

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра биохимии и микробиологии

И.Ф. Каримов

МИКРОБИОЛОГИЯ

Рекомендовано редакционно-издательским советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» в качестве методических указаний для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки

Оренбург
2017

УДК 579.22(076.5)

ББК 28.4я7

К23

Рецензент – доктор биологических наук С.В. Лебедев

Каримов, И.Ф.

К23 Микробиология: методические указания / И.Ф. Каримов
Оренбургский гос. ун-т – Оренбург: ООО ИПК «Университет»,
2017. – 48 с.

Методические указания рекомендованы для аспирантов обучающихся по программам высшего образования направления подготовки 06.06.01 Биологические науки, профиль «Микробиология».

В методических указаниях представлены общие сведения по подготовке и сдаче аспирантами кандидатского экзамена по дисциплине «Микробиология».

УДК 579.22(076.5)

ББК 28.4я7

© Каримов И.Ф., 2017

© ОГУ, 2017

Содержание

Введение.....	4
1 Паспорт специальности 03.02.03 Микробиология	6
2 Содержание курса «Микробиология» для аспирантов	8
2.1 Основные темы дисциплины «Микробиология»	8
2.2 Результаты обучения по дисциплине «Микробиология».....	11
3 Специальный блок дисциплины «Микробиология»	14
3.1 Чувство кворума у бактерий.....	14
3.2 Quorum sensing <i>Vibrio fischeri</i>	16
3.3 Quorum sensing <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.4 Quorum sensing <i>Chromobacterium violaceum</i>	20
3.4 QS системы, включающие аутоиндуктор АИ-2 и АИ пептидной природы.....	21
3.5 Ферменты и субстраты свечения	23
3.6 Генетика и регуляция свечения.....	27
3.7 Экология и применение светящихся бактерий.....	29
4 Оценка уровня знаний аспиранта	35
4.1 Проведение промежуточного контроля знаний	35
4.2 Проведение кандидатского экзамена.....	37
5 Вопросы к экзамену по дисциплине «Микробиология»	39
Список использованных источников	45

Введение

Необходимым требованием, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата наук, является сдача кандидатских экзаменов по философии, иностранному языку и по специальности. Наличие последнего определяется потребностью проверки и подтверждения квалификации аспиранта и оценки его теоретических знаний, опыта профессиональной деятельности, а также способности решать поставленные перед ним задачи.

Кандидатский экзамен по специальной дисциплине сдается по программе, состоящей из двух частей: типовой программы-минимум по специальности, разрабатываемой ведущими в соответствующей отрасли высшими учебными заведениями и научными организациями и утверждаемой Министерством образования и науки Российской Федерации, и дополнительной программы, разрабатываемой соответствующей кафедрой (отделом, лабораторией и т.п.) и утверждаемой Ученым советом учебного и научного учреждения.

Дополнительная программа должна включать новые разделы данной отрасли науки и разделы, связанные с направлением научных исследований соискателя, а также учитывать последние достижения в данной отрасли науки и новейшую литературу.

Экзамен по специальной дисциплине должен выявить уровень теоретической и профессиональной подготовки соискателя, знание общих концепций и методологических вопросов данной науки, истории ее формирования и развития, фактического материала, основных теоретических и практических проблем данной отрасли знаний.

Высшее учебное заведение имеет право принимать кандидатские экзамены у аспирантов и соискателей сторонних организаций при наличии аспирантуры по соответствующим специальностям, как правило, на контрактной основе.

Комиссии по приему кандидатских экзаменов по каждой дисциплине назначаются приказом ректора в составе председателя, как правило – проректора, и двух - трех членов из числа высококвалифицированных научно-педагогических и научных кадров.

При приеме кандидатских экзаменов могут присутствовать члены соответствующего диссертационного совета, ректор, проректор, представители Федерального агентства по образованию.

Кандидатские экзамены в высших учебных заведениях принимаются, как правило, два раза в год в виде сессий продолжительностью один месяц каждая. В случае представления диссертационной работы в диссертационный совет кандидатский экзамен может быть принят по решению ректора вне сроков сессии. Высшее учебное заведение уведомляет соискателей о времени и месте проведения экзаменов не позднее, чем за один месяц до их проведения.

Таким образом, кандидатские экзамены являются составной частью аттестации научных и научно-педагогических кадров. Цель экзамена – установить глубину профессиональных знаний соискателя, степени подготовленности к самостоятельной научно-исследовательской работе. Сдача кандидатских экзаменов обязательна для присуждения ученой степени кандидата наук, а также для соискателей ученой степени доктора наук, не имеющих ученой степени кандидата наук.

1 Паспорт специальности 03.02.03 Микробиология

Согласно паспорту специальности 03.02.03 Микробиология, данная дисциплина представляет собой область науки, занимающаяся исследованием теоретических основ жизнедеятельности микроорганизмов: наследственности, изменчивости, метаболизма, закономерности взаимоотношения с окружающей средой и живыми организмами, распространения в природе, взаимодействия с факторами внешней среды и живыми организмами, их роли в круговороте веществ. Микробиология изучает бактерии, а также определенные группы дрожжеподобных и мицелиальных грибов, микроскопические водоросли, простейшие. Народнохозяйственное значение состоит в использовании микроорганизмов для борьбы с вредителями, болезнями человека, животных и растений; повышения плодородия почв, силосования кормов, получения гормонов, витаминов, полисахаридов, антибиотиков, белка, белково-витаминных добавок, аминокислот, ферментов, вакцин, моноклональных антител и др.

Важно отметить, что ключевым объектом исследования должны быть микроорганизмы как клеточные организмы в целом, а не отдельные компоненты их структуры, к примеру изучение влияния факторов внешней среды на активность литических ферментов в отношении липополисахаридов (в виде готовых препаратов) является областью интересов биохимии. Поэтому при планировании диссертационного исследования и формулировки темы работы необходимо исходить из следующих областей исследования, которыми занимается «Микробиология»:

- 1) проблемы эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения;
- 2) выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов;
- 3) морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов;
- 4) исследование микроорганизмов на популяционном уровне;
- 5) обмен веществ микроорганизмов;

- б) сапрофитизм, паразитизм, симбиоз микроорганизмов;
- 7) экология микробных сообществ, сапрофитных, патогенных, условнопатогенных микроорганизмов в окружающей среде. Абиотические и биотические факторы;
- 8) использование сапрофитных бактерий антагонистов, продуцентов биологически активных веществ для оптимизации микробиоценозов;
- 9) участие микроорганизмов в круговороте веществ;
- 10) использование микроорганизмов в народном хозяйстве, ветеринарии и медицине.

Таким образом, аспирант, осуществляющий подготовку научно-исследовательской работы в данной области должен знать структуру и свойства бактериальных клеток, принципы функционирования клеточных систем и характер взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой, в том числе и с другими представителями сообщества микроорганизмов. С другой стороны, специфика научной работы аспиранта предполагает углубленное и всестороннее изучение отдельно взятого явления или свойства микроорганизма, что позволяет оценить его компетентность в рассматриваемой области науки и оценить глубину проработки имеющейся информации по данной тематике.

Тем не менее, специфика направления науки, в котором рассматривается данная специальность, а именно биологические, сельскохозяйственные, ветеринарные или медицинские, обычно накладывает свой отпечаток на качественный состав включаемых вопросов. В связи с этим важно определить позицию микробиологических исследований, которые в рамках биологических наук в первую очередь носят фундаментальный характер и направлены на выявление механизмов и закономерностей течения явлений, связанных с микроорганизмами.

2 Содержание курса «Микробиология» для аспирантов

2.1 Основные темы дисциплины «Микробиология»

Дисциплина включает в себя восемь тем, позволяющих формирование прочного фундамента знаний о морфологии микроорганизмов, особенностях их физиологических и биохимических процессов, условиях существования и их роли в природе и жизни человека.

Тема №1 «История возникновения и развития микробиологии» подразумевает освещение вопросов о предмете и цели изучения микробиологии, ее основных этапов развития, открытии микроорганизмов А. ван Левенгуком, роли Л. Пастера в формировании микробиологии, значении работ Р. Коха, И.И. Мечникова, П. Эрлиха, С.Н. Виноградского, М. Бейеринка, А. Клейвера, а также открытии вирусов Д.И. Ивановским и пенициллина А. Флемингом.

Следующая тема «Морфология, строение, развитие бактериальной клетки» раскрывает следующие вопросы: существование общих для всех живых клеток структурно-функциональных подсистем, основные отличия прокариот от эукариот, морфология одноклеточных и многоклеточных бактериальных клеток, строение бактериальной клетки, клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий, L-формы. Рассматриваются аспекты структуры цитоплазматической мембраны, капсулы, чехлы, слизи и межклеточный матрикс, жгутики, а также их расположение, организация и механизм движения. Освещаются реакции таксиса, пили, их значение, генетический аппарат прокариотической клетки, белоксинтезирующий аппарат прокариот, структурная организация метаболического аппарата прокариот, внутрицитоплазматические мембраны прокариот, а также запасные вещества и другие внутрицитоплазматические включения.

Третья тема характеризует потребность микроорганизмов в химических элементах, классифицирует бактерий по источнику углерода и энергии, факторам роста. Раскрываются вопросы по основным типам сред, используемых для культивирования микроорганизмов, а также рассматриваются аспекты культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов, выделяются типы питания и размножения бактерий, а также клеточный цикл бактерий в целом с описанием основных его параметров роста культур: время генерации, константа скорости деления, концентрация и плотность бактерий; рост микроорганизмов в периодической культуре, кривая роста, особенности отдельных фаз; рост в непрерывной культуре. Характеризуются причины подавления роста и гибели микроорганизмов под действием различных агентов.

В теме «Метаболизм микроорганизмов» освещаются следующие вопросы: обмен веществ, основные понятия, строение и классификация ферментов, получение энергии микроорганизмами, энергетический обмен (катаболизм) и способы питания, транспорт питательных веществ, брожение, пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса и Энтнера-Дудорова, схема Варбурга-Диккенда-Хореккера, характеристика микроорганизмов, вызывающих разные брожения. аэробное дыхание, роль циклов трикарбоновых кислот и пентозофосфатного окислительного в метаболизме органических соединений, дыхательная цепь переноса электронов, анаэробное дыхание, фотосинтез, конструктивный обмен (анаболизм), синтез основных биополимеров (нуклеиновых кислот, белков, липидов, углеводов), а также регуляция метаболизма и ее уровни, конститутивные и индуцибельные ферменты, индукция и репрессия.

Пятый раздел освещает вопросы, касающиеся разложения отдельными группами микроорганизмов целлюлозы, крахмала, хитина, пектина, лигнина, белка, липидов, фиксации молекулярного азота микро-организмами, свободноживущих, ассоциативные и симбиотические азотфиксаторах с характеристикой биохимии азотфиксации. Описаны особенности

морфологии и систематики цианобактерий, специализированных клеток цианобактерий и их функции, фотосинтеза, фиксации азота, метаболизма аэробных оксигенных фототрофных бактерий. Рассматриваются ключевые особенности пурпурных серных и несерных бактерии, их морфология и физиология, а также зеленые бактерии, особенности их морфологии и физиологии и пигменты фотосинтетического аппарата.

Шестой раздел «Генетика микроорганизмов» описывает спонтанные и индуцированные мутации, «молчащие» мутации, обратные мутации и реверсии, характеристика мутагенов, механизмы репарация ДНК, передачу признаков и генетическую рекомбинацию, процессы конъюгации, плазмиды. Также рассмотрены трансдукция и трансформация.

В седьмом разделе приведена характеристика экосистемы, местообитания, экологической ниши, принципы санитарно-микробиологической оценки качества воды, самоочищение водоемов, микроорганизмы как симбиотические партнеры, мутуалистический симбиоз и антагонистический симбиоз.

Восьмой раздел посвящен методам исследования микроорганизмов и раскрывает принципы световой микроскопии, ее техническое и методическое обеспечение, принципы флюоресцентной (люминесцентной) микроскопии и ее использование для специфического выявления микроорганизмов, зондовая микроскопия и перспективы ее использования при проведении микробиологических исследований, сканирующая электронная и просвечивающая микроскопия. Также рассмотрены основные методы генетического исследования микроорганизмов, включающие ДНК-ДНК-гибридизацию, технические варианты секвенирования ДНК, принцип полимеразной цепной реакции, ее использование при проведении микробиологических исследований, а также реал-тайм ПЦР. Наконец, описаны принципы биолюминесцентного анализа, охарактеризованы природные и рекомбинантные люминесцирующие микроорганизмы, приведены примеры и приемы проведения биолюминесцентного анализа при

оценке интегральной биотоксичности природных сред, а также его использование при оценке специфичности воздействия и анализе живых систем.

2.2 Результаты обучения по дисциплине «Микробиология»

В результате обучения по данной дисциплине у аспиранта должны быть сформирован определенный ряд этапов компетенций.

Знать методы критического анализа и оценки современных научных достижений, а также методы генерирования новых идей при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях. Уметь анализировать альтернативные варианты решения исследовательских и практических задач и оценивать потенциальные выигрыши/проигрыши реализации этих вариантов; при решении исследовательских и практических задач генерировать новые идеи, поддающиеся операционализации исходя из наличных ресурсов и ограничений. Владеть навыками анализа методологических проблем, возникающих при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях; навыками критического анализа и оценки современных научных достижений и результатов деятельности по решению исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях.

Знать содержание процесса целеполагания профессионального и личностного развития, его особенности и способы реализации при решении профессиональных задач, исходя из этапов карьерного роста и требований рынка труда. Уметь формулировать цели личностного и профессионального развития и условия их достижения, исходя из тенденций развития области профессиональной деятельности, этапов профессионального роста, индивидуально-личностных особенностей; осуществлять личностный выбор

в различных профессиональных и морально-ценностных ситуациях, оценивать последствия принятого решения и нести за него ответственность перед собой и обществом. Владеть приемами и технологиями целеполагания, целереализации и оценки результатов деятельности по решению профессиональных задач; способами выявления и оценки индивидуально-личностных, профессионально-значимых качеств и путями достижения более высокого уровня их развития.

Знать современные способы использования информационно-коммуникационных технологий в выбранной сфере деятельности. Уметь выбирать и применять в профессиональной деятельности экспериментальные и расчетно-теоретические методы исследования. Владеть навыками поиска (в том числе с использованием информационных систем и баз данных) и критического анализа информации по тематике проводимых исследований; навыками планирования научного исследования, анализа получаемых результатов и формулировки выводов; навыками представления и продвижения результатов интеллектуальной деятельности.

Знать современное состояние науки в области микробиологии; нормативные документы для составления заявок, грантов, проектов НИР; требования к содержанию и правила оформления рукописей к публикации в рецензируемых научных изданиях. Уметь представлять научные результаты по теме диссертационной работы в виде публикаций в рецензируемых научных изданиях; готовить заявки на получение научных грантов и заключения контрактов по НИР в области микробиологии; представлять результаты НИР (в т.ч., диссертационной работы) академическому и бизнес-сообществу. Владеть методами планирования, подготовки, проведения НИР, анализа полученных данных, формулировки выводов и рекомендаций по направленности «Микробиология»; навыками составления и подачи конкурсных заявок на выполнение научно-исследовательских и проектных работ по направленности подготовки «Микробиология».

Знать принципы молекулярно-генетической организации систем плотностнозависимой коммуникации у бактерий; методические подходы к управлению «чувством кворума» биотехнологически полезных и патогенных бактерий; о токсических и антитоксических эффектах наночастиц и наноматериалов. Уметь исследовать и количественно оценивать активность систем «чувства кворума» в экспериментах *in vitro* и *in vivo*; использовать бактериальные люминесцирующие биосенсоры в системах оценки биологической активности малых молекул и наночастиц. Владеть современными методами оценки систем «чувства кворума»; молекулярно-генетическими методами исследования транскрипционной активности генов, находящихся контролем систем «чувства кворума»; методами биолюминесцентного тестирования активности соединений нанокربона.

Формирование данных компетенций также обеспечивается контрольными заданиями, подразделяемыми на вопросы устного собеседования и дискуссионные темы, позволяющие оценивать и диагностировать знание фактического материала и умение правильно использовать специальные термины и понятия, узнавание объектов изучения в рамках определенного раздела дисциплины, задания реконструктивного уровня (задачи), позволяющие оценивать и диагностировать умения синтезировать, анализировать, обобщать фактический и теоретический материал, установлением причинно-следственных связей, а также творческие задания, позволяющие оценивать и диагностировать умения, интегрировать знания различных областей, аргументировать собственную точку зрения.

3 Специальный блок дисциплины «Микробиология»

3.1 Чувство кворума у бактерий

Феномен Quorum sensing (QS) регуляции был обнаружен впервые около 30 лет назад при изучении биолюминесценции у светящейся морской бактерии *Vibrio fischeri*. Долгое время считалось, что QS регуляция используется только этой бактерией и только для регуляции весьма необычного в микробном мире процесса - биолюминесценции. Все-таки в последние 10 лет выяснилось, что QS регуляция широко распространена у бактерий различных грамотрицательных и грамположительных таксономических групп и что QS системы участвуют в контроле большого количества клеточных процессов. В настоящее время QS регуляция обнаружена у более чем 50 видов бактерий.

QS системы включают, по крайней мере, два обязательных компонента: 1) низкомолекулярные сигнальные молекулы – аутоиндукторы (АИ), легко диффундирующие через клеточную стенку; 2) рецепторные белки, с которыми аутоиндукторы связываются. При низкой плотности популяции бактерии продуцируют базальный уровень аутоиндукторов. При повышении популяции до критического уровня количество АИ увеличивается, сигнальные молекулы накапливаются в среде. Когда их концентрация достигает до определенного порогового значения, АИ взаимодействуют с рецепторными белками; комплексы рецепторный белок - АИ связываются с промоторными областями генов-мишеней, и в результате происходит активация (индукция) экспрессии специфических наборов генов у бактерий/

В последние годы феномен QS вызывает большой интерес исследователей, работающих в области микробиологии и генетики микроорганизмов, а также в прикладных областях (медицина, сельское хозяйство и др.). Было показано, что регуляторные системы типа QS играют ключевую роль во многих процессах бактериальной клетки. Они участвуют

во взаимодействии бактерий с высшими организмами, регуляции вирулентности бактерий, формировании биопленок, регуляции экспрессии генов, связанных с синтезом токсинов, антибиотиков и других вторичных метаболитов, а также различных ферментов, в споруляции бактерий и т.д. QS системы функционируют как глобальные факторы регуляции. Особый интерес вызывает роль QS в регуляции процессов взаимодействия патогенных бактерий с эукариотическим организмом. Конечно, инфекционный процесс происходит при достижении достаточно больших популяций патогенных бактерий, когда начинают функционировать QS системы регуляции. Увеличение концентрации сигнальных молекул в среде приводит к синхронному синтезу факторов вирулентности, способствующих разрушению тканей организма при инфекции. Подобные скоординированные действия бактерий способствуют успешному преодолению ими иммунного ответа инфицированного организма.

С помощью АИ осуществляется коммуникация (межклеточная передача информации) бактерий, принадлежащих к одному или разным видам, родам и даже семействам. Часто в литературе QS называют “языком” бактерий, а аутоиндукторы – «словами». Благодаря коммуникации бактерии могут скоординировано регулировать экспрессию генов во всей популяции, способствующей выживанию бактерий в неблагоприятных условиях среды. Подобное поведение бактерий часто называют «социальным», в нем проявляются черты сходства с многоклеточными организмами.

Лучше всего изучены QS системы грамотрицательных бактерий, функционирующие с участием аутоиндукторов N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ, или АИ-1). Молекулы АГЛ содержат гомосеринлактонное кольцо и боковые ацильные цепи. В настоящее время описаны более 40 видов АГЛ, которые различаются количеством ацильных групп в боковых цепях (от C4 до C18) и наличием замещающих группировок; эти различия определяют специфичность действия АИ. Рецепторные белки, с которыми взаимодействуют АГЛ, и синтазы АГЛ гомологичны LuxR и LuxI белкам

Vibrio fischeri и составляют семьи LuxR и LuxI-подобных белков. QS системы LuxI-LuxR типа описаны у большого количества грамотрицательных бактерий, среди них – патогенные и фитопатогенные бактерии.

3.2 Quorum sensing *Vibrio fischeri*

Палочковидная грамотрицательная бактерия *Vibrio fischeri* может обитать в виде свободноживущего планктонного организма и симбионта головоногих моллюсков и рыб.

Vibrio fischeri полезны кальмару, ведут ночной образ жизни, стирая видимую при лунном свете тень, тем самым защищая кальмара от хищников. Это происходит за счет отражающей способности световых органов кальмара. Тем не менее для этого органы нуждаются в белках, известных как рефлектины, которые вырабатывают именно *Vibrio fischeri*. В свою очередь, кальмар обеспечивает бактерий убежищем и стабильным источником питательных веществ.

Интересным является тот факт, что биолюминесценция бактерий напрямую зависит от QS. Бактерии каким-то образом взаимодействуют друг с другом, и биолюминесценция в световых органах кальмаров возможна лишь при достижении популяцией бактерий определенного уровня.

В симбиозе бактерий помогают специальные клетки, расположенные внутри светового органа кальмаров и рыб. Эти клетки активируют рост симбионтов и препятствуют проникновению конкурентов. После заполнения органа *Vibrio fischeri* бактерии вызывают гибель этих специальных клеток светового органа.

QS регуляция lux оперона *Vibrio fischeri* исследована наиболее подробно. Клетки *Vibrio fischeri* синтезируют АИ N-(3-оксогексаноил)-гомосеринлактон (3OC6-HSL). Комплекс рецепторного белка LuxR с N-(3-

оксогексаноил)-гомосеринлактон с связывается промоторной областью lux оперона и индуцирует его транскрипцию, что приводит к синтезу люциферазы и эмиссии света. При росте культуры с увеличением популяции количество N-(3-оксогексаноил)-гомосеринлактон в среде повышается, его концентрация достигает порогового уровня, достаточного, чтобы могла произойти активация LuxR, связывание его с промоторной областью lux оперона и индукция этого оперона. Любопытно, что ген luxI, кодирующий синтазу N-(3-оксогексаноил)-гомосеринлактон, входит в состав lux оперона, поэтому количество N-ацил-гомосеринлактонов при индукции lux оперона резко увеличивается. Подобная локализация генов синтаз N-ацил-гомосеринлактонов наблюдается в других QS системах, но не всегда. В нескольких изученных QS системах LuxR-подобные белки содержали два домена. С-концевой домен необходим для связывания с ДНК, N-концевой взаимодействует с АГЛ. Связывание рецепторного белка с эффектором АГЛ увеличивает его стабильность, устойчивость к протеолитической деградации.

При присоединении АГЛ изменяется конфигурация LuxR, происходит его правильное сворачивание. С промоторной областью связывается димер рецепторного белка с АГЛ, обычно со специфическим lux-сайтом размером 20 нуклеотидов, содержащим инвертированные повторы. Строгой вид специфичности действия АГЛ не наблюдается. Рецепторный белок лучше всего связывается с «собственным» АГЛ, компонентом той же QS системы, и хуже – с АГЛ «чужими», отличающимися по структуре. Описаны случаи, когда одни и те же типы АГЛ могут продуцироваться и узнаваться бактериями разных видов и родов.

3.3 Quorum sensing *Pseudomonas aeruginosa*

Грамотрицательная подвижная бактерия палочковидной формы, является облигатным (строгим) аэробом. Один из главных возбудителей

локальных и системных гнойно-воспалительных процессов, особенно в условиях стационара. В тропиках бактерия обитает в воде и в почве. Заражение происходит через раневую поверхность.

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) знаменита микробиологам как патоген растений, всё-таки способна вызывать заболевания и у людей. По-другому говоря, *Pseudomonas aeruginosa*, является для человека условно-патогенным организмом. Она никогда не поражает здоровые неповрежденные ткани. С другой стороны, в организме нет таких тканей, которые в случае повреждения или другого снижения защитных функций не могли бы подвергнуться атаке синегнойной палочки. Вследствие этого, инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*, являются довольно распространенными госпитальными инфекциями.

QS регуляция у патогенной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* также подробно исследована. У этой бактерии, вызывающей тяжелые инфекции дыхательных путей, идентифицированы две QS системы, LasI LasR и RhlI RhlR. Синтаза LasI первой QS системы отвечает за продукцию аутоиндуктора N-3(оксододеканойл)-гомосеринлактона (3OC12-HSL). Данная система регулирует синтез факторов вирулентности, ответственных за разрушение тканей организма при инфекции *Pseudomonas aeruginosa*: эластазы, экзотоксина, протеазы, щелочной фосфатазы, а также активирует вторую QS систему *Pseudomonas aeruginos*. RhlI-синтаза определяет продукцию второго N-ацил-гомосеринлактона этой бактерии – N-бутирил-гомосеринлактона (C4-HSL). Комплекс рецепторного белка RhlR с N-бутирил-гомосеринлактоном принимает участие в контроле экспрессии нескольких генов, важных для вирулентности бактерий и их выживания в природных условиях: генов эластазы и щелочной фосфатазы, генов, участвующих в синтезе пиоцианина, а также гена *groS*, который кодирует сигму S субъединицу РНК-полимеразы, ключевой фактор регуляции транскрипции различных генов, экспрессирующихся при переходе клеток в

стационарную фазу роста. Было показано, что экспрессия более 600 генов *Pseudomonas aeruginosa* контролируется QS системами.

Показано, что АИ N-3(оксододеcanoил) – гомосеринлактон может оказывать непосредственное действие на эукариотический организм и без бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, подавляя иммунную систему организма. Инъекции этого соединения вызывали у мышей воспалительный процесс.

У *Pseudomonas aeruginosa* был описан АИ иной природы – 2-гептил-3-гидроокси-4-хинолон (названный PQS). Он формируется из антранилата, интермедиата пути биосинтеза триптофана. 2-гептил-3-гидроокси-4-хинолон частично регулирует экспрессию гена эластазы *lasB* вместе с двумя описанными выше QS системами. Для экспрессии 2-гептил-3-гидроокси-4-хинолон необходим белок *LasR*, а 2-гептил-3-гидроокси-4-хинолон в свою очередь активирует транскрипцию гена *RhlI*. Таким образом, QS системы принимают участие в контроле вирулентности *Pseudomonas aeruginosa* в сложной, иерархической сети регуляции.

Не все грамотрицательные бактерии могут использовать QS системы, функционирующие с участием N-ацил-гомосеринлактона. Тем не менее в некоторых случаях бактерии, не способные синтезировать свой личный сигнал (например, *E. coli*, *Salmonella*), могут отвечать на сигналы других бактерий, взаимодействуя, таким образом, с ними. У *E. coli* и *Salmonella* обнаружены белки-рецепторы *SdiA*, способные отвечать на сигналы N-ацил-гомосеринлактонод . Данные рецепторные белки взаимодействуют с сигнальными молекулами, синтезируемыми другими бактериями.

У некоторых изученных QS систем разнообразных бактерий (*Vibrio fischeri*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*) в биосинтезе АГЛ участвует S-аденозил метионин (SAM) и белок АСР, переносчик ацильных групп. Синтаза связывает ацил-АСР с SAM через формирование амидной связи между ацильной цепью ацил-АСР и аминогруппой гомоцистеиновой части SAM. Далее происходит лактонизация интермедиата, создаётся гомосеринлактонное кольцо, в последствии

образуется N-ацил-гомосеринлактон. Данный путь синтеза N-ацил-гомосеринлактонов, наверное, консервативен для синтаз, гомологов LuxI.

3.4 Quorum sensing *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum является частью нормальной микрофлоры воды и почвы в тропических и субтропических регионах.

Chromobacterium violaceum один из миллиона видов свободноживущих микроорганизмов, населяющих почву и воду в тропической и субтропической зонах. Это возможно, так как *Chromobacterium violaceum* смогла адаптироваться к жизни в суровых условиях окружающей среды: в условиях нехватки питательных веществ, высокого уровня ядов и радиации.

Природный штамм *Chromobacterium violaceum* образует фиолетовый пигмент виолацеин, обладающий свойствами антибиотика, также установлено, что виолацеин участвует в защите от видимого излучения. Это позволяет бактерии выжить в почве тропических и субтропических районов земного шара. Синтез пигмента регулируется системой QS, включающей АИ - N-гексаноил-гомосеринлактон (C6-ГСЛ). Два гена CviI и CviR были выявлены в геноме *Chromobacterium violaceum*, кодирующие белки CviI - N-гексаноил-гомосеринлактон синтазы и CviR – регуляторный белок, структурно и функционально схожие с белками, которые участвуют в контроле биолюминесценции *Vibrio fischeri*. Сигнальные молекулы продуцируются бактерией и свободно диффундируют из клетки в окружающую среду.

При достижении определенной концентрации в среде аутоиндукторы проникают в бактериальные клетки, связываются с CviR и активируют ген CviI - N-гексаноил-гомосеринлактон синтазы, что приводит к массовой продукции N-гексаноил-гомосеринлактона. Эта сигнальная молекула связывается с оператором CviR, вызывая его выражение. Увеличение CviR

позволяет ему связываться с транскрипционным сайтом оперона биосинтеза виолацеин *vioABDC* и запустить экспрессию, что приведет к увеличению пигмента. CviR способен стимулировать экспрессию других генов в *Chromobacterium violaceum*, таких, как хитиназы и экзопротеазы.

3.4 QS системы, включающие аутоиндуктор АИ-2 и АИ пептидной природы

Представленные QS системы функционируют как в грамотрицательных, так и в грамположительных бактериях. Аутоиндуктор АИ-2 был обнаружен в клетках *Vibrio harveyi*; у него особая химическая структура, в молекуле АИ-2 присутствует бор. Аутоиндуктор накапливается во второй половине экспоненциальной фазы роста, и содержание его грубо уменьшается при входе культуры в стационарную фазу. Синтазы АИ-2 кодируются генами *luxS*; эти гены консервативны у разных бактерий. Ген *luxS* присутствует в половине всех секвенированных бактериальных. На основании гомологии белков LuxS у бактерий различных таксономических групп было высказано предположение, что АИ-2 у разных бактерий является одним и тем же веществом, универсальным регулятором. Всё же впоследствии была определена структура еще одной сигнальной молекулы этого типа у *Salmonella typhimurium*; оказалось, что она отличается от АИ-2 *V. harveyi*. Сигнальная молекула *S. typhimurium* не содержала атома бора. Было показано, что АИ-2 двух типов могут легко взаимопревращаться.

О роли АИ-2 в регуляции клеточных процессов в настоящее время известно немного. QS системы этого типа являются глобальными регуляторами экспрессии бактериальных генов: так, было показано, что АИ-2 участвует в регуляции транскрипции 242 генов *E. coli*, составляющих 5,6% генома этой бактерии. QS системы, включающие АИ-2, участвуют в контроле вирулентности ряда бактерий, например возбудителя холеры *Vibrio*

cholerae, энтеропатогенных штаммов *E. coli*, в регуляции споруляции у *Bacillus subtilis*.

Из QS систем, которые включают АИ-2, лучше всего в настоящее время изучена система, участвующая в регуляции экспрессии lux оперона *V. harveyi*. Контроль продукции люциферазы у этой бактерии осуществляют фактически три QS системы, взаимодействующие между собой; одной из них является система, которая включает АИ-2. Функционирование QS системы осуществляется через каскад фосфорилирования/дефосфорилирования. В регуляции этого очень сложного процесса участвует большое количество белков, также рецепторный белок для АИ-2 LuxP, три сенсорные киназы и другие, а ещё пять маленьких нетранслируемых регуляторных РНК, которые, взаимодействуя с РНК-шапероном белком Hfq, связываются с мРНК LuxR белка и дестабилизируют ее, что приводит к подавлению люминесценции.

У грамположительных бактерий функционируют QS системы, в которых используются аутоиндукторы иной природы - секретируемые пептиды (АИП), линейные и содержащие тиолактонное кольцо. В большинстве случаев происходит процессирование из большего предшественника и модификация пептидных аутоиндукторов. Системы QS, которые включают АИП, принимают участие в контроле вирулентности у *Staphylococcus aureus*, регуляции компетентности (т.е. способности принимать экзогенную ДНК при трансформации) у *Streptococcus pneumoniae*, регуляции компетентности и споруляции у *Bacillus subtilis*. Больше всего изучена система QS у *S. aureus*, она весьма сложна. Данная система участвует в регуляции синтеза факторов вирулентности, белков, которые способствуют адгезии и колонизации бактерий, синтезу токсинов, протеаз и другие. Известно, что QS регуляция у *S. aureus* включает функционирование большого количества специфических белков, ингибиторный пептид РИП, регуляторную РНК III. Внутри вида *S. aureus* описаны четыре группы, которые синтезируют АИП различного аминокислотного состава. Занимательно, что каждый тип АИП активирует собственный рецепторный

белок, но подавляет активацию рецепторных белков у трех остальных групп. В результате этого АИП каждой группы стафилококков подавляет вирулентность остальных трех групп *S. aureus*.

Перечисленные выше типы АИ QS систем грамотрицательных и грамположительных бактерий не исчерпывают все известные в настоящее время. Так, стрептомицеты, грамположительные бактерии, в отличие от стафилококков и бацилл, в качестве аутоиндукторов QS систем используют соединения не пептидной природы - бутиролактоны. QS системы, которые включают их, участвуют в регуляции морфологической дифференциации стрептомицетов и продукции вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков.

Интересно, что эти соединения структурно сходны с АГЛ грамотрицательных бактерий. Отчего не исключено, что в природной среде может происходить коммуникация между этими таксономически далекими группами бактерий с помощью указанных сигнальных молекул. Сведения об этом в литературе отсутствуют. У *E. coli* и *Salmonella* обнаружен аутоиндуктор АИ-3 пептидной природы.

3.5 Ферменты и субстраты свечения

Алифатические альдегиды с длиной цепи 6 и более атомов углерода – единственный класс химических соединений, которые способны эффективно функционировать в качестве субстратов бактериальной люциферазы. Длинноцепочечные алифатические спирты, кетоны, кислоты, а также ароматические альдегиды или неактивны в биолюминесцентном процессе, или функционируют в качестве ингибиторов. Структура природного субстрата не идентифицирована, но предполагается, что этим соединением *in vivo* может быть тетрадеканаль. В ходе реакции биолюминесценции алифатический альдегид окисляется в соответствующую кислоту. Фермент

проявляет широкую субстратную специфичность к альдегидам. В качестве субстратов эффективны предельные и непредельные, а также замещенные алифатические альдегиды. Эффективность ненасыщенных и замещенных альдегидов в билюминесцентной реакции зависит от положения кратной связи или заместителя относительно функциональной группы.

Функционирование длинноцепочечных алифатических альдегидов в качестве косубстратов бактериальной люциферазы установлено в работах ученых и подтверждено целым рядом исследователей. Основные работы выполнены с использованием предельных альдегидов (в основном это деканаль, тетрадеканаль). В более поздних исследованиях показано, что разнообразные моноеновые и диеновые цис - транс изомеры ненасыщенных алифатических альдегидов также эффективны в билюминесцентном процессе при этом эффективность C_{16} ненасыщенных соединений соизмерима с C_{14} насыщенными альдегидами.

По сродству люциферазы к альдегидам различной структуры данные носят противоречивый характер. Большинство экспериментальных данных свидетельствуют, что среди насыщенных альдегидов наиболее эффективным субстратом люциферазы из *V. harveyi*, *P. phosphoreum* и *V. fischeri* является тетрадеканаль, а в некоторых случаях по наибольшей активности наблюдается с деканалем. Целый ряд ненасыщенных альдегидов с длиной углеродного скелета C_{14} – C_{16} проявляют себя более эффективными субстратами. Исходя из этого, строгой закономерности между структурой альдегида и интенсивностью свечения не установлено.

Вопрос о природном альдегидном субстрате у светящихся бактерий до настоящего времени остается открытым. Обнаружение альдегидного субстрата люциферазы в реакции *in vitro* поставило вопрос об идентичности длинноцепочечных альдегидов как субстратов *in vivo*. Из различных химических соединений только алифатические альдегиды способны стимулировать люминесценцию, следовательно, субстратами *in vivo* тоже должны быть альдегиды.

Соединения альдегидной природы были обнаружены в экстрактах *P. Phosphoreum*, *V. Fischeri*. В 1974 году были выделены эндогенные C₁₂, C₁₄ и C₁₆ альдегиды у *P. phosphoreum* и *V. fischeri*.

В метаболизме алифатических альдегидов задействовано несколько ферментов – это редуктаза жирных кислот, люцифераза, альдегиддегидрогеназа, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза. Основная роль в процессе синтеза алифатических альдегидов отводится редуктазной реакции.

Поиск системы, продуцирующей альдегиды *in vivo* привел к результатам, которые стали основными в изучении механизма образования альдегидного субстрата. Инкубация экстракта из *P. phosphoreum*, которая содержит люциферазу, в течение 10 мин с НАД(Ф)Н и АТФ стимулировала активность люциферазы в 1300 раз по стандартному анализу с ФМНН₂. В присутствии миристиновой кислоты эффект стимуляции возрастал в 1500 раз. Было также показано, что экстракты *P. phosphoreum*, которые выдержанны при 4 °С в течение 20 часов, сохраняли 100%-ную люциферазную активность, но только 15 % этой активности способно было стимулироваться АТФ, НАД(Ф)Н и миристиновой кислотой. Было сделано предположение, что НАД(Ф)Н и АТФ необходимы для синтеза альдегидного фактора, причем он может образовываться из миристиновой кислоты при участии фермента редуктазы жирной кислоты.

Анализ, который выполнен с использованием (³Н)-миристиновой кислоты, подтвердил ранее предложенный механизм, при котором сначала происходит активация жирной кислоты с участием АТФ до ацильного интермедиата, а затем его восстановление в соответствующей длинноцепочечный альдегид. После продукции тетрадеканала происходит его дальнейшее восстановление до спирта, это связано с наличием альдегидредуктазы в экстрактах.

Функционирование длинноцепочечных алифатических альдегидов в качестве косубстратов бактериальной люциферазы установлено в ряде работ и в дальнейшем подтверждено целым рядом исследователей. Известно, что

альдегид в ходе биолюминесцентной реакции окисляется в соответствующую жирную кислоту. Следовательно, 1 г/литр при 20 °С клеток способен излучать 6×10^{15} фотонов/с. В то время как общее содержание альдегидов в одном грамме составляет 15 нмоль. Это количество альдегидов способно генерировать $1,44 \times 10^{15}$ фотонов (квантовый выход 0,16). Данное количество альдегидов способно обеспечивать свечение в течение 0,5 секунд. В альдегид-дефицитных темновых мутантах свечение способно стимулироваться с высокой эффективностью тетрадекановой кислотой, косвенно указывает на рециклирование альдегида, который используют в люминесцентных реакциях. Биосинтетический механизм, который включает восстановление тетрадекановой кислоты в тетрадеканаль, представлен в работах Е.Мейгена с соавторами.

Редуктазный процесс отличается крайне высоким уровнем энергозатрат (НАД(Ф)Н, АТФ-зависимые реакции). Данная реакция конкурентна основному биолюминесцентному процессу восстановления флавина НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой. Также редуктазная реакция характеризуется высоким значением K_m по кофакторам (20мМ), равновесие данной реакции сдвинуто в обратную сторону.

Совокупность экспериментального материала, который получен в лабораториях Дж. Гастингса, Е. Мейгена, О. Шимамуры позволяет прийти к выводу, что доказательств рециклирования алифатического альдегида с участием редуктазы жирных кислот *in vivo* в фотобактериях отсутствуют.

Таким образом, нерешенных вопросов по физиолого-биохимическому, микробиологическому и биофизическому функционированию биолюминесцентной системы бактерий в природных экосистемах и в лабораторной культуре остается достаточно много.

3.6 Генетика и регуляция свечения

В настоящее время идентифицированы структурные и регуляторные гены люминесцентной системы. Генетическая карта билюминесцентной системы у разных видов бактерий незначительно различается. Однако все они содержат структурные А и В гены, которые кодируют субъединицы люциферазы, CDE-гены, которые кодируют субъединицы редуктазы жирных кислот. Другие *lux* F, G, H, I, R, гены идентифицированы в специфических светящихся штаммах. Lux F локализован между *luxE* и *luxB* генами у большинства, но не у всех видов фотобактерий, но отсутствует у *Vibrio xenorhabdus*. Указанный ген сходен с *luxG* и *luxN* генами у некоторых штаммов *Photobacterium lioghni* и гомологичен *luxF* ген *Photobacterium phosphoreum*.

Установленные гены кодируют следующие функции:

- 1 А, В – структурные гены кодируют функции люциферазы;
- 2 R, I – гены контролируют образование автоиндуктора, индуцибельный синтез люциферазы;
- 3 C, D, E – структурные гены субъединиц с ацилтрансферазной, ацилсинтетазной и ацилредуктазной активностью.

Дополнительные гены имеют вспомогательное значение в билюминесцентной системе. Они контролируют биосинтез прочно связанного с люциферазой Р-флавина и НАДН-ФМН: оксидоредуктазный комплекс.

Светящиеся бактерии представляют собой уникальную систему, в которой корреляция активности *in vitro* может быть сопоставлена с активностью *in vivo*. Люминесценция, которая отражает активность ферментативной системы *in vivo*, прослеживается легко и точно без разрушения клеток.

Регуляция свечения контролируется на разных уровнях:

- 1) физиологическом;

2) молекулярно-генетическом.

Основной вклад в физиологический контроль вносят восстановительный потенциал клетки и уровень темновых утечек электронов, шунтирующих люциферазу. Наряду с этим люминесценция чрезвычайно лабильно реагирует на физико-химические параметры среды, таких как: температура, pH, солевой состав и другие.

На молекулярно-генетическом уровне свечение бактерий комплексно контролируется многими факторами и регулируется несколькими механизмами, в том числе на уровне биосинтеза субстратов - флавина и альдегида, биосинтеза люциферазы и ферментов метаболизма субстратов (ФМН-редуктаза, редуктаза жирных кислот и других ферментов, связанных с процессом преобразования энергии), аутоиндуктором, ингибиторами среды и ряда других параметров.

Одним из ключевых процессов регуляции синтеза люминесцентной системы бактерий является аутоиндукция. В настоящее время установлено, что люминесцирующие микроорганизмы излучают свет, который контролируется регуляторными молекулами – аутоиндукторами. Структурно аутоиндукторы являются ацилгомосерин лактонами, которые различаются между собой заместителями, функциональными группами и длиной углеводородного скелета.

Установлены и идентифицированы структуры аутоиндукторов (ацилгомосерин лактонов) из *Vibrio harveyi* (HAI) и *Vibrio fischeri* (VAI), а у *Photobacterium phosphoreum* аутоиндукция не обнаружена. Функция данных соединений сводится к взаимодействию с регуляторными генами люциферазного оперона, активирующие структурные гены люциферазы и индуцибельный синтез α и β субъединиц. Аутоиндукторы функционируют подобно феромонам. Они синтезируются бактериями в ходе клеточного роста и выбрасываются во внешнюю среду при последующем взаимодействии с регуляторными генами и активируют люциферазную систему.

При достижении плотности клеточной популяции (10^8 - 10^9 кл/мл) синтез люциферазы экспрессируется и возникает интенсивное свечение. Световая эмиссия темновых мутантов при добавлении аутоиндуктора стимулируется тысячекратно и достигается значений свечения нормальной клетки.

Ациллактоны различной структуры регулируют не только активность lux - оперона, но биосинтез антибиотика, перенос конъюгирующих плазмид, спорообразование, синтез полисахаридной капсулы, образование пигментов, контроль клеточного роста. Химически аутоиндуктор *Vibrio fischeri* является N- β -кетокaproилгомосеринлактоном. Предшественниками аутоиндуктора предположительно является гомосерин и β -капроил-ацилфосфат или β -капроил-коэнзим-А. Два последних компонента участвуют в биосинтезе и деградации жирных кислот.

Свечение симбиотических бактерий в световых органах рыб или кальмаров может регулироваться аутоиндукторами (ациллактонами), которые выделяются клетками стенок светового органа хозяина в определенный момент.

Но несмотря на значительные достижения по механизму и регуляции свечения бактерий однозначной точки зрения на химические стадии процесса преобразования энергии и вовлечения в этот процесс флавиновых и альдегидных субстратов, а также участие активаторов и индукторов биолюминесцентной системы в приложении к бактериальным объектам *in vivo* до настоящего времени не существует.

3.7 Экология и применение светящихся бактерий

Способностью люминесцировать обладают физиологически разные группы микроорганизмов, которые занимают различные экологические ниши. Вместе с тем, эти организмы таксономически не очень далеки друг от

друга и разделяют ряд морфологических и физиолого-биохимических свойств с другими представителями семейств *Enterobacteriaceae* и *Vibrionaceae*. Морские светящиеся микроорганизмы относятся к семействам *Enterobacteriaceae* и *Vibrionaceae*, к родам *Vibrio* и *Photobacterium*, также включают в себя свободноживущие и симбиотические формы. Все фотобактерии являются грамотрицательными подвижными палочками, факультативными анаэробными, хемоорганотрофами, которые способны использовать в качестве единственных источниками углерода и энергии различные углеводы, спирты, органические кислоты. Все морские светящиеся бактерии продуцируют внеклеточную хитиназу.

Основным местом обитания светящихся бактерий являются моря и океаны, но известны виды, которые обитают в пресной воде или являются симбионтами некоторых почвенных нематод.

В зависимости от температуры водных акваторий доминируют те или иные виды. При низких температурах, в глубинах океанов (свыше 500 метров), в северных регионах при температурах ниже 15 °C начинают доминировать *Photobacterium phosphoreum*. В теплых водах с температурой выше 15 °C доминируют мезофильные штаммы *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium leiognathi*.

К свободно живущим видам относится *Vibrio harveyi*, а остальные виды являются сапрофитами или паразитами морских животных (рыб, кальмаров и ряда позвоночных). Свободноживущие формы бактерий распределяются на микрочастицах в толще воды, также на гниющих останках морских обитателей. Симбиотические бактерии концентрируются в световых органах и фотофорах глубоководных рыб, фотофорах кальмаров и ряда обитателей морских глубин.

Таксономический статус светящихся бактерий окончательно не определен и находится в постоянном развитии. Раннее таксономическое деление морских фотобактерий основывалось на систематике, которую предложили Дж. Рейхельтом и П. Бауманом. В основу этой систематики

положены морфологические и культуральные признаки, ферментативная активность, состав оснований ДНК, гомология ДНК и рРНК. Согласно этому морские светящиеся бактерии были помещены в два рода – *Veneckeia* и *Photobacterium*. Но в более поздних работах на основании гомологичности рРНК и также дивергенции аминокислотной последовательности ферментов (глутаминсинтетазы, супероксиддисмутазы и щелочной фосфатазы) систематика морских люминесцирующих бактерий была опять пересмотрена. В следствие, было предложено упразднить род *Veneckeia* и два его вида – *V. harveyi* и *V. splendida* – вместе с видами *P. fischeri* и *P. logei* поместить в род *Vibrio*. А род *Photobacterium* вошли три вида: *P. phosphoreum*, *P. leiognathi*, *P. angustum*. Впоследствии было показано дихотомическое расхождение в структуре жирнокислотного компонента клеточных стенок *Vibrio* и *Photobacterium*, это может служить веским аргументом в пользу перераспределения морских светящихся бактерий по данным систематическим группам. Род *Photobacterium* отнесен в группу «факультативные анаэробные грамотрицательные палочки» семейства *Vibrionaceae*. В этой системе видов бактерий *P. phosphoreum* и *P. leiognathi* имеют близкие морфологические характеристики. Существенные различия наблюдаются в оптимальной температуре роста этих видов: *P. phosphoreum* способен к размножению при 4 °С с температурным максимум от 15 до 20 °С, в то время как *P. leiognathi* культивируется при температурах от 30 до 35 °С.

К настоящему времени значительный прогресс достигнут в создании различных типов биосенсоров на основе бактериальной люциферазы и интактных клеток фотобактерий для анализа биологически активных веществ (метаболитов, ферментов и других природных соединений), и еще для анализа токсинов различной химической природы (тяжелые металлы, разнообразные ксенобиотики, пестициды, инсектициды и другие загрязнителей окружающей среды). Основой широкомасштабного аналитического применения люциферазы и фотобактерий является их высокая чувствительность (ряд веществ анализируется на микромолярном и

пикомолярном уровне), быстродействие и экономичность процедуры анализа.

Вопросам экологического биомониторинга уделяется повышенное внимание в связи с существенным загрязнением окружающей среды промышленностью. В использовании фотобактерий для интегральной оценки загрязнения среды, контролем за токсичностью веществ, которые выбрасывают промышленные предприятия, анализом токсичности новых фармакологических и других препаратов, основано на ингибировании эмиссионной реакции. Значительная доля исследований связана с использованием рекомбинантных штаммов различных микроорганизмов с включенным *lux*-опероном. В данном случае проводится специфический анализ тех или иных факторов или химических агентов, которые вызывают биологический стресс клетки.

Основные области научных исследований светящихся микроорганизмов:

- 1 Биология, экология, таксономия светящихся бактерий;
- 2 Физиологический контроль бактериальной биолюминесценции;
- 3 Биохимия люминесцентной системы фотобактерий;
- 4 Структура люциферазы;
- 5 Субстраты, реакционные пути;
- 6 Реакционный механизм люциферазы;
- 7 Клеточная и молекулярно-генетическая регуляция свечения;
- 8 Молекулярная биология люминесцентной системы бактерий;
- 9 Функция бактериальной биолюминесценции.

Прикладные задачи применения фотобактерий и бактериальной люциферазы в медицине, экологии и биотехнологии:

- 1 Биомониторинг экотоксикантов: феромонов, ксенобиотиков;
- 2 Биолюминесцентный анализ ферментов, коферментов, метаболитов в биологических органах и тканях;

3 Биодетекция продуктов биосинтеза, биodeградации и трансформации биологически активных веществ;

4 Имобилизация фотобактерий, бактериальной люциферазы;

5 Разработка технологий получения люминесцентных биосенсоров.

Направления исследований бактериальной биoluminesценции на современном этапе:

1 Природа видового распределения светящихся бактерий по экологическим нишам;

2 Основные элементы адаптации, эволюции фотобактерий;

3 Природа специфического симбиоза фотобактерий в световых органах;

4 Природа паразитизма фотобактерий;

5 Биологическая функция свечения бактерий;

6 Биохимическая функция свечения бактерий;

7 Биологические, химические элементы взаимоотношений фотобактерий с хозяином;

8 Молекулярные основы эволюции фотобактерий;

9 Биохимические элементы возникновения разных типов свечения у различных видов фотобактерий;

10 Температурная, солевая, кислородная адаптация в экологическом распределении видов;

11 Регуляция свечения на биохимическом, молекулярно-генетическом уровнях;

12 Механизм депонирования клеточной энергии на люминесцентную реакцию;

13 Функциональное значение светового выброса энергии клеток;

14 Биологическая функция фотобактерий во внутренних органах морских организмов;

15 Механизм перехода к несветящимся формам в природных экосистемах;

16 Механизм свечения, миграции энергии;

17 Филогения светящихся бактерий;

18 Эволюционные взаимоотношения люминесценции и дыхания у фотобактерий;

19 Разработка и создание люминесцентных биосенсоров и аналитических тест-систем на основе бактериальной люциферазы и светящихся бактерий.

Но, несмотря на существенный прогресс в различных областях бактериальной биолюминесценции, нерешенных вопросов остается достаточно много. В первую очередь это касается понимания регуляторных механизмов свечения *in vivo* бактерий, функциональной роли биолюминесценции в общем метаболизме клетки, биологической и биохимической функции свечения. Все это связано с изменением направления исследований в область молекулярно-генетических и прикладных задач.

4 Оценка уровня знаний аспиранта

4.1 Проведение промежуточного контроля знаний

Система оценивания промежуточных знаний аспирантов по специальной дисциплине «Микробиология» осуществляется по четырехбальной системе и включает расчет интегральной оценки на основе отдельных оценок по тестовым заданиям, вопросам для устного собеседования, типовых и творческих задач с учетом коэффициента значимости (таблица 1).

Таблица 1. Система оценивания

Оценочные средства	Коэффициент значимости (вес)	Система оценивания (оценки)
ОС1 (тестовые задания)	0,10	2,3,4,5
ОС2 (вопросы для устного собеседования)	0,25	2,3,4,5
ОС3 (типовые задачи)	0,25	2,3,4,5
ОС4 (творческие задачи)	0,40	2,3,4,5

Интегральный показатель уровня учебных достижений рассчитывается по формуле:

$$I = \sum_{i=1}^n b_i * O_i \quad (1),$$

где b_i – коэффициент значимости (вес);

O_i – оценка обучающегося по i -му оценочному средству (2, 3, 4 или 5).

Получение максимальной оценки требует наличия процента правильных ответов на тесты 91 % и более; аспирант демонстрирует

глубокие знания, свободно оперирует понятиями и терминами, дает полные и верные ответы на вопросы преподавателя; аспирант способен осуществлять анализ имеющихся данных, свободно оперирует понятиями и терминами, дает полные и верные ответы на вопросы преподавателя; аспирант самостоятельно формулирует проблемные задачи и пути их решения, оперирует специальными понятиями и терминами, дает полные и верные ответы на вопросы преподавателя

Оценка «4» выставляется в случае, если процент правильных ответов составляет от 76 % до 90 %; аспирант демонстрирует глубокие знания, свободно оперирует понятиями и терминами, но дает неполные, но верные ответы на вопросы преподавателя; аспирант способен осуществлять анализ имеющихся данных, свободно оперирует понятиями и терминами, но дает неполные, но верные ответы на вопросы преподавателя; аспирант самостоятельно формулирует проблемные задачи и пути их решения, оперирует специальными понятиями и терминами, но дает неполные, но верные ответы на вопросы преподавателя.

Критерием для оценки «3» являются процент правильных ответов составляет от 61 % до 75 %; аспирант демонстрирует не глубокие знания, с трудом оперирует понятиями и терминами, дает неполные и частично верные ответы на вопросы преподавателя; аспирант способен осуществлять анализ данных с помощью преподавателя, с трудом оперирует понятиями и терминами, дает неполные и частично верные ответы на вопросы преподавателя; аспирант самостоятельно формулирует проблемные задачи но не пути их решения, не в полной мере оперирует специальными понятиями и терминами, дает неполные и частично верные ответы на вопросы преподавателя.

Наконец, наименьший балл выставляется в случае, если процент правильных ответов составляет менее 60 %; аспирант демонстрирует поверхностные знания, не может оперировать понятиями и терминами, дает неполные и неверные ответы на вопросы преподавателя; аспирант не

способен осуществлять анализ данных, не может оперировать понятиями и терминами, дает неполные и неверные ответы на вопросы преподавателя; аспирант самостоятельно не формулирует проблемные задачи, не оперирует специальными понятиями и терминами, дает неполные и неверные ответы на вопросы преподавателя.

4.2 Проведение кандидатского экзамена

Кандидатские экзамены проводятся по усмотрению экзаменационной комиссии по билетам или без них. Для подготовки ответа соискатель использует экзаменационные листы, которые хранятся после приема экзамена в течение года.

Уровень знаний соискателя оценивается, как правило, по четырехбалльной системе: «отлично», «хорошо», «удовлетворительно», «неудовлетворительно», но может и по привычной пятибалльной системе. Лица, окончившие высшие учебные заведения с отличием, поступают в аспирантуру на общих основаниях.

Соискатели ученой степени кандидатов наук, имеющие высшее образование, не соответствующее отрасли науки, в профиле которой подготовлена диссертация, по разрешению соответствующего диссертационного совета сдают дополнительный кандидатский экзамен по общенаучной дисциплине применительно к данной отрасли науки. Аспиранты очной формы обучения в данном случае дополнительный экзамен не сдают.

На каждого соискателя заполняется протокол приема кандидатского экзамена, в который заносятся вопросы, заданные соискателю, в том числе и вопросы билетов. Протокол приема кандидатского экзамена подписывается теми членами комиссии, которые присутствовали на экзамене, с указанием их ученой степени, ученого звания, занимаемой должности и специальности

согласно номенклатуре специальностей научных работников. Протоколы заседаний экзаменационных комиссий после утверждения проректором по научной работе хранятся в личном деле аспирантов в управлении (отделе) аспирантуры.

О сдаче кандидатского экзамена выдается удостоверение установленной формы, а по месту сдачи последнего экзамена – удостоверение о сдаче предыдущих кандидатских экзаменов заменяется на единое удостоверение.

В случае неявки соискателя на кандидатский экзамен по уважительной причине, он может быть допущен ректором к сдаче кандидатского экзамена в течение текущей сессии. Повторная сдача кандидатского экзамена в течение одной сессии не допускается. Решение экзаменационной комиссии может быть обжаловано соискателем в десятидневный срок ректору, решение которого является окончательным.

Расходы, связанные с проведением и приемом кандидатских экзаменов для аспирантов и соискателей, производятся за счет средств учебного заведения, аспирантов и соискателей сторонних организаций, как правило, за счет средств направляющей организации.

Ответственность за соблюдение требований установленного порядка проведения и приема кандидатских экзаменов несет проректор высшего учебного заведения по научной работе, который утверждает протоколы заседаний экзаменационных комиссий.

5 Вопросы к экзамену по дисциплине «Микробиология»

1 Предмет и задачи микробиологии, ее место и роль в современной биологии. Значение микроорганизмов в природных процессах, в народном хозяйстве и здравоохранении.

2 История микробиологии. Открытие микроорганизмов. Значение работ Л. Пастера, Р. Коха, С.Н. Виноградского, Д.И. Ивановского, М. Бейеринка, А. Клейвера, А. Флеминга. Развитие отечественной микробиологии.

3 Главные направления развития современной микробиологии. Основные методы микробиологических исследований.

4 Мир микроорганизмов, общие признаки и разнообразие. Прокариотные и эукариотные микроорганизмы, сходство и основные различия.

5 Принципы классификации прокариотных и эукариотных микроорганизмов. Правила номенклатуры и идентификации. Методы классификации на основе определения последовательности 16S р РНК и ДНК-ДНК гибридизации. Применение нуклеиновых микрочипов для систематики микроорганизмов. Характеристика отдельных групп бактерий, архей и эукарий.

6 Микроскопические методы изучения микроорганизмов. Исследования живых и фиксированных объектов.

7 Прокариотные микроорганизмы. Одноклеточные, многоклеточные бактерии, размеры и морфология бактерий.

8 Строение, химический состав и функции отдельных компонентов клеток.

9 Слизистые слои, S-слои, капсулы и чехлы. Строение клеточных стенок Грам- положительных и Грам- отрицательных бактерий. L-формы и микоплазмы.

10 Жгутики и пили, расположение, организация, механизм действия. Движения скользящих форм. Реакции таксиса.

11 Клеточная мембрана и внутриклеточные мембранные структуры.

- 12 Ядерный аппарат, рибосомы.
- 13 Газовые вакуоли, запасные вещества и другие внутриклеточные включения.
- 14 Способы размножения, дифференцировка, эндоспоры и другие покоящиеся формы.
- 15 Особенности состава и организация клеток архей.
- 16 Эукариоты. Морфология дрожжей, мицелиальных грибов, микроформ водорослей, простейших. Химический состав и функции отдельных компонентов клетки. Циклы развития и размножение.
- 17 Накопительные и чистые культуры. Основные типы сред.
- 18 Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов, метод Хангейта.
- 19 Рост отдельных микроорганизмов и популяций (культур). Сбалансированный и несбалансированный рост.
- 20 Основные параметры роста культур: время генерации, удельная скорость роста, выход биомассы, экономический коэффициент.
- 21 Закономерности роста чистых культур при периодическом выращивании. Рост микроорганизмов при непрерывном культивировании. Синхронные культуры, способы получения и значение.
- 22 .Радиация, характер ее действия на микроорганизмы.
- 23 Фотореактивация и темновая репарация.
- 24 Рост микроорганизмов в зависимости от температуры. Психрофилы, мезофилы и термофилы. Механизмы, позволяющие микробам жить при экстремальных температурах.
- 25 Барофилы. Устойчивость микроорганизмов к высушиванию. Рост микроорганизмов в зависимости от активности воды (a_w).
- 26 Особенности осмофилов и галофилов. Механизмы устойчивости к осмотическому стрессу.

27 Отношение микроорганизмов к молекулярному кислороду: аэробы и анаэробы. Возможные причины ингибирующего действия кислородного стресса на микроорганизмы.

28 Ацидозы, нейтрофилы и алкалофилы.

29 Природа антимикробных веществ и области их применения. Мутагены, механизмы их действия и устойчивости к ним.

30 Основные биоэлементы и микроэлементы, типы питания микроорганизмов. Фототрофия и хемотрофия, автотрофия и гетеротрофия, литотрофия и органотрофия. Сапрофиты и паразиты. Прототрофы и ауксотрофы.

31 Ростные вещества. Диффузия и транспорт. Использование микроорганизмами высокомолекулярных соединений и веществ, нерастворимых в воде. Эндо- и экзоцитоз у эукариот.

32 Соединения углерода и азота, используемые микроорганизмами. Азотфиксация. Способность микроорганизмов использовать разные соединения серы и фосфора. Потребность в железе, магнии и других элементах.

33 Энергетические процессы. Способы обеспечения энергией. Фотосинтез и хемосинтез. Переносчики электронов и электронтранспортные системы, их способности у разных микроорганизмов.

34 Молочнокислое гомо- и гетероферментативное брожение, пропионовокислое, маслянокислое, ацетонбутиловое, спиртовое и другие брожения.

35 Формы участия молекулярного кислорода в окислении разных субстратов. Полное и неполное окисление. Роль цикла трикарбоновых кислот и пентозофосфатного окислительного цикла.

36 Краткая характеристика важнейших микроорганизмов, участвующих в аэробном окислении белков, углеводов, углеводородов и других многоуглеродных веществ. Микроорганизмы - метилотрофы. Светящиеся бактерии.

37 Окисление неорганических соединений: группы хемолитотрофных бактерий и осуществляемые ими процессы. Анаэробные дыхания. Доноры и акцепторы электронов, используемые разными микроорганизмами при анаэробном дыхании.

38 Диссимиляционная нитратредукция и денитрификация. Сульфат- и серу-редукторы. Метаногены, их особенности. Ацетогены. Путь Вуда-Льюнгдала.

39 Фототрофные прокариотные и эукариотные микроорганизмы. Состав, организация и функции их фотосинтезирующего аппарата. Фотосинтез с выделением и без выделения молекулярного кислорода. Использование световой энергии галоархеями.

40 Биосинтетические процессы, ассимиляция углекислоты. Рибулозобисфосфатный цикл, ассимиляция формальдегида метилтрофами. Значение цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного шунта.

41 Ассимиляционная нитратредукция, фиксация молекулярного азота. Свободноживущие и симбиотические азотфиксаторы. Пути ассимиляции аммония.

42 Ассимиляционная сульфатредукция. Синтез основных биополимеров, биосинтез порфириновых соединений, вторичные метаболиты.

43 Биохимические основы и уровни регуляции метаболизма, регуляция синтеза ферментов. Индукция и репрессия. Регуляция активности ферментов, аллостерические ферменты и эффекторы, ковалентная модификация ферментов, аденилатный контроль и энергетический заряд клетки.

44 Наследственная и ненаследственная изменчивость, мутационная природа изменчивости. Частота мутантов и типы мутаций. Спонтанный и индуцированный мутагенезы. Популяционная изменчивость, селекция различных мутантов. Применение мутантов микроорганизмов.

45 Трансформация, трансдукция, конъюгация, рекомбинация и генетический анализ у фагов.

46 Плазмиды, транспозоны, использование вирусов и плазмид в генетической инженерии.

47 Рекомбинация у эукариот, половой и парасексуальный процессы, цитоплазматическая наследственность.

48 Участие микроорганизмов в биогеохимических циклах, взаимосвязь циклов. Роль физиологических групп микроорганизмов в катализе этапов циклов.

49 Ведущая роль цикла углерода, продукция и деструкция в цикле органического углерода, связь с циклом неорганического углерода и циклом кислорода.

50 Цикл азота, группы организмов, участвующие в нем.

51 Цикл серы: серобактерии и сульфидогены.

52 Цикл железа.

53 Самоочищение водотоков. Очистные сооружения и микробные сообщества в них. Морская микробиология. Сообщества микроорганизмов, трофические связи в сообществах.

54 Анаэробное сообщество как модель трофических связей, межвидовой перенос водорода и формиата, синтрофия. Первичные анаэробы и вторичные анаэробы.

55 Экология микроорганизмов, формирование состава атмосферы. Парниковые газы, метаногенез, бактериальный газовый фильтр.

56 Водная микробиология, озеро как модель водной экосистемы. Циклы веществ в водоемах.

57 Геологическая микробиология, роль микроорганизмов в выщелачивании пород и формировании коры выветривания. Цикл кальция и карбонатов, рудообразование.

58 Почвенная микробиология, структура почвы и характерные условия обитания микроорганизмов в почве. Влажность и почвенный воздух, связь микроорганизмов с растениями, ризосфера. Роль мицелиальных организмов в

почве, микориза, гумусообразование. Роль микроорганизмов в формировании характерных типов почв, самоочищение почвы.

59 Палеобактериология и эволюция биосферы в докембрии, реликтовые сообщества. Филогения микроорганизмов, основанная на изучении последовательностей 16 S рНК, симбиогенез.

60 Использование микроорганизмов для получения пищевых и кормовых продуктов, химических реактивов и лекарственных препаратов.

61 Применение в сельском хозяйстве, при выщелачивании металлов из руд, очистке стоков и получении топлив.

Список использованных источников

- 1 Гинцбург, А. Л. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий / А. Л. Гинцбург, Т. С. Ильина, Ю. М. Романова. - Ж. Микробиология. - 2003.- № 5. - С. 86-93.
- 2 Гусев М. В. Микробиология: учебник для студ. биол. специальностей вузов / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. - М.: Издательский центр «Академия», 2003. - 464 с. - ISBN 5-7695-1403-5.
- 3 Дикий И. Л. Микробиология. Руководство к лабораторным занятием / И. Л. Дикий, И. И. Сидорчук, И. Ю. Холупяк. – Москва, 2006. - 576 с.
- 4 Завильгельский, Г. Б. «Quorum sensing», или как бактерии «разговаривают» друг с другом / Г. Б. Завильгельский, И. В. Манухов. - Ж. Молекулярная биология. - 2001. - Т. 35. -№ 2. - С. 268-277.
- 5 Ильина, Т. С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т. С. Ильина, Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург. - Ж. Генетика. - 2004.-Т. 40. - № 11.- С. 1-12.
- 6 Колешко, О. И. Микробиология / О. И. Колешко. - М.: Высшая школа, 2010. – 102 с. - ISBN 5-84-699789-4.
- 7 Коротяев А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А. И. Коротяев. – Москва, 2008. – 230 с.
- 8 Лысак В. В. Микробиология: учебное пособие / В. В. Лысак. - Минск: БГУ, 2007. – 426 с.
- 9 Мишустин, Е. Н. Микробиология / Е. Н. Мишустин, В. Т. Емцев. - М.: Колос, 2006. – 248 с. - ISBN 6-34-698689-1.
- 10 Нетрусов А. И. Микробиология / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М.: Академия, 2006. – 352 с.
- 11 Николаев Ю. А. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов / Ю. А. Николаев, А. Л. Мулюкин, И. Ю. Степаненко, Г.И. Эль-Регистан. - Ж. Микробиология. - 2008. - Т. 75. - № 4. - С. 489-496.

12 Олескин, А. В. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов / А. В. Олескин, И. В. Ботвинко, Е. А. Цавкелова. – М.: Микробиология, 2000. - 180с.

13 Олескин, А. В. Надорганизменный уровень взаимодействия в микробных популяциях / А.В. Олескин. - Ж. Микробиология. - 1993. - Т.62. - № 3. - С. 389-403.

14 Прозоров А. А. Феромоны компетентности у бактерий / А. А. Прозоров. – М.: Микробиология, 2001. – 128 с.

15 Светличный, В. А. Характеристики ауторегуляторного фактора d2, вызывающего автолиз клеток *Pseudomonas carboxydoflava* и *Bacillus cereus* / В. А. Светличный, Г. И. Эль-Регистан, А. К. Романова, В. И. Дуда. - Ж. Микробиология. - 1983. - Т. 52. - № 1. - С. 33-38.

16 Хмель, И. А. Quorum-sensing регуляция экспрессии генов: фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий / И. А. Хмель. - Ж. Микробиология. - 2006. - Т. 75. - №4. - С. 457-464.

17 Хмель И. А. Биоплёнки бактерий и связанные с ними трудности медицинских практик / И. А. Хмель. – М.: ИМГ РАН, 2008. – 123 с.

18 Царев В. Н. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта / В. Н. Царев. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2003. – 576 с. - ISBN978-5-9704-2582-4.

19 Шапиро, Дж. А. Бактерии как многоклеточные организмы / Дж. А. Шапиро. - Ж. В мире науки. - 1998. - № 8. - С. 46-54.

20 Шпаков, А. О. Сигнальные молекулы бактерий пептидной природы QS-типа / А.О. Шпаков. - Ж. Микробиология. - 2009. - Т. 78. - № 2. - С. 163-175.

21 Дерябин, Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. / Д.Г. Дерябин // М.: Наука. – 2009. – с. 246.

22 Ефременко, Е.Н. Люминесцентный биокатализатор для определения токсикантов / Е.Н. Ефременко, О.В. Сенько, В.В. Куц, К.А. Аленина, А.В. Холстов, А.Д. Исмаилов // Патент N 2394910. - 2010.

23 Куц, В.В. Ингибиторное действие фенольных экотоксикантов на фотобактерии при различных значениях рН / В.В. Куц, Ю.М. Ильина, А.Д. Исмаилов, А.И. Нетрусов // Прикл. Биохим. Микробиол. – 2005. - №6. – с. 640-646.

24 Лозинский, В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. / В.И. Лозинский // Успехи химии- 2002 - Т.71. - №6. - с. 559-585.

25 Лозинский, В.Н. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта. / В.Н. Лозинский // Успехи химии. – 1998. – Т.67. - №. 7. – с. 641-655.

26 Синицин, А.П. Имобилизованные клетки микроорганизмов / А.П. Синицин, Е.И. Райнина, В.И. Лозинский, С.Д. Спасов // М.: Изд-во МГУ. – 1994. – с. 288.

27 Угарова, Н.Н. Билюминесцентные методы анализа в микробиологии. / Н.Н. Угарова, Л.Ю. Бровко, И.Ю. Трдастьян, Е.И. Райнина // Прикл. биохим. микробиол. - 1987. - Т.23. - с.11–20.

28 Угарова, Н.Н. Применение билюминесцентной АТФ - метрии в биоаналитических целях / Н.Н. Угарова, В.Г. Фрунджян // Методическое пособие. Химический Факультет МГУ. - 2003. – с. 52.

29 Филимонова, М.Н. Метод определения жизнеспособности клеток *Serratia marcescens*, иммобилизованных в криогель поливинолового спирта / М.Н. Филимонова, Г.К. Габдулина, И.Ф. Заббарова // Прикл. Биохим. Микробиол. – 1990.- Т.26. - №5.- с.706-708.

30 Чумакова, Р.И. Светящиеся бактерии. / Р.И. Чумакова, И.И. Гительзон // М., 1975. – с. 240.

31 Гительзон, И.И. Живой свет океана / И.И. Гительзон // М.: изд. Наука, 1976. – с. 350.

32 Данилов, В.С. Бактериальная билюминесценция / В.С. Данилов, Н.С. Егоров // МГУ, 1990. – с. 240.

33 Arnold, M.A. Fiber-optic biosensors. // J. Biotechnol. – 1990. – V.15. – P. 219-228.

34 Baumann P., Baumann L., Woolkalis M., Bang S. Evolutionary relationships in *Vibrio* and *Photobacterium*. A basis for a natural classification. // Ann. Rev. Microbiol. – 1983. – V. 37. – P.363-398

35 Baumann P., Baumann L., Bang S., Woolkalis M. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckeia*. // Curr. Microbiol. – 1980. – V. 4(3). P. 127-132

36 Baumann L., Baumann P. The marine gram-negative eubacteria. // In The procariotes. Stuttgart. Springer-Verlag. – 1981. – P. 83-181

37 Bechor O, Smulski D.R., Van Dyk T.K., LaRossa R.A., Belkin S. Recombinant microorganisms as environmental biosensors: pollutants detection by *Escherichia coli* bearing *fabA::lux* fusions.// J. Biotechnology. – 2002. – V. 94(1). – P. 125-132.

38 Belkin Sh. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. // Current Opinion in Microbiology. – 2003. –V.6(3). – P. 206-212.

39 Blume L.J., Gautier S.M., Coulet P.R. Design of luminescence photobiosensors.// J. Biolumin Chemilumin. – 1989. – V.4(1). – P. 543-550.