировать и выделять из клетки высокоэффективные токсины.

Некоторые протеолитические клостридии могут быть возбудителями болезней при раневой инфекции (газовая гангрена и столбняк), а также причиной пищевых отравлений. Споры их очень распространены в почве. Если споры *C. histolyticum* или *C. septicum* попадают в открытую рану, к которой нет доступа воздуха или в которой аэробные бактерии, потребляя кислород, создают анаэробные условия, то эти клостридии начинают расти, расщепляя с помощью протеиназ коллаген и другие белки, вызывая образование дурно пахнущих продуктов брожения и газа. С такого рода газовой гангреной («госпитальной гангреной») в прежние времена можно было бороться только путем ампутации пораженной конечности. С раневой инфекцией связано и до сих пор нередко встречающееся заболевание столбняк. Его вызывает *C. tetani*. Эти бактерии в процессе своего роста выделяют очень сильный нейротоксин, вследствие чего возникают тонические судороги мышц.

Наиболее тяжелую форму пищевого отравления — *ботулизм* — вызывает *C. botulinum*. Эти широко распространенные почвенные бактерии могут развиваться в недостаточно простерилизованных мясных продуктах и бобовых консервах. Бактерии получили свое название потому, что встречаются в колбасе (лат. *botulus* — колбаса). Образуемый ими токсин в случае потребления зараженного продукта может вызвать смерть вследствие паралича нервной системы, в частности паралича дыхания, однако этот токсин термолабилен и быстро (за 15 мин) инактивируется при кипячении.

З а н я т и е 1. Получение накопительной культуры маслянокислых бактерий

Для получения накопительной культуры маслянокислых бактерий используют следующие среды:

Среда Имшенецкого:

- мясо-пептонный бульон — 500 мл;
- CaCO_3 — 2–3 г;
- фильтровальная бумага — 15 г;
- водопроводная вода — 500 мл.

Среду стерилизуют при 1,5 атм в течение 30 мин.

Среда Виноградского (г/л):

- KH_2PO_4 — 1,0;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5;
- NaCl — 0,5;
- MnSO_4 — 0,01;
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0,01;
- CaCO_3 — 20;
- KNO_3 — 4;
- дистиллированная вода — до 1 л.

Соли последовательно растворяют в небольшом объеме воды, затем растворы в том же порядке сливают и доводят конечный объем до 1 л. Устанавливают pH 7,2–7,4. Среду стерилизуют при 1,5 атм в течение 30 мин.

К готовой среде Виноградского добавляют раствор стерильной глюкозы из расчета 1 мл 20 % раствора глюкозы на 100 мл среды.

Изучение маслянокислого брожения крахмала на среде с картофелем

Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими 1/3 высокой пробирки, добавляют немного мела, заливают на 2/3 водопроводной водой, закрывают ватными пробками и помещают

на водяную баню при 80 °С на 10 мин для пастеризации. В среду не вносят ни почвы, ни маслянокислых бактерий, так как на коже картофеля всегда есть их споры.

Элективные условия создают: крахмал — источник углерода, используемый только микроорганизмами, содержащими фермент амилазу; пастеризация; анаэробиз (высокий столбик жидкости в пробирке и выделение в процессе брожения CO_2 и H_2 , вытесняющих воздух).

Через два-три дня картофель всплывает вследствие активного образования газов.

По окончании брожения культуральную жидкость применяют для исследования морфологии маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

Выделение маслянокислых бактерий из почвы

Почву отбирают с поверхностного слоя, глубиной не более 2 см, и помещают в полиэтиленовые пакеты.

Для обнаружения в почве анаэробных азотфиксирующих бактерий рода *Clostridium* используют метод получения накопительной культуры в жидкой среде Виноградского.

Среду наливают в пробирки высоким слоем, засевают комочками исследуемой почвы, пастеризуют 10 мин при 80 °С в целях освобождения от сопутствующих аэробных бесспорных бактерий. Через 2—3 суток после посева среда мутнеет, из нее начинают выделяться пузырьки газа, что свидетельствует о развитии анаэробных споровых бактерий, вызывающих в соответствующих элективных условиях маслянокислое брожение. Глюкоза при этом превращается в масляную кислоту и углекислый газ, а в пробирках образуется много пены, появляется запах масляной и уксусной кислот. Последняя также является одним из продуктов маслянокислого брожения.

При исследовании культуральных признаков обращают внимание на следующие параметры:

- изменение цвета среды (изначально среда прозрачная). Окраска может меняться от желтой до коричневой;
- образование осадка;
- появление мути;
- образование пленки.

Выявление возбудителей сбраживания целлюлозы

Для получения накопительной культуры целлюлозоразрушающих бактерий используют среду Имшенецкого.

В высокие пробирки на 2/3 заливают среду Имшенецкого, добавляют 1 г исследуемой почвы, закрывают ватными пробками, затем пастеризуют 10 мин при 80 °С в целях освобождения от сопутствующих аэробных бесспорных бактерий. На дно пробирки помещают полоски фильтровальной бумаги слоем 1,5–2 см, доливают стерильной питательной средой доверху и закрывают пробкой. Пробирки инкубируют при 30–35 °С для обнаружения мезофильных бактерий и при 60 °С – для поиска термофильных бактерий.

Элективность среды обеспечивается присутствием целлюлозы (источник углерода, который может использоваться только специфическими целлюлозоразлагающими бактериями, имеющими фермент целлюлазу) и анаэробными условиями. Пептон, содержащийся в среде в небольших количествах, практически не нарушает элективности среды, но сильно стимулирует процесс.

Через 3–4 суток культивирования при 60 °С в пробирках начинается процесс разрушения клетчатки, жидкость пенится, выделяется газ. Полоски фильтровальной бумаги желтеют, ослизняются, постепенно превращаясь в аморфную массу, и оседают на дно.

При 30–35 °С разрушение клетчатки происходит медленнее (на 5–7-е сутки).

Разрушенные массы клетчатки подвергаются микроскопическому исследованию.

Выявление возбудителей сбраживания пектиновых веществ

Для получения накопительной культуры анаэробных бактерий, вызывающих брожение пектиновых веществ, снопок льняной соломы высотой 6–7 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в пробирку (предпочтительней большего размера, чем стандартный), наполненную на 2/3 водопроводной водой. Пробирку зажимают пинцетом и кипятят на горелке 2–3 мин для удаления экстрактивных (легкосбраживаемых) веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Вода приобретает желто-зеленый цвет. Ее сливают. Вновь наполняют пробирку водопроводной водой, кипятят несколько минут и сливают. Это повторяют 5–6 раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают пробирку под струей воды и в снопик вводят свежую соломинку, не подвергшуюся нагреванию.

Пробирку со снопиком ставят в термостат при 30–35 °С. Через 2–3 дня в ней начинается брожение, которое заканчивается через 5–8 су-

ток. Накопление в культуральной жидкости масляной кислоты наряду с уксусной, образующейся при сбраживании продуктов гидролиза пектина, можно обнаружить при помощи качественных реакций на масляную кислоту. Разрушенные соломины подвергаются микроскопическому исследованию.

З а н я т и е 2. Микроскопирование маслянокислых бактерий

Для микроскопического исследования маслянокислых бактерий используют:

- раствор Люголя;
- фуксин Циля;
- иммерсионное масло.

Микроскопическое исследование маслянокислых бактерий, вызывающих брожение крахмала

Питательную среду из пробирки с картофелем берут пипеткой, погружив ее в средний слой сброженной жидкости.

На предметное стекло из пробирки наносят каплю жидкости. К накопительной культуре добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом, на которое помещают каплю иммерсионного масла.

При микроскопировании препарата обнаруживаются клетки *C. butyricum*, *C. pasteurianum* и других бактерий, имеющих подобную форму. В клетках можно заметить овальные тельца, сильно преломляющие свет, — это споры. В тех местах клетки, где содержится гранулеза, наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

Микроскопическое исследование маслянокислых бактерий, содержащихся в почве

Обычно среду Виноградского используют для обнаружения клеток *C. pasteurianum*, их легко увидеть при микроскопировании осадка. Перед спорообразованием в клетках *C. pasteurianum* накапливается много гранул, для которой характерно окрашивание раствором Люголя. Каплю жидкости, содержащую клетки клостридий, накрывают покровным стеклом и к одному краю стекла подносят пипетку с раствором Люголя, а к другому — фильтровальную бумагу, засасывающую раствор под покровное стекло. При микроскопировании препарата с иммерсионным маслом об-

наруживаются клетки, в которых можно заметить овальные тельца, сильно преломляющие свет, — споры. В тех местах клетки, где содержится гранулеза, возникает сине-фиолетовое окрашивание. Спора в клетке остается при этом неокрашенной и хорошо различима на темном фоне.

Микроскопическое исследование маслянокислых бактерий – возбудителей брожения целлюлозы

В данном случае микроскопическому исследованию подвергают разрушенные массы клетчатки. При исследовании целлюлозоразрушающих бактерий пинцетом извлекают со дна пробирки кусочек разлагающейся бумаги и размазывают по предметному стеклу без добавления воды. Мазок сушат обычным способом, фиксируют на пламени спиртовки и окрашивают фуксином. В препаратах видны длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце — *C. omelianskii*, также выявляются длинные крупные палочки с грушевидной спорой на конце — *C. dissolvens*.

Микроскопическое исследование маслянокислых бактерий – возбудителей брожения пектиновых веществ

Для микроскопического исследования снопик льняной соломы извлекают из пробирки, из его середины вынимают несколько соломинок и выжимают из них немного жидкости на предметное стекло. Добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой.

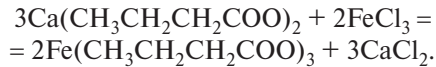
В препарате обычно видны крупные палочковидные бактерии с плектридальным типом спорообразования (барабанная палочка) и прерывистым расположением гранулезы, окрашенной в синий цвет, — это *C. pectinovorum*. Нередко обнаруживается *C. felsineum* — палочки меньшего размера сигарообразной формы со спорой на конце. Гранулеза может заполнять всю вегетативную часть клетки.

З а н я т и е 3. Качественные реакции на масляную кислоту

Для проведения качественных реакций на масляную кислоту используют:

- 5 % раствор хлорида железа;
- 96 % этиловый спирт;
- концентрированную серную кислоту.

Качественной реакцией на масляную кислоту является получение маслянокислого железа (реакция с FeCl_3). Нейтральные растворы маслянокислых солей при нагревании с FeCl_3 приобретают коричневое окрашивание вследствие образования маслянокислого железа. В пробирку наливают 3–5 мл сброженной жидкости, добавляют 1–2 мл 5 % хлорида железа и нагревают на пламени. Реакция протекает по уравнению



Раствор маслянокислого железа в отраженном свете приобретает буровато-коричневое окрашивание, а в проходящем свете — кроваво-красное.

Получение масляноэтилового эфира (ананасовой эссенции)

Масляная кислота представляет собой бесцветную жидкость с неприятным запахом, слабым растворам этой кислоты присущ специфический сырный запах. Однако эфиры масляной кислоты обладают приятными ароматами: метиловый — яблочным, этиловый — ананасовым, изоамиловый — грушевым. Эфиры масляной кислоты как ароматические вещества используют в кондитерской и парфюмерной промышленности, при изготовлении фруктовых напитков. Изоамиловый эфир служит растворителем в лаках для ногтей.

Для получения масляноэтилового эфира к 3–5 мл культуральной жидкости маслянокислых бактерий добавляют 0,5 мл 96 % этилового спирта и 1–2 мл концентрированной серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах эфира (аромат ананаса).

Реакция протекает по уравнению



Вопросы для самоконтроля

1. Какую функцию в экосистеме выполняют маслянокислые бактерии?
2. Где в природе обитают маслянокислые бактерии?
3. Охарактеризуйте основных представителей группы маслянокислых бактерий.
4. Какой тип метаболизма осуществляют эти бактерии?
5. Каково практическое применение маслянокислых бактерий?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основной

- Готтшалк, Г.* Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк. М., 1982.
- Гусев, М. В.* Микробиология : учебник / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. М., 2003.
- Емцев, В. Т.* Микробиология : учебник / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. М., 2005.
- Лысак, В. В.* Микробиология : учеб. пособие / В. В. Лысак. Минск, 2008.
- Лысак, В. В.* Физиология микроорганизмов : учеб. пособие / В. В. Лысак. Минск, 2014.
- Метаболизм бактерий / под ред. И. Гунзалуса, Р. Станиера. М., 1963.
- Нетрусов, А. И.* Микробиология : учебник / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. М., 2006.
- Современная микробиология : в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М., 2005. 2 т.
- Шлегель, Г.* Общая микробиология : пер. с нем. / Г. Шлегель. М., 1987.

Дополнительный

- Белясова, Н. А.* Микробиология : учебник / Н. А. Белясова. Минск, 2012.
- Гутина, В. Н.* Очерки по физиологии микроорганизмов / В. Н. Гутина. М., 1988.
- Квасников, Е. И.* Биология молочнокислых бактерий / Е. И. Квасников. Ташкент, 2000.
- Методические рекомендации по молекулярно-генетическим основам микробиологии / Н. П. Елинов [и др.]. Л., 1982.
- Методы общей бактериологии : учеб.-метод. пособие / Д. А. Васильев [и др.]. Ульяновск, 2008.
- Нестеренко, О. А.* Молочнокислые бактерии и пути их использования / О. А. Нестеренко. М., 1995.
- Николайчик, Е. А.* Регуляция метаболизма / Е. А. Николайчик. Минск, 2007.
- Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов [и др.]. М., 2005.
- Промышленная микробиология / под ред. Н. С. Егорова. М., 1989.
- Работнова, И. Л.* История и перспективы общей физиологии микроорганизмов / И. Л. Работнова. М., 2012.
- Стейниер, Р.* Мир микробов : в 2 т. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. М., 1979. 2 т.
- Теплер, Е. З.* Практикум по микробиологии / Е. З. Теплер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. М., 2004.
- Шлегель, Г.* История микробиологии / Г. Шлегель. М., 2002.

ПРИЛОЖЕНИЯ

1. КОНТРОЛЬ УПРАВЛЯЕМОЙ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Задания для компьютерного тестирования (примерный перечень)

1. Предшественником для биосинтеза пролина является:

- А. Пировиноградная кислота
- Б. α -Кетоглутаровая кислота
- В. 3-Фосфоглицериновая кислота
- Г. Шавелевоуксусная кислота
- Д. Фосфоенолпировиноградная кислота

2. Какие из перечисленных бактерий осуществляют бутандиоловое брожение:

- 1) *Proteus vulgaris*;
- 2) *Pectobacterium carotovorum*;
- 3) *Enterobacter aerogenes*;
- 4) *Yersinia pestis*;
- 5) *Serratia marcescens*;
- 6) *Klebsiella pneumoniae*;
- 7) *Shigella dysenteriae*?

- А. 1, 2, 3, 4
- Б. 2, 3, 4, 6
- В. 1, 2, 3, 5
- Г. 3, 5, 6, 7
- Д. 2, 3, 5, 6

3. Сколько молекул АТФ образуется при аэробном дыхании у бактерий *Escherichia coli* из одной молекулы глюкозы, окисляемой гликолитическим путем?

- А. 38
- Б. 28
- В. 26
- Г. 34
- Д. 30

4. Какие бактерии осуществляют анаэробное дыхание:

- 1) метаногенные;
- 2) водородные;
- 3) сульфатредуцирующие;
- 4) денитрифицирующие;
- 5) нитрифицирующие;
- 6) аммонифицирующие?

- А. 1, 3, 4
- Б. 1, 5
- В. 5, 6
- Г. 2, 3, 5
- Д. 2, 6

5. Сколько молекул АТФ образуется при окислении одной молекулы НАДН в дыхательной цепи бактерий *E. coli*?

- А. 3 Б. 2 В. 1 Г. Нет верного ответа

6. Предшественниками для синтеза пиримидиновых нуклеотидов являются:

- 1) глутамин; 4) эритрозо-4-фосфат;
2) 5-фосфорибозил; 5) аспаргат.
3) карбамоилфосфат;

- А. 1, 5 Б. 3, 4 В. 2, 4 Г. 3, 5

7. Какие из перечисленных бактерий осуществляют 2-кето-3-дезоксиглюконоатный путь окисления углеводов:

- 1) нейссерии; 4) молочнокислые бактерии;
2) псевдомонады; 5) уксуснокислые бактерии;
3) энтеробактерии; 6) пропионовокислые бактерии?

- А. 3, 5, 6 В. 1, 3, 5 Д. 3, 4, 5
Б. 1, 2, 5 Г. 4, 5, 6 Е. 1, 3, 6

8. Какие ферментативные реакции гликолитического пути необратимы:

- 1) катализируемая гексокиназой;
2) катализируемая фосфоенолпируватсинтазой;
3) катализируемая фосфруктокиназой;
4) катализируемая фосфоглицераткиназой;
5) катализируемая пируваткиназой?

- А. 1, 2, 3 В. 1, 3, 5 Д. 3, 4, 5
Б. 2, 3, 4 Г. 2, 4, 5 Е. 1, 2, 4

9. В каком цикле у большинства автотрофных бактерий происходит синтез углеводов?

- А. Окислительном пентозофосфатном Г. Энтнера-Дудорова
Б. Трикарбонных кислот Д. Арнона
В. Восстановительном пентозофосфатном

10. Какие из перечисленных аминокислот синтезируются из оксалоацетата:

- 1) изолейцин; 3) аргинин; 5) треонин;
2) валин; 4) метионин; 6) серин?
А. 2, 3, 4 В. 1, 5, 6 Д. 4, 5, 6
Б. 2, 5, 6 Г. 1, 2, 6 Е. 1, 4, 5

11. Какое из перечисленных веществ является промежуточным продуктом для биосинтеза всех ароматических аминокислот?

- А. α -Кетоглутаровая кислота
- Б. Фосфоенолпировиноградная кислота
- В. Префеновая кислота
- Г. Хоризмовая кислота
- Д. Антраниловая кислота

12. Что является исходным субстратом для синтеза фосфолипидов?

- А. Ацетил-КоА
- Б. Пропионил-АПБ
- В. Фосфодиоксиацетон
- Г. 3-Фосфоглицерин

13. Какие процессы, происходящие у бактерий, относятся к анаэробным:

- 1) ассимиляционная сульфатредукция;
 - 2) нитрификация;
 - 3) диссимиляционная сульфатредукция;
 - 4) денитрификация;
 - 5) метаногенез?
- А. 1, 3, 5 Б. 1, 2, 4 В. 3, 4, 5 Г. 2, 4, 5

14. Какие из представителей родов относятся к экстремально галофильным бактериям:

- 1) *Natronobacterium*;
 - 2) *Sulfolobus*;
 - 3) *Halococcus*;
 - 4) *Pyrodictium*;
 - 5) *Archaeoglobus*;
 - 6) *Natronococcus*;
 - 7) *Halobacterium*?
- А. 3, 4, 5, 6 В. 1, 2, 4, 7 Д. 2, 5, 6, 7
Б. 1, 3, 6, 7 Г. 1, 4, 6, 7

15. У каких бактерий осуществляется обратный транспорт электронов, в процессе которого синтезируются восстановленные переносчики восстановительных эквивалентов:

- 1) зеленых нитчатых;
 - 2) зеленых серных;
 - 3) пурпурных;
 - 4) нитрифицирующих;
 - 5) водородных?
- А. 2, 3, 4 В. 1, 3, 4 Д. 3, 4, 5
Б. 1, 3, 5 Г. 1, 2, 3

16. Какие бактерии осуществляют кислородный фотосинтез:

- 1) цианобактерии;
 - 2) экстремально галофильные археобактерии;
 - 3) гелиобактерии;
 - 4) прохлорофиты;
 - 5) зеленые бактерии;
 - 6) пурпурные бактерии?
- А. 4, 6 Б. 5, 6 В. 1, 4 Г. 2, 3 Д. 1, 3

17. В каких циклах происходит ассимиляция C_1 -соединений у метилотрофных бактерий:

- 1) цикле Кальвина; 4) КДФГ-пути;
2) окислительном пентозофосфатном пути; 5) сериновом цикле;
3) рибулозомонофосфатном цикле;

А. 2, 3, 4 В. 1, 4, 5 Д. 1, 2, 4
Б. 1, 3, 5 Г. 3, 4, 5

18. Какой вид бактерий относится к грамотрицательным анаэробным восстанавливающим серу?

А. *Desulfonema limicola* В. *Desulfosarcina variabilis*
Б. *Desulfuromonas acetoxidans* Г. *Thiobacillus ferrooxidans*

19. Какие из утверждений, касающиеся биосинтеза пептидогликана мурина, являются верными:

- 1) связывание мономерных компонентов пептидогликана осуществляется в цитоплазме клетки;
2) в качестве кофактора используется ундекапренолфосфат;
3) предшественники пептидогликана синтезируются в активированной форме;
4) синтез мономерных компонентов пептидогликана начинается с аминирования глюкозо-6-фосфата у C_2 -атома с помощью глутамина;
5) сшивание цепей пептидогликана (образование пептидных связей) осуществляется с участием фермента транспептидазы?

А. 1, 2 В. 2, 4 Д. 3, 5
Б. 2, 3 Г. 2, 5 Е. 1, 4

20. Через что осуществляется биосинтез фенилаланина из хоризмата у бактерий:

- 1) префенат; 4) индол-3-глицерофосфат;
2) антранилат; 5) фенилпируват?
3) оксифенилпируват;

А. 1, 2, 5 В. 1, 3, 5 Д. 2, 3, 4
Б. 2, 4, 5 Г. 1, 2, 3

21. Какие представители родов относятся к ацетогенным бактериям:

- 1) *Peptostreptococcus*; 3) *Bacillus*; 5) *Sporosarcina*;
2) *Butyrobacterium*; 4) *Acetobacterium*; 6) *Leuconostoc*?

А. 1, 2, 6 В. 3, 5, 6 Д. 1, 3, 4
Б. 3, 4, 5 Г. 1, 2, 4

22. Какие бактерии являются возбудителями гетероферментативного молочнокислого брожения:

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1) <i>Lactococcus lactis</i> ; | 4) <i>Lactobacillus brevis</i> ; |
| 2) <i>Leuconostoc dextranicum</i> ; | 5) <i>Enterococcus faecalis</i> ? |
| 3) <i>Lactobacillus fermentum</i> ; | |

А. 1, 2, 4

В. 2, 3, 5

Д. 2, 3, 4

Б. 3, 4, 5

Г. 1, 4, 5

23. Какие органические акцепторы электронов могут использовать бактерии в процессе анаэробного дыхания:

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| 1) алкилбензолсульфонаты; | 4) прокатеховую кислоту; |
| 2) триметил-N-оксид; | 5) азокрасители; |
| 3) диметилсульфоксид; | 6) 2-хлорбензоат? |

А. 1, 2, 6

В. 1, 2, 3

Д. 3, 4, 6

Б. 2, 5, 6

Г. 3, 4, 5

Темы для рефератов

1. Питание микроорганизмов. Классификация микроорганизмов по типам питания.

2. Пути катаболизма гексоз у микроорганизмов.

3. Механизмы фиксации CO₂ автотрофными и гетеротрофными микроорганизмами.

4. Синтез молекул АТФ у бактерий при аэробном росте на средах с глюкозой.

5. Синтез молекул АТФ у бактерий в анаэробных условиях.

6. Практическое использование бактерий, осуществляющих разные типы брожения.

7. Разложение микроорганизмами природных высокополимерных соединений.

8. Разложение углеводов микроорганизмами.

9. Окисление неорганических соединений хемолитотрофными бактериями.

10. Окисление одноуглеродных соединений микроорганизмами.

11. Разложение ксенобиотиков микроорганизмами.

12. Кислородный фотосинтез, осуществляемый бактериями.

13. Аноксигенный фотосинтез, осуществляемый бактериями.

14. Фотосинтез у экстремально галофильных бактерий.

15. Биосинтез аминокислот бактериями.

16. Биосинтез углеводов бактериями.
17. Биосинтез пептидогликана бактериями.
18. Азотфиксация у бактерий.
19. Билюминесценция бактерий.
20. Регуляция метаболизма бактериальной клетки.

Вопросы для подготовки к экзамену

1. Питание микроорганизмов. Ферментативное оснащение микроорганизмов, обеспечивающее утилизацию питательных веществ. Факторы роста бактериальной клетки. Ауксотрофы и прототрофы.
2. Физиологические группы питания бактерий. Молекулярный кислород, азот и железо как элементы питания бактерий.
3. Транспорт веществ в клетку бактерий.
4. Механизмы автотрофной фиксации CO_2 у микроорганизмов.
5. Ассимиляция CO_2 гетеротрофными микроорганизмами.
6. Метаболизм микроорганизмов. Назначение метаболических реакций у микроорганизмов.
7. Энергетический метаболизм бактериальной клетки. Характеристика типов энергетического метаболизма. Способы синтеза АТФ у бактерий. Источники энергии у бактерий.
8. Пути катаболизма углеводов у бактерий.
9. Аэробное дыхание у микроорганизмов.
10. Строение дыхательных цепей микроорганизмов.
11. Синтез АТФ в дыхательной цепи митохондрий дрожжей.
12. Синтез АТФ в дыхательной цепи бактерий *E. coli*.
13. Анаэробное дыхание — один из типов энергетического метаболизма у бактерий. Доноры и акцепторы электронов, используемые бактериями при анаэробном дыхании.
14. Нитратное дыхание. Денитрифицирующие бактерии; их характеристика, распространение в природе и значение.
15. Диссимиляционная сульфатредукция. Сульфатвосстанавливающие бактерии; их характеристика, распространение в природе и значение.
16. Метаногенез. Распространение в природе, характеристика и значение метаногенных бактерий.
17. Спиртовое брожение. Эффект Пастера. Микроорганизмы, осуществляющие спиртовое брожение. Значение спиртового брожения.
18. Молочнокислое брожение, его типы. Распространение молочнокислых бактерий и их практическое использование.

19. Маслянокислое брожение. Практическое использование бактерий, осуществляющих маслянокислое брожение.

20. Ацетонобутиловое брожение. Двухфазность ацетонобутилового брожения. Практическое использование.

21. Пропионовокислое брожение: пути образования пропионовой кислоты у прокариот. Распространение пропионовокислых бактерий в природе. Практическое использование.

22. Брожение смешанного типа.

23. Бутандиоловое брожение.

24. Использование белков микроорганизмами.

25. Аэробное расщепление аминокислот микроорганизмами.

26. Сбраживание аминокислот микроорганизмами. Реакция Сти-кленда.

27. Анаэробное разложение (сбраживание) азотистых оснований микроорганизмами.

28. Аэробное окисление азотистых оснований микроорганизмами.

29. Окисление липидов и фосфолипидов микроорганизмами.

30. Разложение целлюлозы микроорганизмами.

31. Разложение гемицеллюлоз и глюканов микроорганизмами.

32. Разложение лигнина и пектиновых веществ микроорганизмами.

33. Разложение хитина и хитозана микроорганизмами.

34. Разложение алканов микроорганизмами.

35. Разложение ароматических углеводов микроорганизмами.

36. Разложение ксенобиотиков микроорганизмами.

37. Неполное окисление органических веществ микроорганизмами.

Уксуснокислое брожение.

38. Биосинтез аминокислот бактериями, основные предшественники и пути биосинтеза.

39. Биосинтез ароматических аминокислот бактериями.

40. Биосинтез нуклеотидов бактериями.

41. Биосинтез липидов бактериями.

42. Биосинтез углеводов автотрофными и гетеротрофными бактериями.

43. Биосинтез пептидогликана бактериями.

44. Симбиотические, свободноживущие и ассоциативные азотфиксаторы.

45. Ферменты нитрогеназы. Механизмы защиты ферментов нитрогеназ от молекулярного кислорода у азотфиксирующих бактерий.

46. Биохимия азотфиксации у бактерий.

47. Симбиоз клубеньковых бактерий и бобовых растений.

48. БиOLUMИнесценция бактерий. Зависимость интенсивности люминесценции от плотности клеток бактерий в популяции.

49. Фотосинтетические пигменты у фототрофных бактерий.
50. Структурная организация фотосинтетического аппарата у фототрофных бактерий.
51. Кислородный фотосинтез у прокариот.
52. Характеристика бактерий, осуществляющих кислородный фотосинтез.
53. Аноксигенный фотосинтез у прокариот.
54. Характеристика бактерий, осуществляющих аноксигенный фотосинтез.
55. Фотосинтез у экстремально галофильных археобактерий.
56. Хемолитотрофные бактерии; их группы.
57. Окисление неорганических соединений азота. Нитрифицирующие бактерии; их распространение в природе и значение.
58. Окисление неорганических соединений серы бактериями. Тионовые бактерии и бесцветные серобактерии; их характеристика, распространение в природе и значение.
59. Окисление ионов железа. Ацидофильные и нейтрофильные железобактерии; их характеристика, распространение в природе и значение.
60. Окисление молекулярного водорода бактериями. Водородные бактерии; их характеристика, распространение в природе и значение.
61. Окисление окиси углерода бактериями. Карбокситрофные бактерии.
62. Использование микроорганизмами C_1 -соединений. Метилотрофные бактерии; их практическое применение.
63. Регуляция метаболизма бактерий на уровне активности ферментов.
64. Регуляция метаболизма бактерий на уровне генов. Оперонная организация бактериальных хромосом.
65. Индуцибельные опероны. Катаболитная репрессия.
66. Репрессибельные опероны. Аттенуация.
67. Регулон. Модулон. Регуляция на уровне мультигенных семейств. Аутоиндукция.

2. ПРОГРАММА КУРСА «ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ»

Физиология микроорганизмов является одним из разделов микробиологии, изучение которого позволит расширить научный кругозор студентов, получить знания, необходимые для последующей практической деятельности.

Цель курса – сформировать у студентов целостную систему знаний о метаболизме микроорганизмов и его регуляции, использовании основных физиологических закономерностей функционирования микроорганизмов на практике.

Задачи курса:

- изучить физиологические группы питания микроорганизмов;
- изучить особенности аэробного и анаэробного типов энергетического метаболизма у хемотрофных и фототрофных микроорганизмов;
- изучить биосинтез клеточных строительных блоков (аминокислот, липидов, нуклеотидов, полисахаридов) у бактерий;
- изучить регуляцию метаболизма у микроорганизмов.

В результате изучения дисциплины обучаемый должен

знать:

- биохимические и физиологические основы функционирования микроорганизмов;
- регуляцию метаболической активности клеток микроорганизмов;
- новейшие достижения в области физиологии и биохимии микроорганизмов и использование их в практических целях;

уметь:

- использовать теоретические знания по физиологии микроорганизмов в качестве научной основы микробиологической промышленности и биотехнологии;
- использовать основные закономерности функционирования микроорганизмов в научной деятельности;
- использовать современные методические приемы для изучения биохимии и физиологии микроорганизмов;

владеть:

- микробиологической терминологией;
- основными методами изучения физиолого-биохимических свойств микроорганизмов;
- основными навыками работы на специальном оборудовании для изучения физиологических особенностей разных таксономических групп микроорганизмов.

Содержание учебного материала

Введение

История развития физиологии микроорганизмов. Допастеровский период в истории физиологии микроорганизмов. Проблемы физиологии микроорганизмов в трудах Л. Пастера. История изучения обмена веществ

у микроорганизмов. Развитие представлений о типах трофии микроорганизмов. История изучения уникальных физиологических функций микроорганизмов.

Питание микроорганизмов

Фототрофы и хемотрофы. Автотрофы и гетеротрофы. Облигатные и факультативные автотрофы, миксотрофные бактерии. Механизмы фиксации CO_2 у микроорганизмов. Ассимиляция диоксида углерода гетеротрофными микроорганизмами. Органотрофы и литотрофы. Химические вещества как питательные субстраты. Способы поступления веществ в клетку микроорганизмов. Ферментативное оснащение микроорганизмов, обеспечивающее утилизацию питательных веществ. Конститутивные и индуцибельные ферменты. Экзо- и эндоферменты. Факторы роста бактериальной клетки. Ауксотрофы и прототрофы. Физиологические группы питания бактерий. Облигатные аэробы, микроаэрофилы, облигатные анаэробы, факультативные анаэробы, аэротолерантные микроорганизмы.

Метаболизм микроорганизмов

Виды и основные назначения метаболических реакций, общая характеристика и особенности. Многообразие метаболических путей у микроорганизмов.

Энергетический метаболизм микроорганизмов

Источники энергии у микроорганизмов. Способы синтеза АТФ у микроорганизмов. Пути катаболизма гексоз у микроорганизмов (гликолиз, пентозофосфатный окислительный путь, путь Энтнера-Дудорова). Цикл трикарбоновых кислот. Характеристика типов энергетического метаболизма. Компоненты дыхательной цепи разных микроорганизмов. Аэробное дыхание. Синтез молекул АТФ в дыхательной цепи у бактерий и дрожжей. Анаэробное дыхание. Доноры и конечные акцепторы электронов, используемые разными микроорганизмами при анаэробном дыхании. Нитратное дыхание. Биологические свойства, распространение и роль денитрифицирующих бактерий в природе. Сульфатное дыхание. Биологические свойства, распространение и значение сульфатвосстанавливающих бактерий. Серное дыхание. Карбонатное дыхание. Биологические свойства, экология и роль в природе метаногенных бактерий. Анаэробное дыхание с использованием других неорганических ионов. Фумаратное дыхание. Сукциногенные бактерии. Анаэробное дыхание с использованием других органических акцепторов электронов. Бро-

жение. Спиртовое брожение: химизм, возбудители и практическое использование. Эффект Пастера. Маслянокислое брожение: химизм, возбудители и практическое использование. Ацетонобутиловое брожение. Молочнокислое гомо- и гетероферментативное брожение. Пропионовокислое брожение. Пути синтеза пропионовой кислоты у прокариот. Брожение смешанного типа. Бутандиоловое брожение. Сбраживание аминокислот микроорганизмами. Реакция Стикланда. Сбраживание пуриновых и пиримидиновых оснований микроорганизмами. Разложение целлюлозы, гемицеллюлоз, глюканов, пектиновых веществ, хитина, хитозана, лигнина, углеводов, ксенобиотиков. Окисление липидов и фосфолипидов микроорганизмами. Использование микроорганизмами одноуглеродных соединений. Неполное окисление органических веществ микроорганизмами. Уксуснокислое брожение.

Окисление неорганических соединений хемолитотрофными микроорганизмами. Механизмы окисления неорганических веществ и запасания энергии разными группами хемолитотрофов. Процесс нитрификации и его роль в круговороте азота в природе, осуществляемый нитрифицирующими бактериями. Окисление молекулярного водорода водородными бактериями, приводящее к запасанию энергии. Карбокситрофные (окисляющие оксид углерода) бактерии. Железо- и марганцеоокисляющие бактерии. Бактерии, окисляющие восстановленные неорганические соединения серы.

Использование солнечной энергии бактериями. Пигменты фотосинтезирующих бактерий. Строение фотосинтетического аппарата у бактерий. Фотосинтез с выделением и без выделения молекулярного кислорода (кислородный и аноксигенный фотосинтез). Генерирование восстановительных эквивалентов. Использование энергии света экстремальными галобактериями (бесхлорофильный фотосинтез).

Конструктивный метаболизм микроорганизмов

Общая схема образования компонентов клетки микроорганизмов. Биосинтез аминокислот; основные предшественники и пути биосинтеза. Биосинтез углеводов, нуклеотидов, жирных кислот, фосфолипидов, пептидогликана.

Фиксация молекулярного азота микроорганизмами

Азотфиксация свободноживущими микроорганизмами. Симбиотическая азотфиксация. Ассоциативная азотфиксация. Биохимия азотфиксации. Нитрогеназная реакция.

Биолюминесценция микроорганизмов

Биохимический механизм биолюминесценции. Зависимость биолюминесценции микроорганизмов от плотности их популяции.

Регуляция метаболизма у микроорганизмов

Регуляция активности ферментов у бактерий. Ретроингибирование. Ковалентная модификация. Регуляция синтеза ферментов у бактерий. Индуцибельные опероны и механизмы их функционирования. Катаболитная репрессия. Диауксия. Механизмы функционирования репрессивных оперонов. Аттенуация. Регулоны, модулоны.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Р а з д е л I. ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	5
<i>Лабораторная работа 1.</i> Изучение значения отдельных элементов питания для роста микроорганизмов (на примере гриба <i>Aspergillus niger</i>).....	8
З а н я т и е 1. Расчет содержания компонентов в средах для культивирования гриба <i>Aspergillus niger</i>	8
З а н я т и е 2. Приготовление питательных сред для культивирования и посев гриба <i>Aspergillus niger</i>	12
З а н я т и е 3. Учет результатов культивирования гриба <i>Aspergillus niger</i> в питательных средах, содержащих различные компоненты	13
<i>Лабораторная работа 2.</i> Изучение влияния различных источников углерода, азота, витаминов и микроэлементов на рост микроорганизмов	14
З а н я т и е 1. Изучение влияния различных источников углерода, азота, витаминов и микроэлементов на рост микроорганизмов с помощью метода ауксанограмм.....	14
З а н я т и е 2. Учет результатов. Анализ роста исследуемых микроорганизмов на различных по составу средах	16
Р а з д е л II. МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	19
<i>Лабораторная работа 3.</i> Изучение ферментативной активности микроорганизмов.....	19
З а н я т и е 1. Изучение продукции гидролитических ферментов бактериями родов <i>Escherichia</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Sarcina</i>	24
З а н я т и е 2. Учет результатов. Анализ характера роста и ферментативных активностей исследуемых микроорганизмов на различных субстратах	28
З а н я т и е 3. Получение препаратов амилазы плесневых грибов <i>Aspergillus niger</i> и бактерий <i>Bacillus subtilis</i> . Проверка их активности.....	30
З а н я т и е 4. Изучение влияния температуры на активность амилазы, продуцируемой микроорганизмами.....	31
З а н я т и е 5. Изучение влияния pH, активаторов и ингибиторов на активность амилазы, продуцируемой микроорганизмами.....	32

З а н я т и е 6. Изучение продукции окислительно-восстановительных ферментов бактериями родов <i>Escherichia</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Sarcina</i>	34
<i>Лабораторная работа 4. Утилизация микроорганизмами источников углерода и органических азотсодержащих соединений</i>	37
З а н я т и е 1. Изучение утилизации микроорганизмами источников углерода и органических азотсодержащих соединений	37
<i>Лабораторная работа 5. Транспорт веществ внутрь бактериальной клетки</i>	40
З а н я т и е 1. Изучение катаболитной репрессии на примере представителей семейства Enterobacteriaceae бактерий <i>Dickeya dadantii</i>	45
З а н я т и е 2. Учет результатов. Выявление штаммов, чувствительных к катаболитной репрессии	46
<i>Лабораторная работа 6. Изучение молочнокислого брожения. Количественные и качественные реакции на молочную кислоту. Микроскопическое изучение молочнокислых бактерий</i>	47
З а н я т и е 1. Получение накопительной культуры молочнокислых бактерий	51
З а н я т и е 2. Микроскопирование молочнокислых бактерий.....	52
З а н я т и е 3. Качественные и количественные реакции на молочную кислоту.....	53
<i>Лабораторная работа 7. Изучение маслянокислого брожения. Качественные реакции на масляную кислоту. Микроскопическое изучение маслянокислых бактерий</i>	56
З а н я т и е 1. Получение накопительной культуры маслянокислых бактерий	60
З а н я т и е 2. Микроскопирование маслянокислых бактерий	63
З а н я т и е 3. Качественные реакции на масляную кислоту.....	64
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	66
ПРИЛОЖЕНИЯ	67
1. Контроль управляемой самостоятельной работы студентов	67
2. Программа курса «Физиология микроорганизмов»	74

Учебное издание

Лысак Владимир Васильевич
Игнатенко Елена Игоревна

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Учебно-методическое пособие

Редактор *Т. А. Беланко*
Художник обложки *Т. Ю. Таран*
Технический редактор *Т. К. Раманович*
Компьютерная верстка *С. Н. Егоровой*
Корректор *Е. И. Кожушко*

Подписано в печать 08.04.2016. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Ризография. Усл. печ. л. 4,65. Уч.-изд. л. 4,48. Тираж 100 экз. Заказ 145.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.