

# **Программа**

## **по общей и сельскохозяйственной микробиологии**

### **(экзамен кандидатского минимума)**

#### **1. Введение. Микробиология как наука.**

**Предпосылки возникновения микробиологии:** дискуссия о самозарождении жизни, традиционные микробиологические производства, развитие медицины и ветеринарии. Зарождение и первые шаги микробиологии: открытие микроорганизмов (А. ван Левенгук), доказательство микробиологической природы брожения, гниения (Л. Пастер) и инфекционных процессов (Р. Кох), разработка методов получения чистых культур (Р. Кох, М. Бейеринк), создание фитопатологии и учения о симбиозе (А. де Бари), становление почвенной микробиологии (С.Н.Виноградский, С.П.Костычев), открытие вирусов (Д.И. Ивановский). Роль микробиологии в развитии общей биологии и биотехнологии. Основные разделы микробиологии: общая, сельскохозяйственная, почвенная, медицинская, водная, геологическая, техническая. Специфика сельскохозяйственной микробиологии, ее положение в системе микробиологических знаний и хозяйственное значение.

#### **2. Разнообразие и строение микроорганизмов.**

**2.1. Биоразнообразие микроорганизмов.** Основные группы микроорганизмов – эукариоты (грибы, водоросли, простейшие), прокариоты (бактерии, археи), вирусы – и их эволюционные отношения (теория симбиогенного происхождения эукариот; гипотезы о возникновении вирусов). Принципы и методы систематики микроорганизмов. Метод диагностических сред и его современные модификации; принципы нумерической таксономии. Таксономия, основанная на анализе ДНК: геносистематика, гомология генов рРНК. Различия в понятии вида у прокариот и эукариот.

**2.2. Систематика и цитология прокариот.** Грамположительные и грамотрицательные бактерии, их клеточные формы. Основные группы прокариот: эубактерии, цианобактерии, актиномицеты, археи: сравнительная характеристика и важнейшие представители. Классификация грамотрицательных бактерий: основные представители  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -групп протеобактерий. Поверхностные структуры бактерий: цитоплазматические мембраны, клеточная стенка, периплазма, жгутики, экзополисахариды, капсульные полисахариды, липополисахариды. Внутриклеточные структуры бактерий: цитоплазма, мембранные структуры, хромосома, плазмиды, рибосомы, запасные питательные вещества, гранулы и вакуоли. Способы деления

бактериальных клеток – равное и неравное (почкование). Клеточная дифференцировка у бактерий при адаптации к стрессам (споры, цисты), переходе к азотфиксации (бактероиды, гетероцисты), образовании многоклеточных форм (нитчатые цианобактерии, актиномицеты, миксобактерии).

**2.3. Систематика и морфология грибов.** Одноклеточные, дрожжеподобные и мицелиальные грибы. Поверхностные структуры – мембраны, клеточная стенка. Половые процессы у грибов: гомо- и гетеро-талличность, типы спаривания, чередование гаплоидных и диплоидных фаз в жизненных циклах. Способы клеточного деления – митоз и мейоз. Парасексуальные процессы у дикарионов и гетерокарионов. Основные таксономические и экологические группы грибов, их сельскохозяйственное и биотехнологическое значение.

### **3. Основы генетики микроорганизмов.**

**3.1. Изменчивость и наследственность у бактерий.** Предмет и задачи генетики микроорганизмов, понятие об их изменчивости и наследственности. ДНК как носитель наследственной информации: модель двойной спирали. Репликация и репарация ДНК, их неоднозначность как источник генетической изменчивости. Наследственность, основанная на РНК. Понятие об эпигенетическом наследовании, прионизация белков у дрожжей.

Мутационная и рекомбинационная изменчивость. Типы мутантов (ауксотрофы, устойчивые к антибиотикам и фагам, морфологические), прямой и непрямого отбор мутантов. Мутации спонтанные и индуцированные; основные типы физических и химических мутагенов. Типы мутаций: точковые (замены пар оснований, сдвиги рамки считывания), транспозиции, хромосомные перестройки. Миссенс- и нонсенс-мутации, синонимические и несинонимические замены оснований. Мобильные генетические элементы (транспозоны, инсерционные элементы), их использование для маркировки и идентификации генов.

Способы переноса генов (конъюгация, трансдукция, трансформация) и механизмы рекомбинация (гомологичная, сайт-специфическая, незаконная) у бактерий. Плазмиды, их конъюгативный перенос и мобилизация хромосомы с помощью F-факторов. Перенос генов с помощью вирусов и бактериофагов, вирулентные и умеренные фаги, общая и специфическая трансдукция. Ферменты рестрикции-модификации и преодоление рестрикционных барьеров при переносе генов. Принципы картирования бактериальных генов при конъюгации, трансдукции и трансформации. Картирование генов у грибов, тетрадный анализ.

**3.2. Структура и функции генов.** Ген как единица наследственности и наследования. Преобразования наследственной информации. Центральная догма молекулярной биологии и ее современные модификации. Продукты действия генов – РНК и белки. Выявление генов путем классического генанализа (мутационный и рекомбинационный анализ) и с использованием продуктов действия генов (“обратная генетика”). Неоднозначность действия гена, ее эволюционное и адаптивное значение. Создание клонотек генов и библиотек к-ДНК. Соотношения генотипа и фенотипа, “теория один ген – один полипептид”.

Кодирующие и регуляторные области генов. Транскрипция генов и РНК-полимераза. Регуляция бактериальных генов на уровне транскрипции: одно и двух-компонентные регуляторы, промоторы, опероны и регулоны. Структурно-функциональная организация генов эукариот: интрон-экзонная структура и сплайсинг, особенности экспрессии и регуляции.

**3.3. Геномика микроорганизмов.** Геном как целостная система, соотношение стабильности и пластичности геномов микроорганизмов. Экспериментальные (секвенирование, ПЦР-анализ) и биоинформационные принципы и методы анализа генома. Различия в организации геномов прокариот и эукариот. Геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика в изучении экспрессии генетического материала микроорганизмов. Генетические исследования в “постгеномную эру”.

Структурно-функциональная организация генома бактерий: его коровая часть (гены домашнего хозяйства) и дополнительные части. Хромосома и внехромосомные генетические элементы. Основные типы генома (кольцевой, многокомпонентный, редуцированный) и их эволюционные отношения. Геномные острова и их роль в эволюции бактерий. Структурно-функциональное разнообразие плазмид. Мегаплазмиды и их роль во взаимодействиях бактерий с растениями и животными.

**3.4. Основы популяционной и эволюционной генетики.** Понятие о популяции, особенности его применения к микроорганизмам. Оценка разнообразия бактериальных популяций; клональные и панмиктические популяции. Основные факторы эволюции микроорганизмов: мутационная и рекомбинационная изменчивость, естественный отбор, миграция, генетический дрейф. Горизонтальный перенос генов в популяциях; относительная роль конъюгации, трансдукции и трансформации в эволюции бактерий. Теория “нейтральной эволюции” М. Кимуры, ее соотношение с теорией естественного отбора и использование в филогении (метод молекулярных часов). Молекулярная филогения микроорганизмов, таксономически значимые гены и построение дендрограмм. Гомология, ортология и паралогия генов.

## **4. Молекулярная биология и биохимия микроорганизмов.**

**4.1. Синтез белка.** Белок-синтезирующий аппарат клетки (информационные РНК, рибосомы, транспортные РНК, аминок-ацил-тРНК-синтетазы), особенности их строения и функционирования у прокариот и эукариот. Генетический код и его свойства – универсальность и вырожденность. Основные стадии процесса трансляции: инициация, элонгация, терминация. Неоднозначность процесса трансляции, использование нонсенс- и миссенс-супрессоров для ее изучения. Нерибосомный синтез олигопептидов.

**4.2. Ферменты и их функции.** Строение белковой молекулы: первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры. Основные функциональные группы ферментов (оксидазы, гидролазы, лигазы, синтетазы, трансферазы, киназы), конститутивные и индуцибельные ферменты. Строение ферментов (апопротины и кофакторы, мономерные и мультимерные ферменты), их локализация в клетке. Активный центр фермента и кинетика ферментативной реакции. Ферменты для восприятия сигналов, их рецепторные и эффекторные домены. Небелковые катализаторы – рибозимы.

**4.3. Питание и получение энергии.** Поступление питательных веществ в микробную клетку: пассивная диффузия и активный транспорт, их молекулярные механизмы. Основные способы получения углерода (автотрофия и гетеротрофия), энергии (хемотрофия, фототрофия) и электронов (литотрофия и органотрофия). Синтез АТФ и типы фосфорилирования (окислительное, субстратное, фото-фосфорилирование). Катаболическая репрессия и ее роль в питании микроорганизмов. Катаболизм углеводов: гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса. Аэробное дыхание и цитохромные цепи; анаэробное (нитратное, сульфатное) дыхание. Основные типы брожения (спиртовое, уксуснокислотное, молочнокислотное, маслянокислотное), их биохимия, энергетическая эффективность и биотехнологическое значение. Роль пирувата и ацетил-кофермента А в углеродном обмене. Фотосинтез и фиксация  $\text{CO}_2$  у бактерий и эукариот; темновая фиксация  $\text{CO}_2$ .

**4.4. Метаболизм микробной клетки.** Матричные и ступенчатые биосинтетические процессы. Первичный метаболизм микроорганизмов: синтез аминокислот, азотистых оснований и витаминов. Заменяемые и незаменимые метаболиты. Вторичный метаболизм микроорганизмов: синтез антибиотиков, бактериоцинов, токсинов, фитогормонов, их экологическое и биотехнологическое значение. Синтез и разложение полимерных органических веществ (целлюлоза, крахмал, хитин, липиды): участие экзоферментов и ферментов периплазмы, роль в клеточном метаболизме.

## 5. Экология микроорганизмов.

### 5.1. Распространение в природе и экологические функции микроорганизмов.

Основные экологические группы микроорганизмов. Микроорганизмы в экстремальных условиях (термофилы, галофилы, психрофилы, ацидофилы, алкалофилы), механизмы адаптации к стрессам (недостатку питания и влаги, засолению, экстремальным температурам, кислотности, загрязнению ксенобиотиками и тяжелыми металлами). Роль микроорганизмов в круговороте биогенных элементов – углерода, азота, фосфора, серы, железа.

**5.2. Основы почвенной микробиологии.** Особенности почвы как среды обитания микроорганизмов. Понятие о микробном сообществе почвы, традиционные и современные методы его изучения. Взаимоотношения микроорганизмов в сообществах: синтрофия, антибиоз, конкуренция, хищничество; метабиоз и сукцессии почвенных сообществ. Культивируемые и некультивируемые микроорганизмы. Понятие метагенома, его эволюционный и адаптивный потенциал. Использование методов метагеномики в филогенетическом, популяционном и функциональном анализе почвенной микрофлоры. Оценка разнообразия микробного сообщества.

Роль микроорганизмов в формировании азотного пула почвы: азотфиксации, аммонификация, нитрификация (автотрофная и гетеротрофная), денитрификация, разложение белков, иммобилизация азота. Олигонитрофильные бактерии, их роль в азотном балансе почвы. Свободноживущие и симбиотические азотфиксаторы. Нитрогеназа: структура и каталитические функции. Нитрогеназная реакция: субстраты, продукты, энергетика. Разнообразие нитрогеназ: молибден-содержащие и безмолибденовые формы. Методы измерения азотфиксирующей активности – ацетиленовой, балансовой и изотопный. Организация и регуляция *nif*-генов у свободноживущих (*Klebsiella pneumoniae*) и симбиотических (ризобии) азотфиксаторов.

Участие микроорганизмов в формировании и разложении гумусовых веществ. Автохтонная и зимогенная микрофлора. Формирование структуры почвы. Микробиологическая ремедиация почв: трансформация (мобилизация, иммобилизация) тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов, деструкция ксенобиотиков (пестициды, нефтепродукты). Перспективы использования микроорганизмов для повышения плодородия почв. Создание искусственных почв с помощью микробиологических методов, препарат АМБ.

### 5.3. Микробно-растительные взаимодействия.

*Основы симбиологии и симбиогенетики.* Определение симбиоза, его основные формы. Факультативные, экологически облигатные и генетически облигатные симбиозы. Причины и формы экологической зависимости растений от микроорганизмов; трофические и защитные симбиозы. Мутуалистические, антагонистические и эксплуатационные симбиозы. Основные симбиотические процессы – сигнальное взаимодействие партнеров, развитие новых структур, метаболическая интеграция партнеров. Основные понятия симбиогенетики: симбиоз как надорганизменная генетическая система; единица наследования и наследственности в симбиозе.

*Прикорневая зона как среда обитания микроорганизмов.* Ризосферные рост-стимулирующие бактерии (PGPR): разнообразие, функции (азотфиксация, мобилизация питательных веществ из почвы, синтез фитогормонов), роль в питании растений и их защите от патогенов и вредителей. Роль генотипа растения в формировании микрофлоры ризосферы и ризопланы.

*Симбиотическая азотфиксация.* Разнообразие азотфиксирующих растительно-микробных симбиозов. Принципы организации клубеньковых симбиозов двудольных растений с ризобиями и актиномицетами. Бобово-ризобиальный симбиоз: узнавание и сигнальное взаимодействие растений и бактерий, синтез и рецепция Nod-факторов. Развитие клубенька, “симбиотические” гены растений: их выявление, основные группы и функции. Генетическая система симбиоза у клубеньковых бактерий: контроль вирулентности, азотфиксирующей активности, симбиотической эффективности, специфичности и конкурентоспособности. Эндосимбиотические ниши клубенька (инфекционные нити, симбиосомы), генетический контроль их развития. Метаболическая интеграция партнеров, формирование объединенных систем азотного и углеродного обмена в клубеньках бобовых. Системная регуляция симбиоза. Диалог клубеньковых бактерий с защитными системами растений. Актиноризные симбиозы растений с азотфиксирующими актиномицетами *Frankia*. Ризосферная и эндофитная азотфиксация (на примере *Azospirillum* и *Azoarcus*). Симбиозы растений с цианобактериями (синцианозы).

*Микоризные симбиозы.* Разнообразие микоризных грибов. Арбускулярная микориза (АМ): распространение, основные стадии и молекулярные механизмы регуляции развития и метаболизма. Контроль развития АМ со стороны растения-хозяина. Роль АМ в фосфорном питании растений. Эктомикориза и ее роль в азотном питании растений. Орхидная микориза как пример эксплуатационного симбиоза. Экологическое значение микоризы. Роль микоризы в эволюции растений.

*Защитные симбиозы.* Биоконтроль патогенов, его экологические основы и биохимические механизмы (прямое подавление патогенов, индукция защитных реакций растения). Эпифитные микроорганизмы – антагонисты патогенов и вредных насекомых. Эндوفитные грибы сем. спорыньевых: биоконтроль животных-фитофагов.

*Элементы фитопатологии.* Разнообразие фитопатогенных бактерий и грибов. Биотрофные и некротрофные патогены, вызываемые ими болезни растений. Механизмы атаки растений патогенами-некротрофами (синтез токсинов или литических ферментов) и биотрофами (образование гаусторий грибами, передача белков-эффекторов в растительные клетки бактериями). Локальные и системные защитные реакции растений. Теория “ген-на-ген” и ее использование для получения сортов растений, устойчивых к патогенам. Агробактерии как природные генетические инженеры растений.

**5.4. Взаимодействия микроорганизмов с животными.** Роль микроорганизмов в усвоении животными растительной пищи. Структура и функции микробиоты рубца: разложение целлюлозы, рециклизация азота, синтез белка. Концепция микробиома, его таксономическая структура и адаптивный потенциал. Микроорганизмы – симбионты и антагонисты беспозвоночных и позвоночных животных – вредителей сельского хозяйства. Внутриклеточные симбионты насекомых (*Buchnera*, *Wolbachia*). Экологический и биотехнологический потенциал энтомоцидных и родентоцидных микроорганизмов.

## **6. Микроорганизмы в сельскохозяйственной биотехнологии.**

**6.1. Экологически устойчивое агропроизводство.** Экологические последствия зеленой революции и химизации земледелия и растениеводства. Утрата симбиотического потенциала растений при их окультуривании и селекции – причины и последствия. Понятие об экологически устойчивых системах земледелия и растениеводства. Экологический потенциал микробно-растительных взаимодействий, принципы селекции на повышение эффективности симбиоза.

**6.2. Получение полезных микроорганизмов.** Генетические ресурсы сельскохозяйственно-ценных микроорганизмов, использование центров происхождения культурных растений для их изучения. Аналитические и генетические методы в селекции симбиотических микроорганизмов. Использование мутагенеза, гибридизации и генно-инженерных подходов для направленного получения хозяйственно-ценных штаммов. Генетическая стабильность производственных штаммов и способы ее повышения. Экологическая и генетическая безопасность использования микробных препаратов.

**6.3. Культивирование и хранение полезных микроорганизмов.** Рост микроорганизмов в стационарной культуре, хемостате, турбидостате. Питательные среды и условия роста. Стерилизация, пастеризация и дезинфекция. Понятие о технологичности микроорганизмов. Традиционные и современные способы хранения микробных коллекций. Задачи по сохранению генетических ресурсов микроорганизмов, его особенности по сравнению с хранением генресурсов растений и животных.

**6.4. Микробиологические препараты, применяемые в растениеводстве.** Определение микробиологического препарата, однокомпонентные и многокомпонентные препараты. Препараты клубеньковых бактерий (ризобий): история применения, экологическая эффективность в зависимости от генотипа растений и почвенно-климатических условий. Взаимосвязь экологической эффективности и специфичности ризобий. Экономическая эффективность, препаративные формы ризобий (торфяные, жидкие, гелевые, пелетирование семян). Конкуренция производственных и местных штаммов за инокуляцию растений, прямые и косвенные методы оценки конкурентоспособности клубеньковых бактерий, пути ее повышения. Экстрасол – производство, применение, спектр и эффективность действия.

**6.5. Использование микроорганизмов, взаимодействующих с животными.** Структура и функции микробиоты рубца, возможность ее оптимизации. Микробиологические основы приготовления кормов для сельскохозяйственных животных. Микроорганизмы в биоконтроле вредных животных (грызуны, насекомые-фитофаги, кровососущие двукрылые). Микробиологические препараты для биоконтроля вредителей сельского хозяйства (бактороденцид, битоксибацилин, бактокулицид, актинин).



## Рекомендуемая литература

- 1 Шлегель Г. Общая микробиология. М. Мир. 1987.
2. Ленгелер И., Древис Г., Шлегель Г. (ред. ). Современная микробиология. Прокариоты (в 2 томах). М. Мир. 2008.
3. Громов Б.В., Павленко Г.В. Экология бактерий. Изд-во ЛГУ. Л. 1989.
4. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. М. Общество фитопатологов, 2001.
5. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. Изд-во МГУ. М., 1978.
6. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. 8-е издание. Издательский центр "Академия". 2008.
7. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. М. Колос. 1978.
8. Пиневиц А.В. Микробиология. Биология прокариотов (в 3 томах). Изд-во СПбГУ, 2007-2009.
9. Инге-Вечтомов С.Г. Введение в молекулярную генетику. М. Высшая школа. 1983.
10. Захаров И.А. Курс генетики микроорганизмов. Минск. Высшая школа. 1978.
11. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов. Молекулярная генетика агросистем будущего. Изд-во СПбГУ. 2009.
12. Ермилова Е.В. Молекулярные механизмы адаптации прокариот. Изд-во СПбГУ. 2007.
13. Дьяков Ю.Т. Шнырева А.В., Сергеев А.Ю. Введение в генетику грибов. 2005. Издательский центр "Академия".
14. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Общая микробиология. Издательский центр "Академия". 2007.
15. Фробишер М. Основы микробиологии. М. Мир. 1965.
16. Биопрепараты в сельском хозяйстве (под ред. И.А.Тихоновича, Ю.В. Круглова). М. Россельхозакадемия, 2005.
17. Возняковская Ю.М. Микрофлора растений и урожай. Л.: Колос, 1969. 240 с.
18. Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. Л.: Колос, 1970. 191 с.
19. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. Под ред. Г. Спайнка, А. Кондороши и П. Хукаса (перевод под ред. Тихоновича И.А., Проворова Н.А.). Спб: Бионт, 2002. 567 с.
20. Сафронова В.И., Оследкин Ю.С., Свиридова О.В., Воробьев Н.И. Методы консервации коллекционных культур микроорганизмов. Методические рекомендации. СПб.: ГНУ ВНИИСХМ. 2007, 32 с.