

В. В. Лысак

МИКРОБИОЛОГИЯ

*Допущено
Министерством образования Республики Беларусь
в качестве учебного пособия для студентов
биологических специальностей учреждений,
обеспечивающих получение высшего образования*

МИНСК
БГУ
2007

УДК 579 (075.8)
ББК 28.4я73
Л88

Р е ц е н з е н т ы:

кафедра ботаники Гродненского государственного университета
имени Янки Купалы (профессор, д-р биол. наук *А. И. Воскобоев*);
д-р биол. наук *З. М. Алещенкова*

Лысак, В.В.

Л88 Микробиология : учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007.
– 000 с. : ил.

ISBN 985-485-709-3.

В учебном пособии изложены структурная организация бактериальной клетки, питание, особенности энергетического и конструктивного метаболизма микроорганизмов, генетика, систематика бактерий, взаимоотношения между микро- и макро-организмами, их биогеохимическая деятельность. Кратко описаны методы культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях.

Предназначено для студентов биологических специальностей учреждений, обеспечивающих получение высшего образования.

УДК 579 (075.8)
ББК 28.4я73

© Лысак В. В., 2007
© БГУ, 2007

ISBN 985-485-709-3.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие подготовлено на базе курса лекций, которые более двадцати лет автор читает студентам биологического факультета Белорусского государственного университета. Цель пособия – представить современную информацию о состоянии микробиологической науки, включая сведения по биохимии, генетике, систематике бактерий, которые служат основой для проведения качественно новых исследований клеток прокариот и обеспечивают приоритетное развитие микробиологии.

Принимая во внимание быстрые темпы развития науки, при подготовке учебного пособия автор был вынужден учитывать несколько возникающих проблем. Первая из них связана с тем, что достижения современной микробиологии и смежных с нею дисциплин приводят к существенному увеличению и усложнению учебного материала, что неизбежно сказывается на объеме учебного пособия. Предлагаемые теоретические и практические сведения и данные охватывают основные направления изучения микроорганизмов с позиций исторического развития представлений о них, оценки экспериментальных подходов к исследованию их клеток, а также возможностей использования накопленных знаний при оценке роли микроорганизмов в жизнедеятельности человека.

Вторая проблема заключается в том, что при подготовке учебного пособия определяющим является исходный уровень знаний студентов по предмету. Кроме того, предлагаемый в учебном пособии материал должен диктоваться и возможностями студентов проработать его в процессе изучения с учетом того, что они могут и должны пользоваться еще и другими методическими и учебными разработками. Автор старался стройно и логично изложить современные данные по микробиологии для лучшего их восприятия, выделить по тексту определения основных понятий и другую особо важную информацию.

Нельзя не принимать во внимание, что подготовленные к настоящему времени учебники по микробиологии не всегда имеются в достаточном количестве, а также нуждаются в наполнении современной научной информацией.

Учебное пособие предназначено для студентов биологических факультетов университетов и призвано обеспечить необходимый уровень их подготовки в соответствии с утвержденной программой. Отдельные главы могут заинтересовать специалистов-биологов смежных дисциплин и позволят им расширить круг знаний о многообразной и масштабной деятельности микроорганизмов в формировании и поддержании устойчивости биосферы, их существенной роли в деятельности человека и использовании в народном хозяйстве.

Автор отдает себе отчет в том, что подготовка и написание учебного пособия – дело неимоверно сложное и ответственное. Здесь неизбежны разного рода упущения и недочеты, и поэтому заранее благодарен за любые критические замечания, которые могут быть высказаны в адрес содержания этого учебного пособия.

Автор выражает искреннюю благодарность рецензентам, а также профессору кафедры микробиологии Белорусского государственного университета Ю. К. Фомичеву, доценту Р. А. Желдаковой и методисту Н. В. Авдеенко за неоценимую помощь в работе над учебным пособием.

ВВЕДЕНИЕ

1. Предмет и задачи микробиологии

Микробиология (от греч. *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – наука) – наука о микроскопически малых существах, называемых микроорганизмами. Микробиология изучает морфологию, физиологию, биохимию, систематику, генетику и экологию микроорганизмов, их роль и значение в круговороте веществ, патологии человека, животных и растений, в экономике.

К микроорганизмам относятся преимущественно одноклеточные организмы – бактерии, микроскопические грибы и водоросли, простейшие, а также организмы с неклеточной организацией – вирусы. Предметом изучения микробиологии традиционно служат в основном бактерии, а также в общем плане организации рассматриваются вирусы.

Микроорганизмы в таксономическом отношении очень неоднородная группа, представители которой отличаются друг от друга морфологией, строением, физиологией, типами конструктивного и энергетического метаболизма, а также особенностями питания клетки, но общим их признаком являются малые размеры особей. Например, в среднем линейные размеры бактерий находятся в пределах 0,5–3,0 мкм, но есть среди бактерий свои «гиганты» и «карлики». В частности, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 500 мкм; длина клеток бактерии *Achromatium oxaliferum* составляет 15–100 мкм при поперечнике примерно 5–33 мкм, а продольные размеры клеток спирохет могут достигать 250 мкм. Самые мелкие из известных бактерий – микоплазмы, диаметр клеток которых составляет 0,1–0,15 мкм. Размеры клеток дрожжей, мицелиальных грибов, простейших и водорослей находятся в пределах 10–100 мкм.

У микроорганизмов из-за малых размеров очень велико отношение площади поверхности клетки к ее объему, что создает благоприятные условия для активного обмена с внешней средой. Показано, что метаболическая активность микроорганизмов в расчете на единицу биомассы намного выше, чем у более крупных клеток растений и животных.

Одной из наиболее существенных особенностей микроорганизмов является высокая пластичность их метаболизма, что приводит к быстрому приспособлению к меняющимся условиям окружающей среды. Указанное свойство также связано с малыми размерами клеток. Клетки микроорганизмов могут вместить в себя только несколько сотен тысяч белковых молекул. Поэтому ненужные в данных условиях существования ферменты не могут в клетках микроорганизмов содержаться про запас. Они синтезируются только тогда, когда соответствующее питательное вещество (субстрат) появляется в среде. Такие ферменты называются индуцибельными, они могут составлять до 10 % общего белка, содержащегося в клетке в данный момент времени. Таким образом, для микроорганизмов характерно большее разнообразие ферментных систем и более мобильные способы регуляции обмена веществ, чем для макроорганизмов.

Другим следствием высокой пластичности метаболизма микроорганизмов является, по определению В. И. Вернадского, их «всюдность». Микроорганизмы можно обнаружить в арктических областях, горячих источниках, высоких слоях атмосферы, шахтах с большим содержанием сероводорода и этим они отличаются от всех растений и животных, которые часто распространены лишь на отдельных континентах или в географических зонах.

Отличительным свойством микроорганизмов является также их способность к быстрому размножению. В оптимальных условиях, например, бактерии *Escherichia coli* могут делиться каждые 20 мин.

У микроорганизмов отсутствует дифференцировка на ткани и органы, что также делает их непохожими на растения и животные.

В соответствии с современными принципами классификации все микроорганизмы в зависимости от строения клетки делятся на эукариотические (истинноядерные) и прокариотические (доядерные) (табл. 1). К эукариотическим микроорганизмам относятся водоросли, грибы и простейшие, к прокариотическим – бактерии.

Кроме строения клетки, прокариотические и эукариотические микроорганизмы различаются и по другим признакам:

- прокариотические микроорганизмы морфологически относительно слабо дифференцированы, поэтому основными формами бактерий, за немногими исключениями, считаются кокки, прямые и изогнутые палочки;
- многие группы прокариот способны существовать только в анаэробных условиях (без молекулярного кислорода), получая необходимую для роста энергию в результате брожения или анаэробного дыхания;

Таблица 1

Различия в строении клеток прокариот и эукариот

| Признак | Прокариотическая клетка | Эукариотическая клетка |
|---|---|--|
| Организация генетического материала | Нуклеоид, состоящий чаще всего из одной замкнутой в кольцо или линейной хромосомы. Имеются гистоподобные белки. Гены не несут интронов (за исключением архебактерий). Гены организованы в опероны | Ядро, содержащее обычно более одной хромосомы. Есть белки гистоны. Гены имеют экзонно-интронную организацию. Опероны отсутствуют |
| Локализация ДНК | В нуклеоиде и плаزمиде | В ядре и некоторых органеллах |
| Цитоплазматические органеллы | Отсутствуют (кроме рибосом) | Имеются |
| Рибосомы в цитоплазме | 70S-типа | 80S-типа |
| Движение цитоплазмы | Отсутствует | Имеется |
| Жгутики | Состоят из одной фибриллы, построенной из субъединиц белка флагеллина | Состоят из микротрубочек, собранных в группы |
| Компартментализация клеток | Слабо выражена | Клетка разделена мембранами на отдельные отсеки |
| Клеточная стенка (там, где она имеется) | Содержит пептидогликан муреин (за исключением архебактерий) | Пептидогликан муреин отсутствует |

- значительное количество бактерий может специфически получать энергию путем окисления неорганических веществ;
- большая группа бактерий (фототрофные) обладает способностью использовать энергию солнечного света и строить необходимые им вещества либо из органических соединений, либо из углекислого газа;
- среди бактерий различных таксономических групп широко распространена способность к фиксации молекулярного азота;
- у подавляющего большинства бактерий размножение осуществляется путем бинарного поперечного деления, приводящего к образованию двух одинаковых дочерних клеток.

Деление клеток бактерий начинается, как правило, после завершения цикла репликации ДНК. У большинства грамположительных бактерий и нитчатых цианобактерий деление происходит путем синтеза поперечной перегородки, идущего от периферии к центру. Поперечная перегородка формируется из цитоплазматической мембраны и пептидогликанового

слоя. Расхождение образовавшихся дочерних клеток происходит в результате лизиса срединного слоя поперечной перегородки с помощью ферментов автолизингов. Клетки большинства грамотрицательных бактерий делятся путем перетяжки, которая формируется при сужении в центральной части клетки цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Диаметр клетки в центре постепенно уменьшается, как будто кто-то перетягивает ее пополам. Отверстие между образовавшимися отсеками становится уже, пока не исчезнет совсем и перетяжка не разделит клетку на две части.

Для представителей группы почкующихся бактерий, а также многих цианобактерий характерен другой способ размножения – почкование. При этом в определенном месте на поверхности клетки образуется почка, в которую переходит копия нуклеоида. Почка разрастается в дочернюю клетку и отделяется от материнской клетки.

Некоторые одноклеточные цианобактерии размножаются множественным делением. Оно начинается с предварительной репликации хромосомы и увеличения размеров вегетативной клетки, которая затем претерпевает ряд быстрых последовательных бинарных делений, происходящих внутри клетки. Это приводит к образованию большого количества мелких клеток, получивших название *баеоцитов*. Освобождение баеоцитов происходит путем разрыва материнской клеточной стенки. Таким образом, в основе множественного деления лежит принцип равновеликого бинарного деления. Отличие его от бинарного деления обычного типа состоит в том, что при множественном делении после бинарного деления не происходит роста образовавшихся дочерних клеток, они снова начинают делиться.

Актиномицеты размножаются либо фрагментами мицелия, либо путем образования неполовых спор. Эти способы размножения характерны для эукариотических микроорганизмов, однако отличаются от них тем, что у последних этим процессам предшествует митотическое деление ядра, а у бактерий митоз отсутствует.

2. Значение микроорганизмов в природе и жизни человека

Повсеместное распространение, быстрое размножение и особенности метаболизма микроорганизмов накладывают отпечаток на жизнь всей планеты.

Процессы, в которых принимают участие микроорганизмы, прежде всего, являются определяющими и необходимыми звеньями круговорота таких элементов, как углерод, азот, сера, фосфор, а также других биоген-

ных элементов. Без микроорганизмов приостановился бы круговорот веществ в природе и жизнь на Земле стала бы невозможной.

Микроорганизмы первыми поселяются на материнской горной породе и обуславливают почвообразовательные процессы. Образуя в результате жизнедеятельности минеральные и органические кислоты, микроорганизмы ускоряют растворение и выветривание горных пород, вовлечение освобожденных минералов в биологический круговорот. Микроорганизмы участвуют и в образовании гумуса, определяющего основное свойство почвы – плодородие. Кроме того, жизнедеятельность микроорганизмов обеспечивает доступность гумуса для растений.

Особую роль в формировании и поддержании плодородия почвы играют бактерии, участвующие в круговороте азота в природе. Это азотфиксирующие бактерии, которые превращают недоступный для растений молекулярный азот атмосферного воздуха в связанный, обогащая тем самым почву соединениями азота. Немаловажным этапом круговорота азота в природе является возвращение минерального азота в атмосферу, которое осуществляют денитрифицирующие бактерии в процессе нитратного (анаэробного) дыхания. Если бы этот цикл не был замкнут, то окисленные формы азота вымывались бы из почвы в моря и океаны, оставаясь в них недоступными для растений. Кроме того, образующиеся в процессе денитрификации оксиды азота участвуют в поддержании озонового слоя планеты.

Многие микроорганизмы образуют в процессе метаболизма и выделяют во внешнюю среду различные органические и неорганические кислоты, под действием которых водонерастворимые соли переходят в растворимую форму, в результате чего улучшается питание растений.

Микроорганизмы-редуценты – «санитары» природы. Они осуществляют разложение растительных и животных остатков и превращают их в минеральные вещества. Минерализация органических веществ имеет большое значение, так как при этом необходимые зеленым растениям элементы переходят из недоступной для них формы в доступную. Кроме того, микроорганизмы способны осуществлять деградацию отдельных искусственно синтезированных человеком органических веществ (ксенобиотиков) – пестицидов, гербицидов, поверхностно-активных веществ, составляющих упаковочных материалов, нафталина, толуолов и др. Если бы это не происходило, ксенобиотики бесконтрольно накапливались бы в окружающей среде, загрязняя ее.

Микроорганизмы принимают активное участие в биологическом самоочищении водоемов, выполняя функцию по обезвреживанию и окислительной переработке поступающих в водоем загрязняющих веществ.

Широко используются микроорганизмы и в системах биологической очистки сточных вод. Биологическая очистка сточных вод производится на полях орошения и полях фильтрации, куда поступают подлежащие очистке воды. Просачиваясь через слои почвы, они подвергаются окислительному воздействию целого комплекса почвенных микроорганизмов, в результате чего содержащиеся органические вещества полностью минерализуются. В настоящее время в связи с высоким уровнем развития промышленности и огромным количеством образующихся сточных вод создаются специальные сооружения аэробной биологической очистки – биотенки, биофильтры и аэротенки.

Человек с древних времен интуитивно использовал уникальные особенности микроорганизмов, даже не подозревая об этом. С давних пор процессы брожения применялись при приготовлении теста для хлеба, пива, вина, уксуса, кисломолочных продуктов, росяной мочке льна. Только в настоящее время стало известно, что все эти процессы происходят при участии определенных микроорганизмов, которые присутствуют на используемых для брожения субстратах.

Изучение биосинтетической деятельности микроорганизмов позволило установить их способность к синтезу самых разнообразных соединений, имеющих большое народнохозяйственное значение. В настоящее время с помощью микроорганизмов в промышленных масштабах получают микробный белок, аминокислоты (глутаминовую, треонин, лизин, пролин, глутамин), витамины (В₁₂, рибофлавин), ферменты (амилазы, пектиназы, протеазы, целлюлазы, липазы, изомеразы, трипсины, стрептокиназы, диастазы), интерферон, инсулин, гормон роста человека, органические кислоты (лимонную, молочную, масляную, уксусную, глюконовую), этанол, глицерин, ацетон, бутанол, пропанол, бутандиол, полисахариды (декстраны, ксантаны, пуллулан, альгинаты), средства защиты растений, антибиотики, стероиды, каротиноиды, рибонуклеотиды, кортизон, преднизолон, гидрокортизон и другие ценные продукты.

Достижения микробиологии находят практическое применение в металлургии для извлечения различных металлов из руд. Например, уже реализован способ микробиологического выщелачивания меди из сульфидной руды халькопирита. В перспективе возможно использование микроорганизмов для получения цветных и редких металлов – золота, свинца, германия, лития и др.

Особо следует отметить, что микробиология внедрилась в такие традиционно небιологические производства, как получение энергетического сырья (биогаз метан), добыча нефти, что вносит существенный вклад в решение топливно-энергетической проблемы. Микроорганизмы спо-

собны повышать прочность бетона. Установлено, что при добавлении на тонну бетона нескольких килограммов биомассы микроорганизмов повышается прочность и пластичность строительного материала.

Успехи в области микробиологии открыли новые возможности в профилактике и лечении многих инфекционных заболеваний, в борьбе с которыми ранее медицина была бессильна. За сравнительно небольшой период времени почти полностью ликвидированы такие заболевания, как чума, оспа, холера, малярия, являющиеся в прошлом бичом человечества. В настоящее время внимание микробиологов сосредоточено на проблеме злокачественных опухолей, птичьего гриппа и синдроме приобретенного иммунодефицита. Изучение свойств патогенных микроорганизмов позволило получать в промышленных масштабах вакцины, сыворотки и другие лечебные препараты.

Таким образом, микробиология вносит существенный вклад в решение многих практических задач, проблем здравоохранения и сельского хозяйства, способствует развитию определенных отраслей промышленности.

Следует отметить, что еще имеются большие возможности, основанные на применении микроорганизмов, для расширения и совершенствования биотехнологических процессов. Решение таких актуальных проблем, как обеспечение человечества продуктами питания, возобновление энергетических ресурсов, охрана окружающей среды, так или иначе будет связано с использованием микроорганизмов.

3. История развития микробиологии

Открытие микроорганизмов связано с именем голландского естествоиспытателя **Антони ван Левенгука** (1632–1723), который, заинтересовавшись строением льняного волокна, отшлифовал несколько грубых



Антонии ван Левенгук

линз. Позднее он достиг большого совершенства при изготовлении линз и назвал их «микроскопиями» (рис. 1). Микроскопы А. ван Левенгука, несмотря на простоту конструкции, давали хорошее изображение при увеличении примерно от 50 до 300 раз. С помощью этих микроскопов он рассматривал все, что попадалось под руку: воду из пруда, зубной налет, слюну, кровь, настой перца и многое другое. Результаты своих наблюдений Левенгук посылал в Лондонское королевское общество. В своих письмах он со-

общал, что окружающий нас мир густо населен микроскопическими обитателями, которые он назвал живыми маленькими животными – «анималькулями». А. ван Левенгук был убежден, что микроорганизмы устроены так же, как и макро-организмы, т. е. имеют органы пищеварения, ножки, хвостики и др.

Открытие А. ван Левенгука привлекло всеобщее внимание. Оно явилось основой развития микробиологии, изучения форм микроорганизмов и их распространения во внешней среде. Это был **морфологический**, или **описательный** период развития микробиологии, который продолжался с конца XVII до середины XIX в. Этот период для микробиологии был малопродуктивным, так как оптические приборы того времени не позволяли отличить один вид микроорганизма от другого, не могли дать представление о биологических свойствах и роли микроорганизмов в природе.

Начало изучению физиологии и биохимии микроорганизмов, выяснению их роли в природе и жизни человека положил французский ученый **Луи Пастер** (1822–1895). С его работ начался **физиологический** период микробиологии. Л. Пастер впервые в противоположность мнению химиков показал, что



Луи Пастер

процессы брожения и гниения обуславливаются жизнедеятельностью микроорганизмов, специфических для каждого вида брожения. Он установил, что эти процессы могут осуществляться без доступа молекулярного кислорода в анаэробных условиях. Таким образом, Пастер открыл принципиально новое биологическое явление – анаэробноз. Благодаря своим исследованиям Пастер смог установить природу «болезней» вина и пива, показав, что их скисание и прогоркание также являются результатом жизнедеятельности микроорганизмов. Он предложил способ предохранения вина и пива от скисания и

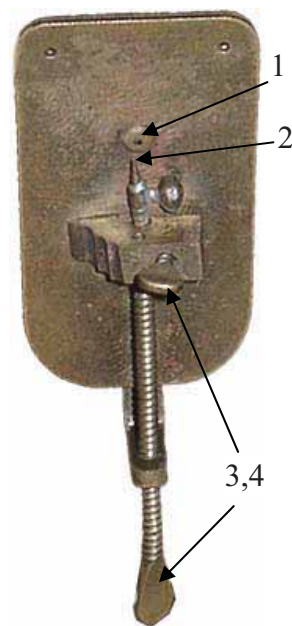


Рис. 1. Устройство одного из микроскопов А. ван Левенгука:

1 – линза; 2 – булавка, к которой прикрепляется объект; 3, 4 – фокусирующие винты

прогоркания (способ борьбы с контаминацией пищевых продуктов): их кратковременный прогрев до температуры 70–80 °С, названный впоследствии *пастеризацией*.

К области теоретических открытий Пастера относятся его работы о невозможности самозарождения жизни. Оппоненты Пастера утверждали, что в субстратах, подвергающихся брожению или гниению, их возбудители самозарождаются. Безупречными экспериментами Пастер показал, что в сосудах со стерильным бульоном, закрытых ватными пробками во избежание контакта с воздухом, самозарождение микроорганизмов невозможно. Рост микроорганизмов наблюдается тогда, когда в сосуд с питательной средой попадает воздух, содержащий микроорганизмы, или питательная среда подвергается недостаточной термической обработке, при которой устойчивые к температуре споры бактерий не погибают.

Неоценимый вклад внес Пастер в медицинскую микробиологию. В процессе исследований он установил, что не только брожение, болезни пива и вина, шелковичных червей обусловлены жизнедеятельностью микроорганизмов, но и многие болезни человека и животных также вызываются микроорганизмами. Они, подобно возбудителям брожения, очень специфичны: каждый вид патогенных микроорганизмов вызывает строго определенное заболевание. Пастер доказал микробную природу таких заболеваний человека и животных, как сибирская язва, куриная холера, бешенство. Кроме того, он разработал способ борьбы с возбудителями этих заболеваний с помощью вакцин – культур патогенных микроорганизмов с ослабленными вирулентными свойствами.

Л. Пастер с полным основанием может считаться основоположником общей, промышленной, медицинской и ветеринарной микробиологии.

Прогресс микробиологии в конце XIX в. был неразрывно связан с работами знаменитого немецкого ученого **Роберта Коха** (1843–1910), занимавшегося изучением возбудителей инфекционных заболеваний. Свои исследования Кох начал с изучения сибирской язвы и показал, что возбудителями этого заболевания являются бактерии вида *Bacillus anthracis*. Позднее он открыл возбудителей туберкулеза (бактерии вида *Mycobacterium tuberculosis*), которые в его честь были названы «палочкой Коха». В 1905 г. Кох за исследования туберкулеза была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Он и его ученики открыли возбудителей и других заболеваний – азиатской холеры, дифтерии, брюшного тифа, столбняка, го-



Роберт Кох

нореи. Исследования специфических возбудителей позволили Коху сформулировать ряд подходов, необходимых для идентификации возбудителя заболевания, которые вошли в историю медицинской микробиологии как постулаты Коха:

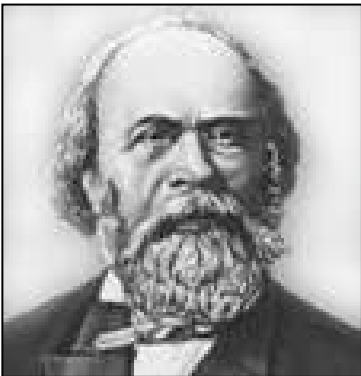
1. Микроорганизм обнаруживают в каждом случае конкретного предполагаемого заболевания, а также в условиях, ответственных за патологические изменения и клиническое течение болезни.

2. Микроорганизм не выделяют при других болезнях как случайный или не патогенный паразит.

3. После изоляции из организма больного и выделения чистой культуры патогенный микроорганизм должен вызвать аналогичное заболевание у восприимчивого животного.

Р. Кох и его ученики обогатили микробиологию новыми методами исследований:

- разработали методы окраски микроорганизмов анилиновыми красителями;
- усовершенствовали технику микроскопирования – конденсор Аббе и иммерсионные объективы, что дало возможность выявлять плохо различимые бактериальные формы;
- ввели в микробиологическую практику плотные питательные среды, на которых микроорганизмы способны формировать колонии, что в свою очередь позволяет невооруженным глазом определять количество жизнеспособных микроорганизмов в пробе. Для создания плотных питательных сред в качестве уплотнителя испробовали жидкость глаза убойного скота, крахмал, затем желатин и наконец агар-агар (вещество, состоящее из двух кислых полисахаридов – агарозы и агаропектина, содержащихся в клеточных стенках красных водорослей);
- разработали методику выделения чистых культур бактерий из изолированных колоний на плотных средах;
- разработали стеклянные емкости для культивирования микроорганизмов на плотных средах (стажер Р. Коха – Р. Петри), которые называются чашками Петри;
- внедрили в микробиологическую практику дезинфекцию как способ удаления микроорганизмов с поверхностей.



Родоначальником русской микробиологии является **Л. С. Ценковский** (1822–1887). Он впервые дал научнообоснованную классификацию микроорганизмов, установил близость бактерий к сине-зеленым водорослям. Ценковский

интересовался также проблемами медицинской микробиологии и создал вакцину против сибирской язвы, которая в его честь получила название «живая вакцина Ценковского» и до настоящего времени успешно применяется в ветеринарной практике.

Велика заслуга в развитии микробиологии **И. И. Мечникова** (1845–1916). Он открыл явление фагоцитоза и впервые показал, что защита организма от болезнетворных микроорганизмов – сложная биологическая реакция, в основе которой лежит способность фагоцитов захватывать и разрушать посторонние тела, попавшие в организм. В 1909 г. за исследования по фагоцитозу Мечникову была присуждена Нобелевская премия в области иммунологии.

Исследования Мечникова не ограничивались формулированием фагоцитарной теории. Он изучал патогенез холеры и биологию холероподобных вибрионов, показал возможность заражения шимпанзе сифилисом и предложил метод лечения сифилиса монохлоридом ртути.

И. И. Мечников является также основоположником учения о микробном антагонизме, послужившем основой для развития науки об антибиотикотерапии. Он показал, что молочнокислые бактерии подавляют гнилостные бактерии. На принципе микробного антагонизма Мечников обосновал теорию долголетия и предложил для prolongации человеческой жизни использовать простоквашу, которая впоследствии получила название «мечниковской». В настоящее время эта теория подтверждена многочисленными экспериментами и положена в основу развития отдельной отрасли биотехнологии, связанной с получением и использованием пробиотиков. **Пробиотиками**



И. И. Мечников



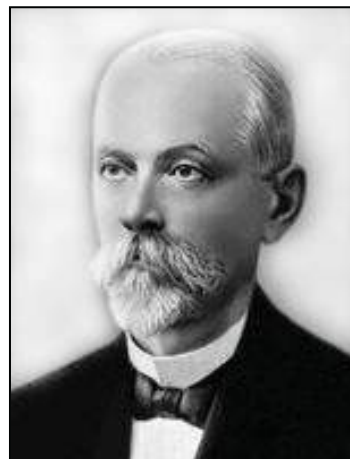
Н. Ф. Гамалея

называют живые культуры микроорганизмов (среди них преобладают молочнокислые бактерии), которые вводят в организм, обеспечивая заселение ими кишечного тракта. В процессе роста и развития такие культуры осуществляют, прежде всего, коррекцию нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и выполняют еще ряд полезных функций.

Соратником И. И. Мечникова был микробиолог и эпидемиолог **Н. Ф. Гамалея** (1859–1949), который внес большой вклад в изучение туберкулеза,

холеры, бешенства, организовал в России первую бактериологическую станцию и ввел в практику вакцинацию людей против бешенства. Он создал также противохолерную и оспенную вакцины, впервые описал явление лизиса бактерий под действием агентов, которые впоследствии были названы бактериофагами. Н. Ф. Гамалея считается одним из основоположников не только медицинской микробиологии, но и иммунологии и вирусологии, поэтому его имя присвоено Институту эпидемиологии и микробиологии в Москве.

Большой вклад в развитие микробиологии внес **Д. И. Ивановский** (1864–1920), который в 1892 г. открыл вирус, вызывающий мозаичную болезнь табака. Открытие Ивановского послужило толчком к обнаружению возбудителей вирусных заболеваний человека и животных. Д. И. Ивановский по праву считается основоположником новой ветви микробиологии – вирусологии.



Д. И. Ивановский

Создание учения об экологии почвенных микроорганизмов неразрывно связано с именем выдающегося русского исследователя **С. Н. Виноградского** (1856–1953). С. Н. Виноградский внес значительный вклад в познание физиологического многообразия микроорганизмов. Он



С. Н. Виноградский

открыл процесс хемосинтеза, показав на примере нитрифицирующих бактерий, серобактерий и железобактерий, что в природе существуют микроорганизмы, способные извлекать энергию при окислении восстановленных неорганических соединений. Виноградский также доказал, что автотрофные бактерии могут расти на минеральных средах, получая необходимую для этого роста энергию путем окисления восстановленных неорганических соединений и используя в качестве источника углерода углекислый газ, т. е. открыл новый хемолитоавтотрофный тип питания микроорганизмов. Заслугой Виноградского является и то, что он впервые выделил из почвы анаэробные бак-

терии, способные фиксировать молекулярный азот, названные им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*.

Для выделения в лабораторных условиях бактерий с определенными свойствами (определенной физиологической группы) Виноградский

предложил создавать специфические (элективные) условия, способствующие преимущественному развитию данной группы микроорганизмов, т. е. он разработал метод накопительных культур.

С.Н. Виноградский опубликовал свыше 300 научных работ по экологии и физиологии почвенных микроорганизмов и поэтому его по праву считают родоначальником почвенной микробиологии.

Принцип выделения микроорганизмов, основанный на методе накопительных культур, был успешно развит голландским микробиологом **М. Бейеринком** (1851–1931). Он впервые выделил из почвы чистые культуры клубеньковых бактерий (симбиотических азотфиксаторов) и аэробных свободноживущих азотфиксирующих бактерий *Azotobacter chroococcum*. Кроме того, Бейеринк выделил чистые культуры сульфатредуцирующих бактерий, которые составляют важное звено в круговороте серы. Ему принадлежат работы по изучению денитрификации и ферментов разных групп микроорганизмов.



М. Бейеринк



В. Л. Омелянский

Ученик С. Н. Виноградского **В. Л. Омелянский** (1867–1928) многое сделал для изучения нитрифицирующих, азотфиксирующих и пектинолитических бактерий. Он впервые выделил целлюлозоразрушающие бактерии, описал их физиологию и химизм брожения клетчатки. В. Л. Омелянский написал первый учебник по микробиологии на русском языке.

Таким образом, выдающиеся ученые во второй половине XIX в. заложили прочный фундамент общей микробиологии, на котором в XX в. эта наука достигла расцвета.

Развитие микробиологии в XX в. ознаменовалось крупными открытиями в области биохимии и генетики микроорганизмов. Так, в 1925 г. **Г. А. Надсон** (1867–1940) впервые получил индуцированные мутации дрожжей посредством облучения клеток рентгеновскими лучами. Он также изучал роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе и их геологическую деятельность.

В середине 50-х годов XX в. **А. Клюйвер** (1888–1956) и **К. ван Ниль** (1897–1985) провели сравнительное биохимическое изучение относительно далеко отстоящих друг от друга физиологических групп микроор-

ганизмов. Они обнаружили, что закономерности процессов энергетического и конструктивного метаболизма для всех микроорганизмов едины. На основании этого А. Клейвер и К. ван Ниль сформулировали основы теории биохимического единства жизни.

В 1941 г. американские исследователи **Дж. Бидл** (1903–1989) и **Э. Татум** (1909–1975), изучая проявление индуцированных мутаций у грибов рода *Neurospora*, сумели приблизиться к пониманию функций генов и сформулировали свой знаменитый постулат «один ген – один фермент». Это открытие совпало по времени с серией достижений генетики микроорганизмов, и его можно считать началом «генетического» периода в истории развития микробиологии.

В 1944 г. американские ученые **О. Эвери**, **К. Мак-Леод** и **М. Мак-Карти** доказали роль ДНК в хранении и передаче наследственной информации, осуществив эксперименты по генетической трансформации у бактерий.

Исследования **Дж. Ледерберга**, **Э. Татума** и **Н. Циндера** в период с 1946 по 1952 г. показали наличие половой дифференциации у бактерий. Они открыли и изучили трансдукцию и конъюгацию, а также закономерности рекомбинации генетического материала у бактерий при этих способах обмена генетической информацией.

В 1953 г. **Дж. Уотсон** и **Фр. Крик** расшифровали строение молекулы ДНК, раскрыли генетический код, механизмы репликации ДНК и регуляции синтеза белка.

Успехи в области генетики микроорганизмов обусловили развитие нового направления – молекулярной генетики, являющейся основой генетической инженерии. Генетическая инженерия внесла потенциально новые идеи и методы в производство широкого спектра биологически активных веществ. Открытия и достижения, полученные на микроорганизмах, явились также основой для возникновения таких новых научных направлений, как молекулярная биология, молекулярная биотехнология, молекулярная вирусология, белковая инженерия и др.

Современный период развития микробиологии тесно связан с научно-техническим прогрессом, потребностями народного хозяйства и здравоохранения. Он характеризуется комплексностью исследований, направленных как на решение общебиологических проблем, так и задач, связанных с рациональным использованием природных ресурсов, охраной окружающей среды, развитием сельского хозяйства, здравоохранения, микробиологической, горнодобывающей и биотехнологической промышленности.

Глава 1. СИСТЕМАТИКА БАКТЕРИЙ

1.1. Принципы систематики

Систематика (таксономия) бактерий является одним из наиболее важных и сложных, но менее разработанных разделов микробиологии. Задачами систематики являются классификация, номенклатура и идентификация организмов.

Классификация – распределение множества организмов по группам (таксонам).

Номенклатура – присвоение названий отдельным группам и видам микроорганизмов. В систематике бактерий, так же как и в ботанике, зоологии, принята бинарная номенклатура, согласно которой бактериям присваивается название, состоящее из двух слов: первое определяет их принадлежность к конкретному роду, второе – к виду. Например, *Clostridium botulinum* и *Clostridium tetani* – два различных вида бактерий, относящихся к одному роду. Названия бактериям присваивают в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий.

Основной таксономической категорией является вид. Виды объединяются в роды, роды – в семейства, семейства – в порядки, далее следуют классы, отделы, царства. В микробиологии существуют также более мелкие таксономические единицы, чем вид: подвид (*subspeciens*), разновидность. Подвиды могут различаться по физиологическим (*biovar*), морфологическим (*morphovar*) или по антигенным (*serovar*) свойствам. Большое значение в микробиологии имеют такие понятия, как **клон** – чистая культура, полученная из одной клетки, и **штамм** – культуры бактерий одного вида, выделенные из различных источников либо из одного источника в разное время или полученные в ходе генетических манипуляций. Разные штаммы одного и того же вида бактерий могут отличаться друг от друга по целому ряду свойств, например по чувствительности к антибиотикам, способности к синтезу токсинов, ферментов и др.

Идентификация устанавливает принадлежность микроорганизмов к определенному таксону на основании наличия конкретных признаков. В

большинстве случаев идентификация заключается в определении родовой и видовой принадлежности микроорганизмов.

Определение бактерий до вида важно не только с позиции чисто познавательной, общебиологической, но и связано с решением ряда прикладных и научных задач. Особенно это важно для медицинской, ветеринарной и промышленной микробиологии, где действующими объектами являются микроорганизмы, и мельчайшие неточности в определении вида могут привести к нежелательным последствиям.

В настоящее время в микробиологии приняты два различных подхода к систематике, обуславливающих существование двух систем классификации: *филогенетической* (естественной) и *фенотипической* (искусственной). В основу *филогенетической* классификации положена идея создания системы прокариот, объективно отражающей родственные отношения между разными группами бактерий и историю их эволюционного развития. *Фенотипическая* классификация преследует, в первую очередь, практические цели, заключающиеся в том, чтобы быстрее установить принадлежность микроорганизма к определенному таксону. Наиболее четко последняя получила свое выражение в Определителе бактерий Берджи (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology), периодически издаваемом Обществом американских бактериологов с привлечением к его написанию крупных специалистов из других стран, изучающих те или иные группы бактерий. Первое издание Определителя было выпущено в 1923 г. группой американских бактериологов под руководством Д. Берджи; девятое издание в русском переводе вышло в 1997 г.

При классификации бактерий учитывается большое количество различных свойств и признаков. Свойства и признаки, характерные для всех бактерий данной группы и нехарактерные для микроорганизмов других групп, называют *критериями систематики*. Чем больше общих признаков имеют сравниваемые организмы, тем больше и оснований для включения их в одну таксономическую группу. В связи с тем что количество признаков, используемых для классификации микроорганизмов, значительно возросло, в конце 50-х годов XX в. возникла *нумерическая (численная) таксономия*, основанная на принципах классификации французского ботаника М. Адансона (1757). В основе нумерической таксономии лежит принцип сопоставления организмов по возможно большему количеству учитываемых признаков при допущении, что все они для систематики равноценны. Однако допущение о равнозначности всех признаков является и основным недостатком нумерической таксономии.

При идентификации бактерий приоритетным является использование генетических (молекулярно-биологических), фенотипических и серологических подходов и критериев систематики.

1.2. Генетические критерии систематики

Наиболее объективными и дающими представление о филогенетических связях между микроорганизмами являются генетические (молекулярно-биологические) критерии. К ним относятся определение относительного содержания ГЦ-пар в ДНК, гибридизация нуклеиновых кислот, определение нуклеотидных последовательностей в молекулах ДНК или РНК, применение генетических зондов (ДНК-зондов), рестрикционный анализ ДНК, методы генетического анализа (изучение переноса генов, генетических скрещиваний, картирование хромосом бактерий и др.).

Относительное содержание ГЦ-пар в ДНК представляет собой стабильный признак бактерий, не зависящий ни от возраста, ни от условий культивирования, ни от отдельных перестроек генов в хромосоме (т. е. данное свойство практически не изменяется под влиянием большинства мутаций).

Молекулы ДНК разных микроорганизмов отличаются друг от друга относительным содержанием пуриновых и пиримидиновых оснований, которые формируют комплементарные пары в антипараллельных цепях ДНК. Близкородственные микроорганизмы имеют идентичное или сходное содержание ГЦ-пар в ДНК, а далеко отстоящие в генетическом отношении сильно отличаются по относительному содержанию этих азотистых оснований. Молярное содержание ГЦ-оснований у широкого круга прокариот колеблется в широких пределах: от 25 до 80 мол. %. В то же время, например у разных видов бактерий рода *Pseudomonas*, содержание ГЦ-пар в ДНК имеет близкие величины – от 61,8 до 69,5 мол. % от общего количества оснований. Следовательно, каждый вид бактерий имеет ДНК с характерным средним содержанием ГЦ-пар, и эту величину можно рассматривать как один из важных признаков вида.

Нуклеотидный состав ДНК бактерий можно определить химическими и физическими методами.

К химическим относится метод хроматографии на бумаге. Определение состава ДНК этим методом включает следующие основные этапы: выделение ДНК, ее гидролиз до азотистых оснований, разделение их с помощью хроматографии на бумаге, элюирование оснований с бумаги и последующая ультрафиолетовая спектрофотометрия. Хотя этот метод довольно длителен и трудоемок, он позволяет определить непосред-

венное соотношение азотистых оснований в ДНК, в то время как в других методах расчеты содержания ГЦ- или АТ-пар основаны на косвенных данных. Метод хроматографии на бумаге является классическим методом определения нуклеотидного состава ДНК, в сравнении с которым можно выявить точность и корректность использования других.

К физическим относятся метод определения содержания азотистых оснований по температуре плавления ДНК и метод ультрацентрифугирования ДНК в градиенте плотности хлорида цезия.

Установлено, что существует прямая зависимость между содержанием ГЦ-пар в молекуле ДНК и температурой ее плавления. **Температура плавления** – это температура, при которой происходит денатурация ДНК в результате разрыва водородных связей между азотистыми основаниями. Поскольку число водородных связей между гуанином и цитозином больше (3), чем между основаниями в АТ-парах (2), то чем выше содержание ГЦ-пар в ДНК, тем выше температура ее плавления. Следовательно, температура плавления любой ДНК служит показателем ее нуклеотидного состава.

Разделение цепей сопровождается заметным увеличением оптической плотности при 260 нм, т. е. максимуме поглощения ДНК в УФ-свете, что легко измерить спектрофотометрически. При постепенном нагревании образца ДНК поглощение увеличивается по мере разрыва водородных связей и достигает плато при температуре, когда ДНК становится полностью одноцепочечной (рис. 2).

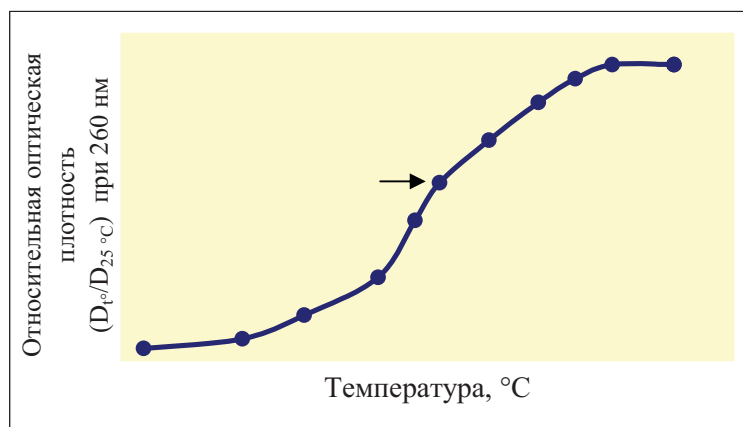


Рис. 2. Зависимость поглощения ДНК от температуры

Средняя точка на кривой возрастания поглощения (указана на рисунке стрелкой) – температура плавления ($T_{\text{пл.}}$) – служит мерой содержания ГЦ-оснований, а нуклеотидный состав ДНК определяется по формуле:

$$(\text{Г} + \text{Ц}) \% = (T_{\text{пл.}} - 69,3^\circ) \cdot 2,439.$$

Метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия (CsCl) основан на том, что имеется линейная зависимость между плотностью ДНК и содержанием в ней ГЦ-пар. Препарат ДНК добавляют к концентрированному раствору CsCl и центрифугируют в течение 24 ч. Установившееся за это время распределение ДНК в градиенте CsCl зависит от ее плотности. При определении нуклеотидного состава ДНК по градиенту плотности в CsCl в качестве стандарта используют ДНК с заведомо известной плотностью. Применение этого метода ограничено из-за сложности оборудования.

Существуют и другие методы определения нуклеотидного состава ДНК (при помощи бромирования оснований, депуринизации, спектрального анализа, электрофореза в полиакриламидном геле и др.), но они не нашли широкого применения в основном из-за высокой требовательности к качеству исследуемых препаратов ДНК и недостаточной точности.

Более тонким методом оценки генетического сходства организмов является **метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот**, с помощью которого определяют число и степень сходства гомологичных участков в геномах сравниваемых видов. Главным достоинством этого метода является то, что он впервые позволил провести количественную оценку родства микроорганизмов. В основе метода лежит способность денатурированных (одноцепочечных) ДНК в подходящих условиях реассоциировать, т. е. соединяться с образованием двухцепочечных молекул ДНК. Для этого ДНК, выделенную из клеток одного микроорганизма, денатурируют нагреванием. Клетки другого штамма выращивают в среде, содержащей радиоактивный предшественник ДНК (^3H , ^{14}C), в результате включения которого ДНК становится меченой. Из клеток этого штамма выделяют ДНК, денатурируют ее и смешивают с денатурированной ДНК первого штамма. Раствор выдерживают при температуре ниже температуры плавления ДНК. При этом происходит «отжиг», или специфическая реассоциация комплементарных цепей с образованием двухцепочечных гибридных молекул ДНК. Оставшиеся после «отжига» одноцепочечные ДНК удаляют обработкой ДНКазой. Гибридные молекулы можно обнаружить путем центрифугирования препарата в градиенте CsCl, где они образуют полосы, занимающие промежуточное положение между «легкими» и «мечеными» молекулами двуспиральной ДНК.

При аналогичных экспериментах с препаратами ДНК из двух неродственных бактерий никакой гибридизации не выявляется; после «отжига» двойные спирали образуются при специфическом спаривании только тех цепей, которые первоначально были получены из одной и той же молекулы ДНК.

Однако оценка гомологии на основе метода центрифугирования в градиенте плотности слишком громоздка для повседневного использования и, кроме того, позволяет обнаружить реассоциацию только тех комплементарных цепей, которые обладают очень высокой степенью сходства. Для измерения реассоциации молекул нуклеиновых кислот был разработан ряд более простых методов. Все они основаны на том, что образование двойных спиралей ДНК должно происходить при использовании двух разных образцов денатурированной ДНК, один из которых помечен радиоактивным изотопом; необходимо лишь отделение двойных спиралей от остаточной одноцепочечной нуклеиновой кислоты и измерение радиоактивности двойных спиралей.

Простейший повсеместно используемый способ изучения реассоциации нуклеиновых кислот – метод с применением колонки, содержащей гидроксилapatит. Гидроксилapatит представляет собой гель фосфата кальция, который при определенных условиях специфически адсорбирует только двойные, но не одиночные цепи нуклеиновых кислот. Гибридационную смесь пропускают через колонку, которую затем промывают для удаления из нее одноцепочечных молекул. Адсорбированные двойные спирали элюируют, и в элюате определяют радиоактивность. Для этого метода необходимо присутствие очень большого избытка немеченой ДНК (в несколько тысяч раз превышающего количество меченой ДНК), чтобы предотвратить реассоциацию меченых комплементарных цепей.

В экспериментах по реассоциации любого типа должны быть стандартизированы температурные условия, ионная сила раствора и средняя длина фрагментов ДНК, так как все эти факторы влияют на возможность образования двойных спиралей.

Следует отметить, что метод молекулярной гибридизации ДНК не всегда может быть использован для изучения родственных связей между эволюционно далекими группами бактерий. Существует определенный уровень дивергенции нуклеотидных последовательностей ДНК, ниже которого образования гибридных молекул не происходит. В таком случае изучают реассоциации ДНК–рРНК. Этот метод позволяет значительно расширить список организмов, у которых можно выявить генетическую гомологию благодаря тому, что на относительно небольшом участке бактериального генома, кодирующего рибосомные РНК, исходная последовательность оснований является более консервативной и сохраняется значительно полнее, чем в основной массе хромосомной ДНК. В итоге путем реассоциации ДНК–рРНК часто можно обнаружить довольно вы-

сокую гомологию геномов двух бактерий, у которых реассоциация ДНК–ДНК не выявляет заметной гомологии.

Как уже отмечалось, сравнивать генотипы бактерий можно с помощью *методов генетического анализа*. Известно, что перенос генетической информации и рекомбинация ее с ДНК реципиента может происходить только между двумя родственными организмами. Осуществлению межвидового, межродового переноса генов могут препятствовать внешние барьеры, например различия в строении поверхностных структур клеток, что ограничивает конъюгацию или необходимое для трансдукции прикрепление бактериофага. Таким же препятствием является ферментативное расщепление «чужой» ДНК после ее проникновения в клетку в результате рестрикции со стороны хозяина. Образование генетических рекомбинантов служит значительно более точным показателем уровня генетической гомологии, чем гибридизация *in vitro*, поскольку включение каждого отдельного фрагмента молекулы ДНК донора зависит от степени его гомологии с ДНК реципиента именно в том небольшом специфическом участке хромосомы, в котором должна произойти рекомбинация.

В последние годы в таксономических исследованиях нашел применение такой метод изучения строения генома бактерий, как *рестрикционное картирование*. Ферменты рестриктазы способны распознавать специфические нуклеотидные последовательности и в строго определенных участках (сайтах рестрикции) «разрезать» молекулы ДНК на фрагменты (рестрикты). Расположение фрагментов ДНК, продуктов расщепления, разделенных с помощью электрофореза в агарозном геле, дает существенную информацию о типе и количестве специфических нуклеотидных последовательностей в хромосомах изучаемых организмов и позволяет судить об их сходстве или различии. Этот метод привлекателен в силу того, что дает возможность выявить сравнительно тонкие различия в последовательностях нуклеотидов ДНК и поэтому его можно использовать для дифференциации микроорганизмов на внутривидовом уровне.

Метод молекулярных, или генных, зондов (ДНК-зондов) основан на реакции гибридизации между фрагментом нуклеотидной последовательности (зондом), несущим наиболее специфический и консервативный для данного вида бактерий ген, с полимерной ДНК изучаемого микроорганизма. С помощью этого метода можно идентифицировать любой биологический объект. Точность метода зависит от используемого зонда (его «чистоты»). Наилучшими ДНК-зондами являются полученные путем химического синтеза олигонуклеотидные последовательности, расположение нуклеотидов в которых соответствует таковому в участке ге-

на (или всего гена), ответственного за определенную функцию бактерий. ДНК-зонды метят различными способами, например флуоресцентными красителями, радиоизотопами или биотином. Разрешающая способность метода может быть значительно повышена с помощью цепной ДНК-полимеразной реакции. В основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) лежит многократное реплицирование специфического участка нуклеотидной последовательности, катализируемое ДНК-зависимой ДНК-полимеразой, и использование праймера (от англ. *primer* – запал, средство воспламенения) – фрагмента ДНК, несущего наиболее специфичную для данного микроорганизма нуклеотидную последовательность гена (или участка гена). С помощью праймера обнаруживают искомый фрагмент идентифицируемого микроорганизма. Чувствительность метода исключительно высока и за несколько часов он позволяет увеличить число копий исследуемого фрагмента ДНК в 10^6 – 10^8 раз. ПЦР может быть использована для идентификации ДНК любого микроорганизма, если для него имеется соответствующий праймер. Применение ПЦР особенно показано в тех случаях, когда трудно выделить чистую культуру возбудителя какого-либо заболевания из-за сложности методов культивирования, малого количества возбудителя в исследуемом образце, высокой антигенной изменчивости и т. д. ПЦР незаменима для обнаружения во внешней среде так называемых некультивируемых, но жизнеспособных форм бактерий, в том числе патогенных (холерного вибриона, сальмонелл, легионелл и др.). Тест-системы с праймерами для проведения ПЦР в целях обнаружения возбудителей различных заболеваний разработаны и внедряются в практику.

Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) дает возможность проводить сопоставительный анализ последовательностей в различных молекулах ДНК и РНК. Поскольку секвенирование всего генома бактерий в настоящее время – трудоемкая и дорогостоящая процедура, то чаще всего анализируются нуклеотидные последовательности рибосомных РНК – 16S-рРНК. Эта РНК универсально распространена, функционально постоянна и, кроме того, достаточно консервативна, чтобы установить глубокие эволюционные связи. Чем больше различий в последовательности нуклеотидов 16S-рРНК у двух бактерий, тем раньше началось расхождение между ними и, следовательно, тем дальше отстоят они друг от друга в филогенетических отношениях.

1.3. Фенотипические критерии систематики

В классификации бактерий используют набор фенотипических признаков: морфологических, культуральных, физиологических и биохимических.

Описание **морфологических признаков** включает определение формы, размеров клеток и их взаимного расположения, типа жгутикования, наличия капсулы, способности образовывать споры, особенностей внутреннего строения. К категории морфологических признаков относится и окраска по методу Грама, связанная со строением клеточной стенки. Однако только морфологических признаков для идентификации бактерий недостаточно. Если, например, выделены подвижные грамотрицательные палочки, не образующие эндоспоры и имеющие длину 6 мкм, то определить их видовую принадлежность только на основании этого невозможно, ибо указанными признаками обладают бактерии многих видов.

При характеристике **культуральных признаков**, т. е. таких, которые проявляются при выращивании бактерий в различных условиях, отмечают особенности роста бактерий на плотной питательной среде (размер, окраска, форма, характер колоний) и в жидких питательных средах (образование осадка, пленки, взвеси, хлопьев и т. д.). Однако и этих признаков недостаточно, так как у культур различных видов они могут проявляться сходным образом.

К числу **физиологических признаков** относятся возможность использовать те или иные источники углерода и азота, потребность в факторах роста, тип энергетических процессов (аэробное и анаэробное дыхание, брожение), отношение к температуре, влажности, кислотности среды и другим факторам внешней среды.

Разнообразными являются **биохимические признаки** бактерий, которые обусловлены наличием тех или иных ферментов, образованием определенных продуктов метаболизма (кислоты, спирты, газы и др.), типом запасных веществ, химическим составом клеток и т. д.

1.4. Серологические критерии систематики

Серологические (от лат. *serum* – сыворотка) критерии систематики основаны на специфических реакциях взаимодействия антигенов (компоненты клеточных стенок, жгутиков, капсул, ДНК и токсинов) идентифицируемых микроорганизмов с антителами, содержащимися в сыворотках. Между антигенами и соответствующими им антителами проис-

ходит связывание, что положено в основу методов серологической диагностики.

Такие серологические реакции, как агглютинация, преципитация, связывание комплемента, иммунофлуоресценция, иммуноферментный и радиоиммунный анализ, позволяют легко и быстро проводить предварительную идентификацию микроорганизмов.

Для постановки серологических реакций необходима сыворотка, которую получают из крови лабораторного животного, иммунизированного коллекционным (известной видовой и штаммовой принадлежности) микроорганизмом. Она содержит антитела, специфичные к данному штамму. Полученную сыворотку используют в серологических реакциях для выявления родственных микроорганизмов, обладающих такими же антигенными детерминантами, как и коллекционный штамм.

Серологические методы являются важным инструментом в диагностике и лечении инфекционных заболеваний человека и животных, поскольку с их помощью можно не только идентифицировать возбудителя заболевания, но и обнаружить в крови больных и переболевших специфические антитела к соответствующим возбудителям. Серологические методы, пожалуй, остаются единственными методами диагностики при невозможности или трудностях выделения возбудителя, сравнительно редко дают ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

1.5. Современная классификация бактерий

В современной систематике бактерий сложилась ситуация, характерная и для классификации других организмов: достигнуты успехи в создании филогенетической системы классификации, отражающей основные направления эволюционного развития и родство представителей определенных таксонов, но сохраняют свое значение искусственные фенотипические классификации, более удобные для идентификации микроорганизмов.

В настоящее время отсутствует сколько-нибудь детализированная эволюционная система прокариот и, скорее всего, решение этой проблемы – дело неблизкого будущего. Особенности прокариот в области морфологической, физиолого-биохимической, генетической организации говорят о неприменимости к ним хорошо разработанных принципов, используемых при построении системы высших организмов.

Не останавливаясь на исторических аспектах проблемы систематики бактерий, следует отметить, что наиболее приемлемой филогенетической системой классификации прокариот является система, основанная на со-

поставлении последовательности нуклеотидов в 16S-rРНК. Эта система положена в основу 2-го издания многотомной энциклопедии прокариот – Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Руководство по систематике бактерий Берджи), первый том которой вышел в свет в 2001 г. В этом труде все прокариоты разделены на 26 филогенетических «ветвей» (групп) на основании строения их 16S-rРНК; 23 «ветви» представлены эубактериями, а три – архебактериями. Следует подчеркнуть, что большое количество этих филогенетических групп содержат виды прокариот, которые не выделены в виде чистых культур и поэтому еще детально не изучены. Для представителей данных видов известны в настоящее время только последовательности нуклеотидов в 16S-rРНК. Из 23 групп эубактерий две филогенетические группы представлены грамположительными бактериями, остальные группы – грамотрицательными.

Грамотрицательные бактерии состоят из крупной группы Протеобактерий (*Proteobacteria*) и 20 групп остальных бактерий, имеющих данный тип клеточной стенки. Краткая характеристика Протеобактерий, к которым по составу 16S-rРНК наиболее близки митохондрии и хлоропласты большинства эукариот, приведена в табл. 2.

Протеобактерии – очень гетерогенная в морфологическом, физиологическом и биохимическом плане группа грамотрицательных бактерий. Для представителей этой группы характерны все типы энергетического метаболизма и питания. Клетки большинства видов Протеобактерий имеют палочковидную, сферическую или вибриоидную форму, размножаются в основном бинарным делением, но для некоторых видов характерно почкование и образование плодовых тел в сложном клеточном цикле. В этой группе имеются как подвижные за счет жгутиков, так и неподвижные бактерии. По отношению к молекулярному кислороду Протеобактерии бывают облигатными аэробами, облигатными и факультативными анаэробами. Группа Протеобактерий на основании различий в 16S-rРНК разделена на пять подгрупп: альфа, бета, гамма, дельта и эпсилон.

Кроме Протеобактерий, к грамотрицательным относятся следующие основные группы эубактерий: водородные термофилы, зеленые нитчатые бактерии, зеленые серные бактерии, цианобактерии, спирохеты, цитофаги, бактериоиды, хламидии, планктомицеты, дейнококки, хлорофлексусы, фузобактерии, фибробактерии, термодесульфобактерии и др.

Филогенетические группы грамположительных бактерий – *Actinobacteria* и *Firmicutes*. Группа *Actinobacteria* («актиномицетная ветвь») представлена следующими родами бактерий, имеющими в ДНК высокое содержание ГЦ-пар: *Geodermatophilus*, *Frankia*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*,

Micrococcus, Actinomyces, Bifidobacterium, Propionibacterium, Actinoplanes, Nocardia, Rhodococcus, Corynebacterium, Mycobacterium. Группа *Firmicutes* («кlostридиальная ветвь» – главным образом грамположительные бактерии с низким содержанием ГЦ-пар в ДНК) состоит из следующих родов: *Clostridium, Lactococcus, Pediococcus, Streptococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Listeria, Caryophanon, Staphylococcus, Sarcina, Sporosarcina, Bacillus, Desulfotomaculum, Heliobacterium, Mycoplasma, Ureaplasma* и др.

Таблица 2

**Грамотрицательные бактерии филогенетической группы
Proteobacteria (Протеобактерии)**

| Основные фенотипические группы | Наиболее распространенные роды |
|---|---|
| Ферментирующие палочки и вибрионы | Энтеробактерии, <i>Vibrio, Photobacterium, Aeromonas, Zymomonas</i> |
| Палочки и кокки, обладающие аэробным дыханием | <i>Pseudomonas, Zoogloea, Azotobacter, Beijerinckia, Azomonas, Rhizobium, Bradyrhizobium, Agrobacterium, Acetobacter, Gluconobacter, Legionella, Neisseria, Acinetobacter, Rickettsia</i> |
| Бактерии, образующие чехлы | <i>Sphaerotilus, Leptothrix, Crenothrix</i> |
| Бактерии, образующие простеки | <i>Caulobacter, Hyphomicrobium</i> |
| Паразиты бактерий | <i>Bdellovibrio</i> |
| Спириллы и магнитоспириллы | <i>Spirillum, Aquaspirillum, Magnetospirillum, Campylobacter, Helicobacter</i> |
| Миксобактерии | <i>Polyangium, Myxococcus</i> |
| Бактерии, восстанавливающие сульфаты и серу | <i>Desulfovibrio, Desulfococcus, Desulfosarcina, Desulfuromonas</i> |
| Нитрификаторы | <i>Nitrosomonas, Nitrospira, Nitrosococcus, Nitrobacter, Nitrococcus</i> |
| Бактерии, окисляющие серу и железо | <i>Thiobacillus, Thiomicrospira, Thermothrix, Beggiatoa, Thiothrix, Gallionella</i> |
| Бактерии, окисляющие водород | <i>Alcaligenes, Ancylobacter, Paracoccus, Rhizobium, Pseudomonas, Spirillum</i> |
| Метилотрофные бактерии | <i>Methylomonas, Methylocystis, Methylobacter, Methylococcus</i> |
| Фотосинтезирующие пурпурные бактерии | Серные: <i>Chromatium, Thiospirillum, Thiocapsa</i> ; несерные: <i>Rhodobacter, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Rhodocyclus</i> |

В составе археобактерий выделяют три филогенетические группы: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* и *Korarchaeota*. Группа *Crenarchaeota* состоит из экстремально термофильных бактерий, большинство представителей которых осуществляют метаболизм серы, некоторые восстанавливают ионы железа и молибдена. В группу *Euryarchaeota* входят облигатно анаэробные метаногенные археобактерии, а также экстремальные термофилы и галофилы. Группа *Korarchaeota* образована археобактериями, обитающими в горячих серных источниках. До настоящего времени ни один из представителей этой группы (обладающих сходной 16S-рРНК) не выделен в виде чистой культуры, поэтому их фенотипические признаки изучены недостаточно.

Заканчивая рассмотрение филогенетических ветвей прокариот, следует отметить, что предложенная филогенетическая система, основанная на исследовании нуклеотидных последовательностей только одного гена рибосомной РНК – не более чем одна из технически удобных и разработанных систем упорядочения многочисленных организмов в целях их идентификации, поэтому построить логически верную таксономию бактерий только с учетом этого признака не представляется возможным.

Наиболее признанной и используемой фенотипической классификацией бактерий является классификация, представленная в девятом издании Определителя бактерий Берджи. В этом издании бактерии на основании строения пограничного слоя клетки разделены на четыре основные категории (отдела): 1) *Gracilicutes* (от лат. *cutes* – кожа, *gracilis* – тонкий) – грамотрицательные эубактерии, имеющие клеточные стенки; 2) *Firmicutes* (от лат. *firmus* – прочный) – грамположительные эубактерии, имеющие клеточные стенки; 3) *Tenericutes* (от лат. *tener* – мягкий, нежный) – эубактерии, лишенные клеточных стенок; 4) *Mendosicutes* (от лат. *mendosus* – ошибочный) – археобактерии, клеточные стенки которых отличаются от аналогичных структур других прокариот.

В **отдел *Gracilicutes*** входят бактерии различной морфологии с грамотрицательной клеточной стенкой. Размножение происходит в основном бинарным делением, некоторые бактерии размножаются почкованием. Эндоспор не образуют. Большинство подвижны: встречаются все типы передвижения бактерий – с помощью жгутиков, скольжением, изгибанием. Отдел включает аэробные, анаэробные и факультативные анаэробные бактерии; фототрофные и хемотрофные бактерии. Отдел подразделяют на три класса: *Scotobacteria*, *Oxyphotobacteria*, *Anoxyphotobacteria*. В класс *Scotobacteria* входят грамотрицательные бактерии, не использующие световую энергию для целей метаболизма, а получающие ее

только в результате окислительно-восстановительных реакций. Название класса происходит от греч. *scotos* – темнота. Это самый крупный класс бактерий. В класс *Anoxyphotobacteria* входят пурпурные бактерии, зеленые бактерии и гелиобактерии, осуществляющие аноксигенный фотосинтез (без выделения молекулярного кислорода). Класс *Oxyphotobacteria* представлен цианобактериями и прохлорофитами, осуществляющими оксигенный фотосинтез (с выделением молекулярного кислорода). Этот тип фотосинтеза аналогичен фотосинтезу, протекающему в растениях.

В **отдел *Firmicutes*** включены бактерии с грамположительной клеточной стенкой. Клетки могут иметь разную форму: палочки, кокки, нитевидные, ветвящиеся. Некоторые представители образуют эндоспores. Большинство из них неподвижны; подвижные формы имеют перитрихальное жгутикование. В состав отдела входят аэробные, анаэробные и факультативно анаэробные бактерии. Отдел состоит из двух классов: *Firmibacteria*, *Thallobacteria*. Класс *Firmibacteria* включает большое количество «неветвящихся» грамположительных бактерий. Класс *Thallobacteria* включает бактерии, клетки которых способны «ветвиться».

Отдел *Tenericutes* представлен бактериями, не имеющими клеточной стенки. В связи с отсутствием клеточной стенки форма клеток непостоянна: в чистой культуре одного вида одновременно присутствуют кокковидные, палочковидные, нитевидные, грушевидные, дисковидные и другие клетки. Размножение бактерий, входящих в этот отдел, происходит бинарным делением, почкованием. Окрасивание по Граму отрицательное. Характерно образование мелких, вырастающих в агар колоний. Могут быть сапрофитными, паразитами или патогенами. Отдел состоит из одного класса *Mollicutes* (микоплазмы).

Отдел *Mendosicutes* образован бактериями с ригидной клеточной стенкой, но не содержащей пептидогликана муреина. Большинство представителей – строгие анаэробы, многие из которых имеют жгутики. Виды характеризуются экологическим и метаболическим разнообразием, способностью жить в экстремальных условиях. Отдел состоит из одного класса – *Archaeobacteria*.

В составе четырех отделов (основных категорий) выделено 35 групп (или секций) бактерий, которые в большей или меньшей степени будут охарактеризованы в последующих главах.

К **отделу *Gracilicutes*** принадлежат следующие группы.

Группа 1. Спирохеты.

Группа 2. Аэробные (или микроаэрофильные), подвижные, спиралевидные (или вибриоидные) грамотрицательные бактерии.

Группа 3. Неподвижные или редко подвижные грамотрицательные изогнутые бактерии.

Группа 4. Грамотрицательные аэробные (или микроаэрофильные) палочки и кокки.

Группа 5. Факультативно аэробные грамотрицательные палочки.

Группа 6. Грамотрицательные анаэробные прямые, изогнутые или спиралевидные палочки.

Группа 7. Бактерии, осуществляющие диссимиляционное восстановление серы или сульфата.

Группа 8. Анаэробные грамотрицательные кокки.

Группа 9. Риккетсии и хламидии.

Группа 10. Аноксигенные фототрофные бактерии.

Группа 11. Оксигенные фототрофные бактерии.

Группа 12. Аэробные хемолитотрофные бактерии и близкие организмы.

Группа 13. Почкующиеся и (или) образующие выросты бактерии.

Группа 14. Бактерии, имеющие чехлы.

Группа 15. Нефотосинтезирующие скользящие бактерии, не образующие плодовых тел.

Группа 16. Скользящие бактерии, образующие плодовые тела.

В *отдел Firmicutes* входят:

Группа 17. Грамположительные кокки.

Группа 18. Грамположительные палочки и кокки, образующие эндоспоры.

Группа 19. Грамположительные палочки правильной формы, не образующие спор.

Группа 20. Грамположительные палочки неправильной формы, не образующие спор.

Группа 21. Микобактерии.

Группы 22–29. Актиномицеты.

К *отделу Tenericutes* принадлежит:

Группа 30. Микоплазмы.

Отдел Mendosicutes включает:

Группа 31. Метаногены.

Группа 32. Сульфатредуцирующие архебактерии.

Группа 33. Экстремально галофильные архебактерии (галобактерии).

Группа 34. Архебактерии, лишенные клеточной стенки.

Группа 35. Экстремально термофильные и гипертермофильные архебактерии, метаболизирующие серу.

В заключение следует подчеркнуть, что большинство микроорганизмов, существующих в природных сообществах, еще должно быть выделено в чистые культуры. Считается, что в настоящее время культивировать можно только 0,1 % всего микробного разнообразия, а остальных представителей бактерий вырастить и идентифицировать не удастся, хотя уже в чистую культуру выделены и описаны около 5 тыс. видов прокариот.

Глава 2. МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

2.1. Морфология бактерий

Для бактерий характерны клетки трех основных форм: шаровидная (сферическая), или кокковидная (от греч. *kokkos* – зерно), цилиндрическая (палочковидная) и извитая (рис. 3).

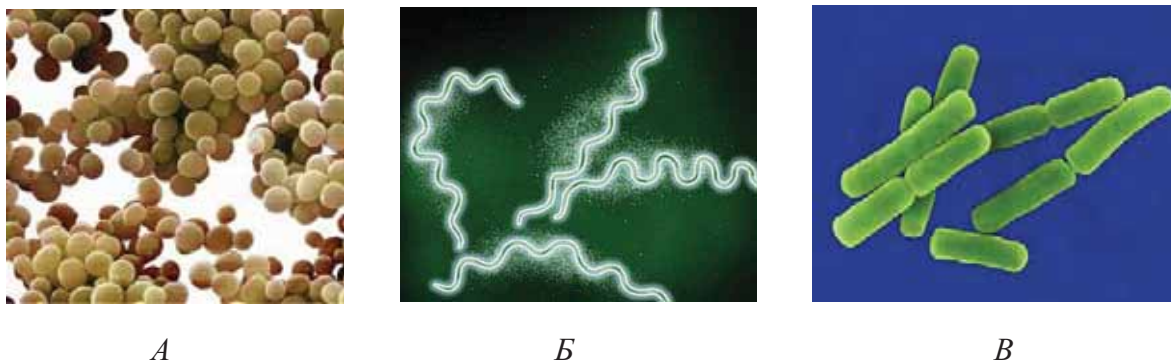


Рис. 3. Микрофотографии клеток бактерий:
А – сферических; Б – извитых; В – палочковидных

Кокковидные бактерии обычно имеют форму правильного шара диаметром 1,0–2,0 мкм, но могут быть овальными, эллипсоидными, бобовидными. Кокковидные бактерии способны делиться в нескольких плоскостях, при этом после деления клетки могут не расходиться и формировать различного вида скопления (рис. 4).

Если деление кокков происходит в одной плоскости, то могут образовываться пары клеток – *диплококки* (от лат. *diplos* – двойной) и цепочки клеток разной длины – *стрептококки* (от греч. *streptos* – цепочка). Кокки, делящиеся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и не расходящиеся после этого, образуют тетрады кокков (*тетракокки*) (от лат. *tetra* – четыре). Когда деление клеток происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются пакеты из восьми кокков в виде тюков кубической формы (*сарцины*) (от лат. *sarcina* – связка, тюк). У некоторых видов бактерий при делении кокков в нескольких плоско-

стях могут образовываться неправильные по форме скопления, напоминающие гроздь винограда – *стафилококки* (от лат. *staphyle* – гроздь винограда).

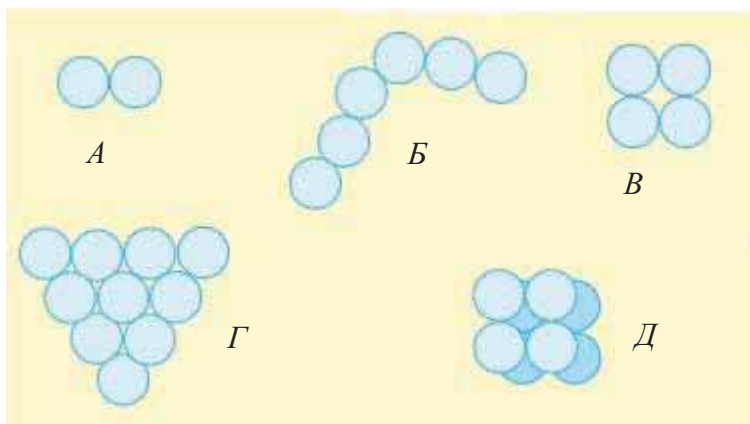


Рис. 4. Типы скоплений кокковидных клеток:

А – диплококки; Б – стрептококки; В – тетракокки; Г – стафилококки; Д – сарцины

Палочковидные (цилиндрические) клетки сильно различаются по отношению длины клетки к ее поперечнику. Они делятся только в одной плоскости – перпендикулярно оси цилиндра. Клетки при этом могут располагаться поодиночке (*монобактерии*), образовывать пары (*диплобактерии*) или цепочки (*стрептобактерии*) (рис. 5).

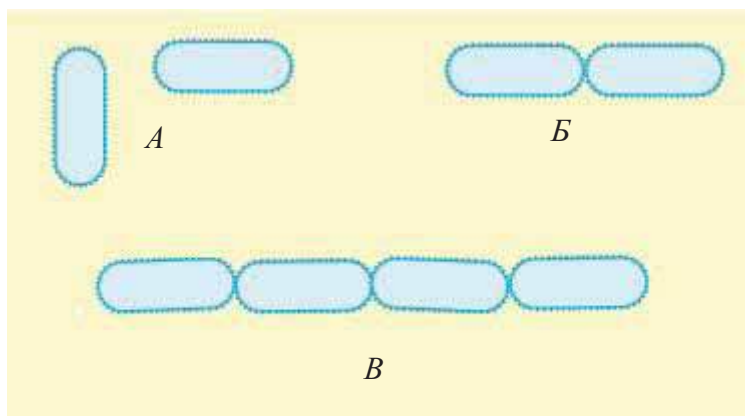


Рис. 5. Типы расположения палочковидных клеток:

А – монобактерии; Б – диплобактерии; В – стрептобактерии

Извитые клетки могут иметь разное число завитков. В зависимости от формы и количества завитков различают три типа клеток: *вибрионы* (от греч. *vibrio* – извиваюсь, изгибаюсь) имеют один завиток, не превышающий четверти оборота спирали (изогнутые клетки наподобие запятой); *спириллы* (от греч. *speira* – спираль) имеют 3–5 крупных завитков и *спирохеты* – большое количество мелких завитков (рис. 6).

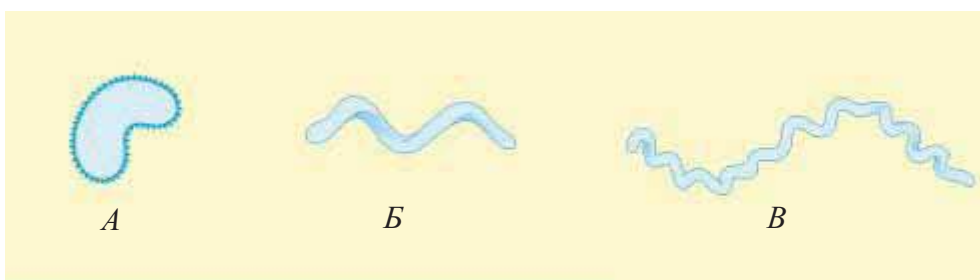


Рис. 6. Типы извитых клеток:
 А – вибрионы; В – спираиллы; В – спирохеты

Кроме описанных форм, которые преобладают среди бактерий, известны и клетки иных типов: клетки с выростами; булабовидной формы; веретенообразные; ланцетовидные; разветвленные и неразветвленные нитчатые; имеющие вид кольца, замкнутого или разомкнутого в зависимости от стадии роста; ветвящиеся; напоминающие шестиугольную звезду; пластинкообразные; в виде кусочков битого стекла, квадратиков и т. д.

Форма клеток большинства бактерий является устойчивым видовым признаком. Однако существуют бактерии, обладающие морфологической изменчивостью (плеоморфизмом), в зависимости от условий имеющие вид палочек, кокков или обнаруживающие слабое ветвление. У некоторых видов бактерий при прохождении цикла развития также наблюдается изменение формы клеток.

2.2. Структурная организация бактериальной клетки

Клетка прокариот, несмотря на относительно малые размеры, имеет все основные структурные компоненты, необходимые для осуществления обмена веществ (рис. 7).

Как и любая другая, прокариотическая клетка имеет цитоплазму, которая окружена цитоплазматической мембраной. Цитоплазма и цитоплазматическая мембрана составляют протопласт, снаружи от него расположены поверхностные структуры. К их числу относятся клеточная стенка, капсулы, чехлы, слизистые слои, жгутики, ворсинки и т. д.

2.2.1. Клеточная стенка

Клеточная стенка является обязательным структурным элементом бактериальной клетки, исключение составляют микоплазмы и L-формы. На долю клеточной стенки приходится от 5 до 50 % сухих веществ клетки.

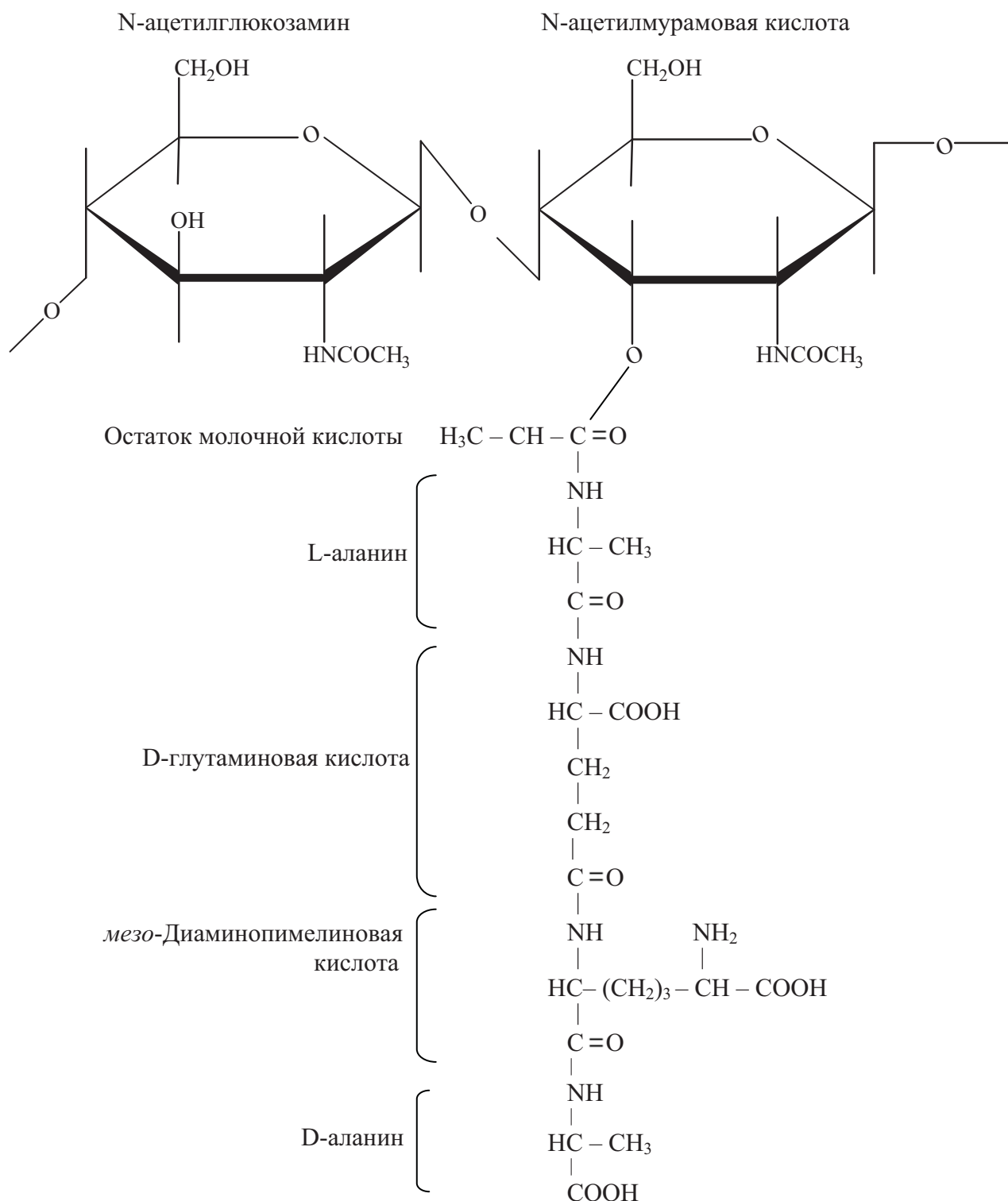


Рис. 8. Структура субъединицы муреина клеточной стенки бактерий *Escherichia coli* (по Г. Шлегелю, 1987)

Мезо-диаминопимелиновая кислота, L-лизин или другие диаминокислоты играют большую роль в формировании межмолекулярных сшивок,

так как в образовании пептидных связей могут принимать участие обе аминокислоты, и таким образом между собой связываются две гетерополимерные цепи муреина (рис. 9).

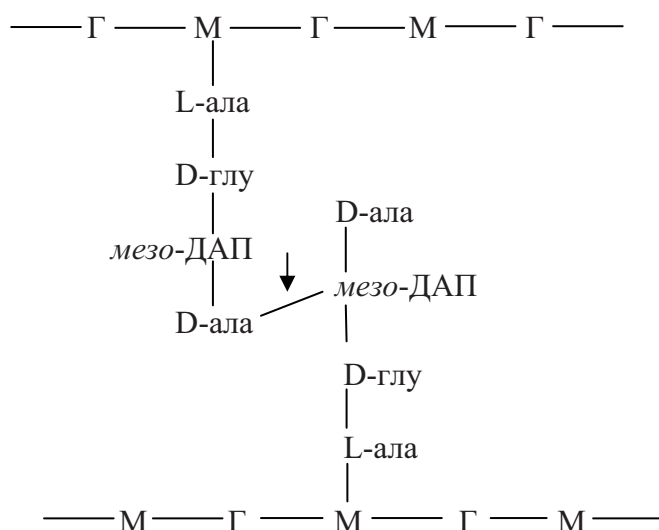


Рис. 9. Пептидные мостики между гетерополимерными цепочками муреина:
Г – N-ацетилглюкозамин; М – N-ацетилмурамовая кислота; ала – аланин; глу – глутаминовая кислота; ДАП – диаминопимелиновая кислота. Стрелкой обозначена пептидная связь

Благодаря пептидным связям гетерополимерные цепи связаны между собой и образуют мешкообразную гигантскую молекулу – муреиновый мешок, который выполняет функцию опорного каркаса клеточной стенки (рис. 10).

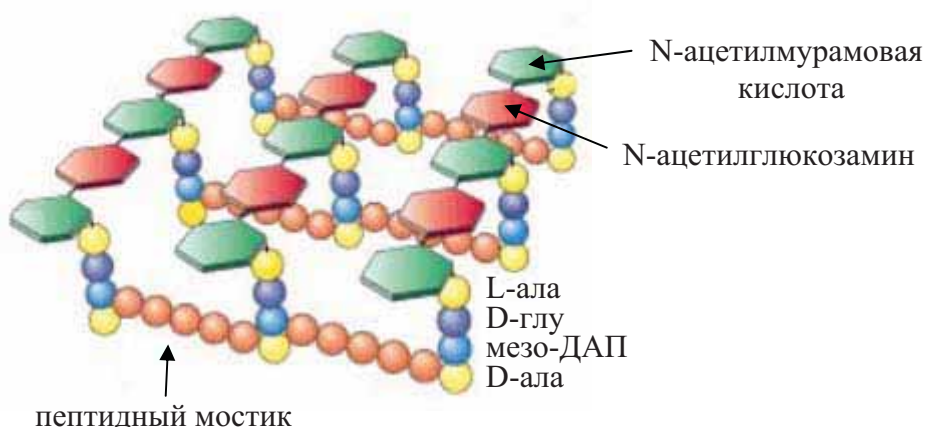


Рис. 10 . Схематическое изображение структуры однослойного поперечношитого муреинового мешка

Следует отметить, что особенностью клеточных стенок бактерий по сравнению с клетками эукариот является наличие в них особых структурных элементов:

- чередующихся последовательностей N-ацетилглюкамина и N-ацетилмурамовой кислоты;
- наличие мезо-диаминопимелиновой кислоты, D-форм аланина и глутаминовой кислоты.

Эти структурные элементы составляют ахиллесову пяту бактерий, используемую врачами в борьбе с инфекцией. Для борьбы с инфекцией бактериальной этиологии применяют лекарственные препараты, специфически воздействующие только на клеточные стенки бактерий или на процесс их синтеза, но не на клетки растений, животных и человека.

Химический состав и строение клеточной стенки постоянны для определенного вида бактерий и являются важным диагностическим признаком, который используется для идентификации бактерий.

В зависимости от строения клеточной стенки бактерии делятся на две большие группы: грамположительные и грамотрицательные. Существует метод окраски, позволяющий разделить бактерии на эти две группы. Он был предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом. Этот метод основан на различной способности микроорганизмов удерживать в клетке красители трифенилметанового ряда – кристаллический фиолетовый или генциановый фиолетовый, что в свою очередь зависит от химического состава и ультраструктуры клеточной стенки бактерий.

Рассмотрим, как построены и чем отличаются клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка грамположительных бактерий под электронным микроскопом выглядит как гомогенный плотный слой, толщина которого колеблется для разных видов от 20 до 80 нм (рис. 11). Муреин в клеточной стенке грамположительных бактерий составляет 50–90 % ее сухой массы. С муреином связаны тейхоевые кислоты – полимеры, образованные остатками спирта рибита или глицерина, связанными фосфодиэфирными мостиками. Тейхоевые кислоты влияют на катионный обмен клетки. Считается, что они осуществляют захват из окружающей среды и связывание ионов Mg^{2+} . У некоторых бактерий они принимают участие в регуляции активности автолитических ферментов – гидролаз, способных разрушать собственную клеточную стенку в процессе роста.

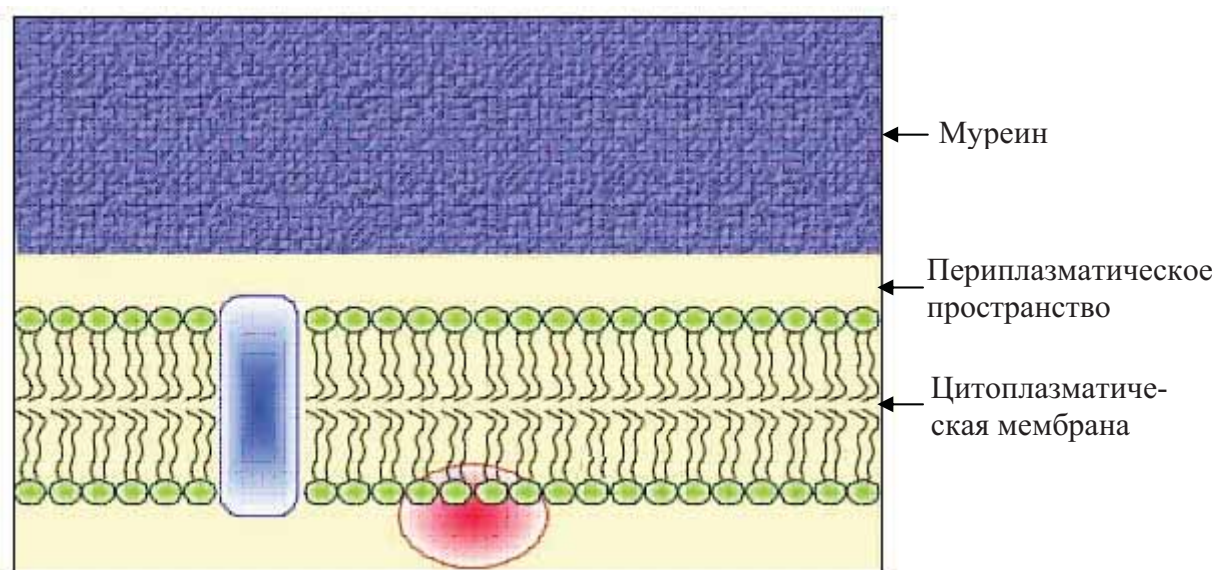


Рис. 11 . Схематическое строение клеточной стенки грамположительных бактерий

Помимо муреина и тейховых кислот, в составе клеточной стенки грамположительных бактерий в небольшом количестве обнаружены полисахариды, белки и липиды (табл. 3).

Таблица 3

**Химический состав клеточных стенок
грамположительных и грамотрицательных прокариот
(по Э. Роуз, 1971; Дж. Фрир, М. Солтон, 1971)**

| Компоненты клеточной стенки | Грамположительные бактерии | Грамотрицательные бактерии | |
|--------------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------------|
| | | внутренний слой (пептидогликановый) | внешний слой (наружная мембрана) |
| Пептидогликан | + | + | - |
| Тейхоевые кислоты | + | - | - |
| Полисахариды | + | - | + |
| Белки | ± | - | + |
| Липиды | ± | - | + |
| Липополисахариды | - | - | + |
| Липопротеины | - | ± | + |

К грамположительным бактериям относятся следующие: *Bacillus subtilis*, *Sarcina ventriculi*, *Streptococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus* и др. (рис. 12).

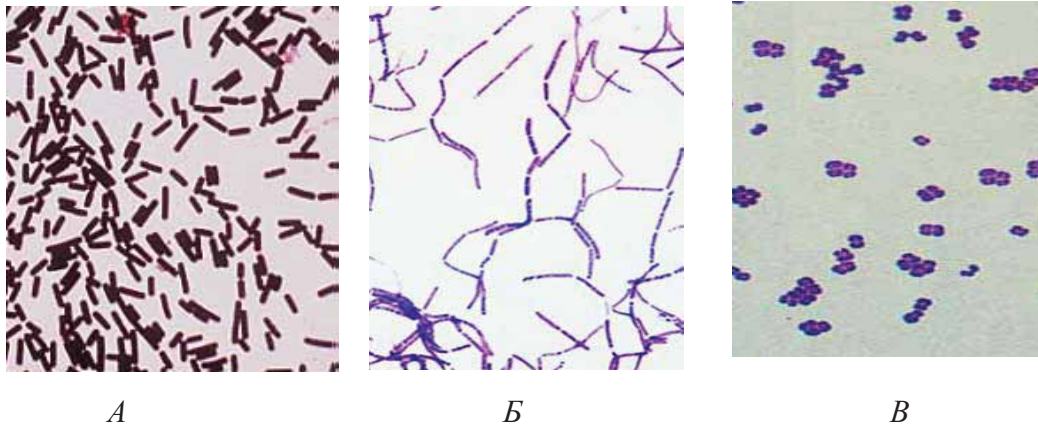


Рис. 12. Грамположительные бактерии:
 А – *Clostridium perfringens*; Б – *Bacillus subtilis*; В – *Micrococcus luteus*

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее составляет 14–17 нм (рис. 13). Внутренний слой клеточной стенки представлен муреином, на долю которого приходится 1–10 % ее сухой массы. Структурные микрофибриллы пептидогликана грамотрицательных бактерий сшиты менее компактно, поэтому поры в их пептидогликановом слое значительно шире, чем в молекулярном каркасе грамположительных бактерий.

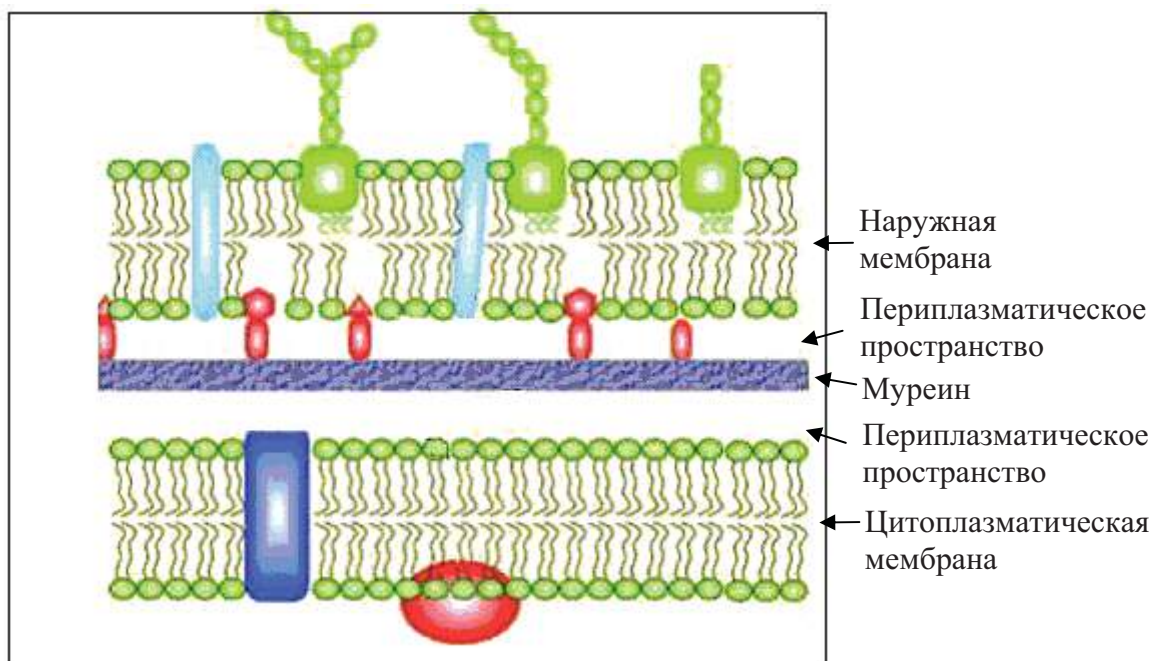


Рис. 13. Схематическое строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий

Внешний слой клеточной стенки (наружная или внешняя мембрана) образован фосфолипидами, липопротеинами и белками. По строению

наружная мембрана имеет типичную организацию, характерную для элементарных мембран. Основной фракцией наружной мембраны являются липиды, составляющие в среднем 22 % сухой массы клеточной стенки. Наружная мембрана выполняет не только механические, но и физиологические функции. В ней находятся трансмембранные белки, которые насквозь пронизывают мембрану. Они представляют собой заполненные водой каналы или гидрофильные поры в липофильной мембране, их называют **поринами**. Существует несколько различных типов поринов, которые осуществляют транспорт через мембрану гидрофильных низкомолекулярных веществ.

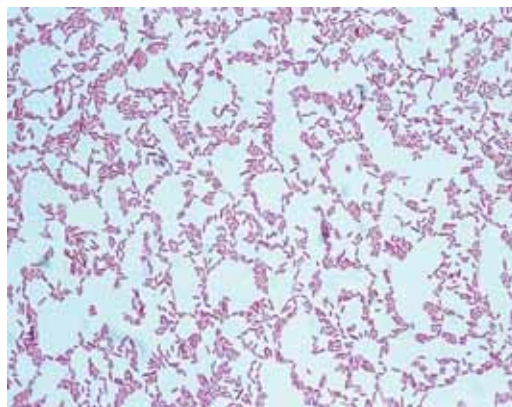
Одной из отличительных особенностей грамотрицательных бактерий является отсутствие в их клеточной стенке тейхоевых кислот.

Компоненты клеточной стенки у грамотрицательных бактерий разделены электронно-прозрачным слоем, а также четко отделены от цитоплазматической мембраны. Пространство между цитоплазматической и наружной мембраной получило название **периплазматического**. В периплазматическом пространстве находятся белки, такие как протеиназы, нуклеазы, периферические белки цитоплазматической мембраны, рестриктазы и, так называемые, связующие белки, которые участвуют в переносе некоторых субстратов в цитоплазму – пермеазы.

К грамотрицательным бактериям относятся *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 14) и др.



А



Б

Рис. 14. Грамотрицательные бактерии:
А – *Escherichia coli*; Б – *Pseudomonas aeruginosa*

Клеточная стенка бактерий выполняет следующие функции:

- механическую защиту клетки от воздействий факторов окружающей среды;
- обеспечивает поддержание формы бактериальной клетки;
- дает возможность клетке существовать в гипотонических растворах;
- осуществляет транспорт веществ и ионов (характерно для грамотрицательных бактерий, имеющих наружную мембрану, которая является дополнительным барьером для их поступления; основным барьером служит цитоплазматическая мембрана);
- препятствует проникновению в клетку токсических веществ (также более характерно для грамотрицательных бактерий, имеющих наружную мембрану);
- на клеточной стенке находятся рецепторы, на которых адсорбируются бактериофаги и бактериоцины;
- в клеточной стенке находятся антигены (липополисахариды у грамотрицательных бактерий и тейховые кислоты у грамположительных бактерий);
- на клеточной стенке находятся рецепторы, ответственные за взаимодействие клеток донора и реципиента при конъюгации бактерий.

Вместе с тем следует отметить, что клеточная стенка не является жизненно важной структурой, так как в определенных условиях она может быть удалена и бактериальные клетки при этом существуют в виде протопластов или сферопластов.

Протопластами называют клетки округлой формы, полностью лишенные остатков клеточной стенки и окруженные только цитоплазматической мембраной. Их образование характерно чаще для грамположительных бактерий. **Сферопласты** отличаются от протопластов тем, что у них сохраняются остатки клеточной стенки, а образуются они преимущественно из клеток грамотрицательных бактерий.

Протопласты и сферопласты можно получить в лабораторных условиях, обрабатывая клетки бактерий лизоцимом (син. N-ацетилмурамидаза), разрушающим муреин; антибиотиками пенициллинового ряда (пенициллин, ампициллин, карбенициллин и др.) или циклосерином, подавляющими синтез муреина. Фермент лизоцим действует на β -1,4-гликозидные связи муреина и тем самым разрушает его у бактерий со сформировавшейся клеточной стенкой. Антибиотики пенициллинового ряда и циклосерин оказывают действие только на растущие бактерии, нарушая синтез муреина клеточной стенки, именно они препятствуют поперечной сшивке пептидогликановых цепей, т. е. образованию пептидных связей.

Протопласты и сферопласты можно получить и с помощью других ферментов, которые разрушают пептидные связи, участвующие в поперечной сшивке гетерополимерных цепей муреина. В качестве примера можно привести фермент эндопептидазу, синтезируемую бактериями *Escherichia coli*. Этот фермент разрывает пептидную связь между D-аланином и мезо-диаминопимелиновой кислотой.

Протопласты и сферопласты стабильно сохраняются в гипертонических или изотонических условиях. Для создания гипертонических условий чаще всего используют сахарозу или маннит в концентрациях 0,1–1,0 М. В гипотонических условиях протопласты и сферопласты лопаются и образуют «тени».

Протопласты и сферопласты в 3–10 раз крупнее исходных клеток бактерий. В гипертонических или изотонических условиях они осуществляют обмен веществ, характерный для исходных клеток, т. е. сохраняют дыхательную активность, синтезируют необходимые биополимеры, образуют эндоспоры, если процесс споруляции уже был инициирован. Можно наблюдать рост сферопластов и протопластов, а иногда и их деление. В отличие от исходных клеток, на них не адсорбируются бактериофаги и бактериоцины. Кроме того, у протопластов и сферопластов отсутствуют мезосомы – производные цитоплазматической мембраны.

При снятии действующего на образование муреина фактора (пенициллин, циклосерин, лизоцим и др.) протопласты, как правило, отмирают, реже регенерируют клеточную стенку и возвращаются в исходное состояние, но могут превращаться в L-формы. Сферопласты ревертируют (превращаются) в нормальные бактериальные клетки, либо превращаются в L-формы, либо отмирают.

Бактерии, частично или полностью лишенные клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию, принято называть **L-формами**. Буква L – первая буква названия Листеровского института в Лондоне, где впервые обратили внимание на развитие морфологически весьма необычных клеток в культуре бактерий *Streptococcus moniliformis*, выделенной из жидкости уха крысы. Позже были описаны L-формы у самых разных видов бактерий. Было показано, что L-формы возникают спонтанно или индуцированно – под воздействием агентов, блокирующих синтез клеточной стенки (антибиотиков пенициллинового ряда и циклосерина, ультрафиолетовых и рентгеновских лучей, аминокислоты глицина).

L-формы образуются в результате несбалансированного роста нормальных бактериальных клеток в длину и толщину и поэтому плеоморфные. В культурах L-форм обнаруживаются клетки размером 0,2–50 мкм.

Они шаровидные, нитевидные, присутствуют и бесструктурные массы. L-формы проходят через бактериальные фильтры и легко разрушаются при механических воздействиях.

В отличие от протопластов и сферопластов, клетки L-форм имеют хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран, т. е. у них содержатся мезосомы, а в отличие от нормальных клеток L-формы часто содержат крупные вакуоли.

L-формы обладают пониженным уровнем метаболической активности по сравнению с исходными бактериями. Они нечувствительны к любым агентам, действующим на клеточную стенку.

Культивировать L-формы можно только на специальных средах с высоким осмотическим давлением. L-формы лучше растут на плотной, чем в жидкой среде. На плотной среде они образуют колонии, врастающие в агар и имеющие характерную форму перевернутой шляпы. Колонии растут медленно, хотя иногда достигают значительных размеров.

У L-форм не функционируют нормальные механизмы клеточного деления. В основном они делятся с образованием элементарных тел, которые отпочковываются от поверхности клетки или от мембраны вакуоли.

Различают стабильные и нестабильные L-формы. Нестабильные L-формы обладают элементами клеточной стенки и поэтому способны ревертировать в нормальные бактериальные клетки после исключения действия фактора, вызвавшего их образование. Стабильные L-формы полностью лишены ригидной клеточной стенки, что сближает их с протопластами. Они крайне редко ревертируют в исходные бактериальные формы и существуют без изменений в различных условиях среды. Переход в L-форму можно рассматривать как способ переживания бактериями неблагоприятных условий, особенно у патогенных микроорганизмов.

Исследования L-форм представляют существенный интерес для медицинской микробиологии, поскольку в таком состоянии в организме человека и животных могут сохраняться патогенные бактерии. При нерациональном использовании антибиотиков, приводящем к образованию L-форм из бактерий, может наступить кажущееся улучшение состояния больного. Однако после прекращения приема лечебного препарата происходит превращение L-форм в бактерии исходного вида с восстановлением их вирулентности, что приводит к рецидиву болезни.

Бактерии, у которых отсутствует клеточная стенка, существуют и в природе: это микоплазмы. Первым описанным представителем микоплазм явился возбудитель плевропневмонии крупного рогатого скота. Подобные микроорганизмы обнаружены и у других животных – овец, коз, крыс, собак, а также у человека, всем им было дано общее название

PPLO (плевропневмониеподобные организмы). Кроме того, микоплазмы могут существовать как сапрофиты в естественных условиях, а также вызывать заболевания и у растений.

2.2.2. Цитоплазматическая мембрана и ее производные

Цитоплазматическая мембрана составляет в зависимости от вида бактерий 8–15 % сухой массы клетки. Химический состав ее представлен белково-липидным комплексом, в котором на долю белков приходится 50–75 %, на долю липидов – 15–50 %. Главным липидным компонентом мембраны являются фосфолипиды. Белковая фракция цитоплазматической мембраны представлена структурными белками, обладающими ферментативной активностью. Белковый состав цитоплазматической мембраны разнообразен. Так, в цитоплазматической мембране бактерий *Escherichia coli* содержится около 120 различных белков. Кроме того, в составе мембран обнаружено небольшое количество углеводов.

Цитоплазматическая мембрана бактерий по химическому составу в целом сходна с мембранами эукариотических клеток, но мембраны бактерий богаче белками, содержат необычные жирные кислоты и в основном не имеют стеролов.

К строению цитоплазматической мембраны бактерий приложима жидкостно-мозаичная модель, разработанная для мембран эукариот. Согласно этой модели, мембрана состоит из бислоя липидов. Гидрофобные «концы» молекул фосфолипидов и триглицеридов направлены внутрь, а гидрофильные «головки» – наружу. В двойной слой липидов встроены белковые молекулы (рис. 15). По расположению и характеру взаимодействия с липидным бислоем белки цитоплазматической мембраны подразделяются на периферические и интегральные.

Периферические белки связаны с поверхностью мембраны и легко вымываются из нее при изменении ионной силы растворителя или при воздействии хелатирующими агентами. Обычно они растворяются в нейтральных буферных растворах и переходят в них без липидных компонентов. К периферическим белкам относятся НАД · Н₂-дегидрогеназы, малатдегидрогеназы, а также некоторые белки, входящие в АТФазный комплекс и др.

АТФазный комплекс представляет собой группу определенным образом расположенных белковых субъединиц, контактирующих с цитоплазмой, периплазматическим пространством и образующих канал, через который осуществляется перемещение протонов.

К **интегральным белкам** относятся белки, частично или полностью погруженные в толщу мембраны, а иногда и пронизывающие ее насквозь, т. е. интегральные белки как бы плавают в бислое липидов. Связь интегральных белков с липидами определяется главным образом гидрофобными взаимодействиями. Эти взаимодействия настолько прочны, что белки могут быть отделены от других элементов мембраны только при обработке детергентами, органическими растворителями, растворами мочевины. В растворе они обычно ассоциированы с липидами, и часто нуждаются в их присутствии для проявления ферментативной активности. К интегральным белкам мембраны бактерий *E. coli* относятся, например, цитохром *b*, железосерные белки, сукцинатдегидрогеназа и др.

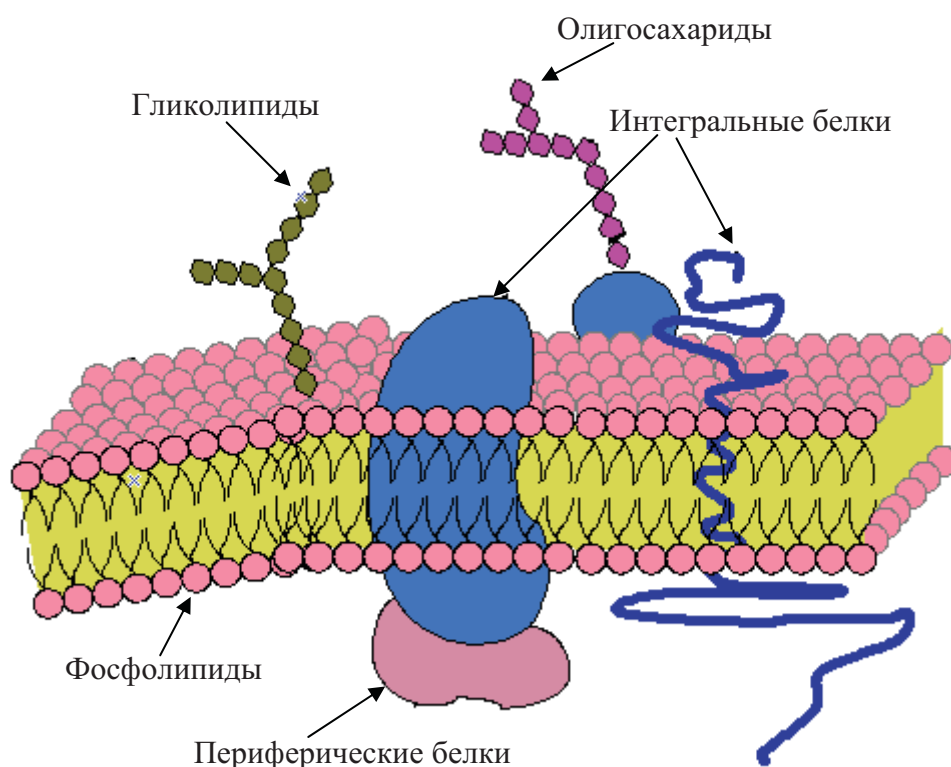


Рис. 15. Структура цитоплазматической мембраны

Цитоплазматическая мембрана выполняет ряд существенных для клетки функций:

- поддержание внутреннего постоянства цитоплазмы клетки. Это достигается за счет уникального свойства цитоплазматической мембраны – ее полупроницаемости. Она проницаема для воды и низкомолекулярных веществ, но не проницаема для ионизированных соединений. Транспорт таких веществ внутрь клетки и выход наружу осуществляется за счет специализированных транспортных систем, которые локализуют-

ся в мембране. Такие транспортные системы функционируют за счет механизмов активного транспорта и системы специфических ферментов пермеаз;

- с вышеуказанной особенностью (полупроницаемостью) цитоплазматической мембраны связана и функция транспорта веществ в клетку и вывод их наружу;
- в цитоплазматической мембране локализируются электронтранспортная цепь и ферменты окислительного фосфорилирования;
- цитоплазматическая мембрана связана с синтезом клеточной стенки и капсулы за счет наличия в ней специфических переносчиков для образующих их молекул;
- в цитоплазматической мембране закреплены жгутики. Энергетическое обеспечение работы жгутиков связано с цитоплазматической мембраной.

У прокариот, принадлежащих к разным таксономическим группам, обнаружены **мезосомы**, которые образуются при впячивании цитоплазматической мембраны в цитоплазму. Мезосомы бактерий разнообразны по форме, размерам и локализации в клетке. Выделяют три основных типа мезосом: *ламеллярные* (пластинчатые), *везикулярные* (имеющие форму пузырьков) и *тубулярные* (трубчатые).

В клетках некоторых бактерий обнаруживаются также мезосомы смешанного типа: состоящие из ламелл, трубочек и пузырьков. Сложно организованные и хорошо развитые мезосомы характерны для грамположительных бактерий. У грамотрицательных бактерий они встречаются значительно реже и относительно просто организованы. По расположению в клетке различают мезосомы, образующиеся в зоне клеточного деления и формирования поперечной перегородки; мезосомы, к которым прикреплен нуклеоид; мезосомы, сформированные в результате инвагинации периферических участков цитоплазматической мембраны.

Существуют разные точки зрения относительно роли мезосом в бактериальной клетке. Согласно одной из них, мезосомы служат для усиления мембранозависимых функциональных активностей клетки, так как в мембранах, образующих мезосомы, находятся ферменты, участвующие в энергетическом метаболизме бактерий. Кроме того, считают, что мезосомы играют роль в репликации ДНК и последующем расхождении ее копий по дочерним клеткам. Мезосомы участвуют в процессе инициации и формирования поперечной перегородки при клеточном делении.

Развитая система внутрицитоплазматических мембран характерна для большинства фотосинтезирующих прокариот. Поскольку в этих мембранах локализован фотосинтетический аппарат клетки, они получили на-

звание **фотосинтетических мембран**. Все фотосинтетические мембраны – производные цитоплазматической мембраны, возникшие в результате ее разрастания и глубокого впячивания (инвагинации) в цитоплазму. Фотосинтетические мембраны образуют у этих бактерий хроматофоры, тилакоиды и ламеллы.

2.2.3. Транспорт веществ в клетку бактерий

Различают следующие способы поступления веществ в клетку бактерий: простая, или пассивная, диффузия; облегченная диффузия; активный транспорт и транслокация групп.

Простая, или пассивная, диффузия – неспецифическое поступление веществ в клетку за счет разницы концентраций, т. е. происходит перемещение молекул из более концентрированного раствора в менее концентрированный – по градиенту концентрации. Этот процесс не связан с затратой энергии. Таким путем осуществляется транспорт низкомолекулярных веществ, особенно кислорода, липофильных соединений (спирты, жирные кислоты), воды, по-видимому, ядов и других чужеродных для клетки веществ, а также удаление продуктов обмена. Скорость перемещения путем простой диффузии невелика.

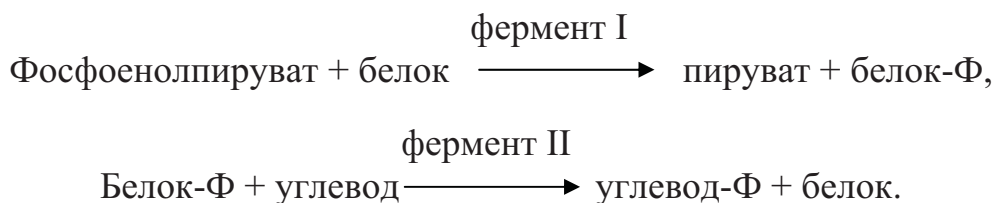
Перенос веществ при **облегченной диффузии** также происходит по градиенту их концентрации. Этот процесс не требует затраты энергии и осуществляется с участием специфических пермеаз. Скорость транспорта зависит от концентрации субстрата в среде.

Активный транспорт – основной механизм избирательного переноса веществ через цитоплазматическую мембрану в клетку против градиента концентрации. Этот процесс, так же как и облегченная диффузия, протекает при участии локализованных в цитоплазматической мембране переносчиков белковой природы – пермеаз, которые высокоспецифичны к субстрату. В отличие от облегченной диффузии, для активного транспорта необходимы затраты энергии либо в виде АТФ, либо за счет протондвижущей силы энергизованной мембраны. От активного транспорта зависит сродство клеток к субстрату, т. е. основной признак, определяющий и набор, и концентрацию используемых веществ.

У многих бактерий, особенно грамотрицательных, в активном транспорте принимают участие особые **связывающие белки**, не идентичные пермеазам и не входящие в структуру мембраны, а локализованные в периплазматическом пространстве. У связывающих белков отсутствует каталитическая активность, но они обладают очень высоким сродством к определенным питательным веществам и различным аминокислотам, углево-

дам, неорганическим ионам. Выделено и изучено более 100 различных связующих белков, которые образуют прочные комплексы со своими субстратами и необходимы для их активного переноса через мембрану. Связующие белки функционируют только в комплексе со специфическими пермеазами, осуществляющими активный перенос субстрата через мембрану. Необходимая для этого метаболическая энергия используется для снижения сродства пермеазы к своему субстрату на внутренней стороне мембраны по сравнению с ее сродством к нему на внешней стороне. В результате этих превращений происходит изменение скорости выхода субстрата наружу, она становится во много раз меньше скорости его поступления в клетку.

Если во всех вышеупомянутых способах переноса веществ через цитоплазматическую мембрану они поступают в клетку в химически неизменном виде, то при *транслокации групп* происходит химическая модификация переносимых молекул. Так происходит поступление в клетку многих прокариот углеводов, в процессе которого они фосфорилируются. Источником фосфатной группы служит фосфоенолпируват, от которого фосфат с помощью фермента (фермента I), находящегося в цитоплазме, переносится на молекулу специального термостабильного белка, а с него при участии второго фермента (фермента II), локализованного в цитоплазматической мембране и обнаруживающего высокое сродство к определенным углеводам, фосфатная группа переносится на углевод на наружной стороне цитоплазматической мембраны:



Фосфорилированные углеводы проникают через цитоплазматическую мембрану и накапливаются в цитоплазме, например глюкоза поступает в клетку в виде глюкозо-6-фосфата. Система переноса углеводов получила название *фосфотрансферазной*. Перенос веществ с помощью фосфотрансферазной системы является выгодным с энергетической точки зрения. Хотя при этом и происходит затрата богатой энергией фосфатной связи фосфоенолпирувата, в процессе переноса образуется молекула глюкозы в фосфорилированной форме (глюкозо-6-фосфат), а это делает ненужным фосфорилирование глюкозы за счет АТФ на первом этапе ее катаболизма.

2.2.4. Секреция продуктов жизнедеятельности бактериальной клеткой

Бактерии синтезируют и секретируют во внешнюю среду различные продукты своей жизнедеятельности. Секреция белков бактериями осуществляется с помощью различных систем и механизмов. При этом следует различать секрецию белков в периплазматическое пространство через цитоплазматическую мембрану и непосредственно в культуральную жидкость. У грамотрицательных бактерий большинство белков секретируется в периплазматическое пространство в виде белков-предшественников, содержащих в своей структуре особый сигнальный (лидерный) пептид из 15–40 аминокислотных остатков. Этот сигнальный пептид обеспечивает перенос белка-предшественника через цитоплазматическую мембрану, после чего отделяется от него с помощью сигнальной пептидазы.

Существует несколько моделей, объясняющих механизм, посредством которого сигнальный пептид обеспечивает секрецию белка-предшественника через цитоплазматическую мембрану в периплазматическое пространство.

Модель прямого транспорта предполагает прямое вхождение лидерного пептида в липидный бислой мембраны с использованием свободной энергии мембраноассоциированных рибосом.

Сигнальная гипотеза предполагает, что в результате взаимодействия сигнального пептида с особым рецептором мембраны образуется внутримембранный канал, через который и осуществляется секреция.

Существуют и другие, более сложные модели механизма переноса секретируемого белка через цитоплазматическую мембрану. По-видимому, применительно к разным белкам и у разных групп бактерий действуют различные механизмы секреции. Лучше всего изучены механизмы секреции белков у бактерий *E.coli*. У них обнаружены два пути секреции: *sec*-зависимый и относительно *sec*-независимый. Для обеспечения секреции белков по *sec*-зависимому механизму требуется участие продуктов ряда *sec*-генов: *secA*, *secY*, *secB*, *secD*, *secE* и *secF*. Источниками энергии для переноса белков служат гидролиз АТФ и градиент концентрации протонов. Для процессинга белка после его перемещения достаточно, по-видимому, активности только двух сигнальных пептидаз: сигнальной пептидазы I (мол. масса 36 кД, кодируется геном *lepB*) и сигнальной пептидазы II (мол. масса 18 кД, кодируется геном *lepA*).

Относительно *sec*-независимый механизм переноса белков используется бактериями *E. coli* для переноса коротких полипептидов, однако и в этом случае на ранних стадиях также участвует белок SecA.

Следует отметить, что некоторые белки секретируются непосредственно в культуральную среду. При этом в каждом конкретном случае используются различные механизмы, которые также еще недостаточно изучены. Например, бактериоцины, синтез которых кодируется генами различных плазмид, не содержат в структуре сигнальных пептидов. Для их секреции через цитоплазматическую мембрану требуется специальный вспомогательный белок – рилизинг-белок. Система транспорта гемолизина HlyA состоит как минимум из двух вспомогательных белков HlyB и HlyD, которые образуют канал для непосредственного выхода гемолизина из цитоплазмы во внешнюю среду.

2.2.5. Цитоплазма и внутрицитоплазматические включения

Цитоплазма – это содержимое клетки, окруженное цитоплазматической мембраной. Фракция цитоплазмы, имеющая гомогенную консистенцию и содержащая набор растворимых РНК, ферментных белков, продуктов и субстратов метаболических реакций, получила название **цитозоля**. Другая часть цитоплазмы представлена структурными элементами: рибосомами, внутрицитоплазматическими включениями, нуклеоидом и мембранными структурами.

Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70S. Они образованы двумя субъединицами – 30S и 50S. По величине и некоторым другим особенностям рибосомы бактерий сходны с рибосомами митохондрий и хлоропластов. Меньшая субъединица 30S содержит молекулу 16S-рРНК и в большинстве случаев по одной молекуле белков 21 вида. Субъединица 50S состоит из двух типов молекул рРНК (23S и 5S) и около 35 молекул различных белков, представленных, как правило, также одной копией.

Бактериальная клетка содержит от 5 до 50 тыс. рибосом, число их тем больше, чем больше скорость роста клетки.

Рибосомы служат местом синтеза белка. Синтез белка осуществляется агрегатами, состоящими из рибосом, РНК – информационной (иРНК) и транспортных (тРНК). Такие агрегаты называются **полирибосомами** или **полисомами**. Полирибосомы могут быть связаны с мембранными структурами или же находиться свободно в цитоплазме.

Различия между рибосомами бактерий (70S) и эукариот (80S) имеют решающее значение для борьбы с инфекционными заболеваниями, так

как некоторые антибиотики, действуя бактерицидно или бактериостатически, частично или полностью подавляют синтез белка, протекающий на рибосомах 70S-типа, но не затрагивают функционирования рибосом 80S-типа.

Внутрицитоплазматические включения подразделяются на активно функционирующие структуры и продукты клеточного метаболизма, не выделяющиеся наружу, а откладывающиеся внутри клетки.

К первой группе внутриплазматических включений относятся **газовые вакуоли**, или **аэросомы**, обнаруженные у бактерий, обитающих в воде. Аэросомы снижают удельную массу бактериальной клетки и благодаря этому поддерживают ее во взвешенном состоянии в водоеме. Аэросома представляет собой скопление газовых пузырьков (везикул), которые имеют веретенообразную форму. Их оболочка состоит только из белка, т. е. устроена не так, как обычная мембрана. Белковые молекулы ориентированы таким образом, что внутренняя сторона оказывается гидрофобной, а наружная – гидрофильной.

К первой группе включений относятся также **хлоросомы** зеленых бактерий и **фикобилисомы** цианобактерий. В этих структурах локализованы пигменты, поглощающие кванты света и передающие энергию возбуждения на фотореакционные центры, т. е. они принимают непосредственное участие в фотосинтезе. Это эллипсоидные образования, окруженные тонкой белковой оболочкой (толщиной 2,5–3,0 нм), которая состоит из отдельных глобул.

Карбоксисомы, или **полиэдрические тела**, содержатся в клетках некоторых автотрофных бактерий. Они имеют форму многогранника диаметром 90–100 нм, окруженного однослойной белковой оболочкой. В карбоксисомах содержится рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза – ключевой фермент, катализирующий фиксацию CO_2 в цикле Кальвина в процессе фото- и хемосинтеза.

Магнитосомы содержатся в водных бактериях, способных ориентироваться в магнитном поле и перемещаться в направлении линий магнитного поля. В их состав входит 0,4 % железа (по сухому веществу). Магнитосомы располагаются в клетках вблизи мест прикрепления жгутиков.

Ко второй группе включений (продуктам клеточного метаболизма) относятся **запасные вещества** – полифосфаты, полисахариды, жиры, сера. Эти вещества накапливаются, если в питательной среде находятся соответствующие исходные соединения, но вместе с тем рост бактерий ограничен или вообще невозможен из-за недостатка каких-то отдельных компонентов питания или же присутствия ингибиторов. Запасные веще-

ства содержатся в клетках в осмотически инертной форме, т. е. не растворимы в воде. В условиях, благоприятных для роста, когда в этих веществах возникает потребность, они снова включаются в метаболизм.

Из полисахаридов в клетках микроорганизмов откладываются гликоген, крахмал и крахмалоподобное вещество гранулоза. Запасные вещества полисахариды образуются из молекул α -D-глюкозы, которые связаны α -1,4-гликозидными связями. Благодаря такому типу связей полиглюкозные цепи не вытянуты в длину, а закручены винтообразно. Много крахмала имеют клетки бактерий рода *Neisseria* и вида *Acetobacter pasteurianus*. Гранулоза содержится в большом количестве в клетках бактерий рода *Clostridium*. Гликоген, или «животный крахмал», синтезируется у бактерий *E.coli*, у бактерий рода *Salmonella*, у бацилл, дрожжей и других микроорганизмов. Установлено, что гликоген у бактерий встречается чаще, чем крахмал. Запасные полисахариды используются микроорганизмами в качестве источников углерода и энергии.

Жиры накапливаются в виде гранул и (или) капелек, преломляющих свет по-иному, чем содержимое цитоплазмы, и поэтому хорошо различимы в световом микроскопе. Запасным жироподобным веществом многих бактерий (например, представителей рода *Pseudomonas*) является поли- β -гидроксимасляная кислота. Это полиэфир, растворимый в хлороформе и состоящий примерно из 60 остатков β -оксибутирата. Доля этого вещества в сухой биомассе клеток может достигать 80 %. Поли- β -гидрокси-масляная кислота является хорошим источником углерода и энергии. Микроорганизмы могут накапливать также триглицериды (нейтральные жиры). Особенно много их запасается в клетках дрожжей и других грибов. Кроме того, микобактерии могут содержать до 40 % восков.

Полифосфаты откладываются в гранулах, называемых **волютиновыми** или **метахроматиновыми зёрнами**. Название «метахроматиновые зёрна» обусловлено тем, что они вызывают характерные изменения цвета (метахромазию) некоторых красителей (метиленового синего, толуидинового синего). Полифосфаты играют роль фосфатных депо и источников энергии.

У многих бактерий, таких как пурпурные и бесцветные серобактерии, зеленые серные бактерии и других, окисляющих сульфид до сульфата, в процессе метаболизма в клетке откладывается молекулярная сера в виде шариков, сильно преломляющих свет. Количество накапливаемой серы зависит от содержания H_2S в окружающей среде. В условиях отсутствия

H_2S сера, находящаяся в клетке, окисляется до SO_4^{2-} . Сера служит источником энергии и донором электронов.

Специфическими запасными веществами цианобактерий являются **цианофитиновые гранулы**, состоящие из полипептида, в который входят аргинин и аспарагиновая кислота в эквимольных количествах. Остов молекулы полипептида построен из остатков аспарагиновой кислоты, соединенных пептидными связями, а к их β -карбоксильным группам присоединены остатки аргинина. Цианофитиновые гранулы служат резервом азота, который используется цианобактериями при его недостатке в среде.

2.2.6. Жгутики и движение бактерий

Большинство бактерий передвигаются при помощи жгутиков. Рассмотреть жгутики можно только в электронном микроскопе. В световом микроскопе без специальных методов обработки отдельные жгутики не видны.

По расположению и числу жгутиков на поверхности клетки бактерии подразделяются:

- на **монотрихи** – имеют один жгутик (например, бактерии родов *Caulobacter* и *Vibrio*);
- **лофотрихи** – имеют на одном или на обоих полюсах клетки пучок жгутиков (например, бактерии родов *Pseudomonas*, *Chromatium*);
- **амфитрихи** – имеют по жгутику на обоих полюсах клетки (например, бактерии рода *Spirillum*);
- **перитрихи** – большое количество жгутиков, располагающихся по всей поверхности клетки (например, бактерии вида *E.coli* и рода *Erwinia*) (рис. 16).

Жгутики представляют собой спирально закрученные нити, состоящие из специфического белка **флагеллина**. Флагеллин построен из субъединиц с относительно малой молекулярной массой. Субъединицы располагаются по спирали вокруг внутреннего свободного пространства. Аминокислотный состав флагеллина у разных видов бактерий может варьировать.

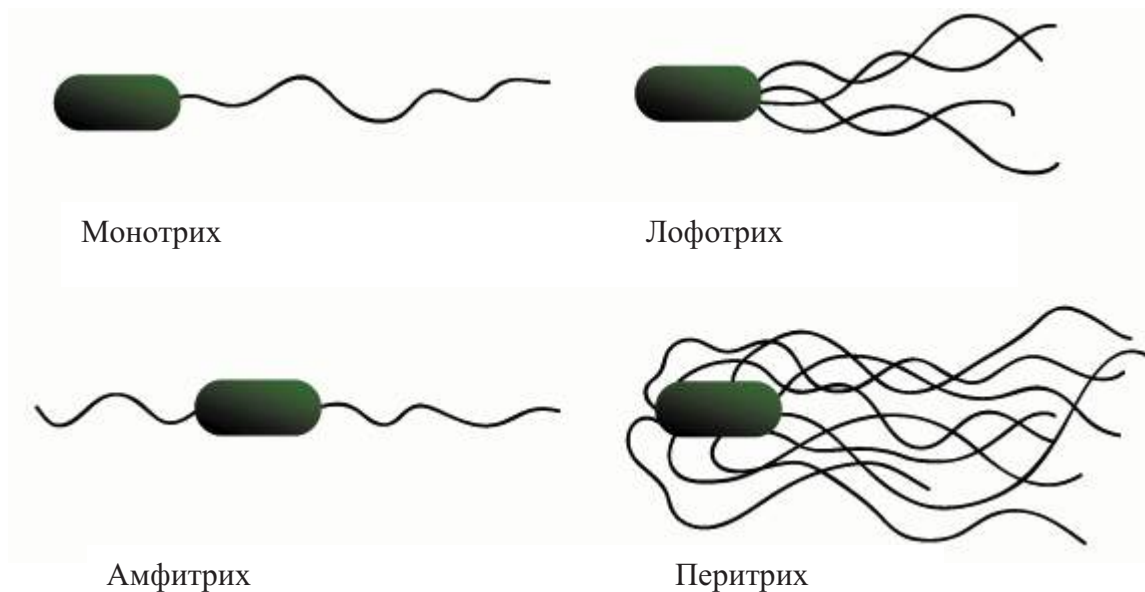


Рис. 16. Типы жгутикования у бактерий

Жгутик состоит из трех частей: нити, крюка и базального тельца (рис. 17). С помощью базального тельца, в которое входит центральный стержень и кольца, жгутик закреплен в цитоплазматической мембране и клеточной стенке. Количество колец у грамотрицательных и грамположительных бактерий различно. У грамотрицательных бактерий имеются четыре кольца: L, P, S, M. Из них L и P – наружная пара колец; S и M – внутренняя пара колец. L-кольцо закреплено в наружной мембране, P – в пептидогликановом слое клеточной стенки, S – в периплазматическом пространстве, а M – в цитоплазматической мембране.

У грамположительных бактерий базальное тельце устроено проще. Оно состоит только из двух колец: S и M, т. е. только из внутренней пары колец, которые размещаются в цитоплазматической мембране и клеточной стенке.

Жгутики бактерий по характеру работы подобны корабельному винту. Если клетка имеет много жгутиков, они при движении собираются в пучок, который образует своеобразный пропеллер. Пучок жгутиков, быстро вращаясь против часовой стрелки, создает силу, заставляющую бактерию двигаться почти по прямой линии. После того как направление вращения жгутиков изменяется, пучок расплетается и клетка останавливается, вместо поступательного движения она начинает хаотически вращаться, ее ориентация изменяется. В тот момент, когда все жгутики бактерии снова начнут синхронно вращаться против часовой стрелки, образовав пропеллер, толкающий бактерию, направление ее поступательного

движения будет отличаться от первоначального. Таким способом бактерия может изменять направление своего движения.

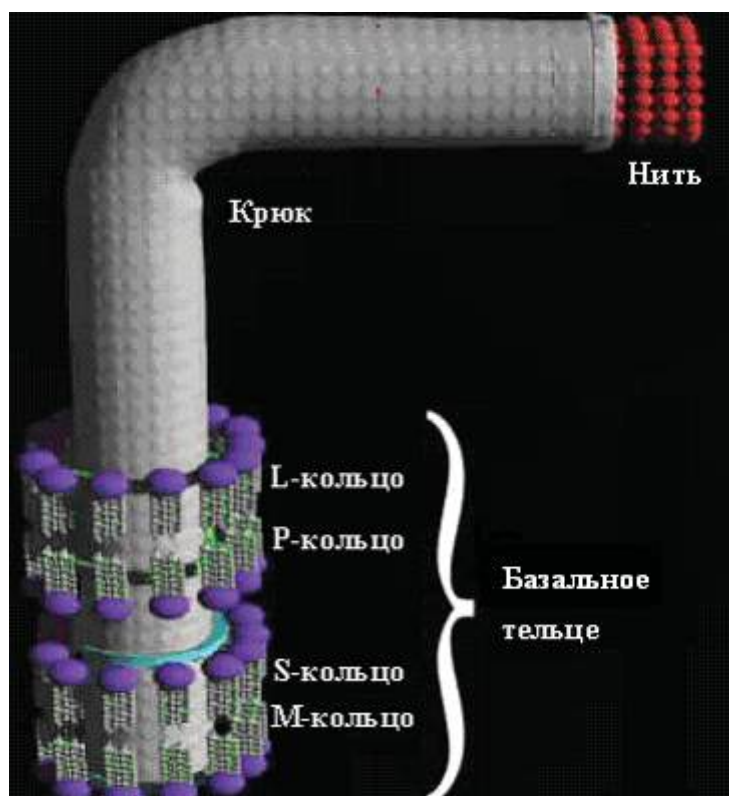


Рис. 17. Структура жгутика грамотрицательных бактерий (по Т. Паустиану, 2001)

Так как у грамположительных бактерий наружная пара колец отсутствует, то считают, что для вращения жгутиков необходимо наличие только внутренней пары (кольца S и M). Эти кольца, соединенные с вращающимся стержнем, выступающим наружу, и образуют так называемый электромотор, обеспечивающий движение жгутика (рис. 18). На периферии кольца M находятся белки MotB. Белки MotA встроены в цитоплазматическую мембрану и примыкают к краям колец M и S. Вращающий момент возникает за счет взаимодействия субъединиц белка MotB с белковыми субъединицами MotA. В белковых субъединицах MotA имеется по два протонных полуканала. Через эти протонные полуканалы переносятся протоны из периплазматического пространства в цитоплазму бактерий (подобно протонному каналу АТФ-синтазы). В результате переноса протонов через белки MotA и MotB происходит вращение кольца M. Установлено, что один полный оборот кольца M связан с переносом через мембрану около 1000 протонов. Таким образом, в качест-

ве источника энергии для вращения жгутиков используется протондвижущая сила, возникающая в цитоплазматической мембране.

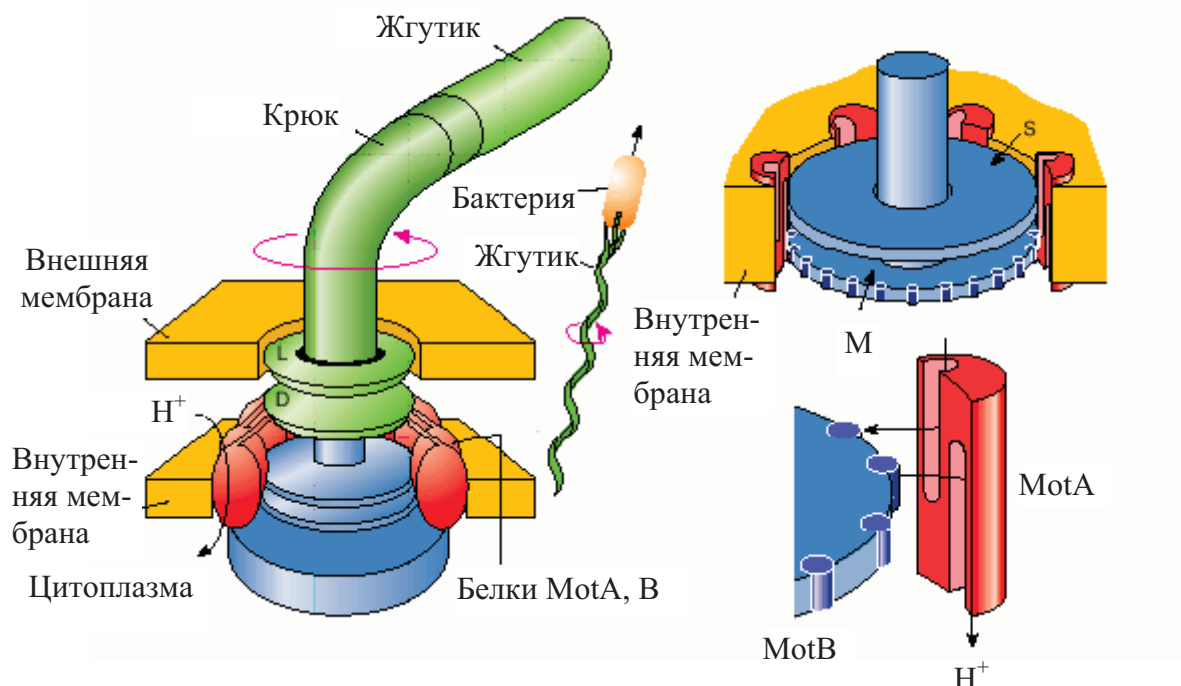


Рис. 18. Схематическое изображение электромотора, вращающего жгутики бактерий (по А. Н. Тихонову, 1999)

Своеобразный тип движения характерен для спирохет. Клетка спирохет состоит из протоплазматического цилиндра, представленного пептидо-гликановым слоем и цитоплазматической мембраной, и окруженного внешним чехлом. Вокруг протоплазматического цилиндра в периплазматическом пространстве находятся пучки нитчатых структур – **аксиальные фибриллы**, которые, как и жгутики, состоят из белка флагеллина. Эти структуры обеспечивают движение спирохет как в жидкой среде, так и на разделе фаз жидкой и плотной среды (рис. 19).

Число аксиальных фибрилл колеблется от 2 до 100. Один конец каждой аксиальной фибриллы прикреплен вблизи полюса протоплазматического цилиндра, а другой – свободен. Клетка содержит по два набора фибрилл, прикрепленных субполярно у каждого полюса клетки. Каждая аксиальная фибрилла тянется практически вдоль всей длины клетки, а в центральной части клетки аксиальные фибриллы перекрываются.

Фибриллы, вращаясь или сокращаясь, обуславливают характерное для спирохет движение: путем изгибания, вращения вокруг оси, волнообразно, винтообразно.

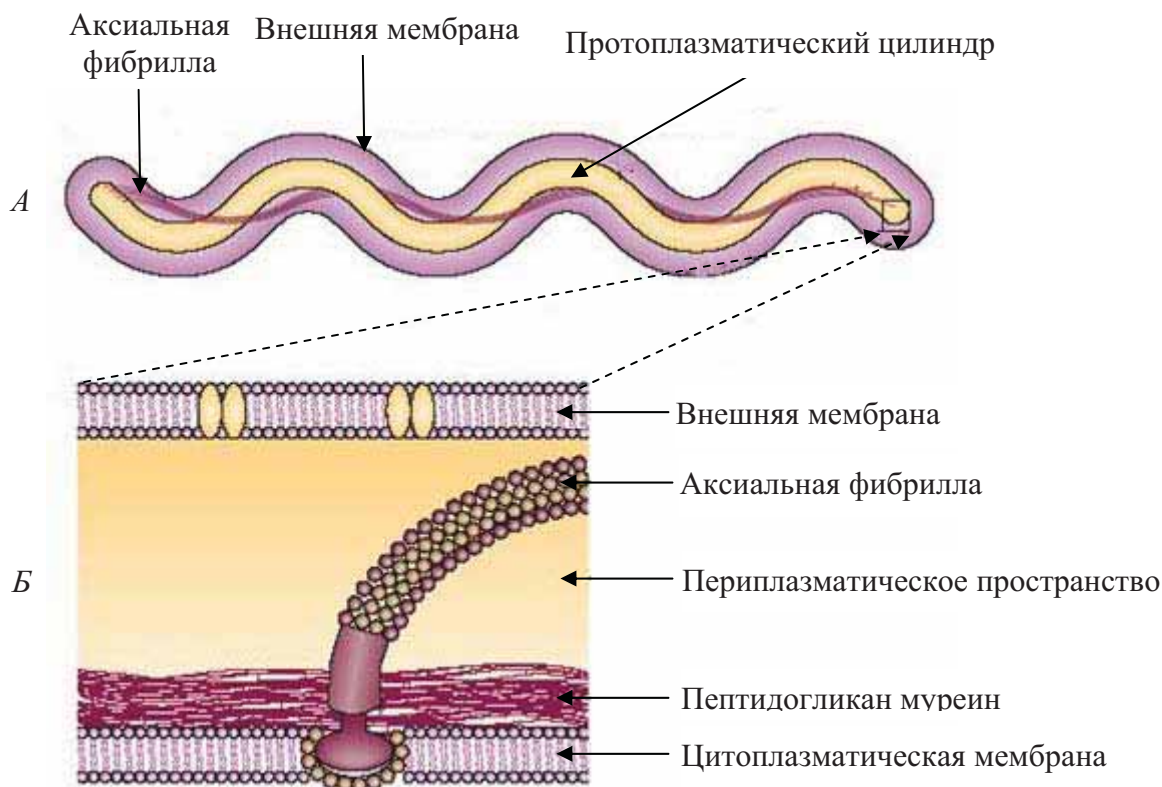


Рис. 19. Клетка спирохет в продольном разрезе (А) и увеличенное в размере место прикрепления аксиальной фибриллы у полюса протоплазматического цилиндра (Б)

У некоторых прокариот установлен **скользящий тип передвижения**. Способность к скольжению выявлена у некоторых микоплазм, миксобактерий, цианобактерий, нитчатых серобактерий и др. Скорость при таком типе передвижения небольшая: 2–11 мкм/с. Общим для всех микроорганизмов, способных к скольжению, является выделение слизи. Кроме того, у ряда таких прокариот в составе клеточной стенки между пептидогликановым слоем и наружной мембраной выявлен тонкий слой белковых молекул. Например, у нитчатых цианобактерий фибриллы образуют единую систему, которая в виде спирали окружает весь трихом (нить). Скольжение нитчатых форм сопровождается и одновременным их вращением, поэтому каждая точка на поверхности трихома описывает при движении спираль. Направление вращения является видоспецифическим признаком и коррелирует с направлением хода спирали белковых фибрилл.

Механизмы скользящего движения не ясны и существуют несколько гипотез, которые их объясняют. Согласно гипотезе реактивного движения, скользящее передвижение обусловлено выделением слизи через многочисленные слизевые поры в клеточной стенке, в результате чего

клетка отталкивается от субстрата в направлении, противоположном направлению выделения слизи. Однако при анализе этой модели было сделано заключение, что для обеспечения скольжения по «реактивному» механизму клетке нужно в течение одной секунды выделить такой объем слизи, который во много раз больше ее цитоплазматического содержимого.

В соответствии со второй гипотезой, получившей распространение в последние годы, скользящий тип движения связан с присутствием белкового слоя, который состоит из правильно расположенных фибрилл, аналогичных нитям жгутиков, но находящихся внутри клеточной стенки. У некоторых скользящих бактерий описаны структуры, очень схожие с базальными тельцами жгутиковых форм. Вращательное движение фибрилл, которое «запускается» этими структурами, приводит к появлению на поверхности клетки «бегущей волны» или движущихся микроскопических выпуклостей клеточной стенки, в результате чего клетка отталкивается от твердого или вязкого субстрата. Согласно этой гипотезе, выделение слизи не является абсолютно необходимым для скольжения, но в определенных условиях улучшает отталкивание клетки от субстрата. Скольжение может осуществляться и без выделения слизи в среде подходящей консистенции. Более того, выделение большого количества слизи, как правило, мешает передвижению клетки или приводит к его потере.

Для подвижных бактерий характерны **таксисы**, т. е. направленная двигательная реакция в ответ на определенный фактор. В зависимости от природы различают хемотаксис, фототаксис, магнитотаксис и вискозитаксис.

Хемотаксис – движение бактерий относительно источника химического вещества. Для каждого микроорганизма все химические вещества в этом плане могут быть разделены на две группы: инертные и вызывающие таксисы, или эффекторы. Среди эффекторов выделяют: аттрактанты – вещества, которые притягивают бактерии; репелленты – вещества, которые отпугивают бактерии.

Фототаксис – движение к источнику света или от него, свойственное фототрофным бактериям.

Магнитотаксис – способность бактерий передвигаться по силовым линиям магнитного поля Земли или магнита. Выявлен в клетках бактерий, содержащих магнитосомы и распространенных в водных экосистемах разного типа.

У ряда бактерий выявлен **вискозитаксис** – способность реагировать на изменение вязкости раствора и передвигаться в направлении ее увеличения или уменьшения.

За чувствительность бактерий к градиенту концентраций определенных факторов ответственны специфические рецепторы. Рецептор реагирует на эффе́ктор и передает сигнал определенного типа на базальное тельце жгутика.

2.2.7. Ворсинки (или фимбрии)

Ворсинки, или фимбрии, – поверхностные структуры, которые состоят из белка пилина и не выполняют функцию движения. По размерам они короче и тоньше жгутиков. Число фимбрий на поверхности клетки колеблется от 1–2 до нескольких тысяч, их имеют как кокковидные, так и палочковидные бактерии.

Различают два типа фимбрий: общие и специфические.

Фимбрии общего типа выполняют функцию прикрепления клетки к поверхности субстрата. Не исключается возможность их участия в поступлении крупномолекулярных соединений в цитоплазму клетки.

Специфические ворсинки – половые пили, обнаруженные у клеток так называемых доноров, т. е. у клеток, содержащих половой фактор (F-плазмиду) или другие донорспецифические плазмиды. Если в клетке бактерий находится половой фактор, то на их поверхности синтезируются одна-две половые F-пили на клетку. Они имеют вид полых белковых трубочек длиной от 0,5 до 10 мкм. F-пили играют определяющую роль в образовании конъюгационных пар при переносе генетического материала от клетки донора в клетку реципиента.

2.2.8. Капсулы, слизи и чехлы

Многие микроорганизмы продуцируют на поверхности клетки слизистое вещество. В зависимости от толщины слизистого слоя принято различать **микрокапсулу** толщиной до 0,2 мкм (она видима лишь в электронном микроскопе). Связь микрокапсулы с клеточной стенкой настолько прочна, что ее иногда предлагают рассматривать как элемент клеточной стенки. **Макрокапсула** представлена слоем слизи толщиной более 0,2 мкм. **Слизью** называют вещество, окружающее клетку, имеющее аморфный, бесструктурный вид и легко отделяющееся от поверхности бактериальной клетки, а по толщине часто превосходящее ее диаметр.

Капсулы и слизь не являются обязательными структурами бактериальной клетки, так как бактерии, их образующие, в результате мутаций легко могут превращаться в бескапсульные формы, и эти изменения не приводят к какому-либо нарушению клеточной активности.

В большинстве случаев капсула образована полисахаридами (например, у бактерий вида *Streptococcus mutans*, некоторых представителей родов *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Corynebacterium* и др.). Капсулы же других видов бактерий состоят из полипептидов, представленных полимерами, в которых содержится много D- и L-форм глутаминовой кислоты. Примером такой капсулы является капсула бактерий *Bacillus anthracis*. Для ряда бактерий показана также способность синтезировать капсулу, состоящую из волокон целлюлозы. Так построена капсула у бактерий *Sarcina ventriculi*.

Слизь по химической природе является полисахаридами. Особенно обильное их образование наблюдается у многих микроорганизмов при выращивании на среде с сахарозой. Например, бактерии *Leuconostoc mesenteroides* (относящиеся к молочнокислым бактериям) быстро превращают раствор, содержащий тростниковый сахар, в декстрановый гель, за что их на сахарных заводах называют «бактериями лягушачьей икры».

Капсулы и слизи выполняют следующие функции:

- защитную – предохраняют клетку от действия различного рода неблагоприятных факторов внешней среды (механических повреждений, высыхания и т. п.);
- создают дополнительный осмотический барьер;
- способны выступать в качестве фактора вирулентности у некоторых бактерий (например, у *Streptococcus pneumoniae*);
- служат барьером для бактериофагов, препятствуя их адсорбции на клетках бактерий;
- являются источником запасных питательных веществ;
- объединяют клетки в цепочки, колонии;
- обеспечивают прикрепление клеток к поверхности субстрата.

Капсульные полисахариды, образуемые бактериями, имеют большое практическое значение. Ксантан, внеклеточный полисахарид бактерий *Xanthomonas campestris*, используется в составе смазок, при добыче нефти, в пищевой промышленности для улучшения вкусовых свойств консервированных и замороженных продуктов, соусов, кремов, а также в косметической промышленности. Декстраны, синтезируемые бактериями *Leuconostoc mesenteroides* и некоторыми другими бактериями, находят применение в качестве кровезаменителей, для лечения ожогов, разделения и очистки биологических молекул, в качестве полиэлектролитов.

В отличие от капсул и слизистых слоев, чехлы имеют сложную тонкую структуру; в их составе выявляют несколько слоев разного строения. Чехлы обычно имеют и более сложный химический состав. Например, чехол бактерий *Sphaerotilis natans* содержит 36 % углеводов, 11 –гексоамина, 27 – белков, 5,2 – липидов и 0,5 – фосфора. Чехлы ряда бактерий, метаболизм которых связан с окислением восстановленных соединений металлов, часто инкрустированы их окислами.

Следует отметить, что между капсулами, чехлами и слизистыми слоями у прокариот обнаружено много переходных форм, что часто не позволяет точно отличить капсулу от слизистых клеточных выделений или капсулу от чехла.

2.2.9. Эндоспоры и другие покоящиеся формы бактерий

Эндоспоры бактерий – особый тип покоящихся клеток, в основном грамположительных бактерий. Эндоспоры формируются эндогенно, т. е. внутри материнской клетки, которая называется спорангием. Бактериальная эндоспора отличается от вегетативной клетки тем, что она характеризуется повышенной резистентностью к нагреванию, действию ультрафиолетовых лучей, антибиотиков и других факторов. Споры некоторых бактерий выдерживают кипячение в течение двух часов, они также могут длительное время сохраняться в покоящемся состоянии. Эти особенности спор являются свойствами, требующими в практической деятельности человека применения особых приемов для их уничтожения.

К спорообразующим бактериям относится большое число грамположительных видов прокариот приблизительно из 15 родов, характеризующихся морфологическим и физиологическим разнообразием. Лучше всего процесс спорообразования изучен у представителей родов *Bacillus* и *Clostridium*.

Поскольку одна клетка образует одну эндоспору и увеличения числа бактерий при ее прорастании не происходит, то спорообразование не рассматривают как способ размножения бактерий. Эндоспоры представляют собой стадию покоя и приспособлены к перенесению неблагоприятных условий. Переход бактерий к спорообразованию (споруляции) наблюдается обычно при истощении питательного субстрата, недостатке источников углерода, азота, фосфора, изменении pH и т. д. Процесс спорообразования энергозависим, поэтому от источника поступления энергии споруляцию разделяют на эндотрофную и экзотрофную. Эндотрофная споруляция осуществляется за счет внутреннего запаса энергии

клетки и не нуждается в дополнительных веществах. В случае экзотрофных процессов используется экзогенная энергия, поступающая извне.

Способность к образованию спор детерминируется генами *spo*, которых у бактерий *Bacillus subtilis* (по данным Г. Халворсена) более 100. Каждый из *spo*-генов отвечает за те или иные стадии споруляции.

Процесс спорообразования можно разделить на три стадии или этапа (рис. 20):

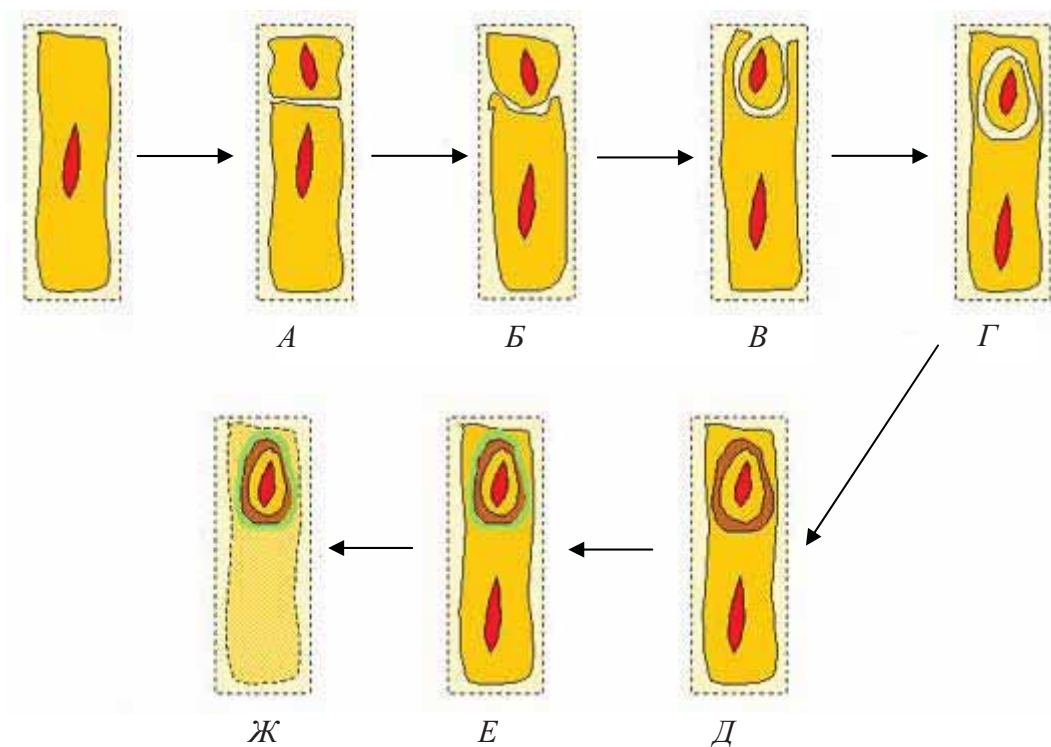
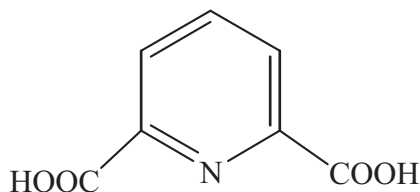


Рис. 20. Схема процесса спорообразования:
 А – отделение протопласта споры; Б, В, Г – образование предспоры;
 Д, Е, Ж – формирование споры

Первый этап – подготовительный. В вегетативной клетке бактерий, переходящей к спорообразованию, прекращаются ростовые процессы, завершается репликация ДНК и изменяется метаболизм, а именно распадается значительная часть белков материнской клетки, образуется специфическое для спор вещество – дипиколиновая кислота, которая не встречается в вегетативных клетках:



Дипиколиновая кислота находится в эндоспорах в виде дипиколината кальция, и именно это соединение обеспечивает высокую терморезистентность спор.

Второй этап – формирование споры – начинается с особого неравного деления клетки. Цитоплазматическая мембрана вегетативной клетки образует впячивание (инвагинацию) от периферии к ее центру и отделяет часть протопласта материнской клетки. В результате этот протопласт содержит один нуклеоид с участком уплотненной цитоплазмы. Образования клеточной стенки между обоими протопластами (как при обычном делении) в данном случае не происходит. Вместо этого протопласт будущей споры обрастает цитоплазматическая мембрана материнской клетки, а образующаяся структура носит название *предспоры* или *протоспоры*.

Предспора расположена внутри материнской клетки и ограничена от нее двумя мембранами. Каждая из этих мембран участвует в синтезе стенки споры. Мембрана протопласта споры синтезирует снаружи от себя стенку зародышевой клетки (зародыша). Мембрана, происходящая от материнской цитоплазматической мембраны, синтезирует вовнутрь *кору споры* или *кортекс*. Кортекс состоит из многослойного муреина, но более кислого, чем муреин клеточной стенки материнской клетки.

Кроме кортекса и стенки зародыша, синтезируется еще и наружная оболочка споры, которая в значительной степени представлена полипептидами. У большинства видов спорообразующих бактерий эндоспора заключена еще в один дополнительный наружный слой – *экзоспориум*, в состав которого входят белки, липиды, углеводы.

По мере формирования многослойных покровов предспора превращается в спору (рис. 21).

Таким образом, эндоспора состоит из следующих структурных элементов: нуклеоида; уплотненной цитоплазмы (за счет дегидратации, перехода белков в связанное состояние, снижения активности некоторых ферментов и синтеза дипиколината кальция); покровных слоев, представленных цитоплазматической мембраной, клеточной стенкой зародыша, кортексом, внутренней оболочкой, наружной оболочкой, экзоспориумом.

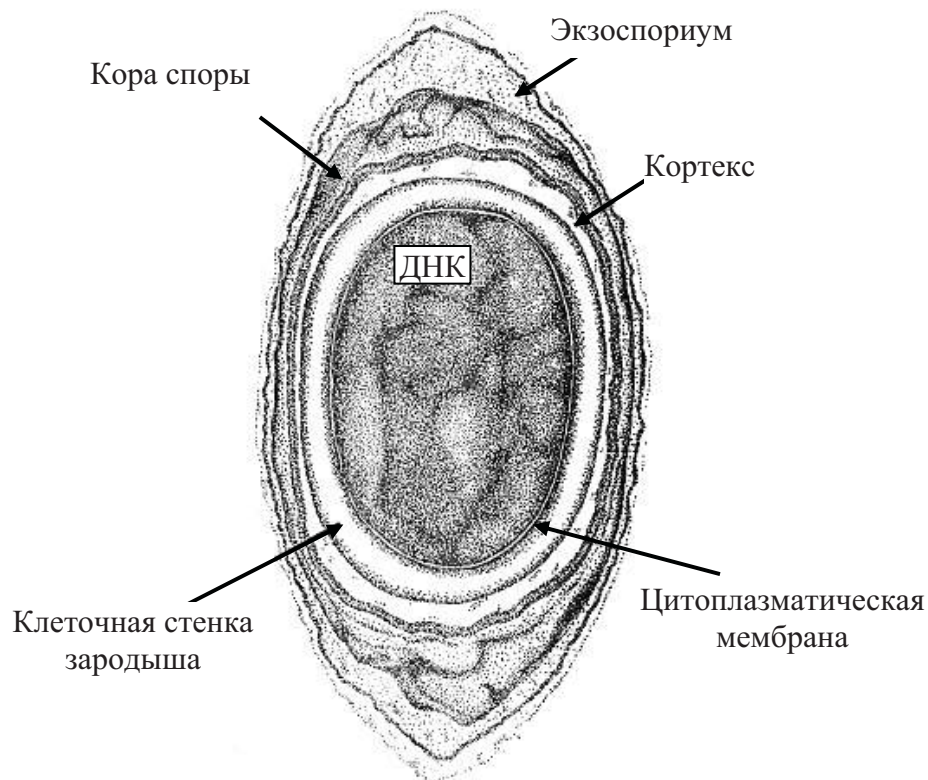


Рис. 21. Схема строения зрелой споры (по С.Халею, 2001)

Третий этап – созревание споры. Спора приобретает характерную форму и занимает определенное положение в клетке (рис. 22). Диаметр споры может превышать или не превышать диаметр вегетативной клетки. В результате этого бактериальная клетка со спорой может принимать форму веретена или теннисной ракетки. Споры в клетке могут располагаться центрально (например, у *Bacillus megaterium*), субтерминально (*Clostridium botulinum*) или терминально (*Clostridium tetani*).

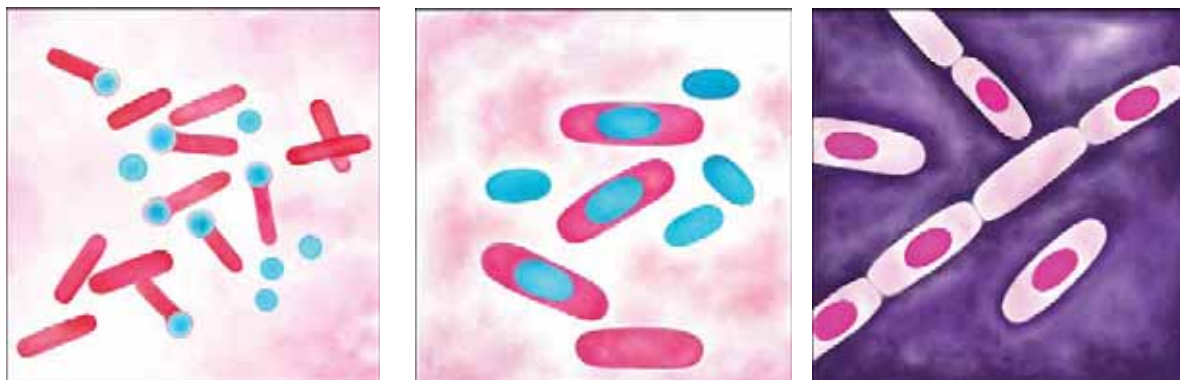


Рис.22. Форма эндоспор и расположение их в клетках бактерий различных видов рода *Bacillus* (по Х. Вилсону, 2007)

Споры освобождаются при лизисе спорангия. Зрелые споры не проявляют метаболической активности. Они чрезвычайно устойчивы к воздействию высокой температуры, разного рода излучений и химических агентов. Терморезистентность обусловлена, как уже отмечалось, очень низким содержанием воды и наличием дипиколината кальция.

При попадании в благоприятные условия споры прорастают в вегетативные клетки. Прорастания спор начинается с поглощения воды и гидратации структур споры, сопровождающихся активацией ферментов и возрастанием дыхания. Литические ферменты разрушают многослойные покровы споры, в среду выделяются дипиколинат кальция, аминокислоты и пептиды. Спора при этом теряет до 25–30 % сухой массы. В месте разрыва оболочки споры образуется ростовая трубка новой вегетативной клетки. В формировании клеточной стенки молодой клетки участвует внутренняя мембрана споры и частично кортекс. Прорастание спор длится около 4–5 ч.

Прорастание спор можно индуцировать, подвергнув их прогреванию до 60–70 °С в течение нескольких минут или кратковременному кипячению (10 мин при 100 °С). Тепловой шок должен проводиться непосредственно перед высевом спор, так как процесс активации обратим.

К другим покоящимся формам бактерий относятся цисты, экзоспоры, микроспоры. Как и эндоспоры, все эти покоящиеся формы предназначены для перенесения бактериями неблагоприятных условий. **Экзоспоры** возникают путем почкования материнской клетки. Они сходны по своим свойствам с эндоспорами бацилл. Образование экзоспор характерно для метанооксиляющих бактерий. **Цисты** – это шарообразные толстостенные клетки, формирование которых характерно для бактерий рода *Azotobacter*. В цисту превращается вся вегетативная клетка. **Микроспоры** образуются также путем превращения всей клетки. Формирование микроспор характерно для бактерий рода *Mycosoccus*.

2.2.10. Нуклеоид и репликация ДНК

Генетический материал прокариот представлен молекулой (молекулами) ДНК, уложенной в компактную структуру и локализованной в ограниченных участках цитоплазмы, не имеющей, в отличие от эукариот, собственной ядерной мембраны. Учитывая эти особенности, генетический аппарат прокариот принято называть **нуклеоидом**.

Тот факт, что в состав нуклеоида входит ДНК, впервые удалось показать Ж. Кейрнсу с помощью метода радиоавтографии. Для этого бактерии *E. coli* выращивали на среде, содержащей предшественник тимина

тимидин, меченный тритием (^3H). Известно, что ДНК – единственное вещество в клетке, которое содержит тимин. Если клетки бактерий, включившие тритий в тимин, лизировать с помощью лизоцима на мембранном фильтре, то можно получить радиоавтограф развернутой молекулы бактериальной ДНК. Такие радиоавтографы убедительно доказывают, что ДНК бактерий *E. coli* имеет форму нити, замкнутой в кольцо. Эта замкнутая в кольцо молекула ДНК включает несколько тысяч генов, расположенных линейно, и называется **хромосомой**.

В зависимости от метода микроскопирования и фиксации нуклеоид выглядит по-разному. При применении световой микроскопии и фиксации парами тетраоксида осмия или использовании различных вариантов окрашивания по Романовскому–Гимза нуклеоид выглядит как бобовидное тело с хорошо очерченными контурами, занимающее центральную часть бактериальной клетки, и длиной (у бактерий кишечной группы) около 1 мкм. В фазово-контрастном микроскопе в клетках живых бактерий нуклеоид также выглядит как овальное тельце, светлое на фоне темной цитоплазмы. При микроскопировании ультратонких срезов бактерий в электронном микроскопе нуклеоид напоминает клубок мотков толстой веревки, состоящей из множества нитей. Используя тот же способ микроскопирования и иммуноокрашивание срезов замороженных бактерий, можно рассмотреть нуклеоид в виде кораллоподобной структуры с плотной сердцевиной и тонкими рогами-выступами. Выступы, или ветви, пронизывают цитоплазму и образуют нечто вроде ореола вокруг сердцевины.

Полностью «уложенный» нуклеоид представляет собой достаточно компактное образование. Стабилизирующую роль в такой организации играют специфические белки. У бактерий кишечной группы известно по меньшей мере пять белков – HU, INF, H1, HLP1 и H, которые способствуют «упаковке» ДНК. Они сходны по аминокислотному составу и другим свойствам с гистонами эукариот, имеют сравнительно небольшие размеры (9–28 кД) и в большинстве своем относятся к основным. Похожие белки, которые способствуют «упаковке» ДНК, выделены у самых различных микроорганизмов, в том числе и архебактерий. Наибольшее значение в «упаковке» ДНК играет белок HU. Связываясь с ДНК, он меняет конфигурацию ее витков.

Важную роль как для сохранения целостности структуры, так и для функционирования генома бактерий играет прикрепление нуклеоида к цитоплазматической мембране. При щадящих способах нуклеоиды выделяются вместе с «фрагментами» мембраны. С использованием различных методов было показано, что имеются фиксированные точки прикре-

пления нуклеоида к мембране: точка начала репликации и точка завершения репликации. Кроме того, нуклеоид имеет «скользящие участки» прикрепления к мембране, в частности тот участок, в котором в данный момент идет репликация, и большое количество «неспецифических» точек контакта с мембраной.

Хотя каждая бактериальная клетка у большинства видов бактерий содержит одну хромосому (большинство бактерий – гаплоидные организмы), часто в интенсивно растущей культуре количество ДНК на клетку может достигать массы, равной 3, 4, 8 и более хромосом. Из этого следует, что термины «нуклеоид» и «хромосома» не всегда совпадают. В зависимости от условий нуклеоид бактериальной клетки может состоять из одной или нескольких копий одной и той же хромосомы. Так, у *Azotobacter chroococcum* в экспоненциальной фазе роста (наиболее интенсивного роста и размножения) на одну клетку приходится 20–25 копий хромосомы, у *Desulfovibrio gigas* – 9–17 копий хромосомы.

Размеры хромосомной ДНК у различных видов бактерий отличаются друг от друга. В качестве примера можно привести размеры хромосомной ДНК некоторых бактерий. У одной из наименьших по размеру бактерий *Mycoplasma genitalium*, вызывающей у людей уретриты, хромосомная ДНК равна 580.070 п. н.; у бактерий *E. coli* – 4.653.831 п. н. Нить хромосомной ДНК у бактерий *E. coli* имеет линейный размер в 1,6 мм, а длина упакованного нуклеоида – 1 мкм, что короче хромосомы в 1600 раз.

Уже отмечалось, что большинство бактерий – гаплоидные организмы, т. е. они имеют одну хромосому. Однако у различных видов бруцелл, *Rhodobacter sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Leptospira interrogans* клетки имеют по две хромосомы, различающиеся между собой по величине. У *Burkholderia cepacia* имеются даже три хромосомы. Эти данные были получены посредством пульс-фореза, позволяющего разделить по подвижности в геле очень крупные молекулы ДНК.

Сравнительно недавно считалось, что хромосомная ДНК бактериальной клетки, как правило, замкнута в кольцо, что доказывалось с помощью метода радиоавтографии. Кроме того, о кольцевой структуре хромосомы у *E. coli*, *Salmonella typhimurium* и *Bacillus subtilis* свидетельствуют и данные генетического анализа: были построены кольцевые генетические карты без каких-либо промежутков между группами сцепления. Наконец, физические карты хромосом, построенные с использованием ферментов рестриктаз, разрезающих хромосому в участках специфических нуклеотидных последовательностей, также свидетельствовали о кольцевой организации хромосом. Такие хромосомы в силу своей струк-

туры не могли быть разделены в геле при пульс-форезе. Однако в 1989 г. была опубликована статья о необычном поведении при пульс-форезе хромосомы *Borrelia burgdorferi* – возбудителя клещевого спирохетоза. Эта ДНК входила в гель и двигалась в нем точно так же, как заведомо линейные хромосомы дрожжей, взятые в качестве контроля. Оказалось, что терминальные участки ДНК линейной хромосомы у боррелий заканчивались шпильчатыми структурами. У других спирохет (лептоспир и трепонем) хромосома была кольцевой.

Позже появились данные о том, что после обработки протеазами выделенная из клеток кольцевая ДНК ряда видов актиномицетов превращается в линейную. Это было неожиданным, так как для актиномицетов уже существовали физические кольцевые карты. Однако выяснилось, что хромосомы актиномицетов оказались «псевдокольцевыми»: они были замкнуты не за счет непрерывного перехода цепочки ДНК правого полукольца хромосомы в левое, а за счет взаимодействия белковых молекул, расположенных на свободных концах ДНК линейной хромосомы и замыкающих их, протеазы же разрывают эту связь. Таким образом, у актиномицетов оказался другой, чем у боррелий, тип организации хромосом. Линейная хромосома была обнаружена и у фитопатогенных бактерий *Rhodococcus fascians*.

Считается, что теоретически возможны три механизма репликации ДНК (рис. 23).

1. **Консервативный**, при котором сохраняется целостность всей родительской двойной спирали (не происходит раскручивания спирали), и она является матрицей для синтеза себе подобной. Дочерняя двойная спираль полностью образуется из нового материала, а родительская как таковая сохраняется.

2. **Дисперсивный**, в соответствии с которым родительская молекула ДНК распадается на фрагменты, а синтез новых цепей происходит на фрагментах, которые затем крест-накрест объединяются с отрезками нового материала. Каждая полинуклеотидная цепь в этом случае должна была бы состоять из чередующихся отрезков старого и нового материала.

3. **Полуконсервативный** предполагает, что родительская двойная спираль раскручивается, и каждая полинуклеотидная цепь служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Таким образом, новая двойная молекула оказывается «гибридом» старой и вновь синтезированной цепи.

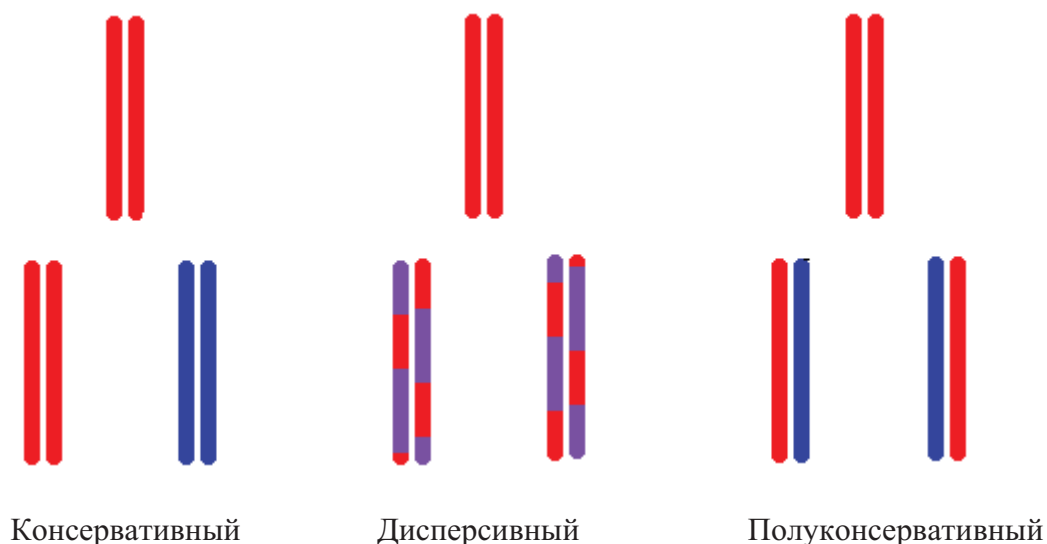


Рис. 23. Механизмы репликации ДНК

В 1957 г. М. Меселсон и Ф. Сталь экспериментально доказали, что репликация хромосомной ДНК у бактерий происходит по полуконсервативному механизму. Для доказательства этого бактерии *E. coli* выращивали на среде в присутствии хлорида аммония, содержащего тяжелый изотоп азота (^{15}N). Через некоторое время бактерии переносили на среду с легким азотом (^{14}N). До и после пересева через определенные промежутки времени отбирали пробы бактерий, лизировали их, из клеток выделяли ДНК и определяли ее плотность методом равновесного центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия. Параллельно бактерии выращивали в присутствии только легких или только тяжелых изотопов азота и проводили те же процедуры, что и с опытными культурами *E. coli*.

Оказалось, что препараты ДНК, выделенные из бактерий, выращенных на средах с разными изотопными формами азота, отличаются по плотности. ДНК, выделенная из бактерий, выращенных на среде с ^{15}N , более тяжелая, чем ДНК бактерий, выращенных на среде с ^{14}N . Однако ДНК, выделенная из бактерий, первоначально растущих на среде с ^{15}N , а затем перенесенных на среду с ^{14}N , имела промежуточную плотность, т. е. была «полутяжелой», или «гибридной». Общее количество такой «полутяжелой» ДНК оставалось постоянным на протяжении нескольких поколений (генераций), тогда как количество «легкой» ДНК увеличилось. М. Меселсон и Ф. Сталь сделали вывод, что в молекуле «полутяжелой» ДНК в составе пуриновых и пиримидиновых оснований одна цепь содержит ^{15}N , а вторая — ^{14}N (рис. 24).

Результаты этих экспериментов не объясняются ни консервативным, ни дисперсивным механизмом репликации ДНК, так как при консервативном механизме выявились бы только полосы тяжелой и легкой ДНК, а при дисперсивном – только полосы гибридной ДНК (и после нескольких генераций). Для доказательства того, что «полутяжелая» ДНК состоит из одной нити, содержащей ^{15}N , и одной нити, содержащей ^{14}N , ее подвергали «плавлению» (нагревали до $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ и быстро охлаждали) для получения одноцепочечных ДНК. Препарат ДНК центрифугировали в градиенте плотности хлорида цезия, после чего были выявлены две полосы: типичная для одноцепочечной ДНК с ^{14}N и типичная для такой же ДНК с ^{15}N . Таким образом, М. Меселсон и Ф. Сталь доказали, что репликация хромосомной ДНК у бактерий осуществляется по полуконсервативному механизму.



Рис. 24. Схема опыта М. Меселсона и Ф. Сталя

Молекулярные механизмы репликации бактериальной ДНК сходны в общих чертах с таковыми у других организмов. Для того чтобы произошла репликация ДНК по полуконсервативному механизму, необходимо, чтобы двухцепочечная молекула ДНК расплелась с образованием одноцепочечных фрагментов. В этом процессе участвует несколько ферментов, основными из них являются:

- 1) ДНК-геликазы, перемещающиеся по цепи ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ и перемещающиеся в направлении $3' \rightarrow 5'$;
- 2) SSB-белки (*single strand binding* – связывающиеся с одонитевой ДНК), которые связываются с одонитевой ДНК и препятствуют ее ренатурации;

3) ДНК-гиразы, или топоизомеразы, белки, которые снимают напряжение при раскручивании кольцевых молекул ДНК и способствуют ее расплетанию.

На образовавшихся односторонних участках ДНК идет синтез комплементарных цепей. В этом процессе участвуют ферменты ДНК-полимеразы. У бактерий *E. coli* синтезируются три типа ДНК-полимераз (I, II и III). Главную роль в репликации хромосомной ДНК у бактерий *E. coli* играет ДНК-полимераза III.

Доказано, что синтез ДНК протекает только в направлении от 5' к 3'-ОН концу (рис. 25). Однако цепи ДНК противоположно направлены и поэтому синтез одной из дочерних цепей осуществляется непрерывно с помощью ДНК-полимеразы III в направлении 5' → 3'. ДНК-полимераза III перемещается по цепи 3' → 5' в направлении раскрывания репликативной вилки и синтезирует новую цепь. Эта цепь называется **ведущей**, или **лидирующей**.

Копия второй цепи (5' → 3') называется **запаздывающей** и она синтезируется из фрагментов ДНК размером 1000–2000 нуклеотидов, которые называются **фрагментами Оказаки**. Для синтеза фрагментов Оказаки необходима «затравка», или праймер. В качестве затравки выступает короткая цепь РНК, которая синтезируется с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы на матрице ДНК. К этой затравке ДНК-полимераза III присоединяет дезоксирибонуклеотиды, в результате образуются фрагменты Оказаки. РНК-праймеры удаляются за счет активности ДНК-полимеразы I, после чего лигаза сшивает отдельные фрагменты Оказаки друг с другом и целостность новой цепи восстанавливается.

Репликация всего кольца ДНК может происходить как в одном, так и в двух противоположных направлениях двойной спирали, что соответственно предполагает наличие одной или двух репликативных вилок на одной молекуле ДНК.

Процесс репликации тесно связан с ростом и делением бактериальной клетки. Обычно деление бактериальной клетки по времени осуществляется после завершения цикла репликации молекулы ДНК. Однако в интенсивно растущих культурах репликация ДНК может опережать деление клетки и нередко в ней содержится ДНК в 4–8 раз больше, чем масса одной хромосомы. Время удвоения хромосомы бактерий *E. coli* занимает приблизительно 40 мин. Однако в благоприятных условиях деление клеток происходит за 20 мин. Это значит, что новый цикл репликации дочерних хромосом начинается еще до того, как заканчивается предыдущий.

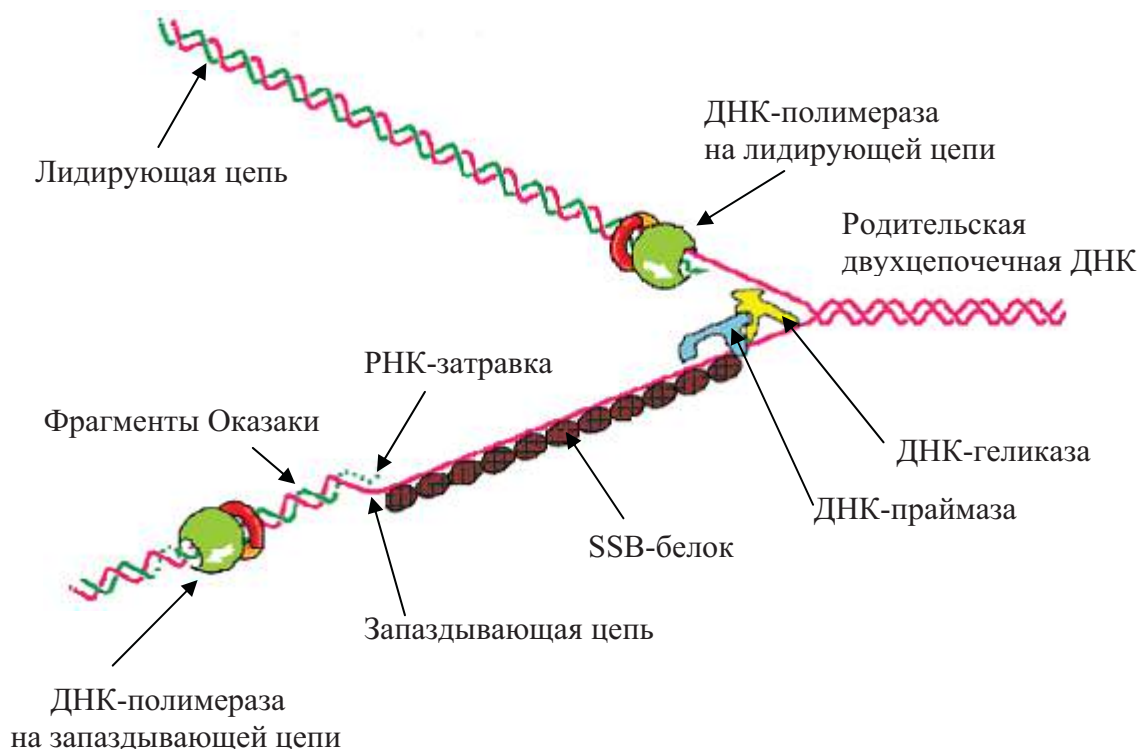


Рис. 25. Репликации ДНК у бактерий *E. coli* в соответствии с полуконсервативным механизмом

Уже отмечалось, что между бактериальной ДНК и цитоплазматической мембраной существует физическая связь; бактериальную ДНК можно обнаружить в мембранных фракциях после центрифугирования клеточных лизатов, а также с помощью электронной микроскопии удалось визуализировать места прикрепления хромосомы к впячиваниям мембраны (мезосомам).

Связь бактериальной хромосомы или плазмиды с цитоплазматической мембраной играет существенную роль в регуляции их репликации. Существуют две модели, объясняющие регуляцию репликации бактериальной ДНК. Согласно модели, предложенной Ф. Жакобом, С. Бреннером и Ф. Кьюзенем (1963), структура, способная самостоятельно реплицироваться, называется **репликоном**: это относится к хромосомам и плазмидам бактерий. Репликон должен иметь кольцевую форму и реплицироваться не по частям, а как единое целое. Согласно этой модели, репликон должен быть прикреплен к цитоплазматической мембране и обязательно обладать двумя специфическими детерминантами или генами — структурным геном и геном-репликатором (или оператором репликации). При росте клетки от мембраны поступает сигнал на структурный

ген и активирует его. Происходит синтез специфического белка-инициатора, который действует на ген-репликатор, что приводит к началу процесса репликации, который продолжается вдоль всего репликона и заканчивается копированием всей его структуры. После репликации ДНК поступает обратный сигнал на мембрану, инициируя деление клетки. Данная модель получила название *модели позитивной регуляции репликации*.

Кроме того, существует *модель негативной регуляции репликации* (Р. Притчард, П. Барт, Дж. Коллинз, 1969). В соответствии с этой моделью в составе репликона есть ген, отвечающий за синтез белка-репрессора, который при высокой концентрации негативно действует на инициацию репликации, а в малой концентрации не влияет на этот процесс. По мере роста клетки концентрация репрессора снижается и создается возможность репликации хромосомы или плазмиды.

Глава 3. ВИРУСЫ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Вирусы – мельчайшие объекты жизни, имеющие неклеточное строение и не способные к проявлению каких-либо признаков живого вне живых клеток. Первый вирус – вирус мозаичной болезни табака был открыт русским ученым Д. И. Ивановским в 1892 г.

Каждый вирус в своем онтогенезе проходит две стадии:

- внеклеточную, когда вирус находится в состоянии покоя (**вирион**), в таком состоянии он находится в условиях окружающей среды;
- внутриклеточную, в течение которой происходит весь цикл репродукции в клетках хозяина.

Каждый вирион представлен в основном двумя компонентами – нуклеиновой кислотой и белком, что позволяет называть вирусы неклеточными формами жизни. Отличия вирусов от клеточных организмов представлены в табл. 4.

Таблица 4

Отличие вирусов от клеточных организмов

| Свойства | Вирусы | Прокариоты | Эукариоты |
|----------------------------|-------------|-------------------------------|-----------|
| Клеточная организация | – | + | + |
| Тип нуклеиновой кислоты | ДНК или РНК | ДНК + РНК | ДНК + РНК |
| Автономный метаболизм | – | + (кроме некоторых риккетсий) | + |
| Рост на питательных средах | – | + (кроме риккетсий) | + |
| Бинарное деление | – | + | + |

3.1. Строение и химический состав вирусных частиц

Как уже отмечалось, вирусная частица состоит из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белка. Белковая оболочка, которая окружает нуклеиновую кислоту, называется **капсидом**. Капсид каждого вируса со-

стоит из отдельных субъединиц – **капсомеров**. Капсиды некоторых вирионов окружены дополнительной мембраной. Если вирус имеет такую мембрану, то говорят, что он «в оболочке» или окружен суперкапсидом, при отсутствии мембраны вирус называют «раздетым» или «голым».

Капсид чаще всего имеет симметричное строение, при котором различают два типа симметрии – спиральную и кубическую.

При **спиральной симметрии** капсида вирусная нуклеиновая кислота образует спиральную (или винтообразную) фигуру, полую внутри, и субъединицы белка (капсомеры) укладываются вокруг нее тоже по спирали (трубчатый капсид) (рис. 26). Примером вируса со спиральной симметрией капсида является вирус табачной мозаики, который имеет палочковидную форму длиной 300 нм и диаметром 15 нм. В состав вирусной частицы входит одна молекула РНК размером около 6 тыс. нуклеотидов. Капсид состоит из 2 тыс. идентичных субъединиц белка, уложенных по спирали.

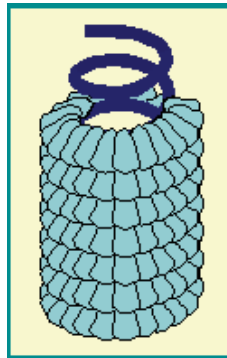


Рис. 26. Строение вируса со спиральной симметрией

При **кубической симметрии** вирусная нуклеиновая кислота уложена плотно (свернута в клубок), а белковые молекулы окружают ее, образуя многогранник (икосаэдр). Икосаэдр – многогранник с 20 треугольными гранями, имеющий кубическую симметрию и приблизительно сферическую форму (рис. 27). К икосаэдрическим вирусам относятся вирус простого герпеса, реовирусы и др.

В зависимости от типа симметрии вирусы подразделяют на вирусы со спиральным, кубическим типом симметрии и сложные вирусы, которые имеют оба типа симметрии и состоят из икосаэдрической головки и хвоста. Примером сложных вирусов являются колифаги Т2, Т4 (т. е. бактериофаги, инфицирующие клетки бактерий *E. coli*) и др. У некоторых сложных вирусов икосаэдрический капсид включает в себя трубчатый нуклеокапсид.

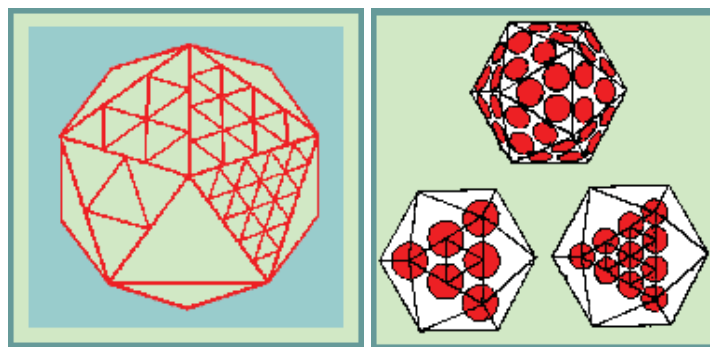


Рис. 27. Строение вируса с кубической симметрией

Кроме того, вирусы подразделяют на две группы по наличию в вирусной частице той или иной нуклеиновой кислоты:

- ДНК-содержащие, имеющие в качестве генетического материала либо одно-, либо двухцепочечную ДНК, которая может быть как линейной, так и кольцевой. Примером ДНК-содержащих вирусов являются кофиды Т2, Т4, λ ; вирус простого герпеса; вирус оспы и др.
- РНК-содержащие вирусы, генетическая информация которых представлена РНК. РНК также может быть как одно-, так и двухцепочечной. Вирусы с одноцепочечной РНК можно разделить, в свою очередь, на два типа: с «плюс»-цепью РНК и с «минус»-цепью РНК. У вирусов первого типа цепь РНК может функционировать в клетке-хозяине непосредственно как информационная РНК, тогда как у вирусов второго типа на «минус»-цепи должна синтезироваться сначала с помощью клеточных РНК-полимераз «плюс»-цепь РНК, которая и служит информационной РНК. Примером РНК-содержащих вирусов являются реовирусы, вирус гриппа, ретровирусы и др.

В зависимости от организма хозяина выделяют вирусы, инфицирующие животных и человека, растения и микроорганизмы.

Вирусы растений иначе называются фитопатогенными вирусами. Эти вирусы попадают внутрь растительных клеток через поражения растительной ткани или с помощью переносчиков насекомых либо нематод. Фитопатогенные вирусы вызывают у растений множество болезней, особенно большой вред приносят вирусы, поражающие картофель.

У человека вирусы вызывают множество заболеваний, включая оспу, грипп, корь, свинку, инфекционный гепатит, желтую лихорадку, полиомиелит, герпес, бешенство, СПИД, раковые заболевания и др. Многие вирусные заболевания у человека и животных можно предупредить путем иммунизации. Вирусные заболевания трудно поддаются лечению, так как вирусы не чувствительны к большинству известных антибиотиков. Вирусы животных и человека передаются контактным путем, с по-

мощью насекомых-переносчиков, а также через объекты окружающей среды.

Вирусы бактерий называются **бактериофагами (фагами)**. Вероятно, в природе не существует бактерий, которые не были бы чувствительными к одному из типов бактериофагов.

3.2. Строение бактериофагов. Взаимодействие бактериофагов с чувствительными клетками бактерий

Строение бактериофагов можно рассмотреть на примере колифага Т4, электронная микрофотография которого была получена одной из первых. Этот бактериофаг, как и все Т-четные колифаги, относится к сложным вирусам, т. е. он состоит из икосаэдрической **головки** диаметром 650 Å, длиной 950 Å и **отростка**, или **хвоста** (рис. 28). В капсиде головки находится плотно упакованная двухцепочечная линейная ДНК и фермент транскриптаза в неактивном состоянии. Отросток фага имеет сложное строение. В нем различают полый **стержень**, покрытый сократимым чехлом, который заканчивается **базальной пластинкой** с шипами и нитями. Все структуры отростка имеют белковую природу. В области базальной пластинки находится фермент – бактериофаговый лизоцим, способный разрушать муреин клеточной стенки бактерий. Здесь же имеется АТФаза, которая регенерирует энергию для сокращения чехла отростка бактериофага.

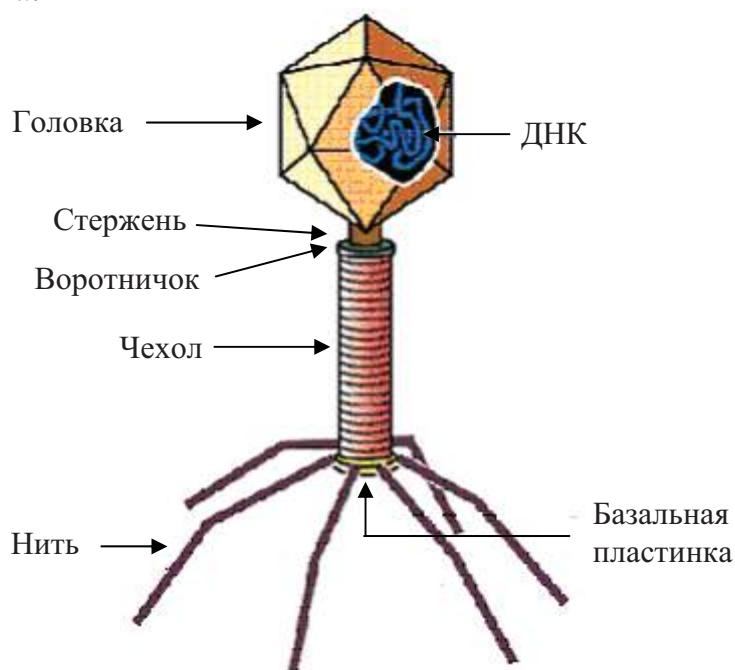


Рис. 28. Строение бактериофага Т4

Некоторые изученные бактериофаги имеют более простое строение. В зависимости от формы зрелых фаговых частиц различают следующие морфологические типы бактериофагов:

- состоящие из икосаэдрической головки и спирального хвоста с сократимым чехлом (Т-четные колифаги);
- состоящие из икосаэдрической головки и длинного гибкого несократимого отростка (колифаги Т1 и Т5);
- нитчатые бактериофаги (колифаг fd);
- состоящие из икосаэдрической головки с коротким несократимым отростком (колифаги Т3 и Т7, фаг Р22 бактерий *Salmonella typhimurium*).

Большинство бактериофагов содержит двухцепочечную ДНК, но охарактеризованы и бактериофаги с одноцепочечной ДНК (колифаг М13) и с одноцепочечной РНК (колифаги fr, Q β , R17).

В зависимости от особенностей размножения в чувствительной клетке бактериофаги подразделяются на две группы: вирулентные и умеренные. **Вирулентные фаги** всегда лизируют зараженные ими бактерии и имеют только один путь развития – **литический цикл**. **Умеренные фаги** могут вести себя двояко: после проникновения в клетку нуклеиновая кислота фага либо вовлекается в литический цикл, либо вступает с клеткой-хозяином в своего рода симбиотические отношения, т. е. встраивается в хромосому бактериальной клетки и превращается в профаг, передаваясь всему потомству данной клетки (**лизогенный путь**). Бактерии, которые содержат профаг, называются **лизогенными** (рис. 29).

Рассмотрим **взаимодействие вирулентных фагов** с чувствительной клеткой хозяином на примере колифага Т4.

При смешивании взвеси фаговых частиц с суспензией бактерий фаговые частицы в результате случайных столкновений с клетками бактерий прикрепляются к последним (адсорбируются). Адсорбция происходит на рецепторах, имеющих в наружной мембране бактерий *E. coli*. За адсорбцией следует стадия инъекции, или введения ДНК, в клетку. Бактериофаговый лизоцим разрушает клеточную стенку бактерий и с затратами энергии, регенерируемой АТФазой, происходит сокращение чехла бактериофага. При этом прокалывается цитоплазматическая мембрана, полый стержень входит в бактериальную клетку и ДНК фага впрыскивается в нее.

Инъекцированная ДНК вызывает полную перестройку метаболизма клетки: прекращается синтез бактериальной ДНК, РНК и белков. ДНК бактериофага начинает транскрибироваться с помощью собственного фермента транскриптазы, который после попадания в бактериальную клетку активируется. Синтезируются сначала ранние, а затем поздние

иРНК, которые поступают на рибосомы клетки-хозяина, где синтезируются ранние (ДНК-полимеразы, нуклеазы) и поздние (белки капсида и хвостового отростка, ферменты лизоцим, АТФаза и транскриптаза) белки бактериофага. Репликация ДНК бактериофага происходит по полуконсервативному механизму и осуществляется с участием собственных ДНК-полимераз.

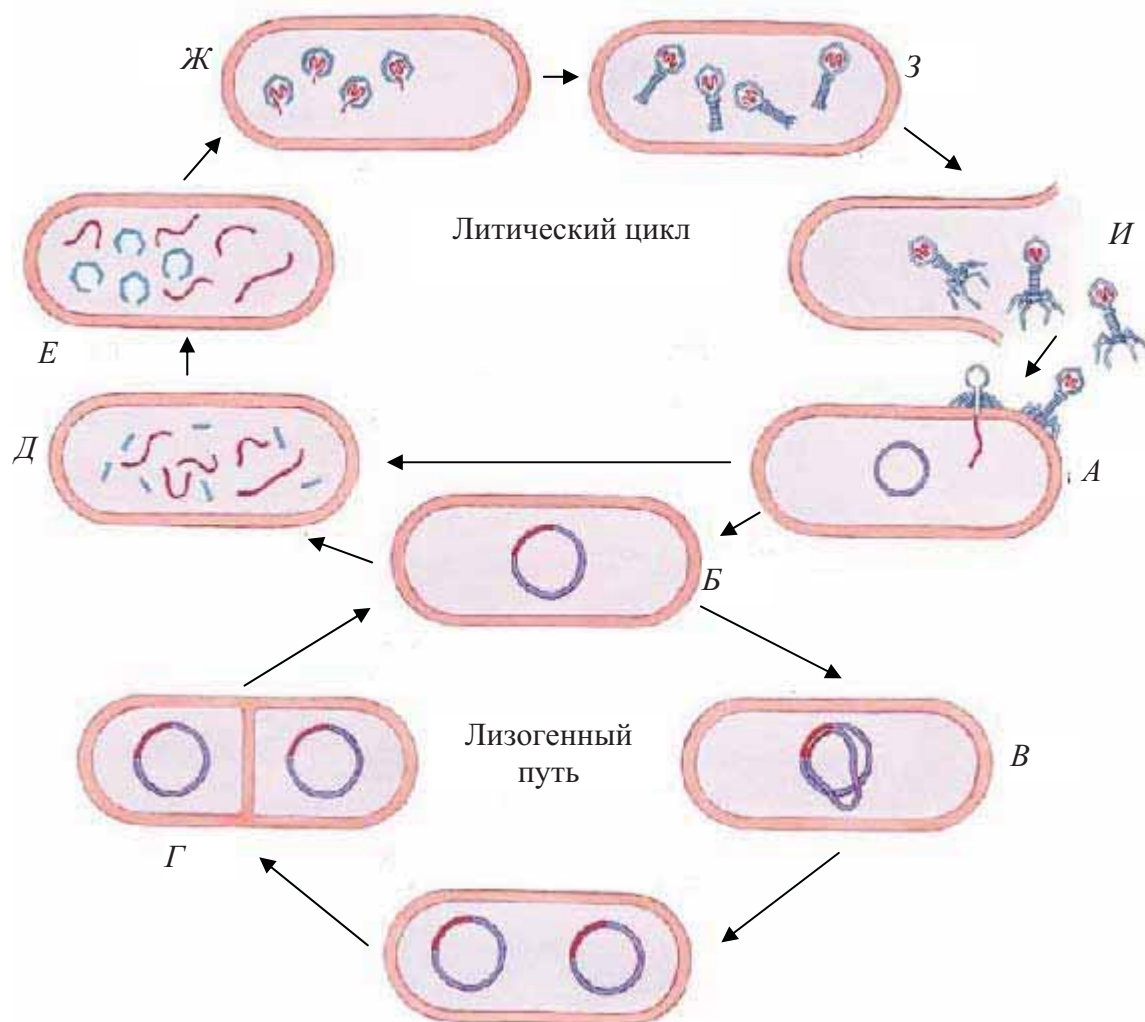


Рис. 29. Взаимодействие умеренных и вирулентных бактериофагов с чувствительной клеткой:

А – адсорбция фага на клетке; Б – интеграция фаговой ДНК в хромосому бактерий; В – репликация фаговой ДНК вместе с бактериальной; Г – деление клетки; Д – репликация фаговой ДНК и синтез фаговых белков; Е – образование капсидов; Ж – упаковка ДНК в капсиды; И – созревние фаговых частиц; И – лизис клетки и выход фаговых частиц

После синтеза поздних белков и завершения репликации ДНК наступает заключительный процесс – созревние фаговых частиц или соединение фаговой ДНК с белком оболочки и образование зрелых инфекционных фаговых частиц. Созревние Т-четных фагов – сложный много-

ступенчатый процесс. Сначала образуются капсиды, наполненные внутри белками. После растворения этих внутренних белков готовые головки заполняются ДНК в определенном количестве, зависящем от типа фага, и закрываются. На завершающей стадии происходит присоединение компонентов отростка и образуются зрелые фаговые частицы, которые после лизиса клетки-хозяина под действием лизоцима бактериофага высвобождаются. Оказавшись во внешней среде, они могут адсорбироваться на чувствительных клетках и повторять весь процесс инфекции. Литический цикл фага Т4 длится обычно 25 мин.

Развитие умеренных фагов (лизогения) подробно охарактеризовано для колифага λ . Это сложный фаг, содержащий линейную двухцепочечную ДНК. На 5'-конце каждой ее цепи имеется одноцепочечная последовательность из 12 нуклеотидов – так называемые липкие концы (*cos*-сайты). Сразу же после проникновения фаговой ДНК в бактериальную клетку липкие концы ДНК ковалентно соединяются ДНК-лигазой клетки-хозяина и образуется кольцевая молекула.

Далее, как правило, эта кольцевая молекула бактериофаговой ДНК не приступает к транскрипции, а встраивается в бактериальную хромосому. Установлено, что гены фага λ кодируют синтез четырех регуляторных белков, один из которых репрессорный белок *cI* (кодируется геном *cI*) блокирует развитие событий литического цикла, а антирепрессорный белок *Cro* (кодируется геном *cro*), наоборот, запускает их. После поступления ДНК фага λ в клетку выбор между литическим и лизогенным путем развития зависит от относительной скорости накопления регуляторных белков: если преобладает антирепрессорная функция белка *Cro*, то развиваются события литического цикла, если успевает проявиться функция репрессорного белка *cI*, литический цикл не осуществляется, так как белок *cI* связывается с ДНК фага λ в особых участках, препятствуя транскрипции фаговых генов.

Встраивание ДНК фага λ в бактериальную хромосому осуществляется согласно интегративной модели А. Кемпбелла. Этот процесс называется **сайт-специфической рекомбинацией**, так как встраивание ДНК фага λ осуществляется в одном и том же месте (сайте) между генами *gal* и *bio* и не зависит от *recA*-системы бактериальной клетки.

За интеграцию ДНК фага λ ответствен фермент – лямбда-интеграза. Этот фермент узнает две разные последовательности: одну в хромосомной ДНК (*att λ*), а другую – в ДНК фага (*b₂*), с последующим разрывом молекул ДНК и их перекрестным воссоединением.

Завершением процесса является то, что ДНК фага λ реплицируется с клеточной ДНК как единая структура, и все дочерние клетки при деле-

нии получают копию фаговой ДНК в составе хромосомы. Подобные клетки называются лизогенными, а ДНК фага λ в них – **профагом**.

Состояние лизогении, поддерживаемое благодаря постоянному образованию белка-репрессора cI, довольно неустойчиво: в любой момент может произойти переключение на литический путь из-за проявления антирепрессорных функций белка Cro. Показано, что в популяции лизогенных бактерий в одной из 10^2 – 10^5 клеток происходит спонтанная индукция профага и запускается литический цикл и такие клетки подвергаются лизису. Эффективность данного процесса зависит как от состояния бактерии-хозяина, так и от действия разнообразных физических и химических факторов. Индукторами перехода лизогения \leftrightarrow литический цикл являются ультрафиолетовое излучение, митомицин C, алкилирующие агенты, для некоторых фагов также и изменение температуры.

Явление индукции профага очень важно учитывать при составлении многокомпонентных заквасок для получения молочнокислых продуктов. Если среди штаммов, входящих в такие закваски, окажутся лизогенные и нелизогенные, но чувствительные к фагу, обусловившему лизогению бактерий, то произойдет явление **фаголизиса** (т. е. гибели клеток), очень опасное для молочной промышленности. Следует отметить, что фаголизис может быть обусловлен и вирулентными фагами, попадающими в технологические потоки при плохой организации производства. Явление фаголизиса также может наблюдаться и в процессе микробного синтеза аминокислот, что значительно снижает рентабельность этих отраслей биотехнологии.

Суммируя вышеизложенное, можно констатировать, что умеренные бактериофаги могут находиться в трех состояниях: в свободном состоянии в виде частиц – вирионов; в состоянии профага; в вегетативном (активном) состоянии, когда бактериофаг способен вызывать лизис бактериальной клетки (табл. 5).

Кроме того, что наличие профага является потенциально летальным для лизогенной бактерии фактором, делает ее иммунной к заражению гомологичным фагом, он может сообщать клетке-хозяину и другие признаки. Преобретение новых признаков, обусловленных профагом, называется **фаговой** или **лизогенной конверсией**. Лизогенная конверсия может затрагивать такие важнейшие свойства бактерий как морфология их колоний, биохимические признаки, способность синтезировать токсины или антибиотики, устойчивость к лекарственным препаратам и др. Это явление хорошо изучено у некоторых болезнетворных бактерий.

Таблица 5

Отличительные свойства состояний умеренных бактериофагов

| Свойства | Вирион | Профаг | Вегетативный фаг |
|---|--------|-----------------------------------|------------------|
| Наличие специфической нуклеиновой кислоты | + | + | + |
| Репликация нуклеиновой кислоты | — | Вместе с бактериальной хромосомой | + |
| Синтез фаговых белков | — | — | + |
| Способность к заражению | + | — | — |
| Способность вызывать лизис клетки | — | — | + |

Например, показано, что способность дифтерийной палочки (*Corynebacterium diphtheriae*) синтезировать сильнейший дифтерийный токсин детерминируется геном tox^+ , а активность этого гена в свою очередь зависит от присутствия в бактериальной клетке в состоянии профага специфического фага β . Известно, что бактерии *Clostridium botulinum* – возбудители ботулизма, синтезируют смертельный токсин только при лизогенизации их специфическими бактериофагами.

Глава 4. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Факторы внешней среды, влияющие на жизнеспособность микроорганизмов, подразделяют на химические и физические. Они действуют на микроорганизмы по-разному. С одной стороны, оказывают стимулирующее действие, например, при использовании определенных химических веществ, необходимых микроорганизмам для поддержания их жизнедеятельности; поддержании оптимальной температуры, обеспечивающей наиболее высокую скорость роста клеток, и т. п.

С другой стороны, действие химических и физических факторов может вызывать торможение метаболизма либо приводить клетки микроорганизмов к гибели. В зависимости от этого все физические и химические факторы подразделяют на *микробостатические* и *микробоцидные*. Факторы внешней среды, полностью или частично угнетающие рост и задерживающие развитие микроорганизмов, относят к микробостатическим. Микробоцидные факторы вызывают гибель микроорганизмов. В зависимости от концентрации или дозы действующего агента, продолжительности контакта и вида микроорганизма один и тот же фактор может оказывать как микробостатическое, так и микробоцидное действие.

4.1. Действие факторов химической природы

Как уже отмечалось, одно и то же химическое вещество может проявлять избирательную активность в отношении микроорганизмов, действуя только на конкретные структуры или процессы микробной клетки и не действуя на клетки других организмов. Такие вещества удобно использовать в терапии для лечения заболеваний микробной этиологии.

Некоторые химические вещества действуют опосредованно, т. е. приводят к микробостатическому эффекту, не поражая саму клетку микроорганизмов. Например, при повышении концентрации сахарозы в среде из клеток микроорганизмов выходит вода, что задерживает их рост, т. е. приводит к микробостатическому эффекту. На этом основано пригото-

ление варенья, джемов и т. п. При разведении этих продуктов микроорганизмы восстанавливают свои функции, и в благоприятных условиях вновь могут расти и развиваться.

Химические соединения по механизму действия на клетки микроорганизмов могут быть разделены:

- на повреждающие клеточную стенку или цитоплазматическую мембрану;
- повреждающие ферменты, участвующие в обмене веществ, а также нарушающие синтез основных биополимеров клетки.

К первой группе относятся химические вещества, повреждающие структуру клеточной стенки (лизозим и др.), нарушающие полупроницаемость цитоплазматической мембраны (фенолы, хлороформ, крезолы, нейтральные мыла, поверхностно-активные вещества или детергенты, эфиры, ионы водорода, спирты, толуолы). Действие фенола, хлороформа, крезола, эфира, толуола, спирта связано в первую очередь с растворением липидов цитоплазматической мембраны, что приводит к нарушению ее проницаемости и разрушению. Кроме того, этанол в достаточно высокой концентрации (70 %) вызывает коагуляцию белков и оказывает микробоцидное действие. Детергенты способны накапливаться в липопротеиновых мембранах (за счет того, что они, как и мембраны, имеют полярную структуру) и вызывать нарушение их функций. Поскольку эти вещества обладают широким спектром антимикробного действия, их обычно применяют для дезинфекции различных поверхностей, материалов и объектов окружающей среды.

Концентрация ионов водорода в окружающей среде действует на микроорганизмы двояко:

- 1) непосредственно на полупроницаемость цитоплазматической мембраны;
- 2) косвенно или опосредованно: а) через влияние на ионное состояние и доступность многих ионов и метаболитов; б) стабильность макромолекул; в) равновесие зарядов на поверхности клетки.

При низких значениях pH понижается растворимость углекислого газа – источника углерода для автотрофных бактерий, а растворимость таких катионов, как Cu^{2+} , Mo^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , возрастает и достигает токсичных уровней. Кроме того, многие органические кислоты при низких значениях pH находятся в недиссоциированной форме и легко проникают в клетку, становясь токсичными для нее. Наоборот, при высоких значениях pH растворимость многих катионов, необходимых клетке (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}), резко понижается, они выпадают в осадок и становятся недоступными для клеток микроорганизмов.

Концентрация ионов водорода во внешней среде влияет и на равновесие электрических зарядов на поверхности клетки: при низких значениях pH увеличивается суммарный положительный заряд, при высоких – суммарный отрицательный заряд. Кроме того, в кислой среде разрушаются ДНК и АТФ, а в щелочной – РНК и фосфолипиды.

В зависимости от отношения к кислотности среды бактерии могут быть разделены на несколько групп:

1) **нейтрофилы** – оптимальное значение pH для роста составляет 6–8, а рост возможен, как правило, в диапазоне от 4 до 9. К этой группе относится большинство известных микроорганизмов. Типичными нейтрофилами являются штаммы бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus faecalis* и др.;

2) **ацидофилы** – оптимальная кислотность среды для роста ниже 4 единиц pH. Среди них различают **факультативные** (интервал pH 1–9, оптимум 2–4) и **облигатные** ацидофилы (интервал pH 1–5, оптимум 2–4). В природе экстремально кислые условия встречаются в некоторых озерах, болотах, горячих источниках. Типичными представителями облигатных ацидофилов служат бактерии родов *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Acetobacter* и др.;

3) **алкалофилы** – оптимальные условия для развития находятся в пределах значений pH 9,0–10,5, которые встречаются в щелочных почвах, в местах скопления экскрементов животных. Среди алкалофилов различают **факультативных** алкалофилы (интервал pH для роста 5–11, оптимум pH 9,0–10,5), к которым относятся нитратвосстанавливающие и сульфатвосстанавливающие бактерии, многие аммонификаторы. **Облигатные** алкалофилы растут при высоких значениях pH – 8,5–11,0, при оптимуме 9,0–10,5. К таким бактериям относятся *Bacillus pasteurii*, некоторые цианобактерии и др.

Однако следует отметить, что хотя микроорганизмы и могут осуществлять процессы жизнедеятельности в условиях различной кислотности или щелочности среды, реакция внутри их клеток поддерживается всегда близкой к нейтральной. Это достигается благодаря наличию в цитоплазме буферных систем и низкой полупроницаемости мембраны для ионов водорода.

Способность к росту при низких или высоких значениях pH обеспечивает микроорганизму определенные преимущества, так как в этих условиях мала конкуренция со стороны большинства других организмов.

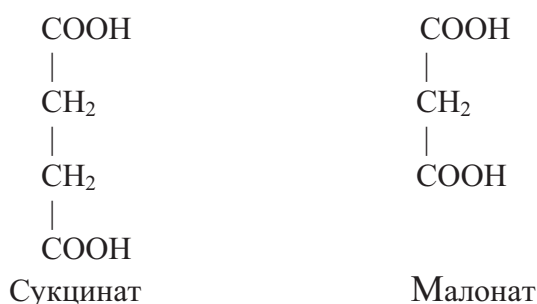
К группе химических веществ, оказывающих микробоцидное действие на микроорганизмы, повреждающих ферменты и вызывающих нарушение обмена веществ, относятся ионы тяжелых металлов, оксид уг-

лерода, цианиды, некоторые активные окислители – перманганат калия, пероксид водорода, хлорная известь, иод.

Ионы тяжелых металлов (Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) могут взаимодействовать с гидроксильными, сульфгидрильными, карбоксильными группами, а также аминогруппами, вызывая изменения свойств белков и коферментов. В частности, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ связывают SH-группы и тем самым глубоко изменяют третичную и четвертичную структуры ферментных белков. Они также блокируют сульфгидрильную группу кофермента А. В результате ингибирования ферментных систем нарушаются дыхание, синтез РНК и белков.

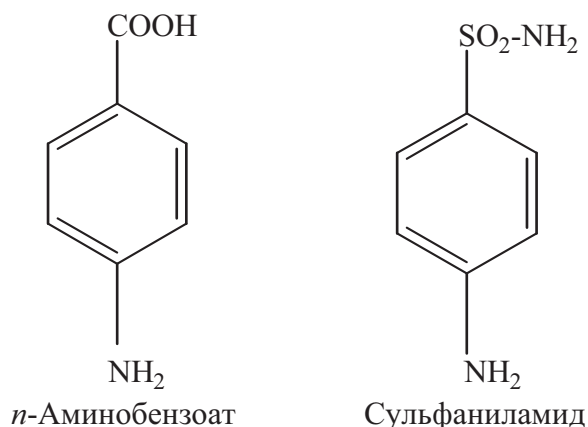
Цианиды действуют как дыхательные яды – связывая железо, они блокируют функцию терминального дыхательного фермента цитохром-оксидазы. Оксид углерода подавляет дыхание, конкурируя со свободным кислородом за цитохромоксидазу, т. е. действует путем «конкурентного торможения». Окислители KMnO_4 , иод, H_2O_2 и другие вызывают резкое усиление окислительных процессов, приводящее к отмиранию клетки.

К группе химических веществ, нарушающих синтез клеточных компонентов, относятся структурные аналоги соответствующих соединений – антиметаболиты. Рассмотрим несколько примеров. Структурным аналогом сукцината является малонат:



В присутствии малоновой кислоты даже в низких концентрациях подавляется превращение сукцината в фумарат. При этом нормальный метаболит сукцинат конкурирует со своим структурным аналогом малонатом за каталитический центр сукцинатдегидрогеназы. В основе этого конкурентного ингибирования лежит структурное сходство ингибиторов с нормальными клеточными метаболитами.

Вторым примером конкурентного ингибирования является включение производных сульфаниловой кислоты (сульфаниламидов) в фолиевую кислоту (витамин В_с, или фолацин) вместо *n*-аминобензойной кислоты. Это основано на том, что они имеют структурное сходство:



Большинство бактерий способно синтезировать фолиевую кислоту из более простых компонентов. Если в состав питательной среды внести сульфаниламид, то он будет включаться в фолиевую кислоту, что приведет к синтезу неполноценного витамина и в конечном счете к остановке роста клеток. В организме животных и человека фолиевая кислота не образуется, они ее получают в готовом виде с пищей. В их клетках сульфаниламид не может включаться в этот витамин и не способен, таким образом, оказывать ингибирующее действие, что используется в терапии инфекционных заболеваний.

К микростатическим агентам, которые ограничивают рост нежелательной микрофлоры в продуктах питания, косметических средствах и других, относятся **консерванты**. Данные вещества не должны обладать токсичными, мутагенными или канцерогенными свойствами по отношению к организму человека. Наименее токсичными и чаще других применяемыми консервантами являются поваренная соль и сахар. Их добавление в продукты уменьшает концентрацию свободной воды и тем самым ограничивает развитие микрофлоры. Для этих целей широко используются органические кислоты: лимонная, молочная, уксусная, пропионовая, бензойная, сорбиновая, а также их соли. Действие данных соединений основано на снижении pH продукта, что отрицательно сказывается на развитии нейтрофильных и алкалофильных организмов. Кроме того, многие органические кислоты оказываются токсичными для микроорганизмов.

Для консервирования фруктов, ягод, соков, вин используют диоксид серы (SO_2), а также жидкие сульфиты. Долгое время для консервирования мясных и рыбных продуктов широко применяли нитриты и нитраты, которые эффективно ингибируют рост таких опасных возбудителей, как *Clostridium botulinum*, вызывающих порчу богатых белком продуктов. Однако выяснилось, что эти соли могут взаимодействовать с вторичными и третичными аминами, образуя нитрозамины – высоко канцероген-

ные соединения, поэтому применение нитритов и нитратов в пищевых продуктах сейчас ограничено.

4.2. Действие факторов физической природы

Все физико-химические процессы, обеспечивающие функциональную активность клетки, а также состояние ее макромолекул, в большей или меньшей степени зависят от температуры. При высокой температуре белки, нуклеиновые кислоты и другие компоненты клетки могут необратимо инактивироваться, что приводит к ее гибели. При слишком низкой температуре также нарушаются процессы биосинтеза, ограничивая развитие микроорганизмов.

По отношению к температуре бактерии делят на три основные группы: мезофилы, психрофилы и термофилы, которые в свою очередь подразделяют на отдельные подгруппы.

Большинство известных видов прокариот относится к **мезофилам**, для них оптимальные температуры роста лежат в пределах 20–42 °С. Типичным представителем мезофилов является *E. coli*, оптимальная температура роста которой 37 °С.

Микроорганизмы, способные нормально расти при низких (0–20 °С) температурах, называют **психрофильными**. Психрофильные бактерии делятся на облигатные и факультативные. Основное различие между ними заключается в том, что облигатные психрофилы не способны к росту при температуре выше 20 °С, а верхняя температурная граница роста факультативных психрофилов намного выше. **Облигатные психрофилы** – узкоспециализированные микроорганизмы, обитающие в постоянно холодной среде; их температурный оптимум ниже 15 °С, максимум – около 20 °С; при 30 °С они отмирают. Облигатные психрофилы обитают в холодных почвах, морях Арктики и Антарктики, на вечных снегах высокогорных районов, их находят в пробах из горных ледников, в воде колодцев и родников. Эти бактерии играют существенную роль в круговороте веществ в регионах с постоянно низкими температурами. В качестве представителей облигатных психрофилов можно привести бактерии *Vaccillus psychrophilus*, морские светящиеся бактерии, железобактерии (например, рода *Gallionella*) и др.

Факультативные психрофилы распространены значительно шире и встречаются в почвах и водах не только холодной, но и умеренной зоны. Многие из них вызывают порчу пищевых продуктов при низких температурах. Оптимум для роста факультативных психрофилов соответствует 25–30 °С, т. е. они способны расти в условиях, благоприятных для мезо-

фильных организмов. К этой группе относятся некоторые виды бактерий родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter* и др.

Способность психрофилов развиваться при низкой температуре связывают с особенностями строения их клеток:

- температурный оптимум активности ферментов у них ниже, чем у аналогичных ферментов мезофильных микроорганизмов. При отклонении температуры от оптимальной активность большинства ферментов психрофилов значительно быстрее падает при повышении температуры, чем при ее понижении. Тем не менее некоторые ферменты психрофилов при повышении температуры усиливают свою активность. Это ферменты, вызывающие деградацию или разрушение клеточных макромолекул, что может быть одной из причин термочувствительности облигатных психрофилов;

- проницаемость их мембран остается высокой при охлаждении благодаря содержанию в липидах ненасыщенных жирных кислот, вследствие чего мембраны не застывают и остаются полужидкими;

- белоксинтезирующий аппарат психрофилов способен функционировать при низких температурах.

К **термофильным** относят микроорганизмы, которые растут при температуре выше 45–50 °С. Группу термофилов делят на четыре подгруппы:

1) **термотолерантные** – растут при температурах от 10 до 55–60 °С, оптимальная область находится в пределах 35–40 °С (как у мезофилов). Основное их отличие от мезофилов – способность расти при повышенных температурах. Примером термотолерантных бактерий являются бактерии вида *Methylococcus capsulatus*;

2) **факультативные термофилы** имеют температурный максимум 50–65 °С и минимум менее 20 °С, оптимум приходится на область температур, близких к верхней границе роста. Примером факультативных термофилов являются гомоферментативные молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*. Они обитают на поверхности многих растений, откуда попадают в различные продукты – их легко обнаружить в молочных продуктах, соленьях, маринадах, вине, фруктовых соках. Лактобациллы постоянно присутствуют в полости рта, кишечном тракте многих теплокровных животных и человека;

3) **облигатные термофилы** способны расти при температурах до 70 °С и не растут при температуре ниже 40 °С. Оптимальная температурная область облигатных термофилов примыкает к их верхней температурной границе роста (65–70 °С). Представители облигатных термофилов – бактерии вида *Bacillus stearothermophilus* и др.;

4) **экстремальные термофилы** имеют следующие температурные параметры: оптимум в области 70–75 °С, минимальная граница роста – 40 °С и выше, максимальная – около 90 °С. Эти микроорганизмы распространены в горячих источниках, особенно в районах активной вулканической деятельности. Представители – бактерии родов *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Thermoplasma* и др.

Природу термоустойчивости объясняют рядом структурных и биохимических особенностей этих бактерий:

- липиды, входящие в состав клеточных мембран, содержат насыщенные жирные кислоты. В связи с этим они имеют более высокую температуру плавления по сравнению с липидами, содержащими ненасыщенные жирные кислоты;
- у экстремально термофильных бактерий обнаружено повышенное содержание гуанина и цитозина в ДНК, что придает стабильность и повышает температуру плавления этих молекул;
- ферменты термофилов гораздо устойчивее к нагреванию в сравнении с соответствующими белками мезофильных бактерий. Часто такая высокая термостабильность достигается в результате изменения первичной структуры белковой молекулы. В качестве примера можно привести следующий: при сравнении лактатдегидрогеназ мезофильных и термофильных бактерий рода *Bacillus* обнаружено увеличенное содержание основных аминокислот аргинина и лизина в активном центре лактатдегидрогеназ у термофилов. Устойчивость ферментов термофилов обеспечивается также ионами Ca^{2+} , кофакторами и другими агентами, которые связываются с ними.

Термофильные бактерии имеют большое практическое значение. Обладая очень интенсивным метаболизмом, они являются активными продуцентами витаминов, ферментов, органических кислот, кормового белка и других ценных веществ. Эти их свойства широко используются в микробиологической промышленности, так как применение мезофильных микроорганизмов в ней ограничено из-за того, что в результате культивирования часть энергии выделяется в виде тепла и происходит разогрев субстрата (питательной среды), что приводит к гибели мезофильных микроорганизмов.

Термофильные бактерии играют также большую роль в биологической очистке бытовых отходов и образовании метана.

Микроорганизмы подвержены воздействию различных видов **электромагнитных излучений**. Эффект воздействия зависит от дозы облучения и длины волны. Наиболее длинноволновая радиация (радиоволны – длина волны более 1100 нм) не вызывает биологического эффекта.

Инфракрасные лучи (700–1100 нм и более) оказывают тепловое воздействие на микроорганизмы и используются зелеными и пурпурными бактериями в процессе фотосинтеза. Видимая часть спектра (300–700 нм) используется цианобактериями и другими фототрофными бактериями в процессе фотосинтеза. УФ-лучи (10–300 нм) могут оказывать на микроорганизмы как микробоцидное, так и мутагенное действие, что определяется видом микроорганизмов и дозой облучения. Наибольший летальный эффект УФ-лучей наблюдается при длине волны 260 нм, при которой отмечается максимум поглощения УФ-лучей молекулами ДНК. Летальное действие УФ-лучей объясняется в первую очередь изменениями структуры ДНК: разрывом водородных связей, расщеплением связей между дезоксирибозой и фосфатом, а также образованием сшивок между тиминовыми азотистыми основаниями (димеров тимина), которые обуславливают нарушение процессов репликации и транскрипции.

УФ-облучение не всегда приводит клетку бактерий к гибели. Многие микроорганизмы обладают механизмами, призванными исправлять (репарировать) повреждения ДНК, вызванные УФ-облучением. Гибель клеток от УФ-лучей наступает тогда, когда повреждение происходит быстрее, чем репарация ДНК. Кроме нуклеиновых кислот, УФ-лучи поглощают белки и другие макромолекулы, что приводит к нарушению их структуры и функций.

К воздействию УФ-излучения более устойчивы те виды бактерий, в клетках которых содержатся каротиноиды. У гетеротрофных организмов каротиноиды служат защитной системой, снижающей повреждения нуклеиновых кислот, а у фототрофных бактерий они предохраняют бактериохлорофиллы от фотоокисления.

Ионизирующая радиация, под которой обычно подразумевают рентгеновское и гамма-излучение (с длиной волны менее 10 нм), вызывает летальный для клетки эффект. В отличие от УФ-лучей, она действует на биополимеры не прямо, а опосредованно, вызывая образование свободных радикалов и органических перекисей, которые реагируют с нуклеиновыми кислотами и белками, вызывая одно- и двунитевые разрывы цепей ДНК, изменения азотистых оснований, окисление сульфгидрильных групп белков в дисульфидные и т. д. Чувствительность микроорганизмов различных групп к ионизирующей радиации проявляется в разной степени. Например, бактерии *Clostridium botulinum* (тип E) сохраняют жизнеспособность при дозе 1,5 Мрад, *E. coli* – только 0,18 Мрад. Абсолютным «чемпионом» по устойчивости к ионизирующей радиации являются бактерии *Micrococcus radiodurans*, которые обитают в водах атомных реакторов, встречаются в залежах урановых руд. Эти бактерии устойчивы к

дозе ионизирующего излучения в 2–3 Мрад, что объясняется наличием в их клетках мощных репарационных систем, призванных исправлять повреждения в ДНК. Ионизирующее излучение используется в качестве стерилизующего фактора, в том числе для продления срока хранения некоторых продуктов (фруктов, овощей, морепродуктов).

Высокие значения **гидростатического давления** приводят к разрушению клеточных структур, происходит денатурация белков, прекращается деление и клетки приобретают нитевидную форму. Однако существуют бактерии, которые живут на глубине 7000 м и более, где давление достигает более 1000 атмосфер. Из осадков на дне океанов выделяют бактерии двух групп: баротолерантные и пьезофильные (барофильные). **Баротолерантные бактерии** размножаются как при обычном, так и при давлении в несколько сот атмосфер. **Пьезофильные** (менее многочисленная группа) при давлении в сотни атмосфер дают больший урожай биомассы, чем при атмосферном давлении. Пьезофильные бактерии (например, бактерии вида *Bacillus submarinus*) – это обитатели глубоководных впадин морей и океанов.

Концентрация веществ, растворенных в окружающей среде, т. е. **осмотическое давление**, также оказывает большое влияние на жизнеспособность микроорганизмов: чем концентрированнее раствор, тем труднее клетке поглощать из него воду. В гипертонических растворах, т. е. таких, в которых осмотическое давление больше, чем в клетке, происходит обезвоживание клеток (плазмолиз) и полное прекращение роста. Это явление называется физиологической сухостью. Однако некоторые микроорганизмы способны нормально развиваться в достаточно концентрированных растворах. Такие микроорганизмы называют **осмофильными**. Осмофильные микроорганизмы, для которых требуется высокое содержание NaCl, получили название **галофильных**. К экстремальным галофилам относятся бактерии из родов *Halobacterium* и *Halococcus*, живущие в растворах NaCl при концентрациях, близких к насыщающим. У таких бактерий концентрация солей в цитоплазме равна концентрации внешнего раствора, однако в клетках преобладает не натрий, а калий. Белки галофильных бактерий отличаются по строению от таковых негалофильных: содержание кислотных групп в них преобладает над основными. Эти кислотные группировки нейтрализуются катионами. Высокие концентрации солей необходимы галофилам для поддержания каталитической активности ферментов, стабилизации мембран и рибосом. Галофильные бактерии обнаружены в соленых озерах, в солончаковых почвах. Они обычно вызывают порчу соленой рыбы и мяса.

Высокочастотные (более 16 кГц) механические колебания упругой среды, или **ультразвук**, не воспринимаются нашими органами слуха. При воздействии на микроорганизмы ультразвук создает большую разницу в давлении на отдельные части клеток и повреждает их: разжижается и вспенивается цитоплазма, разрушаются поверхностные структуры, содержимое клетки смешивается с окружающей средой. Чувствительность микроорганизмов к ультразвуку, пропорциональная частоте колебаний и длительности воздействия, зависит также от их индивидуальных особенностей и физиологического состояния. Чем крупнее клетки, тем более чувствительны они к воздействию ультразвука; палочки и извитые формы чувствительнее кокков. При длительном воздействии наблюдается полная гибель микроорганизмов, что используется в целях стерилизации. Ультразвук применяют и для разрушения клеток, чтобы извлечь из них некоторые биологически активные вещества.

Кроме охарактеризованных физических факторов, на развитие микроорганизмов оказывает воздействие изменение напряжения магнитных полей. Этот фактор в настоящее время рассматривается как экологический, определяющий протекание многих биологических процессов. Особенно чувствительны к изменению напряжения магнитного поля магниточувствительные микроорганизмы, содержащие в клетках магнитосомы.

Небезразличны микроорганизмы и к действию земного притяжения, сотрясений, а также электрического тока.

4.3. Антимикробное действие антибиотиков

Антибиотики (антибиотические вещества) – низкомолекулярные продукты метаболизма микроорганизмов, растений и животных или их модификации, задерживающие рост либо полностью подавляющие развитие других микроорганизмов. Большинство известных в настоящее время антибиотиков образуются именно клетками микроорганизмов.

Первый антибиотик был открыт шотландским бактериологом А. Флемингом в 1929 г. Флеминг выделил плесневый гриб, который был определен как *Penicillium notatum*, и установил, что культуральная жидкость этой плесени способна оказывать антибактериальное действие по отношению к патогенным коккам (рис. 30). Культуральная жидкость гриба, содержащая антибактериальное вещество, названа им пенициллином. Хотя попытки Флеминга выделить активное начало, образуемое грибом *P. notatum*, не увенчались успехом, однако большой его заслугой явилось

то, что он указал на перспективы практического применения обнаруженного им агента.

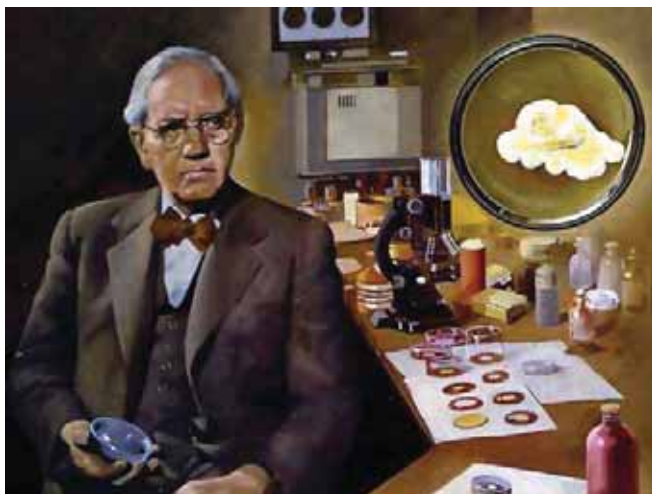


Рис. 30. Флеминг в своей лаборатории, знаменитый гриб *Penicillium notatum* (из <http://www.biografiasyvidas.com/monografia/fleming/fotos4.htm>)

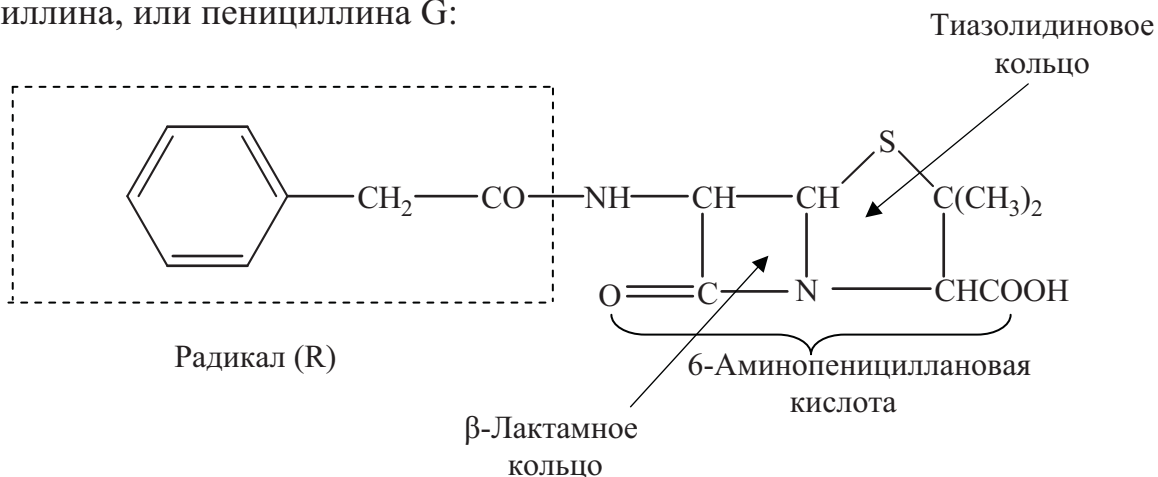
Спустя примерно десять лет после сообщения А. Флеминга, пенициллин начал изучать Э. Чейн. Он был убежден, что это вещество – фермент. В 1940 г. Х. Флори и Э. Чейн получили в кристаллическом виде пенициллин и установили, что это не фермент, а низкомолекулярное вещество пептидной природы.

Изучение пенициллина в бывшем Советском Союзе было начато З. В. Ермольевой. В 1942 г. под ее руководством в лаборатории биохимии микробов Всесоюзного института экспериментальной медицины в Москве был получен первый отечественный антибиотик, сходный с пенициллином, – крустозин, сыгравший огромную роль в спасении жизни воинов в годы Великой Отечественной войны.

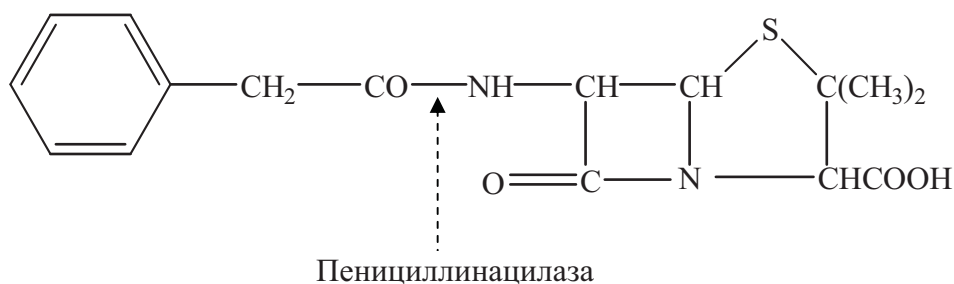
После того как было установлено, что пенициллин обладает активностью в отношении возбудителей септических инфекций, пневмонии, эпидемического менингита и других заболеваний, начались интенсивные поиски продуцентов этого антибиотика. В результате было установлено, что пенициллин могут синтезировать не только *Penicillium notatum*, но и многие другие виды грибов, например *P. chrysogenum*, *P. nigricans*, *Aspergillus flavus*, *A. nidulans*.

Пенициллины, синтезируемые различными микроорганизмами, близки по химическому строению. Они относятся к группе β -лактамных антибиотиков, общим для которых является наличие 4-членного β -лактамного кольца, входящего в состав 6-аминопенициллановой кислоты. К 6-аминопенициллановой кислоте присоединен радикал. В зависимости

от того, какой радикал присоединен к 6-аминопенициллановой кислоте, все антибиотики пенициллинового ряда разделяют на природные и полусинтетические. В качестве примера рассмотрим строение бензилпенициллина, или пенициллина G:

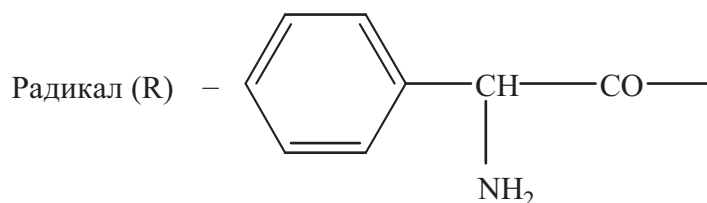


Исходным продуктом для полусинтетических пенициллинов является 6-аминопенициллановая кислота, которую чаще всего получают путем ферментативного расщепления бензилпенициллина или феноксиметилпенициллина с участием пенициллинацилазы:

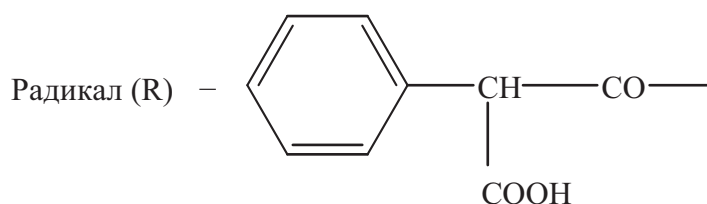


Затем к 6-аминопенициллановой кислоте химическим путем присоединяют различные радикалы. Примером полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда являются:

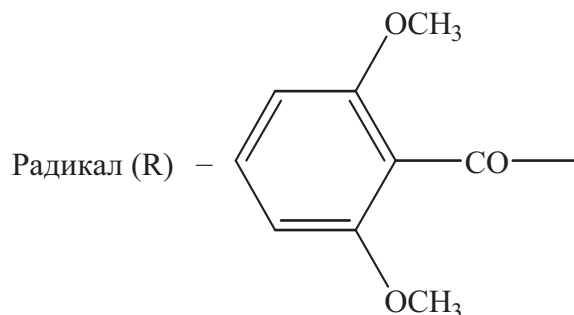
- ампициллин:



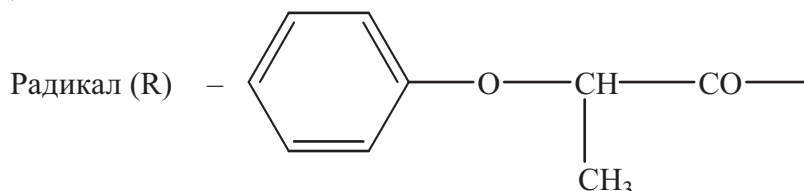
- карбенициллин:



- метициллин:



- фенициллин:



Полусинтетические антибиотики, в отличие от природных, не инактивируются β -лактамазами, которые в молекулах природных антибиотиков расщепляют β -лактамное кольцо. Поскольку этот фермент синтезируется многими микроорганизмами, то они устойчивы к природным пенициллинам, и лечить заболевания, возбудителями которых являются такие микроорганизмы, ими нельзя. Прибегают в данном случае к полусинтетическим антибиотикам.

К настоящему времени выделено и описано более 3000 антибиотиков. Примерно 50 % известных антибиотиков синтезируются штаммами, принадлежащими к актиномицетам, главным образом к одному из родов – роду *Streptomyces*. Большое число антибиотиков является продуктами жизнедеятельности других бактерий, но среди этих антибиотиков лишь немногие нашли пока практическое применение. Почти все антибиотики бактериального происхождения по химической природе являются пептидными. Среди бактерий-продуцентов следует выделить спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis*, которые способны образовывать около 70 различных полипептидных антибиотиков, *Bacillus polymyxa* – 20 антибиотиков, которые относятся к семейству полимиксиновых, *Bacillus bre-*

vis – 23 антибиотика. Антибиотики продуцируются также многими видами плесневых грибов.

Способность к синтезу антибиотиков не является строго специфическим признаком. Один и тот же антибиотик может образовываться микроорганизмами, относящимися к разным видам, родам и даже порядкам. Кроме того, штаммы, принадлежащие к одному виду, могут синтезировать разные антибиотики. Однако, как правило, чем дальше отстоят друг от друга организмы в таксономическом отношении, тем меньше вероятность, что они синтезируют один и тот же тип антибиотика.

Антибиотики в химическом отношении представляют гетерогенную группу соединений:

- молекулярная масса антибиотиков варьирует от 150 до 5000 Да, т. е. это низкомолекулярные вещества;
- молекулы одних антибиотиков состоят только из атомов С и Н, но чаще из С, О, Н и N; другие антибиотики содержат также атомы серы, фосфора и галогенов;
- в молекулах антибиотиков представлены почти все функциональные группы, известные в органической химии (гидроксильная, карбоксильная, карбонильная, азотсодержащие функциональные группы и др.), а также алифатические и алициклические цепи, ароматические кольца и т. д.

Общим для всех антибиотиков является то, что они могут быть получены в кристаллическом виде.

Отличие антибиотиков от других продуктов метаболизма микроорганизмов, также подавляющих рост отдельных видов, как, например, спирты, органические кислоты, пероксиды, состоит в следующем.

Во-первых, антибиотики обладают высокой биологической активностью. Например, для подавления роста грамположительных бактерий (стрептококков, микрококков и др.) требуется концентрация антибиотика эритромицина, равная всего 0,01–0,25 мкг/мл. Конечно, при таких ничтожно малых концентрациях спирта или органической кислоты никакого ингибирующего бактерии эффекта быть не может.

Во-вторых, антибиотики обладают избирательностью биологического действия. Это означает, что не все микроорганизмы чувствительны к конкретному антибиотику. В этой связи микроорганизмы делят на две группы: чувствительные к определенным антибиотикам и резистентные, или устойчивые, к ним.

Антибиотики часто объединяют в группы в зависимости от того, рост каких микроорганизмов они подавляют. Выделяют следующие группы

антибиотиков: противовирусные, антибактериальные, антипротозойные, противогрибковые, противоопухолевые.

Чувствительность различных бактерий к антибиотикам определяется в значительной мере структурой клеточной стенки, поскольку от этого зависит способность антибиотика проникать в бактериальную клетку. В соответствии с активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий антибиотики можно разделить на две группы. Большинство антибиотиков действует на грамположительные бактерии, через клеточную стенку которых эти соединения легче проникают, так как в ней нет дополнительного барьера – наружной мембраны. Такие антибиотики относят к соединениям с узким спектром действия. Антибиотики, активные в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, называются антибиотиками широкого спектра действия.

Бактерицидный или бактериостатический эффект, вызываемый антибиотиками, как правило, связан с нарушением отдельных звеньев метаболизма либо структур бактериальных клеток.

В зависимости от механизма действия антибиотики делят на несколько групп:

- ингибирующие синтез клеточной стенки (пенициллины, бацитрацин, ванкомицин, цефалоспорины и др.);
- нарушающие функционирование цитоплазматической мембраны (грамицидины, валиномицин, полиены, трихомицин и др.);
- подавляющие синтез РНК (рифампицины, стрептоварицины и др.);
- подавляющие синтез ДНК (митомицин С, противоопухолевые, новобиоцин и др.);
- ингибирующие синтез белка (хлорамфеникол, стрептомицин, канамицин, эритромицин, линкомицин, пуромицин, фузидиевая кислота, тетрациклины и др.).

Рассмотрим механизм действия некоторых антибиотиков.

Пенициллин ингибирует синтез муреина, входящего в состав клеточной стенки. В частности, он нарушает образование пептидных связей в процессе синтеза пептидогликана, инактивируя ключевой фермент транспептидазу, ответственный за этот процесс. Синтезируется несшитый пептидогликан, в результате чего образуется «ослабленная» клеточная стенка, не способная выдержать увеличивающееся в результате роста клетки давление, что приводит к разрушению и лизису клеток.

Митомицин С блокирует синтез ДНК за счет того, что его молекулы связываются с ДНК в области репликативной вилки, образуя поперечные

сшивки между цепями и препятствуя их разделению. ДНК-полимераза не может продвигаться по ДНК и осуществлять репликацию.

Актиномицин D связывается с ГЦ-богатыми участками в молекуле ДНК и препятствует перемещению ДНК-зависимой РНК-полимеразы вдоль ДНК-матрицы из-за невозможности локального расплетания цепей и, следовательно, подавляет синтез иРНК.

Рифампицин подавляет синтез всех видов РНК, связываясь с β -субъединицей РНК-полимеразы.

Фузидиевая кислота блокирует функционирование фактора элонгации G, что препятствует транслокации рибосом и, следовательно, нарушает синтез белка.

Аминогликозидные антибиотики (стрептомицин, неомицин, канамицин и т. п.), группа тетрациклинов связываются с 30S-субъединицей рибосом, что прекращает биосинтез белка.

Хлорамфеникол и эритромицин ингибируют реакцию транспептидации, связываясь с 50S-субъединицами рибосом.

Грамицидин A включается в структуру клеточной мембраны, образуя каналы, стенки которых имеют липофильную природу снаружи и гидрофильную внутри, что позволяет катионам выходить из клетки.

Практическое использование антибиотиков заключается в следующем:

- при лечении инфекционных заболеваний человека и животных. Однако они могут оказывать побочное действие: вызывать аллергии, дисбактериоз, анафилактический шок и даже смерть, поэтому принимать антибиотики следует с большой осторожностью;
- для защиты растений от болезней, вызываемых бактериями и грибами;
- для стимуляции роста сельскохозяйственных животных;
- для предотвращения порчи мяса, рыбы и других продуктов;
- в качестве инструментов для исследования специфических функций клетки (синтеза муреина, биосинтеза белка, транспорта ионов через мембрану и т. д.).

ГЛАВА 5. ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБНОГО РОСТА

5.1. Питание микроорганизмов

Питание клеток микроорганизмов – включение в метаболические реакции любого характера тех или иных соединений внешней среды. Питательным веществом следует считать любое химическое вещество, которое способно удовлетворять энергетические потребности клетки либо анаболические функции, либо те и другие. Потребности в питательных веществах у микроорганизмов весьма разнообразны, но тем не менее можно говорить о каких-то общих принципах питания.

Прежде всего, все химические элементы, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов, подразделяют на макро- и микроэлементы. К макроэлементам (биогенным) относятся десять элементов, содержащихся в основных биополимерах всех организмов: С, О, Н, N, S, Р, К, Са, Mg, Fe. Микроэлементы включают в себя Mn, Mo, Zn, Cu, Co, Ni, Ba, В, Cr, Na, Se, Si, W и другие, однако в них нуждаются не все организмы. Из макро- и микроэлементов бактерии синтезируют все вещества, необходимые для построения клетки: белки, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, витамины, липиды и т. д.

Некоторые виды микроорганизмов не способны сами синтезировать отдельные органические вещества: аминокислоты, азотистые основания, витамины, вследствие чего не могут расти при их отсутствии в питательной среде. Такие соединения являются для них **факторами роста**. Микроорганизмы, нуждающиеся в определенном факторе роста, называются **ауксотрофными** в отличие от **прототрофных**, которые способны синтезировать все необходимые для них соединения. Примером природных ауксотрофных микроорганизмов являются молочнокислые бактерии, которые зависят от наличия в среде почти всех аминокислот и витаминов.

По способу поступления питательных веществ в клетки микроорганизмов различают два типа питания: **осмотрофное** и **фаготрофное**. Подавляющее большинство микроорганизмов питается по осмотрофному

типу: поглощают растворенные в воде вещества. Фаготрофное питание у большинства микроорганизмов невозможно, так как их клетки имеют ригидные клеточные стенки, и поэтому они не способны захватывать твердые частицы.

В зависимости от использования источников углерода все микроорганизмы разделяются на автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы (от греч. *autos* – сам, *trophe* – пища, питание) – это микроорганизмы, способные усваивать или фиксировать углекислый газ воздуха в качестве единственного источника углерода и синтезировать из нее органические вещества своих клеток.

Гетеротрофы – организмы, нуждающиеся в готовых органических веществах.

Как автотрофы, так и гетеротрофы подразделяют на две группы в зависимости от того, какой источник энергии они используют: **фототрофы** используют энергию света и трансформируют ее в химическую, **хемотрофы** используют энергию, освобождаемую при реакциях окисления-восстановления.

В зависимости от того, какие питательные вещества – органические или неорганические – являются донорами электронов, все микроорганизмы также подразделяют на две группы. **Органотрофными** являются организмы, использующие в качестве доноров электронов органические соединения, к **литотрофным** относятся организмы, способные использовать в качестве доноров электронов неорганические вещества (H_2 , NH_3 , H_2S , CO , Fe^{2+} и т. д.).

В соответствии с тремя вышеуказанными критериями (источник энергии, источник углерода, донор электронов) все микроорганизмы могут быть разделены на восемь физиологических групп (табл. 6).

Клетки микроорганизмов не могут существовать без кислорода. Основным источником кислорода является вода. Кроме того, он содержится в CO_2 и многих органических соединениях. Многим микроорганизмам помимо этого необходим молекулярный кислород. Главная функция O_2 состоит в том, что он служит конечным акцептором электронов при аэробном дыхании; при этом он восстанавливается до воды. По отношению к молекулярному кислороду все бактерии можно разделить на несколько физиологических групп:

1) **облигатные аэробы** – бактерии, способные получать энергию только путем аэробного дыхания и поэтому нуждающиеся в O_2 . Среди них следует выделить **микроаэрофилы** – бактерии, которые нуждаются в O_2 для получения энергии, но растут только при низком его содержании

Таблица 6

Классификация бактерий по типам питания

| Тип питания | Источник энергии | Донор электронов | Источник углерода | Представители |
|------------------------|--|-------------------------|-----------------------|---|
| Хемолитоавтотрофия | Окислительно-восстановительные реакции | Неорганические вещества | CO ₂ | Нитрифицирующие, тионовые, водородные бактерии, железобактерии |
| Хемолитогетеротрофия | » » | » » | Органические вещества | Метаногенные, сульфатредуцирующие бактерии |
| Хемоорганавтотрофия | » » | Органические вещества | CO ₂ | Факультативные метилотрофные бактерии |
| Хемоорганогетеротрофия | » » | » » | Органические вещества | Большинство бактерий (энтеробактерии, молочнокислые бактерии, маслянокислые бактерии и др.) |
| Фотолитоавтотрофия | Солнечный свет | Неорганические вещества | CO ₂ | Некоторые виды пурпурных и зеленых бактерий, цианобактерий |
| Фотолитогетеротрофия | » » | » » | Органические вещества | Некоторые виды пурпурных и зеленых бактерий |
| Фотоорганавтотрофия | » » | Органические вещества | CO ₂ | Некоторые виды пурпурных бактерий |
| Фотоорганогетеротрофия | » » | » » | Органические вещества | Некоторые виды пурпурных и зеленых бактерий, цианобактерий, галобактерий |

в среде (2–5 %), т. е. более низком, чем содержание кислорода в атмосфере (21 %);

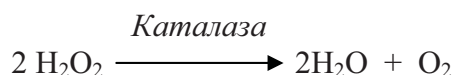
2) **факультативные анаэробы** – бактерии, способные расти как в присутствии, так и в отсутствии O₂. Они могут переключать свой энергетический метаболизм с аэробного дыхания (в присутствии O₂) на брожение или анаэробное дыхание (в отсутствии O₂). Среди факультативных анаэробов следует выделить **аэротолерантные** бактерии, которые могут расти в присутствии атмосферного кислорода, но не способны его использовать в качестве акцепторов электронов, получая энергию исключительно с помощью брожения;

3) **облигатные анаэробы** – могут расти только в среде, лишенной молекулярного кислорода, поскольку он токсичен для них.

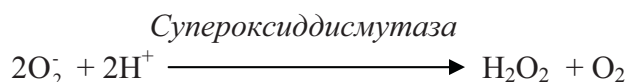
Токсичность молекулярного кислорода для анаэробных бактерий связана с отсутствием в их клетках механизмов, обеспечивающих детоксикацию сильных окислителей, которые образуются в его присутствии в процессе развития.

Установлено, что окисление флавопротеинов или других доноров электронов, а также радиация приводят к восстановлению O_2 , сопровождаемому образованием супероксид-радикалов и пероксид-анионов, которые легко связывают протоны и переходят в пероксид водорода (H_2O_2). В ходе последующих перестроек формируются также очень токсичные гидроксил-радикалы. Все эти формы являются сильными окислителями, способными окислять сульфгидрильные группы ферментов, приводя к их инактивации, а также вызывать повреждения в молекулах ДНК.

Многие клетки синтезируют ферменты каталазу и пероксидазу, защищающие их содержимое от токсичного действия радикалов кислорода:



Супероксиды разлагаются под действием супероксиддисмутазы:



Каталаза и супероксиддисмутаза обычно обнаруживаются в клетках аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и обеспечивают им защиту от токсичного действия активных форм кислорода. Микроаэрофилы могут иметь либо не иметь каталазу (это видоспецифичный признак, используемый в систематике), но обычно содержат супероксиддисмутаза. В противоположность им облигатные анаэробы обычно не синтезируют данные ферменты или образуют их в малых количествах. Поэтому они не способны к детоксикации радикалов кислорода и не могут развиваться в его присутствии.

Одним из основных элементов, из которых построены клетки микроорганизмов, является азот. В расчете на сухое вещество его содержание в клетке составляет около 10 %. В природе азот встречается в форме окисленных и восстановленных соединений, а также в виде молекулярного азота атмосферы. Большинство прокариот потребляют азот в восстанов-

ленной форме в виде солей аммония (NH_4^+) и аммиака (NH_3). Многие бактерии используют органические азотсодержащие вещества – белки, аминокислоты, мочевины, разрушая их с выделением аммиака. Окисленные формы азота – нитраты (NO_3^-) и нитриты (NO_2^-) – также могут усваиваться различными группами бактерий. Некоторые бактерии способны использовать атмосферный азот. Это уникальное свойство характерно для азотфиксирующих микроорганизмов. Среди них выделяют как свободноживущие (бактерии родов *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, некоторые виды родов *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, некоторые цианобактерии, пурпурные бактерии и зеленые серные бактерии и др.), так и симбиотические (бактерии родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Frankia*, некоторые виды родов *Chromatium*, *Klebsiella*, некоторые цианобактерии и др.). В процессе биологической фиксации молекулярный азот восстанавливается до аммиака. Азотфиксирующие бактерии обеспечивают один из необходимых этапов в круговороте азота в природе.

5.2. Закономерности роста популяций микроорганизмов

Под **ростом** понимают согласованное увеличение количества всех химических компонентов, формирующих клеточные структуры. Рост клеток обычно сопровождается увеличением их массы и размеров. Однако эта закономерность наблюдается не всегда, так как в некоторых условиях клетки способны просто накапливать запасные или резервные вещества, т. е. масса может увеличиваться, но роста при этом не наблюдается. В подходящей же среде, к которой бактерии полностью адаптированы, они находятся в состоянии сбалансированного роста. В период сбалансированного роста удвоение биомассы сопровождается удвоением всех других учитываемых параметров популяции, например количества белка, ДНК, РНК и внутриклеточной воды. Иными словами, культуры, растущие сбалансированно, сохраняют постоянный химический состав. В условиях сбалансированного роста легко определить величину скорости роста бактериальной популяции в каждый момент времени, если измерить прирост любого компонента клетки по отношению к его исходному количеству. Таким образом, в культуре, растущей сбалансированно, скорость прироста вещества клеток в любой данный момент пропорциональна числу или массе имеющихся в это время бактерий. Коэффициент пропорциональности называют **удельной скоростью роста** (μ). Данная величина отличается для разных культур, и даже для одной куль-

туры в зависимости от условий выращивания она меняется. Удельную скорость роста можно рассчитать по следующим формулам:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad \text{и} \quad \frac{dX}{dt} = \mu X;$$

где N – число клеток в единице объема; X – масса клеток в единице объема; t – время.

После интегрирования и перехода к десятичным логарифмам получим формулу для определения удельной скорости роста (ч^{-1}):

$$\lg N - \lg N_0 = \frac{\mu (t - t_0)}{2,303}$$

и

$$\mu = \frac{2,303 (\lg N - \lg N_0)}{t - t_0}.$$

Зная удельную скорость роста, можно определить **время генерации** (g – время, необходимое для удвоения числа клеток популяции в часах или минутах):

$$g = \frac{0,693}{\mu}.$$

Если рост клеток в культуре ограничен количеством внесенного в питательную среду компонента, то между его начальной концентрацией и полученной биомассой клеток существует постоянная линейная зависимость (при условии ограничения роста только по одному параметру). Масса клеток, образованная на единицу использованного компонента среды, представляет собой величину, которую называют **экономическим коэффициентом** (или выходом биомассы) – Y . Эту величину определяют по уравнению

$$Y = \frac{X - X_0}{S_0 - S},$$

где X – масса сухого вещества клеток (г/мл культуры), вступившей в стационарную фазу роста; X_0 – масса сухого вещества клеток в 1 мл среды сразу после инокуляции среды; $(X - X_0)$ – урожай бактериальной культуры (урожай зависит от количества и природы используемых питательных веществ, а также от условий культивирования); $(S_0 - S)$ – количество потребленного субстрата (компонента среды).

В лабораторных и промышленных условиях используют два основных способа культивирования микроорганизмов: **периодическое** (статическое) и **непрерывное** (проточное).

Рост бактерий в периодической культуре происходит до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых им компонентов питательной среды не достигнет минимума, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов метаболизма, то получается так называемая периодическая культура (популяция клеток в ограниченном жизненном пространстве).

Зависимость концентрации жизнеспособных клеток при **периодическом культивировании** от длительности инкубирования описывается характерной кривой, которая имеет S-образную форму (рис. 30). На кривой можно различить несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности: начальную (или лаг-) фазу; экспоненциальную, или логарифмическую, фазу; стационарную фазу; фазу отмирания.

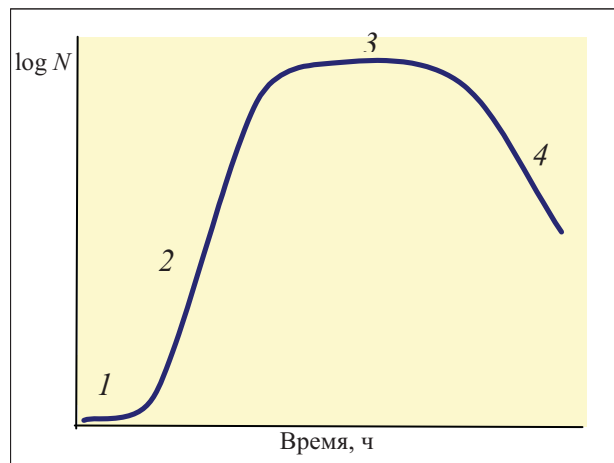


Рис. 31. Кривая роста бактериальной популяции:
1 – лаг-фаза; 2 – экспоненциальная фаза;
3 – стационарная фаза; 4 – фаза отмирания

Лаг-фаза, или **фаза задержанного роста**, охватывает промежуток времени между инокуляцией бактерий и достижением ими максимальной скорости деления. В клетках бактерий в этот период идут в основном процессы, связанные с приспособлением их к условиям культивирования (составу среды, температуре, pH и т. п.). Продолжительность фазы определяется следующими факторами.

- Начальными условиями культивирования вносимого посевного материала. Если источники энергии и углерода в новой среде отличаются от тех, которые были в предшествующей культуре, то для приспособления к новым условиям в клетке должен быть синтезирован набор ферментов, потребность в которых ранее отсутствовала и поэтому они в

ней не синтезировались. Этот процесс индуцируется внесением нового субстрата. Если проанализировать химический состав бактериальной клетки в течение лаг-фазы, то можно отметить, что во время нее происходит быстрое увеличение количества РНК (в 8–12 раз).

- **Возрастом посевного материала:** чем старше культура, которую используют для инокуляции новой питательной среды, тем большее время занимает лаг-фаза, хотя при значительном количестве засеваемого активно делящегося посевного материала культура может развиваться без лаг-фазы.

Во время лаг-фазы деления клеток не происходит, отмечаются лишь процессы, подготавливающие клетку к размножению.

Лаг-фаза переходит в начальную фазу размножения, или фазу ускорения роста, когда клетки начинают делиться с постепенно увеличивающейся скоростью.

Фаза **экспоненциального (логарифмического) роста** характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток и скоростью роста. Для различных видов бактерий эти величины могут варьировать в значительных пределах. Например, бактерии *E. coli* при 37 °С делятся примерно каждые 20 мин, а бактерии родов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* – 5–10 ч. Культуры бактерии *E. coli* вступают в стационарную фазу при концентрации клеток $2-5 \cdot 10^9$ /мл.

Во время экспоненциальной фазы все клетки в популяции имеют приблизительно одинаковый размер, содержат максимальное количество РНК, количество белка в них также максимально и постоянно. Во время экспоненциальной фазы клетки наиболее жизнеспособны и обладают высокой биохимической активностью.

Стационарная фаза наступает тогда, когда число жизнеспособных клеток достигает максимума и не увеличивается, так как скорость размножения бактерий равна скорости их отмирания. В связи с тем, что скорость роста определяется концентрацией субстрата, то еще до его полного использования начинает снижаться и скорость роста, поэтому переход от экспоненциальной фазы к стационарной происходит постепенно. Скорость роста может снижаться не только из-за недостатка субстрата, но и вследствие высокой плотности бактериальной популяции, при низком парциальном давлении кислорода или по причине накопления токсичных продуктов обмена. Все эти факторы обуславливают переход к стационарной фазе. Переход в стационарную фазу включает период несбалансированного роста, когда компоненты клеток синтезируются с различными скоростями, соответственно и содержание отдельных химических веществ в клетках на разных стадиях отличается.

Химический состав клеток зависит от фактора, лимитирующего рост. Клетки в стационарной фазе меньше по размеру, содержат меньше РНК, более устойчивы к различного рода воздействиям (физи-ческим и хими-ческим), чем в экспоненциальной фазе роста культур. В этот период в клетках или в среде культивирования нередко накапливаются продукты вторичного метаболизма (антибиотики, пигменты, бактериоцины и др.). Продолжительность этой фазы может быть от нескольких часов до нескольких дней в зависимости от вида микроорганизма.

В стационарную фазу роста поведение клеток в бактериальной популяции может регулировать явление, которое получило название **апоптоз**. Суть его сводится к тому, что при исчерпании питательного субстрата голодающая популяция бактерий разделяется на две субпопуляции, одна из которых погибает и подвергается автолизу, клетки же другой популяции, используя продукты автолиза как субстрат, продолжают размножаться. Установлен механизм генетического контроля апоптоза у бактерий *E. coli*. Он осуществляется особым опероном *maz*, представленным двумя генами: *mazE* и *mazF*. Продукт гена *mazF* – стабильный цитотоксический белок-киллер, а продукт гена *mazE* – нестабильный белок MazE, разрушающий белок-киллер. Истощение фонда аминокислот в питательной среде приводит к блокированию экспрессии оперона *maz*, в результате синтез белка MazE прекращается и белок-киллер вызывает гибель и автолиз части популяции. В среде пополняется фонд аминокислот, синтез белка MazE у оставшихся живых клеток активируется, и они продолжают размножаться.

В **фазе отмирания** происходит экспоненциальное снижение числа живых клеток. Скорость отмирания бактерий существенно варьирует в зависимости от условий среды и физиологических особенностей организма. Например, энтеробактерии отмирают медленно в отличие от некоторых видов бактерий рода *Bacillus*, скорость гибели которых происходит быстро. Причины отмирания клеток могут быть разными. Это и накопление органических кислот (как у бактерий родов *Escherichia*, *Lactobacillus*), автолиз (лизис над действием собственных ферментов), накопление антибиотиков, бактериоцинов и др.

В условиях **непрерывного (проточного) культивирования** в сосуд, содержащий популяцию бактерий, подается свежая питательная среда и из него одновременно удаляется часть среды с клетками микроорганизмов. Это позволяет на длительное время задержать культуру в состоянии экспоненциального роста.

Проточное культивирование осуществляется в аппаратах (ферментерах) двух типов: хемостатах и турбидостатах. **Хемостат** состоит из со-

суда-культиватора, в который с заданной постоянной скоростью поступает питательная среда. Для равномерного и полного смешения питательных веществ содержимое культиватора механически перемешивается и аэрируется стерильным воздухом. Избыточная биомасса клеток с питательной средой вытекает из культиватора через сливной сифон. В хемостате прирост биомассы прямо пропорционален скорости притока субстрата и удаления продуктов метаболизма. Примером хемостата в природе служит рубец жвачных животных.

Турбидостат представляет собой ферментер, в котором поддерживается заданная плотность клеток за счет определения оптической плотности среды культивирования. Когда количество биомассы увеличивается относительно некоторого выбранного уровня, что фиксируется фотоэлементом, соединенным с системой реле, включается подача свежей питательной среды.

Для глубинного культивирования бактерий с аэрацией в промышленных и лабораторных условиях применяют биореакторы, или ферментеры. Они представляют собой герметические котлы, в которые заливается жидкая питательная среда. Ферментеры снабжены автоматическими приспособлениями, позволяющими поддерживать постоянную температуру, оптимальное значение pH и редокс-потенциал, дозированное поступление необходимых питательных веществ. Кроме того, они снабжены системами перемешивания, аэрирования, охлаждения, пеногашения.

Непрерывное культивирование широко используется в промышленной микробиологии, а также при проведении физиологических, биохимических и генетических исследований, так как в данных условиях наблюдается константная плотность популяции и концентрация всех компонентов питательной среды.

Для изучения процессов обмена веществ на протяжении цикла клеточного деления часто необходимо, чтобы все клетки в популяции делились одновременно (синхронно). Культуры, в которых все клетки находятся на одинаковой стадии клеточного цикла и делятся одновременно, называют **синхронными**. Синхронизировать рост и деление клеток в какой-либо популяции можно различными искусственными приемами, такими как изменение температуры, изменение интенсивности освещения (для фототрофных микроорганизмов), лимитирование количества питательных веществ или фильтрование суспензии клеток микроорганизмов через специальный фильтр, позволяющий отобрать клетки одного размера. Однако в синхронизированном состоянии культура не может находиться длительное время и после двух-трех генераций процесс деления клеток асинхронизируется.

Культивирование иммобилизованных клеток микроорганизмов находит широкое применение в биотехнологии, а именно в производстве ценных органических веществ, в деградации токсичных природных и неприродных соединений, а также промышленных отходов, для очистки сточных вод от загрязнений.

Методы иммобилизации клеток основаны на способности микроорганизмов к адсорбции на твердых поверхностях. Существуют два принципиально различных подхода к иммобилизации: без образования ковалентной связи между клеткой и носителем (физические) и с образованием ковалентной связи между ними (химические).

Химические методы иммобилизации предполагают образование ковалентной связи между какой-либо из функциональных групп на поверхности клетки микроорганизма и материалом носителя. Эти методы применяются сравнительно редко, так как клетки в этом состоянии могут терять нужную активность.

Физические методы иммобилизации реализуются в результате адсорбции микроорганизмов на поверхности различных нерастворимых синтетических или природных пористых материалов, при включении клеток в поры поперечносшитого геля и т. п. Например, при смешивании суспензии клеток с раствором полимера (полиакриламид, агароза и т. п.) с последующей полимеризацией образуется пространственная структура геля с включенными в его ячейки клетками микроорганизмов. В результате микроорганизмы оказываются заключенными в ячейки, которые ограничивают их перемещение, но не препятствуют поступлению питательных веществ и осуществлению каталитических функций.

В настоящее время разрабатываются методы иммобилизации клеток путем их включения в белковые мембраны с использованием коллагена, казеина, миозина и других белков или полипептидов. Мембраны с иммобилизованными клетками сворачивают в рулон и помещают в колонку, через которую пропускают субстрат.

Иммобилизованные клетки сохраняют высокую ферментативную активность, что позволяет использовать их в непрерывно действующих технологических процессах. При этом облегчается выделение продуктов биосинтеза.

5.3. Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях

Для культивирования микроорганизмов используются различные по составу питательные среды, в которых должны содержаться все веществ-

ва, необходимые для роста. В связи с тем что конструктивные и энергетические процессы у микроорганизмов крайне разнообразны, универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех без исключения микроорганизмов, не существует.

Основными компонентами любой питательной среды для культивирования микроорганизмов являются источники углерода и азота. Их количественное отношение определяет специфичность подавляющего большинства сред.

Для культивирования автотрофных микроорганизмов необходимо обеспечить клетки углекислым газом, так как его концентрация в воздухе не превышает 0,03 % и поступление в среду за счет диффузии недостаточно для интенсивного роста микроорганизмов. В среды для культивирования автотрофов вносят чаще всего карбонат кальция (CaCO_3), можно также вносить гидрокарбонат натрия (NaHCO_3) или другие карбонаты. В некоторых случаях через среду продувают воздух, искусственно обогащенный 1–5 % углекислого газа.

Потребности гетеротрофов в углероде не могут быть удовлетворены при использовании CO_2 . Для их развития среда должна содержать источник углерода в виде органических соединений. В зависимости от индивидуальных особенностей микроорганизмы-гетеротрофы способны использовать различные соединения – органические кислоты, спирты, углеводы, углеводороды, ароматические соединения и др. Но в лабораторной практике в качестве источника углерода чаще всего применяют глюкозу, так как это наиболее легко утилизируемое микроорганизмами соединение углерода.

Вторым по значимости компонентом питательной среды является азот. Азот входит в состав органических веществ клетки главным образом в восстановленной форме – в виде амина ($-\text{NH}_2-$)- или имино ($-\text{NH}-$)-групп. Потребности микроорганизмов в источнике азота могут быть удовлетворены различными азотсодержащими соединениями, в которых азот имеет разную степень восстановленности. Для очень многих микроорганизмов это могут быть и соли аммония, которые вносят в среду в виде хлоридов или сульфатов. Однако следует помнить, что аммонийные соли – физиологически кислые вещества, по мере использования иона аммония в среде накапливается анион соответствующей кислоты, что приводит к заметному возрастанию кислотности среды и может отрицательно повлиять на развитие микроорганизмов.

Потребности значительного числа микроорганизмов в азоте могут быть удовлетворены нитратами. Питательные среды для культивирования таких микроорганизмов содержат нитраты в виде солей калия или

натрия. В отличие от солей аммония, нитраты физиологически щелочные соединения, так как при использовании аниона NO_3^- в среде накапливаются катионы K^+ или Na^+ . Нитриты для многих микроорганизмов токсичны, поэтому в качестве источника азота практически не используются.

Наиболее требовательные к азоту микроорганизмы культивируют на питательных средах, содержащих белки или продукты их неполного гидролиза – пептоны. Пептоны представляют собой смесь поли- и олигопептидов, аминокислот, органических азотистых оснований, солей и микроэлементов. Их получают в результате воздействия протеолитическими ферментами на белки животного (мышечный белок, казеин) или растительного (соевая мука) происхождения. Необходимо иметь в виду, что микроорганизмы могут использовать пептон не только как источник азота, но и как источник углерода и энергии.

Кроме источников углерода и азота, микроорганизмам для построения веществ клетки необходимы также соединения серы, фосфора, калия, магния, кальция и других макроэлементов. Все они должны содержаться в питательной среде в доступной для микроорганизмов форме. Потребности в этих элементах удовлетворяются обычно за счет минеральных солей. Так, потребности подавляющего большинства микроорганизмов в сере удовлетворяются сульфатами, хотя в клетке сера находится в основном в восстановленной форме, в виде сульфгидрильных групп. Соли фосфорной кислоты удовлетворяют потребности микроорганизмов в фосфоре. Все необходимые металлы (калий, натрий, кальций, марганец) и другие элементы микроорганизмы получают в форме катионов или анионов неорганических солей. Например, источником магния служит, как правило, MgSO_4 , натрия – NaCl , кальция – CaCO_3 или CaCl_2 .

Помимо макроэлементов, многие микроорганизмы требуют наличия в среде так называемых факторов роста. Факторы роста могут быть двух типов: неорганические и органические. К неорганическим факторам роста относятся микроэлементы – Co , Zn , Mo , Mn , Fe , Cu и др. Они входят в состав активных групп многих ферментов. В качестве органических факторов роста можно выделить витамины, пуриновые, пиримидиновые основания, аминокислоты. Факторы роста добавляют в питательную среду в значительно меньших количествах, чем макроэлементы. Следует помнить, что микроорганизмы усваивают аминокислоты в L-, а не в D-форме.

Потребности микроорганизмов сразу в нескольких аминокислотах часто удовлетворяют, добавляя к среде гидролизат белка. Для получения гидролизатов используют белки животного (мясо, рыбу, желатину, казе-

ин) или растительного (семена сои, подсолнечника, кукурузы) происхождения, а также клетки микроорганизмов (дрожжи, водоросли, бактерии). Гидролиз проводят с использованием протеолитических ферментов, кипячением минеральных кислот или крепких щелочей.

Некоторые натуральные вещества, к числу которых относятся дрожжевой или кукурузный экстракт, содержат сразу несколько различных факторов роста (витамины, минеральные соли, аминокислоты).

Все питательные среды по составу делятся на натуральные и синтетические. **Натуральными** называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения. К средам такого типа относятся овощные или фруктовые соки, ткани животных, молоко, отвары мяса, вытяжки почвы, различные части растений, клетки микроорганизмов. На натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, поскольку такие среды содержат все компоненты, необходимые для их роста и развития. Однако эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав и мало пригодны для изучения обмена веществ микроорганизмов, так как в них трудно учесть потребление ряда компонентов и образование продуктов метаболизма. Натуральные среды используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления биомассы и для диагностических целей.

Синтетические среды – это среды, в которые входят соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах. Они широко используются при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов.

Наряду с натуральными и синтетическими выделяют **полусинтетические среды**. Главными компонентами полусинтетических сред являются соединения известного химического состава – углеводы, соли аммония или нитраты, фосфаты и др. Однако в них всегда включаются вещества неопределенного состава, такие как дрожжевой, почвенный, кукурузный экстракт или гидролизат казеина. Эти среды находят широкое применение в промышленной микробиологии для получения аминокислот, витаминов, антибиотиков и других важных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

По назначению среды подразделяют на селективные и дифференциально-диагностические. **Селективные среды** предназначены для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания. Они обеспечивают преимущественное развитие определенной физиологической группы микроорганизмов. **Дифференциально-диагностические среды** дают возможность быстро отличить одни виды микроорганизмов от других и выявить некоторые их особенности. Эти среды особенно широко приме-

няются в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации микроорганизмов. Примером таких сред являются среды Гисса, которые используются для изучения сахаролитических свойств микроорганизмов, т. е. способности ферментировать те или иные углеводы и спирты.

В состав среды Гисса входит основной фон (пептон и K_2HPO_4), индикатор (бромтимоловый синий, бромкрезоловый пурпурный, Андрее и др.) и один из изучаемых углеводов или спиртов. Различают малый и большой пестрый ряд Гисса. В малый ряд Гисса входят следующие углеводы и спирты: глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза и маннит. В большой пестрый ряд Гисса входят, кроме тех, что образуют малый ряд, другие углеводы и спирты, например арабиноза, рамноза, сорбит, дульцит и т. д. Среда Гисса можно использовать в жидком или полужидком состоянии. В последнем случае к жидкой среде добавляют 0,5 % агара. Рост микроорганизмов на средах Гисса может приводить к накоплению органических кислот, нейтральных продуктов и газов. Выделение этих продуктов регистрируется по изменению pH среды. Например, если среда Гисса содержит индикатор бромтимоловый синий, то цвет ее будет изменяться в зависимости от pH следующим образом: pH = 7,0 – зеленый; pH > 7,0 – синий; pH < 7,0 – желтый.

По физическому состоянию различают жидкие, сыпучие, плотные, или твердые, среды. **Жидкие среды** применяют для накопления биомассы или продуктов обмена, для исследования физиологии и биохимии микроорганизмов. **Сыпучие среды** применяют главным образом в промышленной микробиологии для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений. К таким средам относятся, например, разваренное пшено, отруби и др. **Плотные среды** используют для выделения чистых культур, определения количества жизнеспособных микроорганизмов, хранения культур в коллекциях, для накопления биомассы и др.

В целях уплотнения сред применяют агар, желатину или силикагель (кремнекислый гель). Для уплотнения чаще всего используют агар. Он представляет собой сложный полисахарид, в состав которого входят агароза и агаропектин. Агар получают из красных морских водорослей. Он удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. В воде он образует гель, который плавится примерно при температуре 100 °С и затвердевает при 40 °С. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать микроорганизмы при относительно высокой температуре. Желатина – это экстракт, получаемый из субстратов, богатых коллагеном – белком костей, хрящей, сухожилий,

чешуек. Образующий желатиной гель плавится при температуре 25 °С, которая ниже обычной температуры инкубации многих микроорганизмов (30–37 °С). Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами, которые многие микроорганизмы выделяют в среду. Эти свойства желатины ограничивают ее применение в качестве уплотняющего средства. Силикагель используют как твердую основу для синтетических сред строго определенного состава.

Для жизнедеятельности микроорганизмов существенное значение имеют не только состав питательной среды, но и такие факторы, как плотность среды, аэрация, температура, свет и влажность. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных диапазонах значения каждого фактора, причем для различных групп микроорганизмов они часто неодинаковы.

Так как рН среды имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов, то в приготовленных средах всегда следует определять значение рН, которое может изменяться в процессе стерилизации. Поэтому после стерилизации рН следует повторно проверить и, если это требуется, установить нужное значение, стерильными растворами низкой концентрации кислоты или щелочи. В процессе культивирования микроорганизмов рН среды часто меняется и для того, чтобы не допустить чрезмерного изменения и удержать его на необходимом уровне, используют различные приемы. Иногда в среды добавляют буферные растворы или избыточное количество мела, который нейтрализует образующиеся кислоты. Лучше всего контролировать рН среды в ферментерах, применяемых для проточного культивирования.

Поскольку микроорганизмы по-разному относятся к молекулярному кислороду, это определяет и различия в способах их культивирования.

Культивирование аэробных микроорганизмов проводят следующим образом:

- на поверхности плотных сред или в тонком слое жидких сред, когда микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха;
- в жидких средах (глубинное культивирование). В этом случае микроорганизмы используют растворенный в среде кислород. В связи с низкой растворимостью кислорода, для обеспечения роста аэробных бактерий в толще среды, требуется постоянное аэрирование. Наиболее простой и широко распространенный в лабораторной практике способ глубинного культивирования – выращивание на шейкерах (качалках), обеспечивающих встряхивание колб или пробирок со скоростью 100–200 об/мин и более. Помимо перемешивания, аэрировать культуру

микроорганизмов можно продуванием под давлением через толщу среды стерильного воздуха.

Культивирование анаэробных микроорганизмов более сложно, чем выращивание аэробов, так как здесь должен быть сведен до минимума контакт микроорганизмов с молекулярным кислородом. Для этого используют различные приемы для создания анаэробных условий. Их подразделяют на физические, химические и биологические. Все они основаны на том, что микроорганизмы культивируют в каком-то замкнутом пространстве.

К **физическим методам** создания анаэробных условий относится выращивание микроорганизмов в микроанаэро-статах – вакуумных металлических камерах, снабженных манометром. Анаэро-статом может служить обычный стеклянный эксикатор с притертой крышкой. Из анаэро-стата откачивают воздух, а затем заполняют его газовой смесью, состоящей на 80–90 % из азота и на 10–20 % углекислого газа, до давления порядка 500 мм рт. ст.

К **химическим методам** создания анаэробных условий относится использование химических веществ, поглощающих кислород. В качестве поглотителей кислорода в лабораторной практике применяется щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реагенты. Поглотители помещают на дно химического эксикатора, в который помещают анаэробные микроорганизмы, засеянные в пробирки, колбы или чашки Петри. Эксикатор закрывают притертой крышкой. При этом способе создания анаэробных условий необходимо учитывать поглощающую способность используемых веществ и объем замкнутого пространства, в котором выращивается культура.

Биологический способ создания анаэробных условий заключается в следующем. Питательную среду в чашке Петри разделяют желобком на две половины, на одну половину засевают облигатные аэробные бактерии, а на другую облигатные анаэробные бактерии. Чашку закрывают, зазор между доннышком и крышкой заливают парафином или воском и помещают в термостат с оптимальной для роста микроорганизмов температурой. Вначале наблюдается рост аэробных микроорганизмов (до истощения свободного кислорода), после чего начинается размножение клеток анаэробов.

Для культивирования анаэробных бактерий используют и другие методы, ограничивающие доступ воздуха к растущей культуре:

- выращивание в высоком слое среды;
- выращивание в толще плотной среды;

- культивирование в вязких средах, в которых диффузия молекулярного кислорода в жидкость уменьшается с увеличением ее вязкости;
- заливка среды с посевом высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина.

Глава 6. МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

Энергетический метаболизм (катаболизм) – это совокупность реакций окисления различных восстановленных органических и неорганических соединений, сопровождающихся выделением энергии, аккумулируемой клеткой в форме фосфатных связей.

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

Конструктивный и энергетический метаболизм состоит из ряда последовательных ферментативных реакций, протекание которых условно можно представить следующим образом. На начальном этапе воздействию подвергаются молекулы химических веществ, которые служат исходными субстратами для метаболизма обоих типов. Иногда эту часть метаболического пути называют **периферическим метаболизмом**, а ферменты, катализирующие первые этапы превращения субстрата, – периферическими. Последующие превращения (**промежуточный метаболизм**) включают ряд ферментативных реакций и приводят к синтезу промежуточных продуктов. Образующиеся на последних этапах конечные продукты конструктивных путей используются для построения вещества клеток, а энергетических – выделяются в окружающую среду.

Конструктивные и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. У большинства прокариот они тесно связаны между собой. В процессе анаболизма синтезируются многочисленные ферменты, участвующие в энергетическом метаболизме. С другой стороны, в реакциях

катаболизма образуется не только энергия для биосинтетических целей, но и многие промежуточные продукты, которые необходимы для синтеза веществ, входящих в состав клеточных структур.

Метаболизм прокариот, как энергетический, так и конструктивный, отличается чрезвычайным разнообразием. Это является результатом того, что бактерии в качестве источников энергии и углерода могут использовать самый широкий набор органических и неорганических соединений. Такая способность обусловлена различиями в наборе клеточных периферических ферментов, или **экзоферментов**, относящихся к классу гидролаз, которые выделяются наружу и разрушают макромолекулы исходных субстратов до веществ с низкой молекулярной массой. Образующиеся в результате действия таких ферментов вещества поступают в клетку бактерий и подвергаются действию ферментов промежуточного метаболизма. Эти ферменты называются **эндоферментами**, так как они локализуются внутри клетки. Эндоферменты, синтезируемые микроорганизмами, относятся ко всем известным классам ферментов – оксидоредуктазам, трансферазам, гидролазам, лиазам, изомеразам и др. Многие из эндоферментов локализованы на мембранах или на рибосомах, в таком состоянии они называются связанными ферментами. Другие ферменты находятся в свободном, растворенном состоянии в цитоплазме.

Набор ферментов в клетке может изменяться в зависимости от условий, в которых обитают бактерии, соответственно все ферменты подразделяют на две группы: конститутивные и индуцибельные. **Конститутивные ферменты** синтезируются постоянно, независимо от наличия веществ-субстратов. В клетке они обнаруживаются в более или менее постоянных концентрациях. Примером конститутивного фермента является ДНК-полимераза. **Индукцибельные ферменты** синтезируются в ответ на появление в среде субстрата-индуктора. К ним относится большинство гидролаз. Способность к индукции синтеза таких ферментов обеспечивает быструю приспособляемость бактерий к конкретным условиям.

Таким образом, назначение метаболизма состоит в следующем:

- генерация энергии в молекулах АТФ или других богатых энергией соединениях;
- образование субъединиц, из которых синтезируются макромолекулы основных биополимеров клетки (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, липидов);
- активация образованных субъединиц за счет переноса фосфатной группы с АТФ, происходящая с затратой энергии. Тем не менее этот

процесс необходим, поскольку только активированные субъединицы способны вступать в реакции полимеризации;

- синтез специфических макромолекул из активированных субъединиц, т. е. их полимеризация. Полимеризация активированных субъединиц может происходить двумя способами:

- а) в реакциях матричного синтеза (так синтезируются белки и нуклеиновые кислоты);

- б) за счет простой конденсации одинаковых активированных субъединиц (например, образование молекул крахмала из остатков глюкозы).

6.1. Общая характеристика энергетического метаболизма

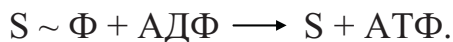
Ранее было отмечено, что по отношению к энергетическим источникам все микроорганизмы подразделяются на две группы: хемотрофные и фототрофные. Хемотрофные микроорганизмы используют для синтеза молекул АТФ энергию, освобождаемую в результате химических реакций, фототрофные – световую энергию в процессе протекания фотосинтеза.

Синтез молекул АТФ из АДФ и фосфатов может происходить двумя способами:

- фосфорилированием в дыхательной или фотосинтетической электронтранспортной цепи. Этот процесс у прокариот связан с мембранами или их производными, поэтому его называют **мембранным фосфорилированием**. Синтез АТФ в данном случае происходит при участии фермента АТФ-синтазы:



- фосфорилированием на уровне субстрата. При этом фосфатная группа переносится на АДФ от вещества (субстрата), более богатого энергией, чем АТФ:



Такой способ синтеза АТФ получил название **субстратного фосфорилирования**. В клетке реакции субстратного фосфорилирования не связаны с мембранными структурами и катализируются растворимыми ферментами промежуточного метаболизма.

У хемотрофных бактерий генерация энергии в молекулах АТФ сводится к двум типам биохимических реакций: окисления и восстановления. Окисляться микроорганизмами могут самые разнообразные органические и неорганические вещества, являющиеся донорами электронов.

Поскольку электроны не могут самостоятельно существовать, они обязательно должны быть перенесены на молекулы, способные их воспринимать. Такие молекулы называются акцепторами электронов. Донором электронов не может быть предельно окисленное вещество, а их акцептором – предельно восстановленное. При биологическом окислении чаще всего происходит одновременный перенос двух электронов; при этом от субстрата отщепляются также два протона (H^+). Такое окисление субстрата, происходящее с отщеплением двух протонов и двух электронов, называется **дегидрированием**. Поэтому нередко термины «донор водорода» и «донор электронов» употребляются как синонимы.

Все окислительно-восстановительные реакции энергетического метаболизма у хемотрофных микроорганизмов можно разделить на три типа:

- аэробное дыхание, или аэробное окисление;
- анаэробное дыхание;
- брожение.

Основной процесс энергетического метаболизма многих прокариот – **аэробное дыхание**, при котором донором водорода или электронов являются органические (реже неорганические) вещества, а конечным акцептором – молекулярный кислород. Основное количество энергии при аэробном дыхании образуется в электронтранспортной цепи, т. е. в результате мембранного фосфорилирования.

Анаэробное дыхание – цепь анаэробных окислительно-восстановительных реакций, которые сводятся к окислению органического или неорганического субстрата с использованием в качестве конечного акцептора электронов не молекулярного кислорода, а других неорганических веществ (нитрата – NO_3^- , нитрита – NO_2^- , сульфата – SO_4^{2-} , сульфита – SO_3^{2-} , CO_2 и др.), а также органических веществ (фумарата и др.). Молекулы АТФ в процессе анаэробного дыхания образуются в основном в электронтранспортной цепи, т. е. в результате реакций мембранного фосфорилирования, но в меньшем количестве, чем при аэробном дыхании.

Брожение – совокупность анаэробных окислительно-восстановительных реакций, при которых органические соединения служат как донорами, так и акцепторами электронов. Как правило, доноры и акцепторы электронов образуются из одного и того же субстрата, подвергающегося брожению (например, из углевода). Сбраживанию могут подвергаться различные субстраты, но лучше других используются углеводы. АТФ при брожении синтезируется в результате реакций субстратного фосфорилирования.

Наиболее выгодным типом окислительно-восстановительных реакций у бактерий, в результате которых генерируется наибольший запас энергии в виде молекул АТФ, является аэробное дыхание. Наименее выгодным типом энергодающих реакций является брожение, сопровождающееся минимальным выходом АТФ.

Поскольку большинство микроорганизмов в качестве источника энергии использует углеводы, и в первую очередь глюкозу, рассмотрим основные пути ее расщепления или катаболизма.

У бактерий возможны три пути катаболизма глюкозы:

1) гликолиз, или фруктозо-1,6-дифосфатный путь, или путь Эмбдена – Мейергофа – Парнаса (по имени исследователей, внесших большой вклад в изучение этого процесса);

2) окислительный пентозофосфатный путь, или гексозомонофосфатный путь, или путь Варбурга – Диккенса – Хореккера;

3) 2-кето-3-дезоксиглюконоатный путь (КДФГ-путь), или путь Энтнера – Дудорова.

Следует отметить, что все перечисленные пути катаболизма глюкозы у микроорганизмов могут протекать при разных типах энергетического метаболизма (аэробное дыхание, анаэробное дыхание, брожение).

Все пути катаболизма начинаются с того, что глюкоза, поступившая в клетку, сначала фосфорилируется при участии фермента гексокиназы и АТФ как донора фосфата. Образуется глюкозо-6-фосфат, который представляет метаболически активную форму глюкозы в клетке и служит исходным соединением для любого из трех путей катаболизма углеводов.

Пути расщепления глюкозы состоят из многих биохимических реакций, каждая из которых катализируется специфическим ферментом.

Наиболее распространенным путем катаболизма глюкозы у многих микроорганизмов является *гликолиз* (рис. 31). При этом глюкозо-6-фосфат изомеризуется с помощью глюкозофосфатизомеразы и фосфорилируется далее в фруктозо-1,6-дифосфат, который затем расщепляется на 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) и фосфодиоксиацетон. Последний под действием фермента триозофосфатизомеразы превращается в 3-ФГА. Таким образом, из одной молекулы глюкозы образуются две молекулы 3-ФГА. На эти реакции превращения глюкозы в 3-ФГА затрачивается энергия двух молекул АТФ. Далее происходит окисление каждой молекулы 3-ФГА до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (1,3-ФГК).

1,3-ФГК – высокоэнергетическое соединение, содержащее макроэргическую фосфатную связь, реагирует с АДФ (фермент фосфоглицераткиназа), отдавая высокоэнергетическую фосфатную группу, в результате чего синтезируется молекула АТФ.

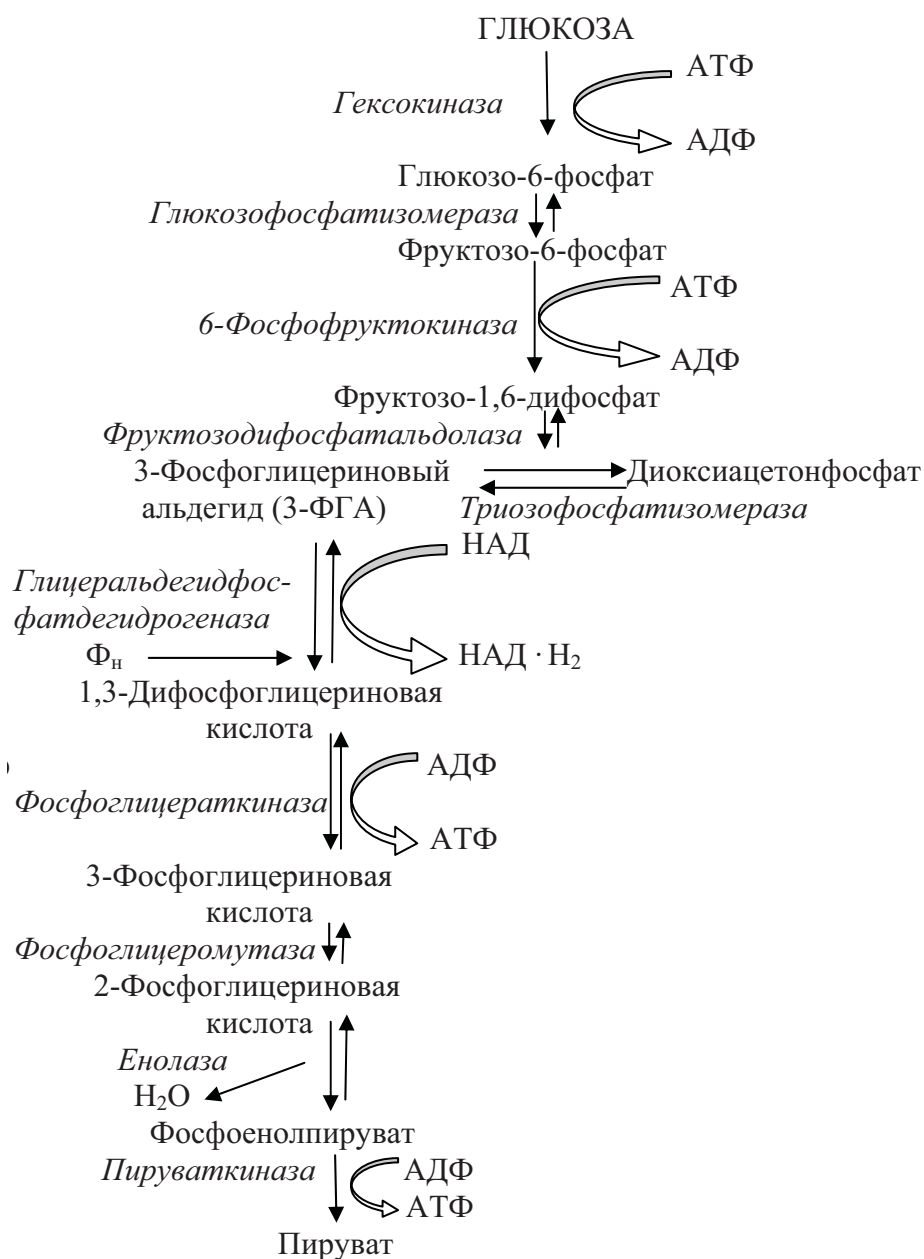
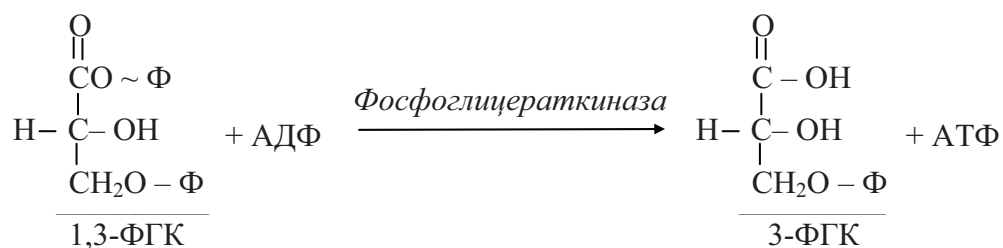
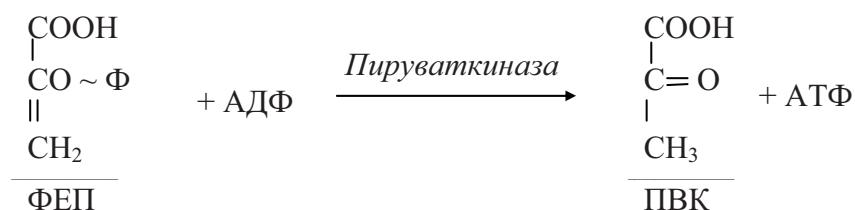


Рис. 31. Гликолитический путь расщепления глюкозы

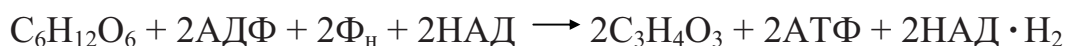
Таким образом, энергия, освободившаяся при окислении 3-ФГА, путем субстратного фосфорилирования оказывается аккумулированной в молекуле АТФ. Образуется 3-фосфоглицериновая кислота (3-ФГК).



Далее 3-ФГК под действием фермента фосфоглицеромутаза превращается в 2-ФГК, из которой в результате отщепления воды образуется фосфоенолпировиноградная кислота (ФЕП). Это также высокоэнергетический фосфат, с которого богатая энергией фосфатная группа переносится пируваткиназой на АДФ, образуется молекула АТФ и пировиноградная кислота (ПВК). Это второе фосфорилирование на уровне субстрата:



Таким образом, при распаде одной молекулы глюкозы образуется четыре молекулы АТФ, в которых аккумулируется освободившаяся энергия. Поскольку в начале процесса на активирование глюкозы были затрачены две молекулы АТФ, чистый выход АТФ на одну молекулу глюкозы составляет две молекулы. Суммарное уравнение гликолиза можно записать следующим образом:



Пентозофосфатный путь расщепления углеводов характерен для некоторых представителей семейства *Enterobacteriaceae*, а также для гетероферментативных молочнокислых бактерий и некоторых маслянокислых бактерий. В этом цикле глюкозо-6-фосфат, образующийся путем активирования глюкозы молекулой АТФ, превращается через ряд промежуточных реакций в 6-фосфоглюконовую кислоту, которая подвергается окислению и декарбоксилированию с образованием рибулозо-5-фосфата, CO_2 и $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$. Рибулозо-5-фосфат включается в сложный цикл, приводящий к образованию из трех его молекул двух молекул глюкозо-6-фосфата и одной молекулы 3-фосфоглицеринового альдегида. Глюкозо-6-фосфат может снова включаться в цикл, а 3-ФГА может быть превращен в пировиноградную кислоту.

С энергетической точки зрения этот путь катаболизма углеводов в 2 раза менее эффективен, чем гликолитический, так как при окислении одной молекулы глюкозы образуется только одна молекула АТФ. Однако большое значение этого пути в том, что он обеспечивает клетки бактерий пентозами (рибулозо-5-фосфатом), которые являются предшественниками нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Кроме того, в этом цикле образуются две молекулы НАДФ · Н₂, которые необходимы клетке для восстановительных реакций биосинтеза.

Путь Энтнера – Дудорова встречается у прокариот реже других. Он характерен в основном для псевдомонад и уксуснокислых бактерий. От пентозофосфатного пути он отличается тем, что 6-фосфоглюконовая кислота превращается в пировиноградную кислоту и 3-ФГА. Последний может превращаться в пировиноградную кислоту. Из одной молекулы глюкозы при функционировании этого пути синтезируется одна молекула АТФ, по одной молекуле НАДФ · Н₂ и НАД · Н₂. Следует подчеркнуть, что путь Энтнера – Дудорова является самым кратчайшим механизмом расщепления углеводов до пировиноградной кислоты.

Сравнительная характеристика различных путей катаболизма глюкозы представлена на рис. 32.

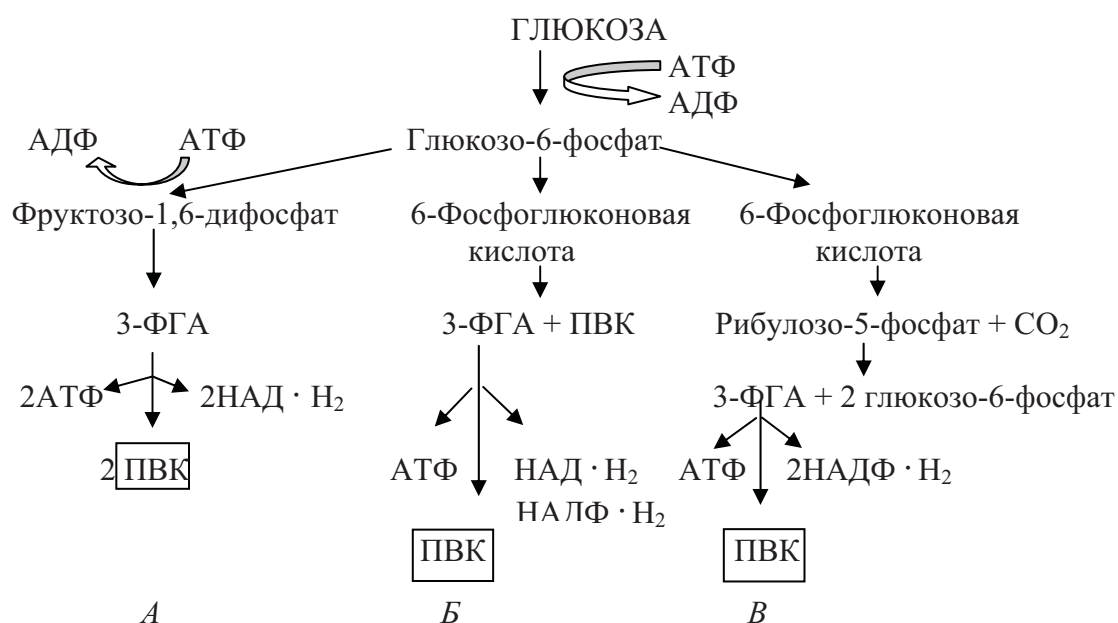


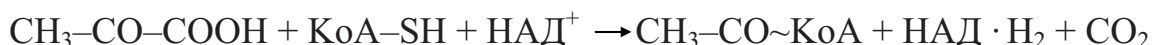
Рис. 32. Схема путей катаболизма глюкозы в клетках прокариот:
А – гликолиз; Б – путь Энтнера – Дудорова; В – пентозофосфатный путь

Таким образом, рассмотрев пути катаболизма глюкозы, мы можем заключить, что важнейшим продуктом, образующимся в них, является пировиноградная кислота, которая подвергается дальнейшим превраще-

ниям. Пируват занимает центральное положение в метаболизме клеток и может служить предшественником многих продуктов.

6.1.1. Аэробное дыхание

Пировиноградная кислота, образующаяся в одном из трех вышеперечисленных путей катаболизма глюкозы, окисляется с участием коэнзима А до ацетил-КоА. В данном процессе работают ферменты пируватдегидрогеназы:



Ацетил-КоА является исходным субстратом цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), или цикла Кребса.

В цикл Кребса включается одна молекула ацетил-КоА, которая в реакции с оксалоацетатом, катализируемой цитратсинтетазой, приводит к образованию лимонной кислоты и свободного коэнзима А. Лимонная кислота с помощью фермента аконитазы превращается в *цис*-акотиновую и изолимонную кислоты. Изолимонная кислота через щавелевоянтарную кислоту превращается в α -кетоглутаровую кислоту, которая подвергается дальнейшему декарбоксилированию.

В конечном итоге окисление ацетил-КоА в ЦТК приводит к образованию двух молекул CO_2 , одной молекулы АТФ и восьми атомов водорода, из которых шесть атомов связаны в молекулах пиридиннуклеотидов и два атома – в молекулах флавопротеинов (рис. 33).

Таким образом, цикл трикарбоновых кислот выполняет функцию конечного окисления органических веществ, обеспечивает образование восстановительных эквивалентов для окислительного фосфорилирования и биосинтетические процессы клетки различными предшественниками, такими как оксалоацетат, сукцинат, α -кетоглутарат и др.

У некоторых бактерий цикл трикарбоновых кислот «разорван». Наиболее часто отсутствует этап превращения α -кетоглутаровой кислоты в янтарную. В таком виде ЦТК не может функционировать в системе энергодающих реакций клетки. Основная функция «разорванного» ЦТК – биосинтетическая.

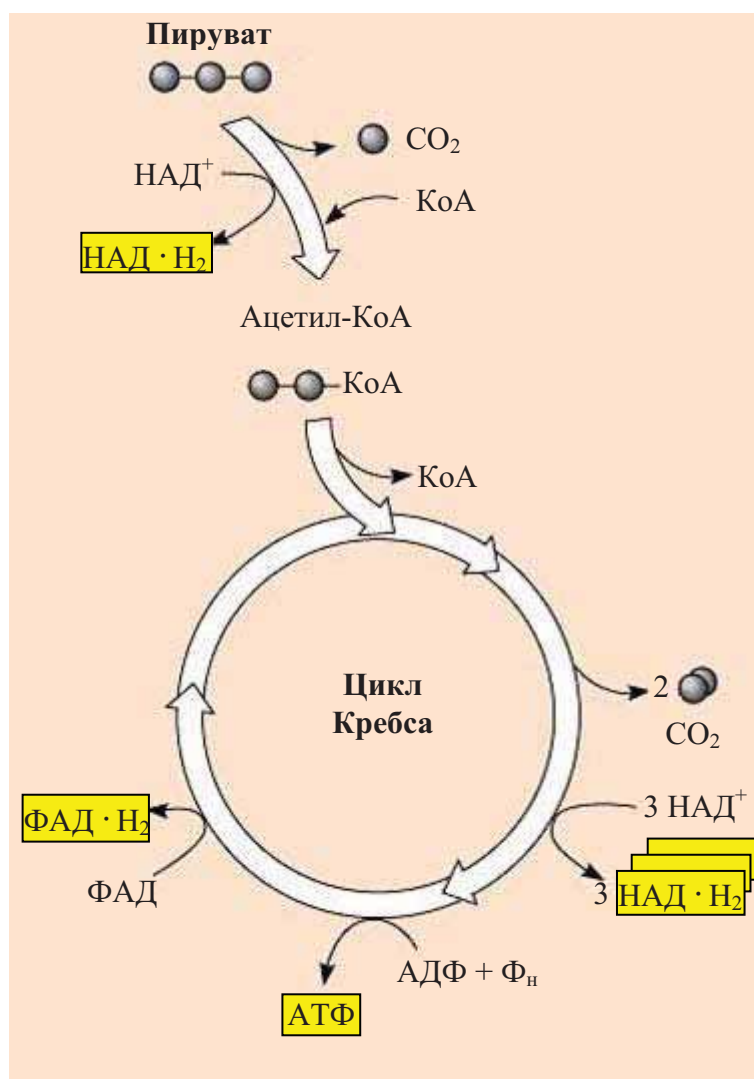


Рис. 33. Цикл Кребса

Образовавшиеся на разных этапах окисления органических веществ $\text{HAD} \cdot \text{H}_2$ и $\text{ФАД} \cdot \text{H}_2$, поступают в дыхательную цепь, которая у бактерий находится в цитоплазматической мембране, а у эукариот – в мембране митохондрий. В дыхательной цепи $\text{HAD} \cdot \text{H}_2$ и $\text{ФАД} \cdot \text{H}_2$ вновь окисляются до HAD и ФАД , а отщепившийся от них водород передается не менее чем через пять переносчиков на заключительный участок цепи, где соединяется с молекулярным кислородом, образуя воду (рис. 34).

Транспорт водорода с участием компонентов дыхательной цепи сопровождается протеканием ряда окислительно-восстановительных реакций. В некоторых из них выделяется достаточно энергии для образования АТФ, и такой процесс носит название **окислительного фосфорилирования**. В реакциях окислительного фосфорилирования принимает уча-

ствие специальный фермент АТФ-синтаза, который катализирует превращение АДФ в АТФ.

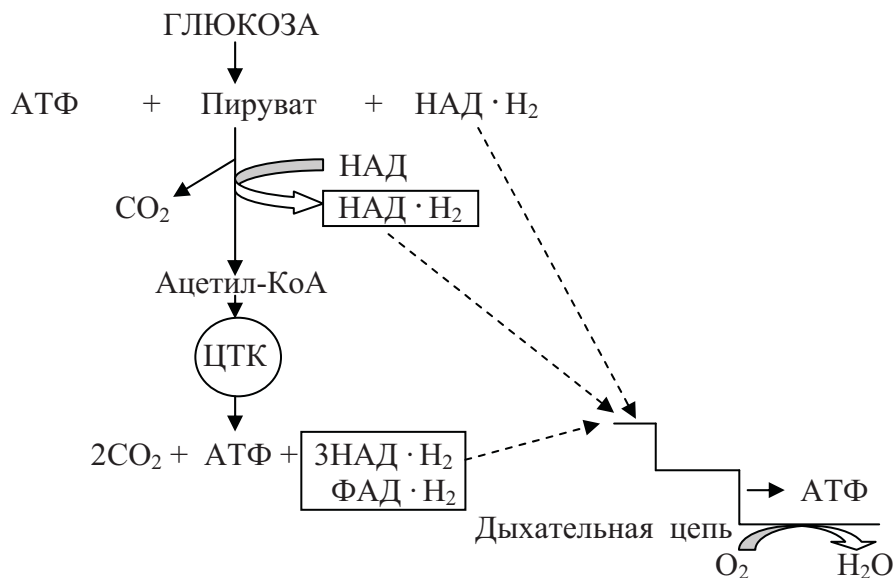


Рис. 34 Схема аэробного дыхания

Дыхательные цепи микроорганизмов состоят из следующих важнейших, локализованных в мембране, переносчиков атомов водорода или электронов: флавопротеинов, железосерных белков, хинонов и цитохромов.

Флавопротеины – коферменты, в состав которых входит витамин В₂, а в качестве простетических групп в них выступают флавинмоноклеотид (ФМН) или флавинадениндуклеотид (ФАД). Флавопротеины осуществляют перенос атомов водорода, т. е. являются дегидрогеназами. Дегидрогеназа, содержащая в качестве простетической группы ФМН, является НАДФ · Н₂-дегидрогеназой. Это стартовый переносчик в дыхательной цепи, осуществляющей перенос водорода с НАДФ · Н₂ на следующие компоненты дыхательной цепи. Дегидрогеназа, содержащая в качестве простетической группы ФАД, действует как сукцинатдегидрогеназа. Она катализирует окисление янтарной кислоты в фумаровую в ЦТК. Атомы водорода от ФАД · Н₂ поступают сразу на хиноны, локализованные на последних этапах электронтранспортной цепи.

Железосерные белки (FeS-белки) содержат железосероцентры, в которых атомы железа связаны, с одной стороны, с серой аминокислоты цистеина, а с другой – с неорганической сульфидной серой (рис. 35).

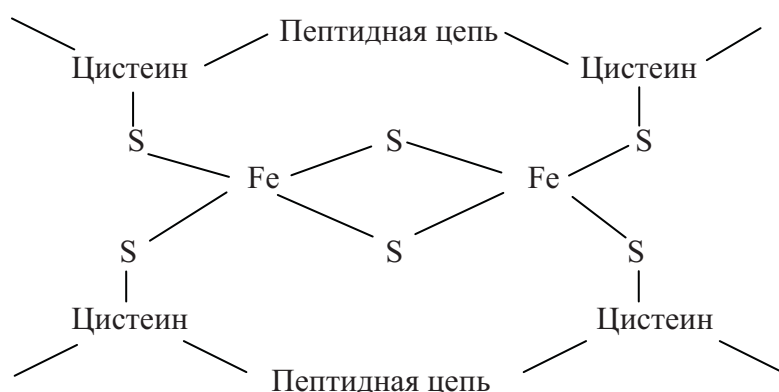


Рис. 35. Железосероцентры (FeS-центры) белков

Железосероцентры входят в состав некоторых флавопротеинов (например, сукцинатдегидрогеназы и НАДФ · Н₂-дегидрогеназы), или же служат в качестве единственных простетических групп белков. Дыхательные цепи содержат большое число FeS-центров. Железосероцентры в зависимости от строения могут осуществлять одновременный перенос одного или двух электронов, что связано с изменением валентности атомов железа.

Хиноны – жирорастворимые соединения. У грамотрицательных бактерий они представлены убихиноном (кофермент Q) или менахином (рис. 36).

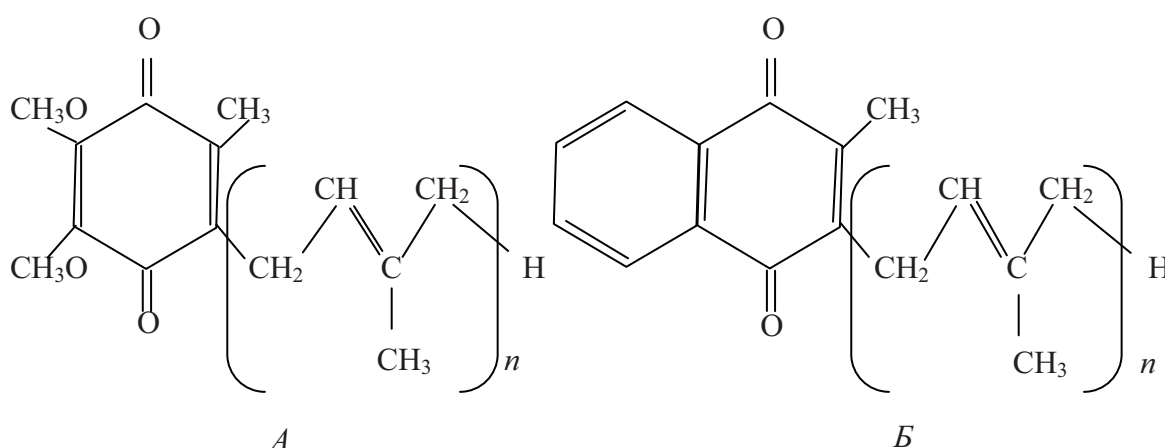


Рис. 36. Хиноны грамотрицательных бактерий:
А – кофермент Q (убихинон); В – менахинон

Хиноны липофильны, и поэтому локализуются в липидной фазе мембраны. Они переносят атомы водорода. По сравнению с другими компонентами дыхательной цепи, хиноны содержатся в 10–15-кратном избытке. Они служат «сборщиками» водорода, поставляемого различными коферментами и простетическими группами в дыхательной цепи, и пере-

дают его цитохромам. Таким образом, они функционируют в дыхательной цепи на участке между флавопротеинами и цитохромами.

Цитохромы принимают участие на заключительном этапе в цепи переноса электронов. К ним электроны поступают от хинонов. В качестве простетической группы цитохромы содержат гем. Цитохромы окрашены; они отличаются друг от друга спектрами поглощения и окислительно-восстановительными потенциалами. Различают цитохромы *a*, *a*₃, *b*, *c*, *o* и ряд других. Наиболее широко распространен цитохром *c*. Он найден почти у всех организмов, обладающих дыхательной цепью. Конечные (терминальные) цитохромы дыхательной цепи – это цитохромы *a* + *a*₃ или цитохромоксидаза. Они передают электроны на молекулярный кислород, т. е. катализируют восстановление молекулярного кислорода до воды. В реакционном центре цитохромоксидазы, помимо двух гемов, содержатся два атома меди.

Дыхательная цепь построена таким образом, что одни ее компоненты переносят только атомы водорода, а другие – только электроны. Причем переносчики атомов водорода и переносчики электронов последовательно чередуются в дыхательной цепи. Флавопротеины и хиноны осуществляют перенос атомов водорода, а FeS-белки и цитохромы – электронов.

В составе дыхательных цепей у микроорганизмов выявлены определенные различия. В качестве примера сравним дыхательные цепи в митохондриях дрожжей (рис. 37) и у бактерий *E. coli* (рис. 38).

Из рис. 37 видно, что митохондриальная дыхательная цепь у дрожжей содержит четыре комплекса:

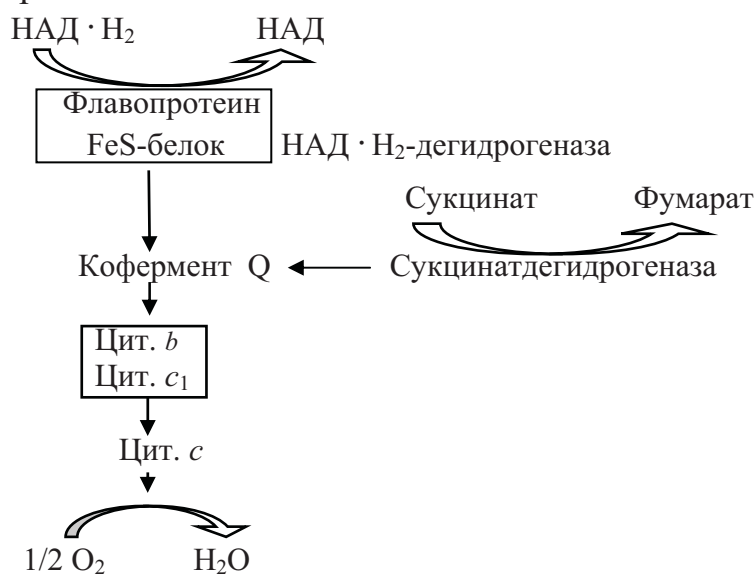


Рис.37. Компоненты дыхательной цепи митохондрий у дрожжей:
цит. – цитохром

- комплекс 1 – НАД · Н₂-дегидрогеназа; в него входят ФМН и железосерные белки; НАД · Н₂-дегидрогеназа переносит водород от НАД · Н₂ к коферменту Q;
- комплекс 2 – сукцинатдегидрогеназа, содержащая ФАД. Она отдает водород в дыхательную цепь на уровне кофермента Q;
- комплекс 3 – цитохром *b* и цитохром *c*₁, принимающие электроны от кофермента Q и передающие их на цитохром *c*;
- комплекс 4 – цитохромоксидаза, осуществляющая перенос электронов на молекулярный кислород.

Дыхательная цепь бактерий *E. coli* по своему составу отличается от дыхательной цепи митохондрий дрожжей:

- в нее не входит цитохром *c*;
- дыхательная цепь у *E. coli* разветвлена.

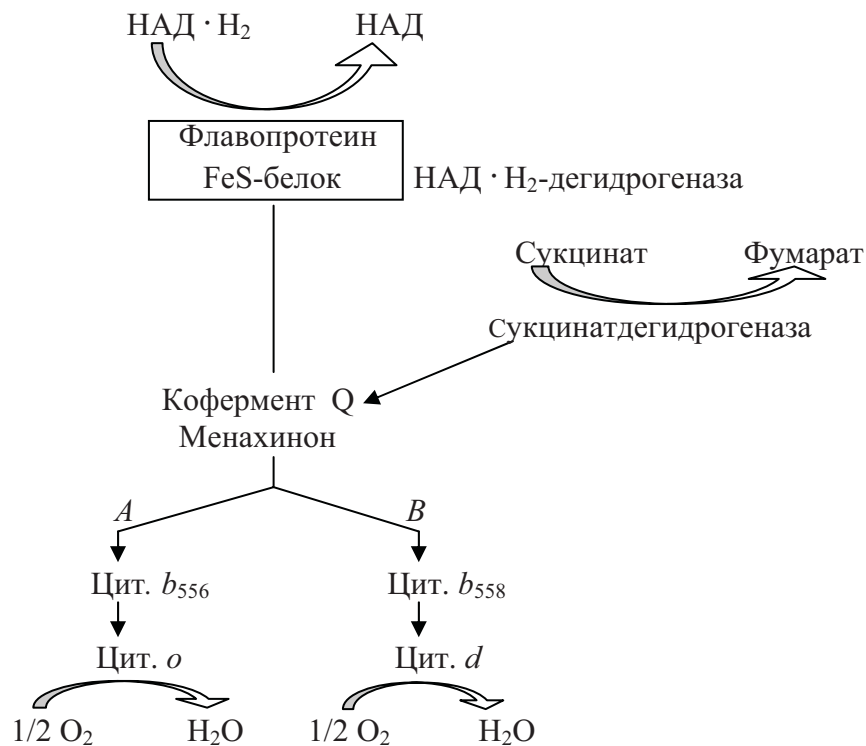


Рис. 38 Компоненты дыхательной цепи бактерий *E. coli*:

A – путь при росте в аэробных условиях; *B* – путь при росте с ограниченным снабжением кислородом

В клетках, растущих в условиях достаточной аэрации, восстановительные эквиваленты передаются к кислороду преимущественно через кофермент Q, цитохром *b*₅₅₆ и цитохром *o*. При ограниченном снабжении кислородом клетки используют в качестве переносчиков электронов менахинон или убихинон и цитохромы *b*₅₅₈ и *d*. В последнем случае образуется меньшее количество АТФ.

Установлено, что в дыхательной цепи митохондрий дрожжей существуют три пункта фосфорилирования, которые соответствуют участкам выхода протонов во внешнюю среду. Первый участок локализован в начале дыхательной цепи и связан с функционированием НАДФ · Н₂-дегидрогеназы. Второй определяется способностью убихинона переносить водород. Последний локализован в конце дыхательной цепи и связан с активностью цитохромоксидазы. Если роль донора водорода выполняет ФАД · Н₂, то возможны только два пункта фосфорилирования, так как при этом выпадает участок дыхательной цепи, где располагается НАДФ · Н₂-дегидрогеназа (рис. 39).

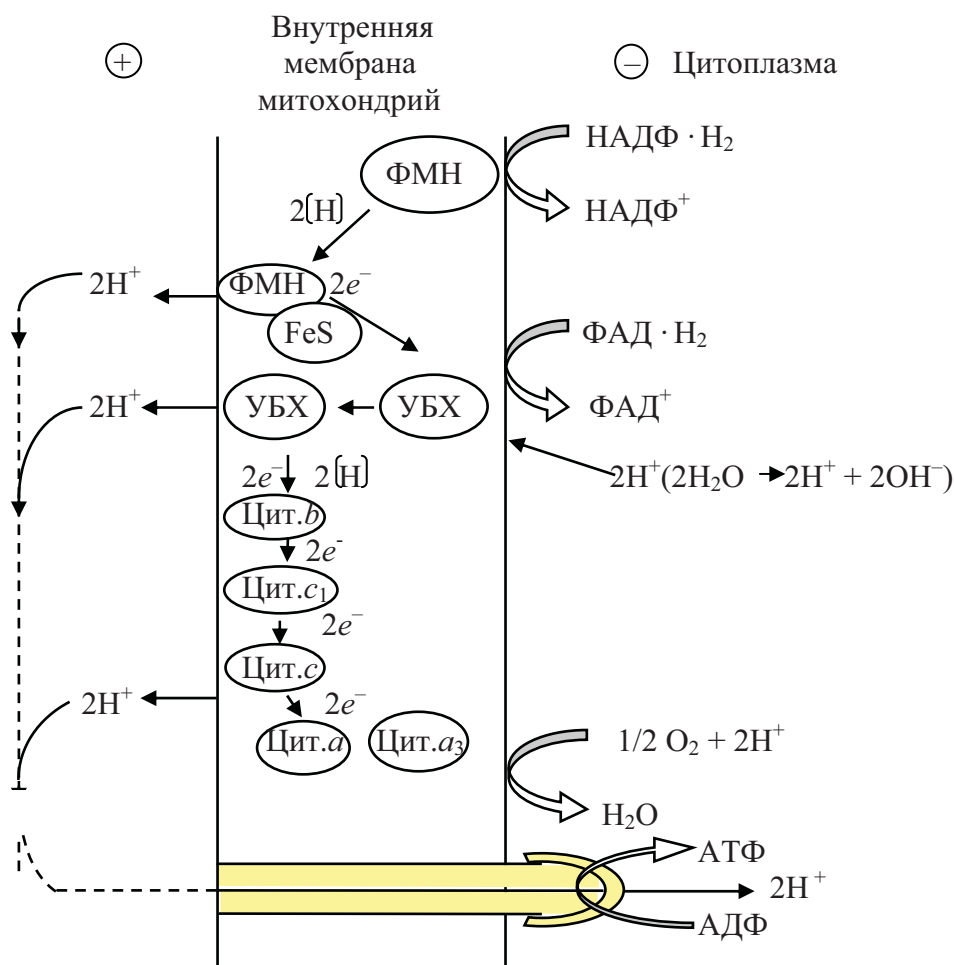


Рис. 39. Функциональная организация компонентов дыхательной цепи митохондрий дрожжей:
УБХ – убихинон

Как видно из рис. 39, связывание протонов происходит на внутренней стороне мембраны, а их освобождение – на наружной. Так как внутренняя мембрана митохондрий и цитоплазматическая мембрана бактерий

непроницаемы для ионов, в том числе и для H^+ , и OH^- , то создается трансмембранный электрохимический, или протонный градиент между наружной и внутренней их сторонами. Протоны могут обратно поступать через мембрану только в определенных местах. В некоторых из них располагаются специфические белки – АТФ-синтазы. АТФ-синтаза – многокомпонентный белковый комплекс, состоящий из гидрофильной головки (5 субъединиц, представленных в различных количественных соотношениях), обращенной в цитоплазму, ножки и основания (3 субъединицы), погруженного в мембрану. В процессе переноса протонов через мембрану АТФ-синтаза катализирует присоединение фосфата к АДФ с отщеплением воды, в результате образуется АТФ. Однако, в настоящее время пока в деталях не ясно, каким образом энергия трансмембранного электрохимического градиента используется в реакциях фосфорилирования.

Установлено, что синтез молекулы АТФ связан с переносом двух протонов через комплекс АТФ-синтазы. Так как при окислении $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ молекулярным кислородом выделяется шесть протонов, то, следовательно, максимальный выход АТФ в этом процессе составляют три молекулы. При окислении $\text{ФАД} \cdot \text{H}_2$, возможны два пункта фосфорилирования.

Теперь подсчитаем, каков энергетический выход при окислении одной молекулы глюкозы при аэробном дыхании у дрожжей:

- в процессе гликолиза образуются по две молекулы АТФ, $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ и пирувата;
- при окислительном декарбоксилировании двух молекул пирувата образуются две молекулы ацетил-КоА и две молекулы $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$;
- окисление двух молекул ацетил-КоА в цикле Кребса приводит к образованию шести молекул $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$, двух молекул $\text{ФАД} \cdot \text{H}_2$ и двух молекул АТФ.

В итоге образуются четыре молекулы АТФ, 10 молекул $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$, две молекулы $\text{ФАД} \cdot \text{H}_2$. Установлено, что при окислении одной молекулы $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ максимально образуются три молекулы АТФ, при окислении одной молекулы $\text{ФАД} \cdot \text{H}_2$ – две молекулы АТФ. Следовательно, при окислении 10 молекул $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ выход составляет 30 молекул АТФ, а двух молекул $\text{ФАД} \cdot \text{H}_2$ – четыре молекулы АТФ.

Суммарный энергетический выход аэробного дыхания у эукариотических микроорганизмов, когда катаболизм глюкозы осуществляется гликолитическим путем, составляет 38 молекул АТФ:



Для аэробных прокариот характерна меньшая степень сопряжения электронного транспорта в дыхательной цепи с фосфорилированием. Рассмотрим на примере бактерий *E. coli*. Как видно из рис. 40, в дыхательной цепи этих бактерий имеются только два пункта, в которых происходит «выброс» протонов, а не три, как в случае митохондриальной цепи у дрожжей. Следовательно, при окислении одной молекулы НАД · Н₂ образуются только две молекулы АТФ, а при окислении молекулы ФАД · Н₂ – одна молекула АТФ.

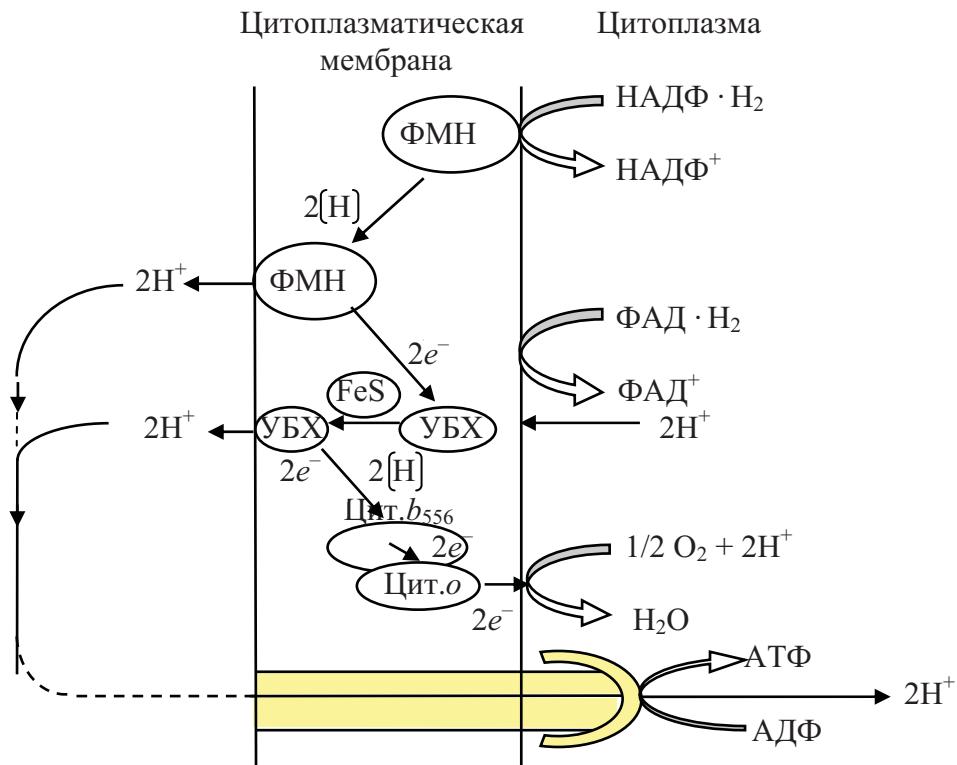


Рис. 40. Функциональная организация компонентов дыхательной цепи бактерий *E. coli*

Таким образом, при аэробном дыхании у бактерий *E. coli*, когда катаболизм глюкозы происходит гликолитическим путем, образуется 26 молекул АТФ:

- две молекулы АТФ синтезируются в гликолизе;
- две молекулы АТФ синтезируются в двух оборотах цикла Кребса;
- 10 молекул НАД · Н₂ приводят к синтезу 20 молекул АТФ;
- две молекулы ФАД · Н₂ приводят к синтезу двух молекул АТФ.

У других прокариот, таких как *Corynebacterium diphtheriae*, в дыхательной цепи имеется только один пункт «выброса» протонов. У *Mycobacterium phlei* – три, как в дыхательной цепи митохондрий дрожжей. Из этого можно сделать вывод, что дыхательные цепи различных бактерий

существенно различаются и они в основном значительно менее энергетически эффективны.

6.1.2. Получение энергии в результате анаэробного дыхания

При анаэробном дыхании конечным акцептором электронов в электронтранспортной цепи являются неорганические или органические соединения. Например, если конечным акцептором электронов является SO_4^{2-} , то процесс называют *сульфатным дыханием*, а бактерии – *сульфатвосстанавливающими* или *сульфатредуцирующими*. В том случае, если конечным акцептором электронов служит NO_3^- или NO_2^- , то процесс называется *нитратным дыханием* или *денитрификацией*, а бактерии, осуществляющие этот процесс, – *денитрифицирующими*. В качестве конечного акцептора электронов может выступать CO_2 , процесс соответственно называют *карбонатным дыханием*, а бактерии – *метаногенными (метанобразующими)*. Одним из немногих примеров, когда конечным акцептором служит органическое вещество, является *фумаратное дыхание*.

Бактерии, способные к анаэробному дыханию, имеют укороченные электронтранспортные, или дыхательные, цепи, т. е. они не содержат всех переносчиков, характерных для дыхательных цепей, функционирующих в аэробных условиях. Кроме того, в дыхательных цепях анаэробов цитохромоксидаза заменена соответствующими редуктазами. У строгих анаэробов не функционирует цикл Кребса или же он разорван и выполняет только биосинтетические, но не энергетические функции. Основное количество молекул АТФ при анаэробном дыхании синтезируется в процессе мембранного фосфорилирования.

По отношению к молекулярному кислороду бактерии, осуществляющие анаэробное дыхание, являются факультативными или облигатными анаэробами. К облигатным анаэробам относятся сульфатвосстанавливающие и метаногенные бактерии. К факультативным анаэробам – денитрифицирующие бактерии и бактерии, осуществляющие фумаратное дыхание. Факультативные анаэробы могут переключать свой энергетический метаболизм с аэробного дыхания в присутствии в среде молекулярного кислорода на анаэробное дыхание в отсутствии молекулярного кислорода.

Выход АТФ при анаэробном дыхании меньше, чем при аэробном, но больше, чем при брожении.

Рассмотрим примеры некоторых основных типов анаэробного дыхания.

Нитратное дыхание, или денитрификация

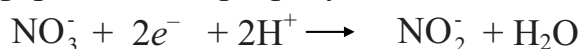
Как уже упоминалось, конечными акцепторами электронов при нитратном дыхании являются нитраты (NO_3^-) или нитриты (NO_2^-). Результатом нитратного дыхания является восстановление NO_3^- или NO_2^- до газообразных продуктов (NO , N_2O или N_2). Следует отметить, что к денитрификации (как, впрочем, и некоторым другим процессам азотного цикла) способны только бактерии, у эукариот эти реакции не происходят.

Суммарную реакцию нитратного дыхания, где окисляемым субстратом является глюкоза, а конечным акцептором электронов – нитраты, можно записать следующим образом:



Полный процесс денитрификации состоит из четырех реакций восстановления, каждая из которых катализируется специфическими мембраносвязанными редуكتазами.

Первый этап: восстановление нитрата до нитрита, катализируют молибденсодержащие ферменты нитратредуктазы:



Второй этап: восстановление нитрита до оксида азота, катализируют нитритредуктазы:



Нитрат- и нитритредуктазы очень чувствительны к молекулярному кислороду, который ингибирует их активность, а также репрессирует синтез. Соответственно данные реакции (восстановление нитрата до нитрита и восстановление нитрита оксида азота) могут протекать только в том случае, когда кислород полностью отсутствует или когда его концентрация незначительна.

Третий этап: восстановление оксида азота до закиси азота, катализируют редуктазы оксида азота:



Четвертый этап: восстановление закиси азота в молекулярный азот, катализируют редуктазы закиси азота:



У денитрифицирующих бактерий, которые являются факультативными анаэробами, функционирует полная электронтранспортная цепь в

случае аэробного дыхания, при наличии O_2 в среде, и укороченная – при анаэробном дыхании, при отсутствии O_2 в среде. Электронтранспортные цепи бактерий-денитрификаторов в анаэробных условиях содержат все основные типы связанных с мембранами переносчиков: флавопротеины, хиноны, цитохромы *b* и *c*. Цитохромоксидазы в этих условиях не синтезируются, а их функции выполняют редуктазы (нитратредуктазы, нитритредуктазы, редуктазы оксида и закиси азота). Установлено, что нитратредуктазы денитрифицирующих бактерий связаны с дыхательной цепью на уровне цитохрома *b*, а нитритредуктазы и редуктазы оксида и закиси азота на уровне цитохрома *c*. Процесс полной денитрификации, когда происходит восстановление NO_3^- до N_2 , транспорт электронов в дыхательной цепи можно представить следующим образом (рис. 41).

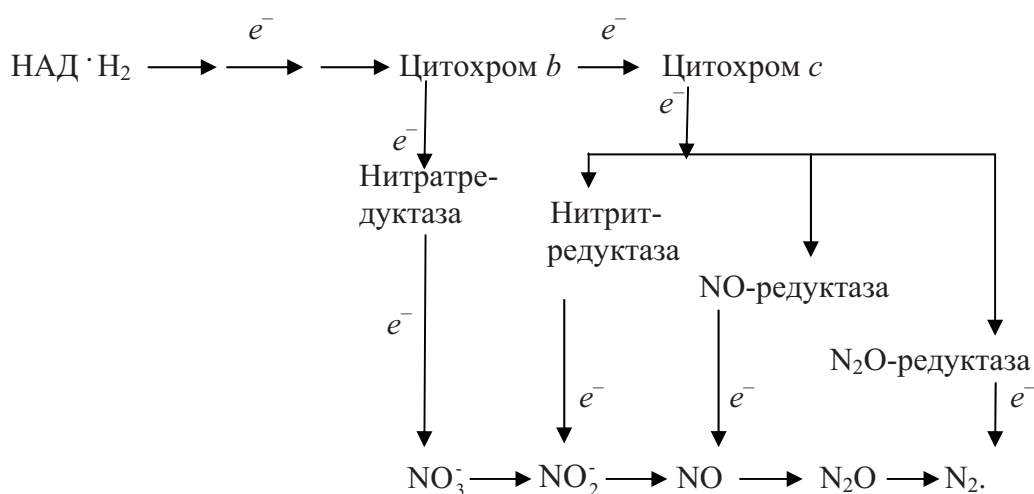
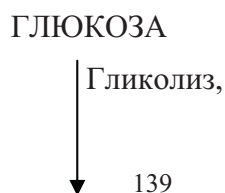


Рис. 41. Транспорт электронов в процессе денитрификации

Количество синтезируемых молекул АТФ зависит от строения дыхательной цепи, наличия и свойств соответствующих редуктаз. При «полной» денитрификации энергии запасается в большем количестве, чем при «усеченной», когда осуществляются только отдельные этапы этого процесса: $NO_3^- \longrightarrow NO_2^-$; $NO \longrightarrow N_2O$; $N_2O \longrightarrow N_2$.

Схематично нитратное дыхание при окислении глюкозы можно представить следующим образом (рис. 42).



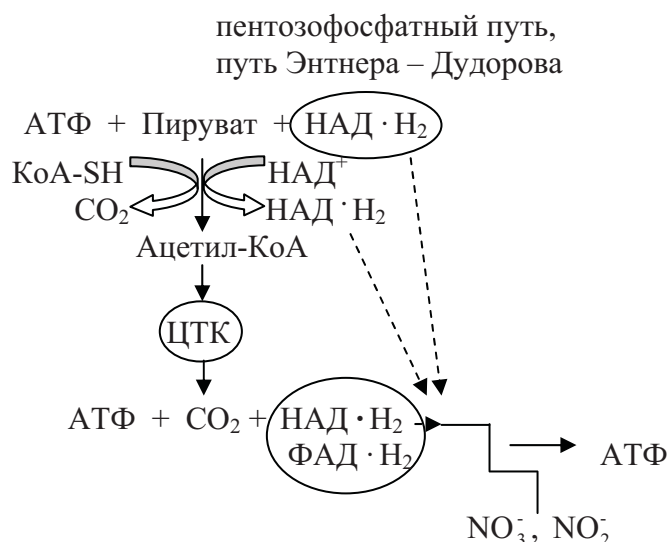


Рис. 42. Схема нитратного дыхания

Денитрифицирующие бактерии широко распространены в природе. Они принадлежат ко всем основным физиологическим группам: фототрофным, хемолитотрофным, грамположительным и грамотрицательным факультативным анаэробам. Однако в большей степени способность к денитрификации распространена у бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Денитрифицирующие бактерии – это обитатели пресных и морских водоемов, почв разного типа, хотя процесс денитрификации у них происходит только в анаэробных условиях, т. е. когда содержание кислорода падает ниже 0,2 %. Этот процесс считается вредным для сельского хозяйства, так как доступные для растений нитраты превращаются в недоступный для них молекулярный азот, что приводит к обеднению почвы азотом. Тем не менее денитрифицирующие бактерии являются важным звеном в круговороте азота в природе, обогащая атмосферу молекулярным азотом. Кроме того, эти бактерии играют положительную роль в очистке подземных вод и почв от накопившихся в результате деятельности человека (внесение высоких доз удобрений, промышленные стоки) нитратов и нитритов, которые в больших концентрациях токсичны для живых организмов. В связи с этим денитрифицирующие бактерии используют для очистки сточных вод от нитратов.

Сульфатное дыхание, или диссимиляционная сульфатредукция

Это процесс окисления в анаэробных условиях субстрата (органических соединений или молекулярного водорода), при котором в качестве конечного акцептора электронов выступает сульфат (SO_4^{2-}), в результате чего происходит его восстановление до H_2S . Бактерии, осуществляющие этот процесс, получили название сульфатвосстанавливающих или сульфатредуцирующих.

Сульфатвосстанавливающие бактерии – строгие анаэробы. Они разнообразны по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам. В настоящее время в состав группы сульфатвосстанавливающих бактерий входит более 40 видов. Все сульфатвосстанавливающие бактерии, за исключением представителей двух родов (*Desulfotomaculum* и *Desulfosarcina*), имеют клеточную стенку грамотрицательного типа. Среди них есть и одноклеточные, и нитчатые формы. К одноклеточным бактериям относятся представители родов *Desulfovibrio* (слегка изогнутые, не образующие эндоспор палочки с полярно расположенным жгутиком) и *Desulfotomaculum* (спорообразующие палочки с перитрихально расположенными жгутиками). Нитчатые формы, для которых характерен скользящий тип движения, представлены бактериями рода *Desulfonema*.

В качестве источника углерода и энергии сульфатвосстанавливающие бактерии используют, главным образом, органические кислоты, в первую очередь пируват и лактат. Некоторые виды могут потреблять также сукцинат, фумарат, малат. Обнаружена способность использовать жирные кислоты, содержащие от 1 до 12–18 атомов углерода, такие как формиат, ацетат, пропионат, бутират. Отдельные сульфатвосстанавливающие бактерии могут использовать спирты (этанол, пропанол, бутанол), некоторые сахара, циклические и C_1 -соединения, холин.

У видов *Desulfonema limicola* и *Desulfosarcina variabilis* обнаружена способность к автотрофии. Причем эти бактерии используют в качестве источника углерода – CO_2 , в качестве источника энергии – молекулярный водород, а в качестве конечного акцептора электронов – SO_4^{2-} .

Сульфатвосстанавливающие бактерии могут получать энергию для роста разными способами. Некоторые виды растут на средах с органическими субстратами без сульфатов. В этом случае единственным источником энергии служит процесс брожения, при котором АТФ синтезируется в реакциях субстратного фосфорилирования. Основными субстратами являются пируват, лактат, этанол, при сбраживании которых выделяется молекулярный водород. Однако специфическим способом получения энергии, послужившим основанием для выделения ряда прокариот

в отдельную физиологическую группу – группу сульфатвосстанавливающих бактерий, является сульфатное дыхание.

Получение энергии в результате сульфатного дыхания, как и при любом типе дыхания, состоит из трех этапов:

- отрыва электронов от энергетического субстрата;
- переноса их по дыхательной цепи;
- присоединения их к веществам, функционирующим в качестве конечных акцепторов электронов.

Этап отрыва электронов от энергетических субстратов катализируют различные субстратные ферменты (лактат-, пируват-, этанолдегидрогеназы) и гидрогеназы. С их помощью электроны передаются сразу в дыхательную цепь. Сульфатвосстанавливающие бактерии содержат ферменты реакций цикла Кребса, но этот цикл «разорван» и функционирует только в условиях конструктивного метаболизма.

В качестве компонентов дыхательной цепи у сульфатвосстанавливающих бактерий идентифицированы флавопротеины, FeS-белки (ферредоксин, рубредоксин), хиноны (типа менахинона), цитохромы *b* и *c*. Особенностью дыхательной цепи многих сульфатвосстанавливающих бактерий является высокое содержание цитохрома *c*₃. Точная локализация компонентов, их последовательность в дыхательной цепи пока достоверно не установлены. Однако установлено, что окисление, в частности H₂, происходит на наружной стороне мембраны, а реакции восстановления SO₄²⁻ – на внутренней. Перенос электронов по дыхательной цепи сопровождается возникновением электрохимического градиента с последующим генерированием энергии в молекулах АТФ.

Последний этап, заключающийся в акцептировании сульфатом электронов с помощью нескольких редуктаз, называется ***собственно диссимиляционной сульфатредукцией***.

У некоторых микроорганизмов, использующих в качестве источника серы сульфаты, происходит ***ассимиляционная сульфатредукция***. При этом происходит восстановление сульфата до сульфида, который затем идет на синтез серосодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин). Основные отличия диссимиляционной сульфатредукции от ассимиляционной сводятся к следующему:

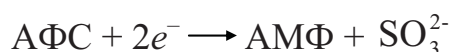
- диссимиляционное восстановление сульфата присуще только узкому кругу высокоспециализированных прокариотических организмов;
- активность процессов диссимиляционной сульфатредукции намного выше, чем ассимиляционных, следствием чего является накопление в среде больших количеств H₂S;
- механизмы обоих процессов различны.

Рассмотрим химизм диссимиляционной сульфатредукции.

Восстановление сульфата начинается с его активирования с участием АТФ в реакции, катализируемой АТФ-зависимой сульфурилазой:



В результате этой реакции образуется аденозинфосфосульфат (АФС) и пиррофосфат (ФФ), последний расщепляется пиррофосфатазой. Аденозинфосфосульфат с помощью аденозинфосфосульфатредуктазы восстанавливается до сульфита, что сопровождается образованием АМФ (аденозинмонофосфата):

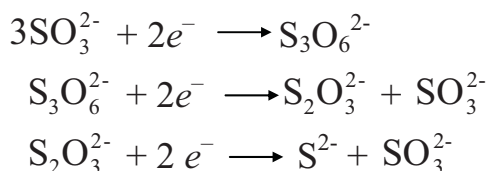


Восстановление сульфита (SO_3^{2-}) до сульфида (S^{2-}) отличается у разных видов бактерий:

- в первом случае сульфит с помощью сульфитредуктазы прямо восстанавливается до сульфида:



- в случае второго механизма происходит последовательное трехступенчатое восстановление сульфита с образованием промежуточных продуктов, таких как тритионат и тиосульфат, при участии сульфит-, тритионат- и тиосульфатредуктазы:



Сульфатвосстанавливающие бактерии распространены в анаэробных зонах водоемов разного типа, почвах и пищеварительном тракте животных. Наиболее интенсивно восстановление сульфатов происходит в соленых озерах и морских лиманах, где почти нет циркуляции воды и содержится много сульфатов, вызывая замор рыбы.

Являясь основными продуцентами сероводорода, сульфатвосстанавливающие бактерии могут приносить вред, вызывая коррозию металлических труб и других подводных и подземных сооружений:



Карбонатное дыхание

Карбонатное дыхание – процесс окисления молекулярного водорода, при котором конечным акцептором электронов является CO_2 . Бактерии, осуществляющие этот процесс, называются метаногенными.

Метаногенные бактерии объединены в одну группу на основании двух общих для всех ее представителей свойств: строгий анаэробизм и способность образовывать метан.

В настоящее время к метаногенным бактериям относятся бактерии более 40 видов. Они объединены в 13 родов, сгруппированы в 6 семейств и 3 порядка.

Среди метаногенных бактерий встречаются прямые или изогнутые палочки разной длины; клетки неправильной или извитой формы. У некоторых видов обнаружена тенденция формировать нити или пакеты клеток. Клетки могут быть неподвижными или передвигающимися с помощью перитрихально или полярно расположенных жгутиков. Обнаружены виды, образующие споры.

Метаногенные бактерии имеют необычный химический состав клеточных стенок. Они не содержат ни ацетилмурамовой кислоты, ни D-аминокислот. У этой группы прокариот описаны клеточные стенки трех типов:

- состоящие из пептидогликана особого химического строения, получившего название псевдомуреин;
- построенные из белковых глобул;
- клеточные стенки гетерополисахаридной природы.

Цитоплазматическая мембрана этих бактерий содержит липиды, представленные простыми эфирами глицерина и терпеноидных спиртов. Сложных эфиров, состоящих из глицерина и жирных кислот, у них не обнаружено.

Другой особенностью метаногенных бактерий является то, что механизм трансляции у них нечувствителен к антибиотикам, подавляющим синтез белка у других прокариот.

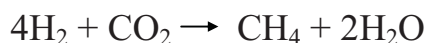
На основании этих, а также других отличительных признаков и в соответствии с современной классификацией метаногенные бактерии относят к классу археобактерий.

Большинство метаногенных бактерий имеет температурный оптимум для роста в области 35–40 °C, но есть виды, у которых он сдвинут в сторону более низких (20–25 °C) или высоких (65–70 °C) температур.

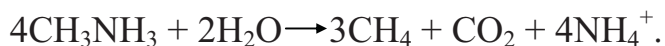
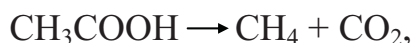
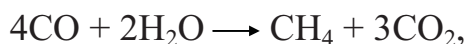
В качестве источника азота метаногенные бактерии используют аммонийный азот или некоторые аминокислоты. Источником серы могут служить сульфаты, сульфиды или серосодержащие аминокислоты.

В качестве источников углерода для биосинтетических целей метаногенные бактерии используют узкий круг соединений. Около половины изученных видов не нуждаются для роста в каких-либо органических соединениях. Они способны расти на синтетических средах, содержащих молекулярный водород и CO_2 . При этом CO_2 служит не только для акцептирования электронов при окислении H_2 , но и единственным источником углерода. У таких автотрофных штаммов ассимиляция CO_2 происходит без участия фермента рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы – ключевого фермента цикла Кальвина. Представители этой группы бактерий ассимилируют молекулы CO_2 с помощью реакций карбоксилирования. Первыми или ранними продуктами этих реакций являются ацетил-КоА и пируват, которые идут на синтез клеточных веществ.

Рассмотрим процесс карбонатного дыхания, т. е. как метаногенные бактерии получают энергию. Метаногенные бактерии в основном получают энергию за счет окисления молекулярного водорода в процессах, сопряженных с восстановлением CO_2 :



Кроме H_2 и CO_2 , многие метаногенные бактерии могут использовать для получения энергии формиат, метанол, ацетат, а также метилированные амины:



Механизм энергетических процессов у метаногенных бактерий полностью еще не изучен, но общие принципиальные его положения установлены. Показано, что получение энергии связано с функционированием электронтранспортной цепи, в которой обнаружены дегидрогеназы (или гидрогеназы), переносчики электронов и редуктазы.

Природа всех переносчиков электронов в дыхательной цепи у метаногенных бактерий пока не установлена, хотя показано, что все изученные метаногенные бактерии имеют необычные по структуре переносчики электронов, содержащие в качестве коферментов и простетических

групп соединений, найденные только у представителей этой группы: фактор F_{420} (производное 5-деазафлавина, назван по максимуму флуоресценции в окисленной форме при 420 мкм), кофермент М (2-меркаптоэтанолсульфат), тетрагидрометанооптерин, метанофуран, фактор F_{430} , фактор F_B , 5-гидроксибензимидазол-гидроксикобамид.

При участии фактора F_{420} , а также гидрогеназы осуществляется одновременный перенос двух электронов от H_2 в реакции, катализируемые редуктазами. Редуктазы связаны с переносчиками дыхательной цепи. При этом образуется ряд промежуточных продуктов. Из рис. 43 видно,

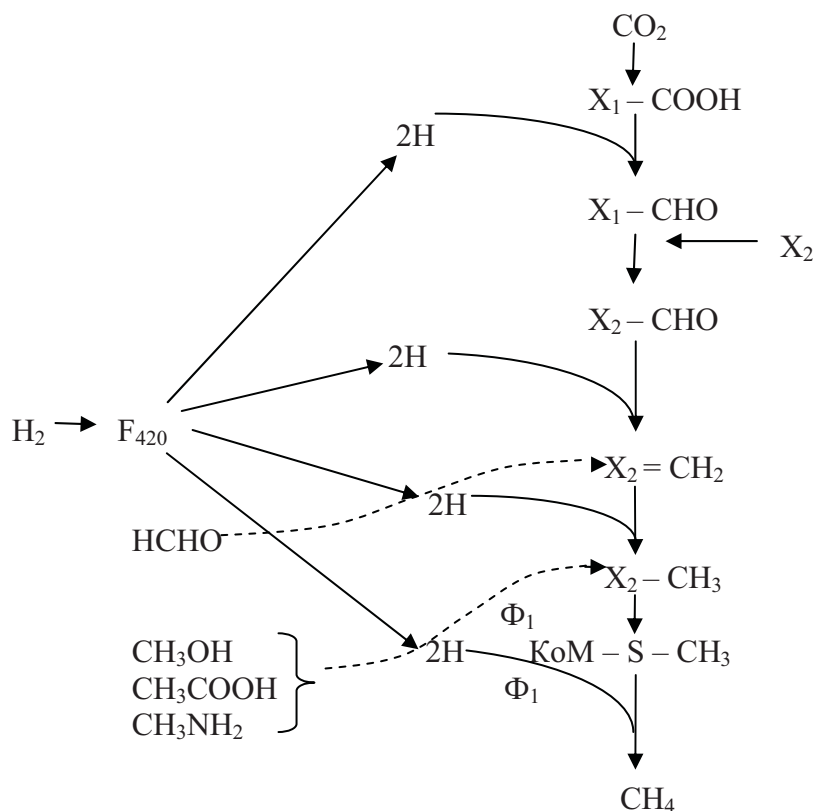


Рис. 43. Схема восстановления CO_2 до CH_4 метаногенными бактериями:
 X_1-COOH – карбоксипроизводная; X_1-CHO – формилпроизводная;
 $X_2=CH_2$ – метиленпроизводная; X_2-CH_3 – метилпроизводная; Φ_1 – метилредуктазная система; $KoM-S-CH_3$ – метилкофермент М

что восстановление CO_2 до CH_4 требует переноса 8 электронов (или 8 атомов водорода), что осуществляется с помощью нескольких редуктаз, т. е. процесс проходит ступенчато. Образующиеся при этом промежуточные продукты остаются связанными с переносчиками в дыхательной цепи неизвестной природы. К настоящему времени идентифицирован только один переносчик – кофермент М (КоМ), участвующий на заключительной стадии образования метана. Этот переносчик присоединяет к

себе метильную группу, образующуюся в результате ступенчатого восстановления CO_2 . Затем с помощью соответствующей редуктазы происходит освобождение молекулы метана.

При восстановлении CO_2 до метана запасается энергия в форме электрохимического ионного потенциала. Фосфорилирование на субстратном уровне у метаногенных организмов отсутствует. Количество образующейся энергии непосредственно зависит от изменяющихся в природных условиях концентраций молекулярного водорода. При оптимальных условиях (концентрация H_2 равна 10^5 Па) количество свободной энергии, высвобождающейся в этом процессе, является достаточным для синтеза 1 моль АТФ/моль CH_4 . Однако в природных местообитаниях метаногенов концентрация H_2 несравнимо ниже (1–10 Па) и поэтому энергии образуется меньше. Такая выраженная зависимость выхода энергии от концентрации H_2 связана с тем, что процесс метаногенеза характеризуется высоким потреблением водорода – 4 моль H_2 /моль CH_4 .

Физиологические свойства метаногенных бактерий (строгий анаэробизм, зависимость от наличия молекулярного водорода) определяют их распространение в природе. Обычными местами обитания этих бактерий является анаэробная зона водоемов, богатых органическими соединениями, иловые отложения озер и рек, болота, заболоченные почвы, осадочные слои морей и океанов. Метаногенные бактерии – типичные обитатели пищеварительного тракта животных и человека и важный компонент микрофлоры рубца жвачных животных.

Метаногенные бактерии представляют значительный практический интерес как продуценты газообразного топлива – метана (биогаза). Они участвуют в разложении органических веществ в отстойниках сточных вод при биологической очистке, в переработке экскрементов животных вместе с отбросами, содержащими целлюлозу, в навозных ямах.

Фумаратное дыхание

Фумаратное дыхание отличается от всех описанных ранее способов анаэробного дыхания следующими особенностями: во-первых, это единственный пример анаэробного дыхания, когда роль конечного акцептора электронов в дыхательной цепи играет органическое вещество (фумаровая кислота); во-вторых, этот тип получения энергии не является единственным возможным для какой-либо определенной таксономической группы бактерий. Во всех известных в настоящее время случаях бактерии, способные осуществлять фумаратное дыхание – хемоорганотрофы, которые обладают также способностью к брожению. Таким образом, исполь-

зование фумарата в качестве акцептора электронов при дыхании является лишь дополнительным механизмом, позволяющим бактериям получать большее количество энергии в анаэробных условиях.

Восстановление фумарата в бактериальных клетках часто сопровождается образованием сукцината, который может выделяться в среду в довольно больших количествах, а бактерии, осуществляющие этот процесс, называют **сукциногенными**. К ним относят, в первую очередь, некоторые виды родов *Bacteroides*, *Fibrobacter*, *Wolinella*. Все они являются микроаэрофилами, способными к аэробному дыханию при низких концентрациях кислорода, но в отсутствии O_2 могут использовать альтернативный акцептор электронов – фумарат.

Кроме сукциногенных бактерий, к фумаратному дыханию способны многие другие хемоорганотрофы, но их метаболизм не сопровождается выделением заметных количеств янтарной кислоты. К числу таких микроорганизмов можно отнести энтеробактерии (роды *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella* и др.), представителей рода *Propionibacterium*. Все перечисленные роды добывают энергию в анаэробных условиях в результате брожения, при этом пропионовокислые бактерии в ходе брожения осуществляют этап фумаратного дыхания. Для перечисленных бактерий добавление фумарата к питательной среде значительно улучшает их рост, что связано с увеличением эффективности синтеза АТФ за счет окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи при восстановлении фумарата.

6.1.3. Получение энергии в результате брожения

По своей биологической сути брожение – это способ получения энергии, при котором АТФ образуется в результате анаэробного окисления органических субстратов в реакциях субстратного фосфорилирования. При брожении продукты расщепления одного органического субстрата могут одновременно служить и донорами, и акцепторами электронов.

При сбраживании углеводов и ряда других веществ образуются (по отдельности или в смеси) такие продукты, как этанол, молочная, муравьиная, янтарная кислоты, ацетон, CO_2 , H_2 и др. В зависимости от того, какие продукты преобладают или являются особенно характерными, различают спиртовое, молочнокислое, муравьинокислое, маслянокислое, пропионовокислое и другие типы брожения.

Спиртовое брожение

Катаболизм глюкозы в этом случае проходит по гликолитическому пути до стадии синтеза пировиноградной кислоты. Далее осуществляется ее декарбоксилирование пируватдекарбоксилазой при участии тиамин-пирофосфата, в результате чего образуются ацетальдегид и CO_2 . Ацетальдегид выступает конечным акцептором водорода. При помощи алкогольдегидрогеназы он восстанавливается до этанола (рис. 44).

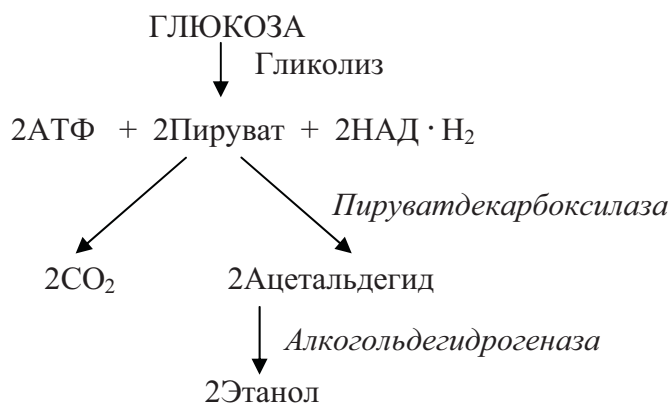


Рис. 44. Схема спиртового брожения

Суммарная реакция процесса спиртового брожения выражается следующим уравнением:



Энергетический выход спиртового брожения составляет две молекулы АТФ на одну молекулу катаболизированной глюкозы.

Типичными возбудителями спиртового брожения являются некоторые виды дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe* и др.) и бактерий (*Erwinia amylovora*, *Sarcina ventriculi*, *Zyotomonas mobilis*). Кроме того, этанол образуют такие мезофильные бактерии, как *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Clostridium sporogenes*, *Spirochaeta aurantia*, а также термофильные бактерии *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *C. thermocellum*.

Спиртовое брожение широко используется для получения технического и пищевого спирта, вина, пива, а также в хлебопечении. В последнем случае значение имеет не образующийся спирт, а углекислый газ, который выделяется в большом количестве и вызывает разрыхление, подъем теста и его специфический запах.

Маслянокислое брожение

Маслянокислое брожение проходит в строго анаэробных условиях и осуществляют его облигатно-анаэробные бактерии рода *Clostridium*. В основе его лежит сбраживание углеводов по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты, которая далее подвергается декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА. Основной продукт брожения – масляная кислота синтезируется в результате конденсации двух молекул ацетил-КоА. Превращение ацетил-КоА в масляную кислоту сопряжено с процессами восстановления, в которых в качестве доноров водорода используются молекулы НАД · Н₂, образующиеся ранее в процессе гликолиза. Кроме того, одна из молекул ацетил-КоА, присоединяя неорганический фосфат, может подвергаться фосфорилированию, превращаясь в ацетилфосфат и далее в ацетат, что сопровождается синтезом АТФ при субстратном фосфорилировании. Это третья молекула АТФ, которая синтезируется при маслянокислом брожении (две другие молекулы АТФ образуются при расщеплении глюкозы по гликолитическому пути) (рис. 45).

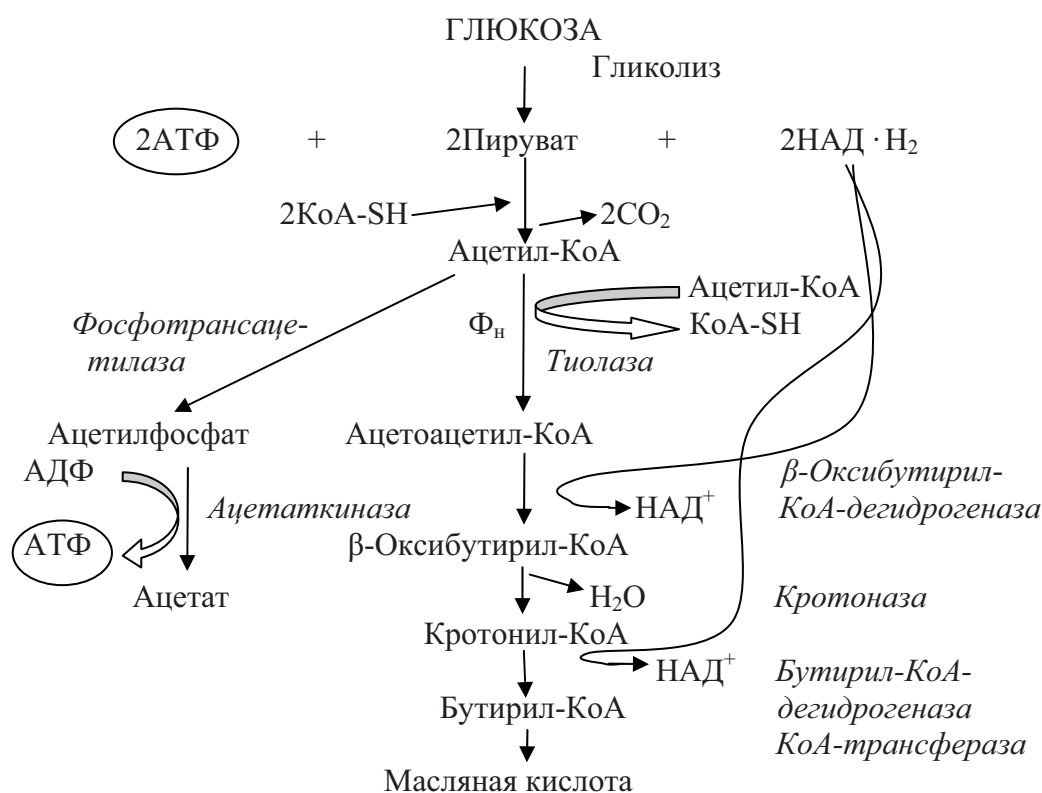


Рис. 45. Схема маслянокислого брожения

Определение энергетического выхода маслянокислого брожения и установление его уравнения затруднено из-за лабильности процесса, состоящего из двух основных ответвлений, одного – окислительного, ве-

дущего к синтезу ацетата и АТФ, другого – восстановительного, функция которого – акцептирование водорода, образующегося в процессе гликолиза. Количественное соотношение между обоими ответвлениями зависит от многих внешних факторов (состав среды, стадия роста бактерий и др.). Расчеты показали, что в целом на одну молекулу сбраживаемой глюкозы в маслянокислом брожении образуется 3,3 молекулы АТФ. Это наиболее высокий энергетический выход брожения, т. е. получения энергии за счет субстратного фосфорилирования.

Маслянокислое брожение имеет практическое применение для получения масляной кислоты, используемой в парфюмерной промышленности. Для ее производства используют картофель, зерно, мелассу (отходы сахарного производства). Маслянокислые бактерии нередко причиняют вред, вызывая порчу продуктов – прогоркание масла, сметаны, квашеных овощей, силоса, а также при недостаточной стерилизации – порчу консервированных грибных и мясных продуктов.

Молочнокислое брожение

Различают два типа молочнокислого брожения: гомоферментативное и гетероферментативное. При гомоферментативном молочнокислом брожении синтезируется практически одна молочная кислота ($\approx 90\%$ всех продуктов брожения). Катаболизм глюкозы в этом случае происходит по гликолитическому пути. Образующаяся при этом пировиноградная кислота не подвергается декарбоксилированию, а под действием лактатдегидрогеназы восстанавливается до молочной кислоты. Конечным акцептором водорода выступает пировиноградная кислота (рис. 46).

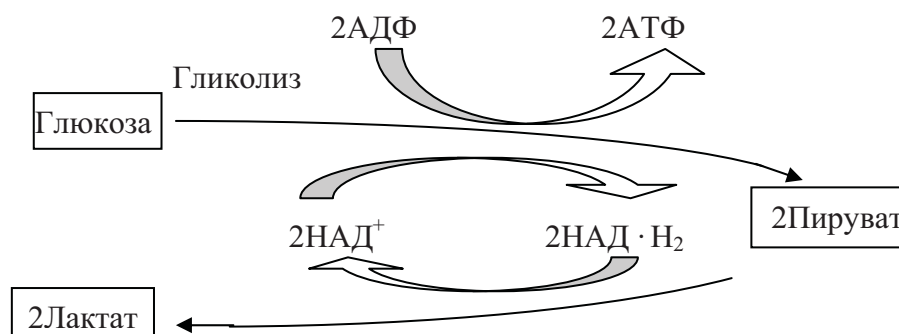


Рис. 46. Схема гомоферментативного молочнокислого брожения

Гомоферментативное молочнокислое брожение идет по следующему суммарному уравнению:



Возбудителями гомоферментативного молочнокислого брожения являются, например, бактерии *Streptococcus cremoris*, *S. lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis* и др.

Гетероферментативное молочнокислое брожение приводит к образованию разнообразных продуктов: молочной и уксусной кислот, этилового спирта, углекислого газа и глицерина. При этом типе брожения расщепление углеводов происходит по пентозофосфатному пути. Конечными акцепторами водорода являются пировиноградная кислота и ацетальдегид. Возбудителями гетероферментативного молочнокислого брожения являются бактерии видов *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus brevis* и др.

Молочнокислые бактерии находят широкое применение в различных отраслях хозяйственной деятельности человека в процессе приготовления кисломолочных продуктов, сырокопченых колбас, квашения овощей и фруктов, в хлебопечении, для силосования кормов, биологической выделки кож и т. п. Они входят в состав нормальной микрофлоры человека и животных. Многие представители патогенны.

Пропионовокислое брожение

Основным продуктом, образующимся при пропионовокислом брожении, является пропионовая кислота. Кроме нее, синтезируются уксусная кислота и CO_2 . Пропионовокислые бактерии расщепляют углеводы по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты, которая подвергается дальнейшим превращениям с образованием пропионовой кислоты, уксусной кислоты и CO_2 :



Поскольку пропионовокислые бактерии развиваются, как правило, в тех же субстратах, что и молочнокислые (рубец и кишечник жвачных животных), то предпочтительным субстратом для окисления является молочная кислота, синтезирующаяся в результате молочнокислого брожения:



Существуют два метаболических пути образования пропионовой кислоты у пропионовокислых бактерий:

- акрилатный путь, в котором лактат в ходе ряда последовательных реакций восстанавливается до пропионата;

- сукцинат-пропионатный путь, в котором лактат превращается в пропионат через стадии образования пирувата и сукцината.

Акрилатный путь присущ, по-видимому, только нескольким видам микроорганизмов (*Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*). Субстратами для данного метаболического пути могут служить L-, D-, или LD-формы лактата. В клетках указанных бактерий присутствует фермент рацемаза, катализирующий взаимопревращения стереоизомеров: L-лактат превращается в L-лактил-КоА, который в результате пока еще не изученных детально реакций превращается в акрилоил-КоА. В свою очередь акрилоил-КоА восстанавливается до пропионил-КоА с дальнейшим образованием пропионата (рис. 47).

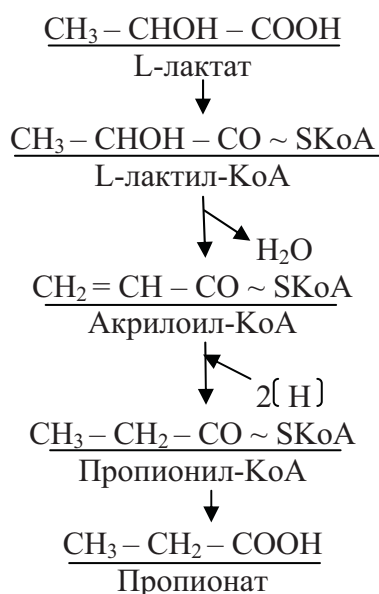


Рис. 47. Акрилатный путь пропионовокислого брожения

Кроме пропионата, в акрилатном типе брожения образуются также ацетат и CO_2 . Выход АТФ составляет одну молекулу на три молекулы потребленного в этом случае лактата.

Сукцинат-пропионатный функционирует у большинства микроорганизмов, образующих пропионат. Сукцинат в этом пути синтезируется как промежуточный продукт, но может продуцироваться также в качестве конечного продукта в малых или больших количествах. С другой стороны, бактерии, использующие акрилатный путь, не образуют скольких-нибудь значительных количеств сукцината.

Этот тип брожения называют еще метилмалонил-КоА-путем, потому что в нем образуется характерный промежуточный продукт – метилмалонил-КоА (рис. 48).

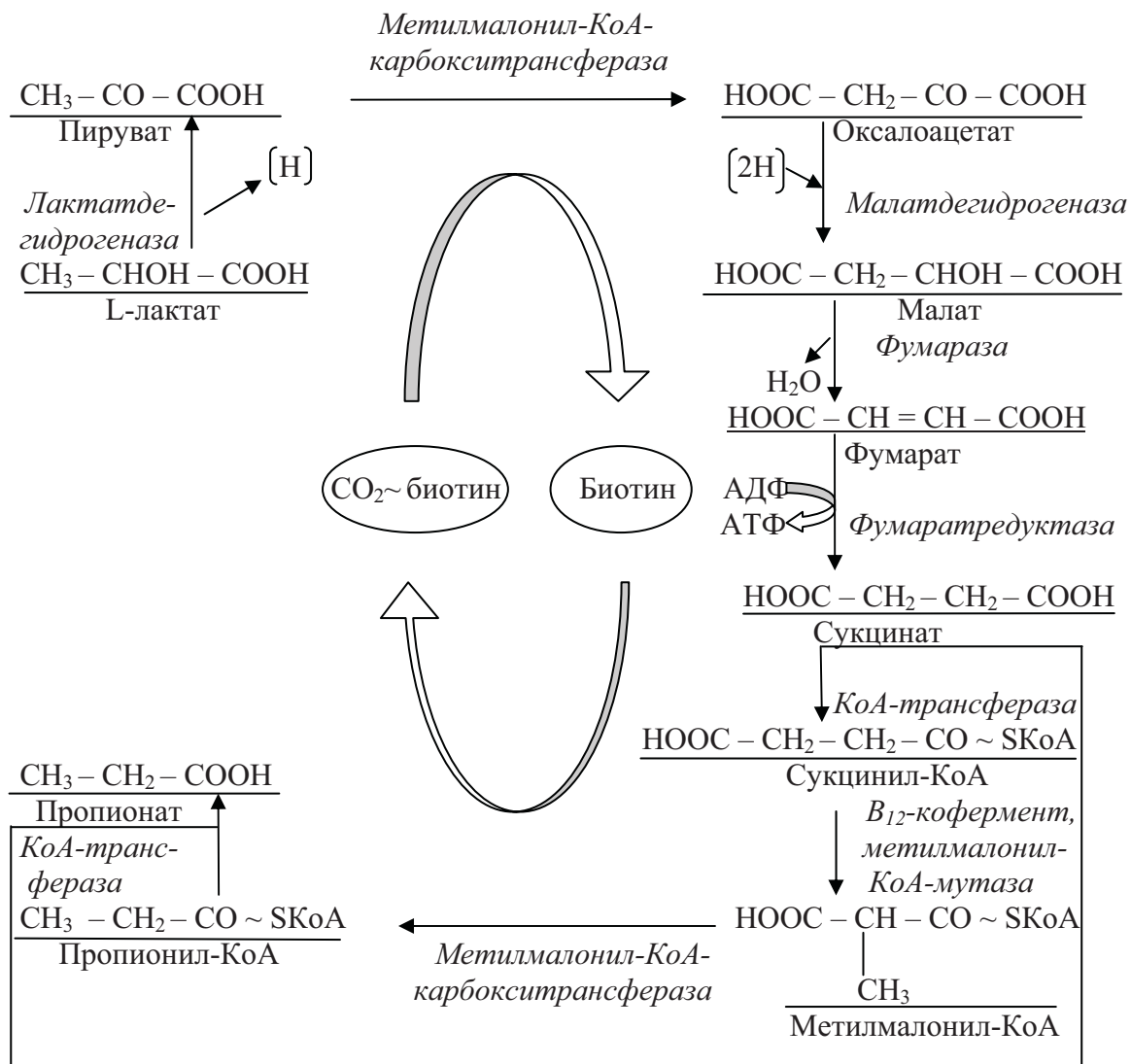


Рис. 48. Метилмалонил-КоА-путь образования пропионовой кислоты бактериями

Исходным соединением при функционировании этого типа брожения является лактат, который окисляется до ПВК. На следующем этапе происходит карбоксилирование ПВК с участием фермента метилмалонил-КоА-карбокситрансферазы и комплекса $\text{CO}_2 \sim \text{биотин}$. Синтезируемый в реакции оксалоацетат восстанавливается до сукцината с образованием промежуточных продуктов малата и фумарата. На этапе превращения фумарата в сукцинат происходит субстратное фосфорилирование, в результате чего образуется молекула АТФ. Затем сукцинат при участии фермента КоА-трансферазы присоединяется к КоА и активируется, образуя сукцинил-КоА. Последний под действием метилмалонил-КоА-мута-

зы и при участии кофактора B_{12} превращается в метилмалонил-КоА, после декарбоксилирования которого образуется пропионил-КоА. Молекула CO_2 связывается с метилмалонил-КоА-карбокситрансферазой, что вновь приводит к образованию комплекса $CO_2 \sim$ биотин. Синтез пропионата происходит в результате реакции переноса КоА от пропионил-КоА на сукцинат при участии фермента КоА-транс-феразы. Таким образом, в процессе образования пропионата КоА и CO_2 переносятся с последующего продукта на предшествующий, не освобождаясь. Следует отметить, что в этом процессе участвуют три кофактора (биотин, КоА и кофермент B_{12}).

Пропионовокислое брожение используется в сыроделии при созревании твердых сыров, которое длится два-три месяца. Источником пропионовокислых бактерий служит сычужный фермент – водный экстракт телячьих желудков. Пропионовокислые бактерии превращают молочную кислоту в пропионовую и уксусную кислоты, придающие сыру острый вкус, а благодаря выделению углекислого газа в сырной массе образуются поры («глазки»). В связи с тем что пропионовокислые бактерии способны накапливать в своих клетках большие количества витамина B_{12} , их также используют для его промышленного получения.

Брожение смешанного типа, или муравьинокислое брожение

Этот вид брожения характерен для энтеробактерий, входящих в семейство *Enterobacteriaceae*. К их числу относят *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Erwinia amylovora*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis* и др.

Энтеробактерии являются факультативными анаэробами: при наличии воздуха они осуществляют аэробное дыхание, а в анаэробных условиях – брожение, продуктами которого являются уксусная, муравьиная, янтарная и молочная кислоты, этанол, ацетоин, 2,3-бутандиол, CO_2 и молекулярный водород. Брожение получило название муравьинокислого, потому что характерным, хотя и не главным продуктом брожения, является муравьиная кислота. Наряду с муравьиной кислотой выделяются и другие продукты, поэтому такой тип брожения еще называют брожением смешанного типа.

При брожении смешанного типа гексозы используются в основном по гликолитическому пути, и только у незначительной части микроорганизмов – по пентозофосфатному пути. Катаболизм глюконата проходит по пути Энтнера – Дудорова.

В зависимости от того, какие продукты образуются при брожении смешанного типа, различают две его разновидности.

1. Брожение, характерное для бактерий родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, при котором образуются главным образом кислоты (молочная, уксусная, янтарная, муравьиная). Кроме органических кислот, выделяются газообразные продукты CO_2 и H_2 (в соотношении 1:1), образуется этанол и совсем не синтезируется 2,3-бутандиол (рис. 49).

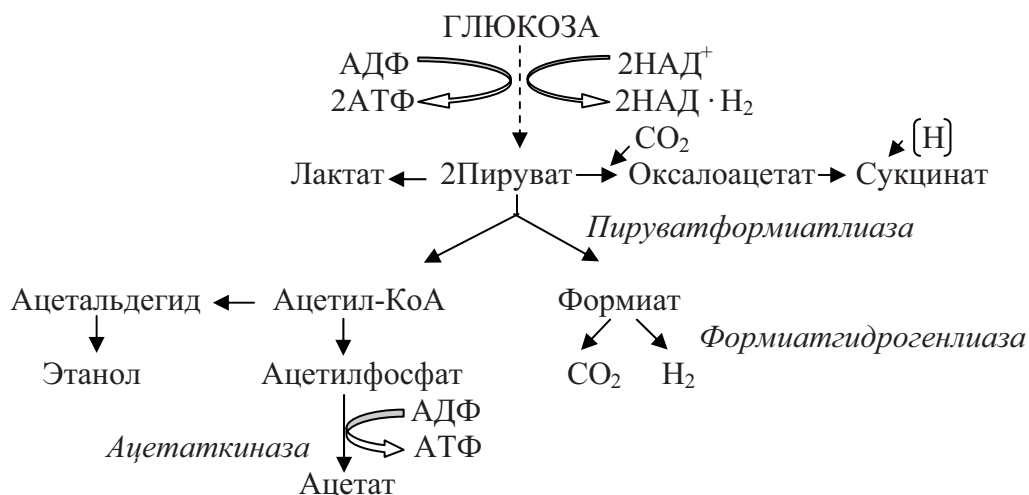


Рис. 51. Брожение смешанного типа, характерное для бактерий родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia*

Выход АТФ в этом случае составляет 2–2,5 молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы. Кроме двух молекул АТФ, образующихся в процессе гликолиза, еще некоторое количество АТФ синтезируется в реакции, катализируемой ацетаткиназой.

2. Брожение, характерное для бактерий родов *Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Erwinia*. При таком брожении органических кислот синтезируется значительно меньше, чем в брожении первого типа, однако больше образуется CO_2 и этанола. Кроме того, основным продуктом такого брожения является 2,3-бутандиол и соответственно этот тип брожения называют иначе **бутандиоловым** (рис. 50).

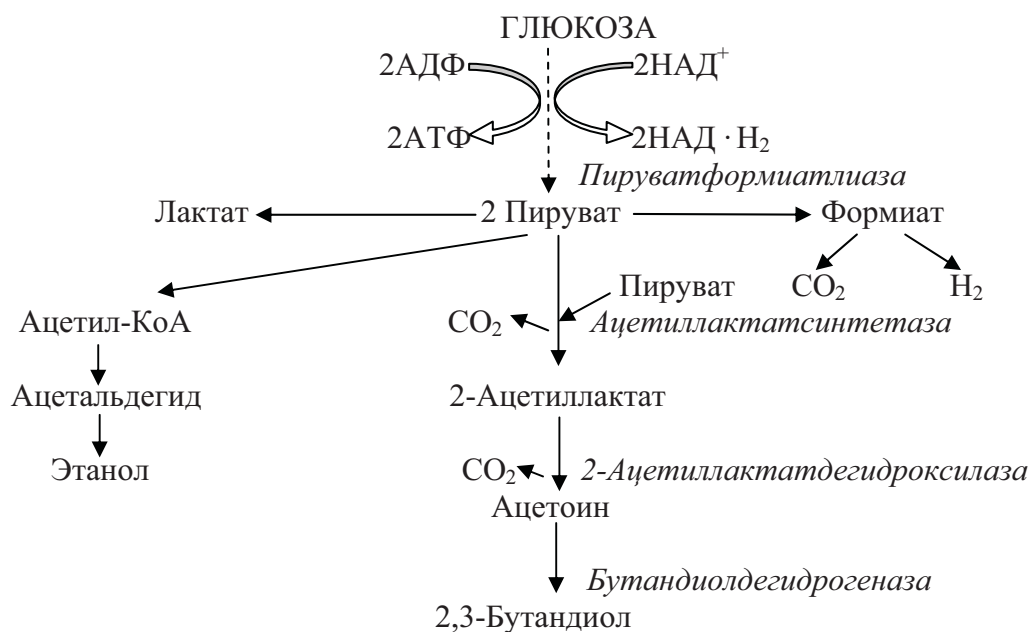


Рис. 50. Бутандиоловое брожение, характерное для бактерий родов *Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Erwinia*

Ацетоин образуется из двух молекул пирувата. Процесс его образования включает двукратное декарбоксилирование и поэтому в бутандиоловом брожении CO_2 выделяется намного больше, чем в предыдущем случае. Но в этом брожении синтезируется меньше кислот, так как образование бутандиола конкурирует за промежуточный продукт – пируват. Выход АТФ – две молекулы на одну молекулу глюкозы.

Таким образом, анализируя рассмотренные типы брожений, можно заключить, что наиболее выгодным для клетки с энергетической точки зрения, является маслянокислое. В этом случае при потреблении одной молекулы глюкозы образуется в среднем 3,3 молекулы АТФ.

6.2. Общая характеристика конструктивного метаболизма

Установлено, что у бактерий *E. coli*, растущих в аэробных условиях на среде с глюкозой, около 50 % глюкозы окисляется до CO_2 . При этом образуются молекулы АТФ, в которых аккумулируется энергия. Остальные 50 % глюкозы используются для построения клеточного материала. На подобные процессы затрачивается большая часть энергии АТФ, образовавшейся в результате аэробного окисления.

Более 95 % клеточного материала бактерий *E. coli* и других микроорганизмов состоит из макромолекул или полимеров: белков, полисахаридов, липидов, РНК, ДНК. На долю белков приходится 52 %, а на долю нуклеиновых кислот – 19 % массы сухого вещества. Около 3 % сухого

вещества клеток составляют низкомолекулярные органические соединения и соли.

Образованию полимеров из глюкозы предшествует синтез составляющих их мономеров: в случае полисахаридов – различных моносахаридов, в случае нуклеиновых кислот – рибо- и дезоксирибонуклеотидов, в случае белков – аминокислот и т. д. (рис. 51)

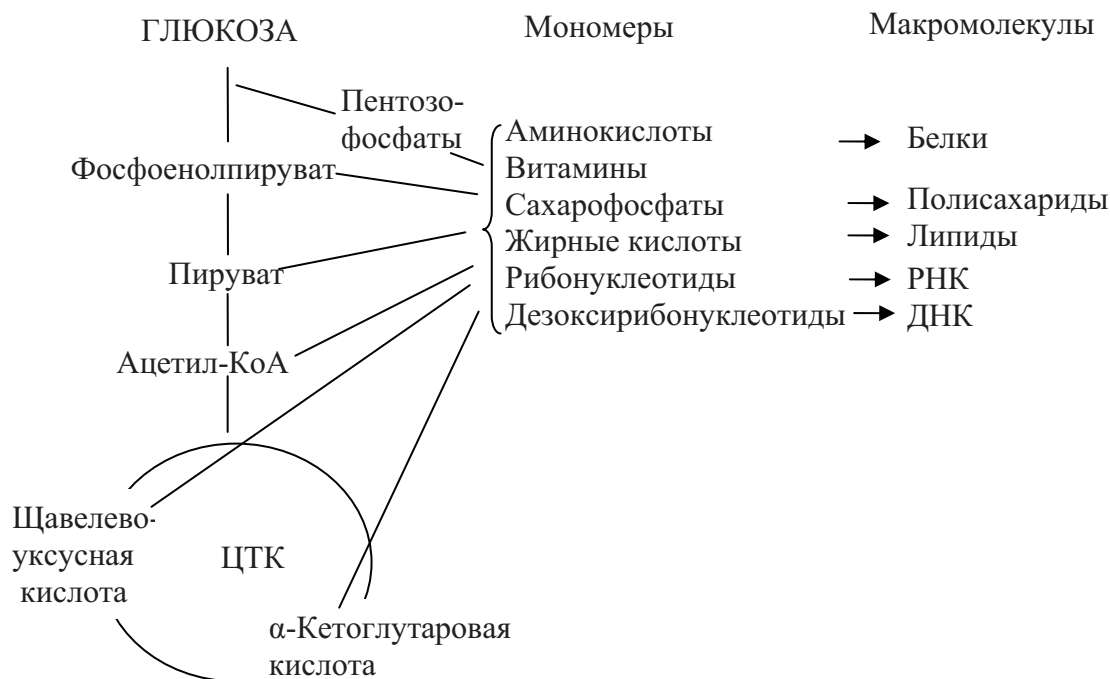


Рис. 51. Общая схема путей биосинтеза клеточного материала из глюкозы

Мономеры синтезируются из промежуточных метаболитов (амфиболитов), которые образуются при катаболизме глюкозы. Такими промежуточными метаболитами являются пентозофосфаты, фосфоенолпируват, пируват, ацетил-КоА, щавелевоуксусная и α-кетоглутаровая кислоты. Они являются исходным материалом для синтеза всех необходимых клетке аминокислот, витаминов, сахарофосфатов, жирных кислот, рибо- и дезоксирибонуклеотидов, которые образуются в реакции полимеризации.

6.2.1. Биосинтез аминокислот

Большинство бактерий способно синтезировать все аминокислоты, входящие в состав клеточных белков. Предшественниками для синтеза аминокислот служат промежуточные продукты метаболизма, такие ки-

слоты, как α -кетоглутаровая, щавелевоуксусная, пировиноградная, 3-фосфоглицериновая и другие соединения.

Особенностью биосинтеза аминокислот является использование общих биосинтетических путей. Входящих в состав белков 20 аминокислот, в зависимости от исходных метаболитов для их синтеза можно сгруппировать в шесть семейств (табл.7).

Таблица 7

Предшественники для биосинтеза аминокислот

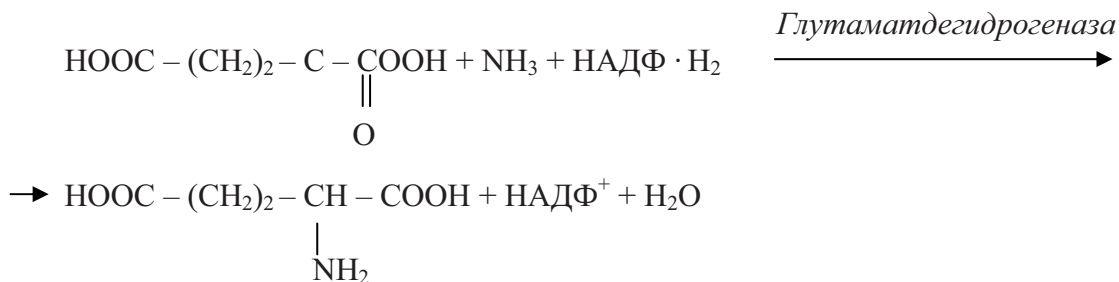
| Предшественник | Метаболический путь, приводящий к образованию предшественника | Аминокислоты с общими биосинтетическими путями |
|--|--|---|
| Пировиноградная кислота | Гликолиз, путь Энтнера – Дудорова, окислительный пентозофосфатный путь | Аланин Валин Лейцин |
| Щавелевоуксусная кислота | Цикл Кребса, реакции карбоксилирования | Аспарагиновая кислота Аспарагин Лизин Метионин Треонин Изолейцин |
| α -Кетоглутаровая кислота | Цикл Кребса | Глутаминовая кислота Глутамин Аргинин Пролин |
| 3-Фосфоглицериновая кислота | Гликолиз, цикл Кальвина | Серин Глицин Цистеин |
| Фосфоенолпировиноградная кислота + эритрозо-4-фосфат | Гликолиз Окислительный пентозофосфатный путь | Фенилаланин Триптофан Тирозин |
| 5-Фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ | Окислительный пентозофосфатный путь | Гистидин |

Как видно из табл. 7, щавелевоуксусная кислота представляет собой отправную точку для синтеза шести аминокислот, α -кетоглутаровая кислота является предшественником четырех, а пировиноградная и 3-фосфоглицериновая – трех аминокислот.

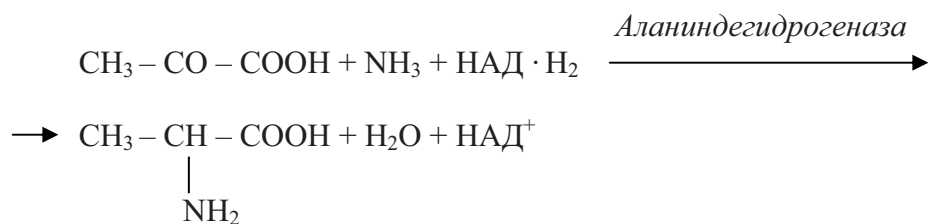
Источником азота для аминокислот у разных групп бактерий являются нитраты, нитриты, молекулярный азот, аммиак. Перевод неорганического азота в органические соединения происходит всегда через образование аммиака, и поэтому нитраты, нитриты, молекулярный азот предва-

рительно восстанавливаются до аммиака и только после этого включаются в состав органических соединений.

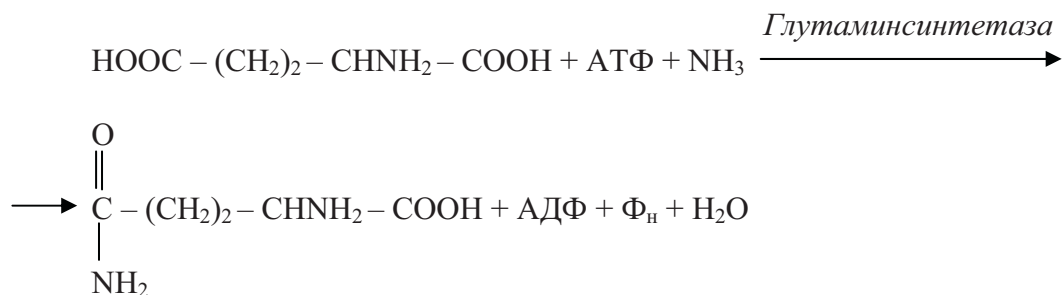
Биосинтез аминокислот происходит различными путями. Наиболее простой способ – **восстановительное аминирование кетокислот аммиаком**. Например, при взаимодействии α -кетоглутаровой кислоты с аммиаком при участии фермента глутаматдегидрогеназы образуется глутаминовая кислота:



При участии фермента аланиндегидрогеназы пировиноградная кислота взаимодействует с аммиаком с образованием аланина:

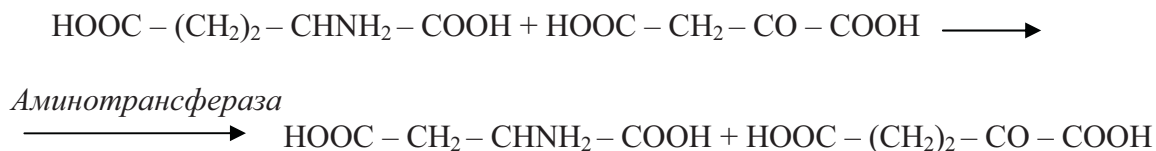


Некоторые аминокислоты образуются путем **амидирования**. Например, из глутаминовой кислоты с участием фермента глутаминсинтетазы образуется глутамин:



Большинство же аминокислот получает аминогруппу от одной из первичных аминокислот в результате **трансаминирования**, или **переаминирования**. Из свободных аминокислот в цитоплазме бактерий количественно преобладает глутаминовая кислота. Она служит донором аминогрупп при биосинтезе многих аминокислот. Так, глутаминовая кислота, взаимодействуя со щавелевоуксусной кислотой при участии фермента

аминотрансферазы, обеспечивает образование аспарагиновой кислоты. Отдав аминогруппу, глутаминовая кислота превращается в α -кетоглутаровую, которая выступает в качестве стартового вещества для синтеза глутаминовой кислоты:



Пути биосинтеза некоторых аминокислот очень сложны. В качестве примера можно рассмотреть путь биосинтеза ароматических аминокислот (триптофана, фенилаланина, тирозина). Как уже отмечалось, исходными веществами для их синтеза являются эритрозо-4-фосфат и фосфоенолпируват. Молекулы этих веществ конденсируются с образованием C_7 -соединения, которое подвергается циклизации, образуя 5-дегидрохинат. Через ряд этапов 5-дегидрохинат превращается в хоризмовую кислоту, которая является общим промежуточным продуктом биосинтеза всех ароматических аминокислот. На этом этапе биосинтетический путь разветвляется, один путь ведет к биосинтезу триптофана через антраниловую кислоту, а другой – префеновой кислоты, которая является предшественником как тирозина, так и фенилаланина (рис. 52).

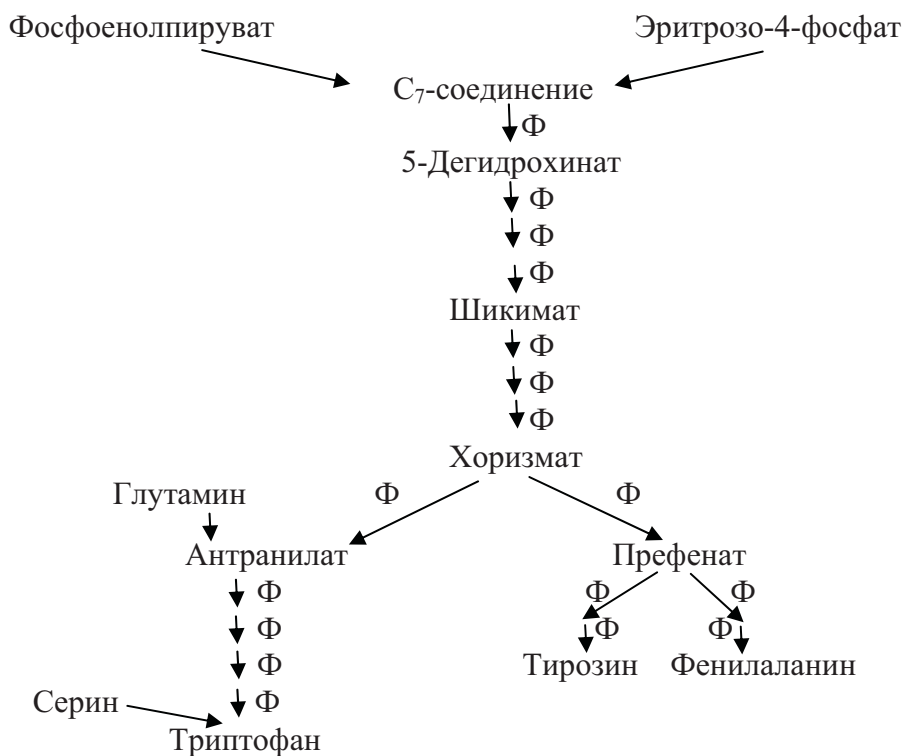


Рис. 52. Путь биосинтеза ароматических аминокислот у микроорганизмов

Некоторые гетеротрофные прокариоты, такие, например, как молочнокислые бактерии, не способны синтезировать все аминокислоты, поэтому их рост возможен только на сложных по составу питательных средах, содержащих ряд продуктов природного происхождения.

6.2.2. Биосинтез нуклеотидов

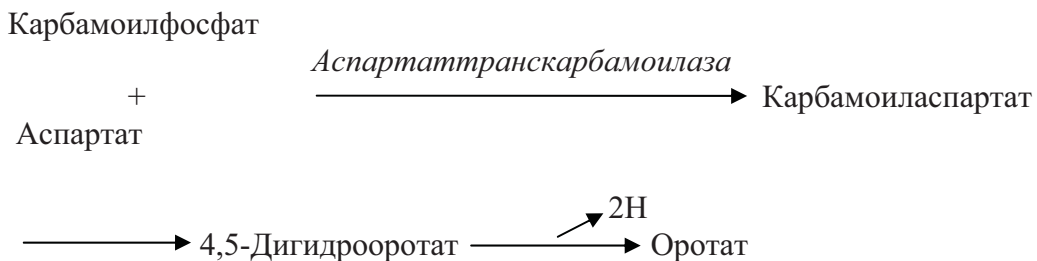
Нуклеотиды являются исходным материалом для биосинтеза нуклеиновых кислот. Кроме того, нуклеотиды входят в состав многих коферментов и участвуют в активации и переносе аминокислот, углеводов, компонентов клеточной стенки и липидов. Нуклеотиды – сложные соединения, состоящие из азотистых оснований (это производные пурина – аденин, гуанин и пиримидина – цитозин, тимин), пентоз (рибоза и дезоксирибоза) и остатка фосфорной кислоты.

Большинство микроорганизмов способно синтезировать нуклеотиды из низкомолекулярных соединений. Если же нуклеотиды есть в питательной среде или они образуются при распаде нуклеиновых кислот, то клетка их не синтезирует, а использует в готовом виде.

Синтез пиримидиновых нуклеотидов. Предшественниками для синтеза пиримидиновых оснований служат карбамоилфосфат и аспартат. Карбамоилфосфат синтезируется из аммиака и углекислого газа:



Фермент аспартаттранскарбамоилаза конденсирует эти соединения с образованием карбамоиласпартата. Карбамоиласпартат подвергается циклизации с образованием 4,5-дигидрооротата. Затем в результате дегидрирования этого соединения происходит образование оротата – первого промежуточного продукта, содержащего пиримидиновое кольцо.



Прежде чем превратиться в одно из пиримидиновых оснований, оротат связывается с рибозо-5-фосфатом, который является исходным соединением для образования пентозного компонента нуклеотидов. Как известно, рибозо-5-фосфат может синтезироваться двумя путями:

- окислительным – из глюкозо-6-фосфата через окислительный пентозофосфатный путь;
- неокислительным – из фруктозо-6-фосфата и 3-фосфоглицеринового альдегида в результате реакций, катализируемых трансальдолазой и транскетолазой.

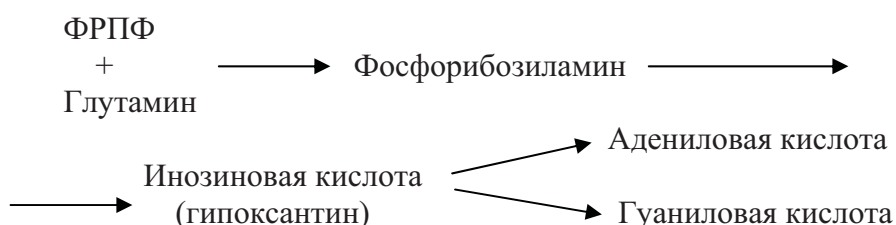
Для синтеза нуклеотидов рибозо-5-фосфат используется в высокоэнергетической форме – в виде фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ).

Фосфорибозилпирофосфат взаимодействует с оротатом, в результате образуется оротидинмонофосфат, который декарбоксилируется в уридинмонофосфат или уридиловую кислоту:



Из уридиловой кислоты путем аминирования образуется цитидиловая кислота (нуклеотид, содержащий азотистое основание цитозин), путем метилирования – тимидиловая кислота (нуклеотид, содержащий азотистое основание тимин).

Синтез пуриновых нуклеотидов. Начальной стадией синтеза пуриновых нуклеотидов является взаимодействие ФРПФ с глутамином с образованием фосфорибозиламина, который через ряд последовательных ферментативных реакций превращается в инозиновую кислоту (пуриновый нуклеотид гипоксантин). Инозиновая кислота служит исходным продуктом для синтеза двух других нуклеотидов – адениловой и гуаниловой кислот.

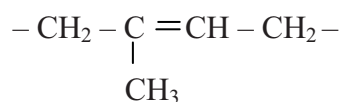


При синтезе дезоксирибонуклеотидов происходит восстановление рибозы до дезоксирибозы. Это происходит на стадии рибонуклеотидов, т. е. синтезируются рибонуклеотиды, а затем происходит восстановление их до дезоксирибонуклеотидов.

Синтезированные клеткой или усвоенные из среды нуклеотиды при участии РНК- и ДНК-полимераз полимеризуются в полинуклеотиды – молекулы РНК и ДНК.

6.2.3. Биосинтез липидов

Липиды в клетке бактерий представлены химическими соединениями различной природы. Это триглицериды, жирные кислоты, фосфолипиды, гликолипиды, воск. К липидам бактерий относятся также соединения, молекула которых содержит изопреновые фрагменты:



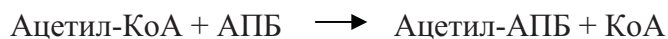
Из изопреновых фрагментов (путем их полимеризации) построены молекулы каротиноидов, хлорофиллов, хинонов. К соединениям липидной природы относятся и некоторые витамины и их производные.

У прокариот липиды входят в состав клеточных мембран и клеточной стенки, служат запасными веществами, являются компонентами пигментных систем и цепей электронного транспорта.

Наиболее универсальные липидные компоненты бактерий – жирные кислоты и фосфолипиды.

Исходным субстратом для **синтеза жирных кислот** с четным числом углеродных атомов служит ацетил-КоА.

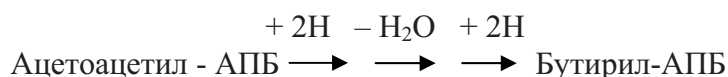
На первом этапе происходит перенос ацетильной группы от ацетил-КоА на молекулу особого белка, называемого ацилпереносящим белком (АПБ):



Ацетил-АПБ выполняет функцию затравки, к которой присоединяется C_2 -фрагмент. Донором C_2 -фрагмента служит молекула малонил-АПБ, синтезирующаяся также из ацетил-КоА. В результате присоединения C_2 -фрагмента к ацетил-АПБ образуется ацетоацетил-АПБ:



Затем с помощью серии ферментативных реакций происходит восстановление окисленных углеродных атомов ацетоацетил-АПБ, приводящее к образованию бутирил-АПБ:

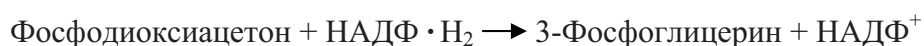


В результате конденсации бутирил-АПБ с новой молекулой малонил-АПБ и последующего восстановления продукта реакции образуется молекула C_6 -жирной кислоты (капроил-АПБ). Последовательное наращивание C_2 -остатков приводит к синтезу жирных кислот, содержащих обычно 16–18 углеродных атомов.

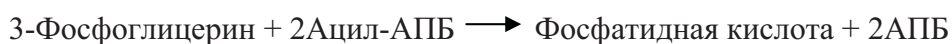
Жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов образуются в результате начальной конденсации пропионил-АПБ и малонил-АПБ.

В клетках бактерий компонентами липидов являются в основном насыщенные жирные кислоты или содержащие одну двойную связь (моновенасыщенные). Полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие две и более двойные связи, найдены до сих пор только у цианобактерий.

Исходным субстратом для **синтеза фосфолипидов** служит фосфодиоксиацетон (один из промежуточных продуктов гликолитического пути). Фосфодиоксиацетон восстанавливается с образованием 3-фосфоглицерина:



3-Фосфоглицерин взаимодействует с двумя остатками жирных кислот в виде комплекса с белком АПБ. Образуется фосфатидная кислота:



Присоединение к фосфатной группе фосфатидной кислоты серина, инозита, глицерина или другого соединения приводит соответственно, к синтезу фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и фосфатидилглицерина.

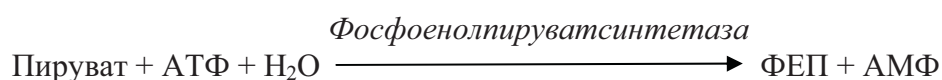
6.2.4. Биосинтез углеводов

Если микроорганизмы – автотрофы, то исходным веществом для синтеза углеводов является CO_2 . Синтез углеводов происходит у большинства автотрофов в цикле Кальвина (восстановительный пентозофосфатный цикл), который функционирует так же, как и у растений. Для цикла Кальвина характерны два специфических фермента, не участвующие в других метаболических путях. Это:

- фосфорибулокиназа, превращающая рибулозо-5-фосфат при участии АТФ в рибулозо-1,5-дифосфат, который затем выступает в качестве акцептора CO_2 ;
- рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза, катализирующая реакцию фиксации CO_2 рибулозо-1,5-дифосфатом с образованием двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты. Последняя подвергается серии последовательных ферментативных превращений, ведущих к образованию молекулы глюкозы.

У бактерий-гетеротрофов на среде с неуглеводными предшественниками (например, аминокислотами, глицерином, молочной кислотой) синтез углеводов осуществляется с использованием реакций гликолитиче-

ского пути, идущих в обратном направлении. Этот процесс называется **глюконеогенезом**. Но некоторые ферментативные реакции гликолитического пути необратимы (реакции, катализируемые гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой). Поэтому в клетках гетеротрофных прокариот, способных использовать двух- и трехуглеродные соединения, сформировались специальные ферментативные реакции, позволяющие обходить необратимые реакции гликолитического пути. Одной из таких обходных реакций у бактерий *E. coli* и других бактерий является превращение пирувата в фосфоенолпируват (ФЕП) под действием фосфоенолпируватсинтетазы:



Образовавшиеся таким образом углеводы используются для синтеза олиго- и полисахаридов. Биосинтез полисахаридов осуществляется путем трансгликозилирования, т. е. путем переноса остатков моносахаридов на конец растущей цепи полисахарида. Этот процесс всегда сопровождается затратой энергии.

Глава 7. ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

Генетика – наука о наследственности и изменчивости живых организмов. В отличие от классической генетики, генетика бактерий – относительно молодая отрасль микробиологии, первые работы по которой появились в начале 1940-х годов. Генетика бактерий пользуется всеми разработанными для классической генетики терминами и определениями. С момента возникновения и до настоящего времени она завоевала необычайную популярность. Такой успех обусловлен двумя главными причинами.

Во-первых, основные принципы генетики бактерий в равной степени применимы ко всем животным и растительным организмам независимо от того, являются они многоклеточными или одноклеточными. Это связано с тем, что все живые организмы обладают сходными по ряду свойств детерминантами наследственных признаков. Данное сходство распространяется на природу самих детерминант (генов), их локализацию в ДНК, передачу потомству, стабильность, а также на способ контроля процессов, определяющих развитие признаков.

Во-вторых, в исследованиях по изучению природы наследственности прокариоты в значительной степени заменили такие излюбленные объекты генетики, как плодовая мушка дрозофила, мышь, кукуруза, поскольку бактерии имеют высокую скорость размножения и образуют популяции с высокой плотностью, а процесс их культивирования относительно прост. Это позволяет проводить генетический анализ в короткие сроки с использованием огромного числа особей, которые не занимают значительного пространства. Кроме того, использование клеток бактерий позволяет изучать биологические явления на уровне одной клетки, избегая их сложных взаимодействий и взаимозависимостей, типичных для высших организмов.

7.1. Мутации у бактерий. Доказательства природы возникновения мутаций у бактерий

Термин «мутация» введен Г. Де Фризом (1901), изучавшим изменчивость и наследственность у растений и определившим *мутацию* как «скачкообразное изменение наследственного признака». Это понятие М. Бейеринк (1912) позднее распространил и на бактерии.

Мутация – событие редкое и обычно происходит с частотой $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-10}$. Это означает, что в популяции мутантной по конкретному признаку (гену) является одна клетка из 10^4 – 10^{10} клеток.

В результате постановки ряда экспериментов были получены данные, свидетельствующие о том, что у бактерий мутации носят спонтанный и ненаправленный характер. К их числу относятся, прежде всего, эксперименты С. Лурия, М. Дельбрюка, Г. Ньюкомба и супругов Е. и Дж. Ледерберг.

В 1943 г. С. Лурия и М. Дельбрюк доказали спонтанное возникновение мутантов бактерий с помощью *флуктуационного теста*. В эксперименте с участием бактериофага T1, обладающего высокой вирулентностью в отношении бактерий *E. coli*, исследовался процесс возникновения резистентности у данных бактерий к фагу.

При постановке эксперимента культуру бактерий *E. coli*, полученную из одной клетки (т. е. чистую культуру), чувствительную к бактериофагу T1, выращивали до определенной плотности и разделяли на две части. Далее одну из них распределяли по 1 мл в 100 пробирок. Вторую часть оставляли в объеме 100 мл. После этого все культуры инкубировали в одинаковых условиях. На следующем этапе выращенные культуры засеивали на агаризованную среду с фагом T1. В результате на поверхности среды формировалось определенное количество колоний, которые можно рассматривать как устойчивые к фагу, т. е. Тон^r . Устойчивые к фагу T1 бактерии сохраняют данное свойство также и при последующем их культивировании в отсутствие фага (рис. 53).

Принцип флуктуационного теста заключается в следующем: если устойчивые мутанты возникают при контакте с фагом (изменчивость адаптивная), то каждая культура независимо от того, из какой части она была взята, должна содержать приблизительно одинаковое количество устойчивых клеток. Если же устойчивые бактерии возникли спонтанно, до обработки фагом, то следствием этого является тот факт, что их количество в засеянных независимых культурах (100 пробирок) будет отличаться от количества, полученного при анализе образцов, из одной и той же (100 мл) культуры.

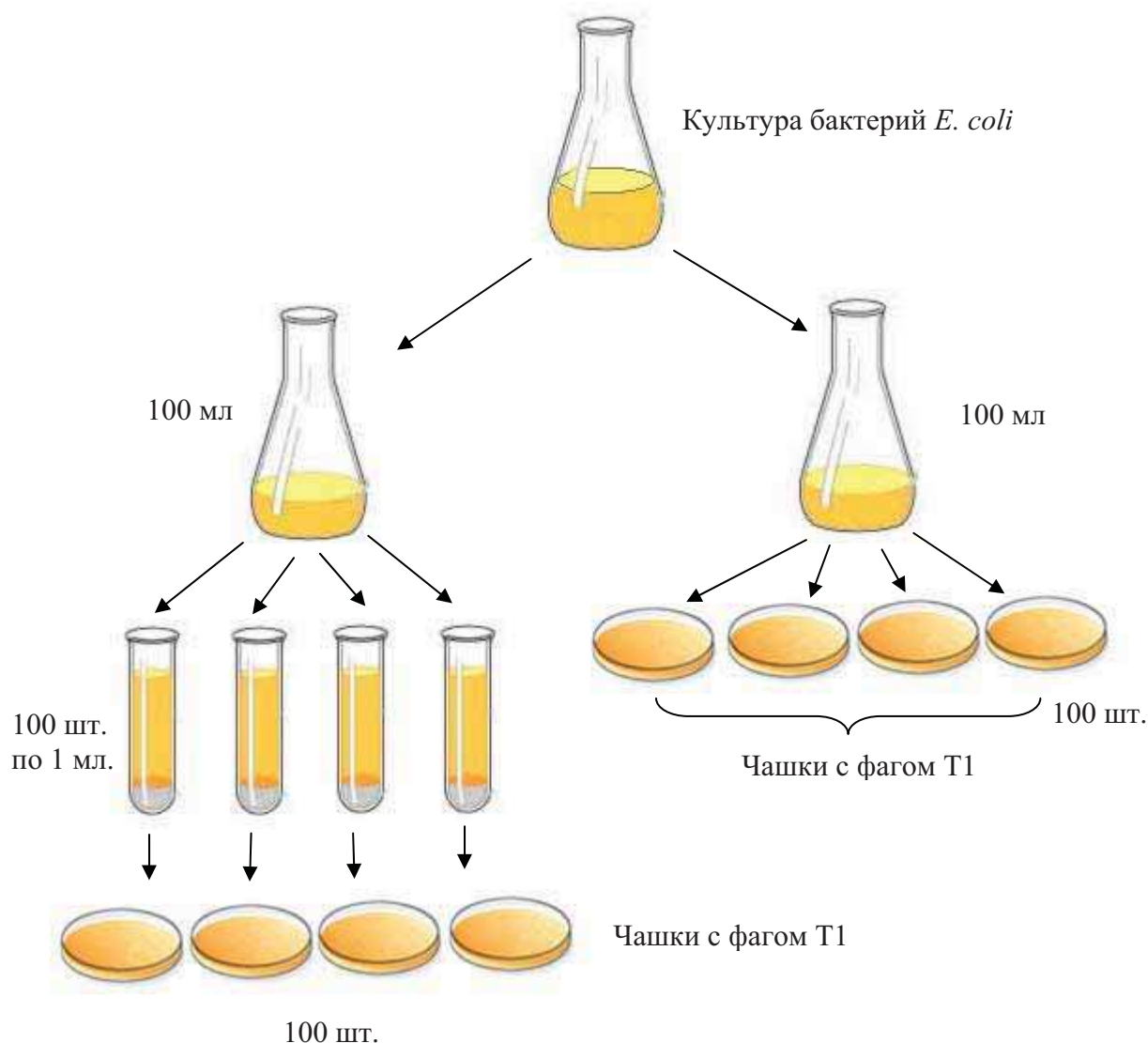


Рис. 53. Флуктуационный тест С. Лурия и М. Дельбрюка

Независимо полученные результаты свидетельствуют о том, что культуры разного происхождения действительно обнаруживают более резкие колебания (флуктуации) в содержании устойчивых клеток (0, 103, 62, 3, 159 и т. п.), чем пробы, взятые из одного и того же образца (142, 140, 155, 146, 110 и т. п.), что подтверждает гипотезу о спонтанном характере возникновения мутаций.

В 1949 г. Г. Ньюкомб поставил другой по методическому подходу эксперимент с фагом T1 и бактериями *E. coli*, который впоследствии получил название **перераспределительного теста**. Он засеивал чашки Петри культурой *E. coli*, чувствительной к фагу T1, с образованием сплошного газона. Засеянные чашки инкубировались при оптимальных услови-

ях (37 °C) в течение 5 ч. За это время каждая из засеянных клеток формировала микроколонию. Затем в половину засеянных чашек Петри вносили по 0,1 мл физиологического раствора и с помощью шпателя перераспределяли клетки на поверхности среды. Остальные чашки оставались нетронутыми (контроль). На поверхность всех чашек с помощью пульверизатора Ньюкомб наносил суспензию фага T1, и чашки повторно помещал в термостат. После инкубирования определяли число колоний, являющихся потомством устойчивых клеток.

Принцип, положенный в основу данного теста, предполагает, что устойчивые клетки возникают вследствие спонтанных мутаций до контакта с фагом, и на чашках, где бактерии были перераспределены, должно формироваться больше устойчивых колоний, чем на контрольных чашках, так как каждая клетка из микроколонии устойчивых бактерий после перераспределения сформирует колонию, устойчивую к фагу T1 (рис. 54).

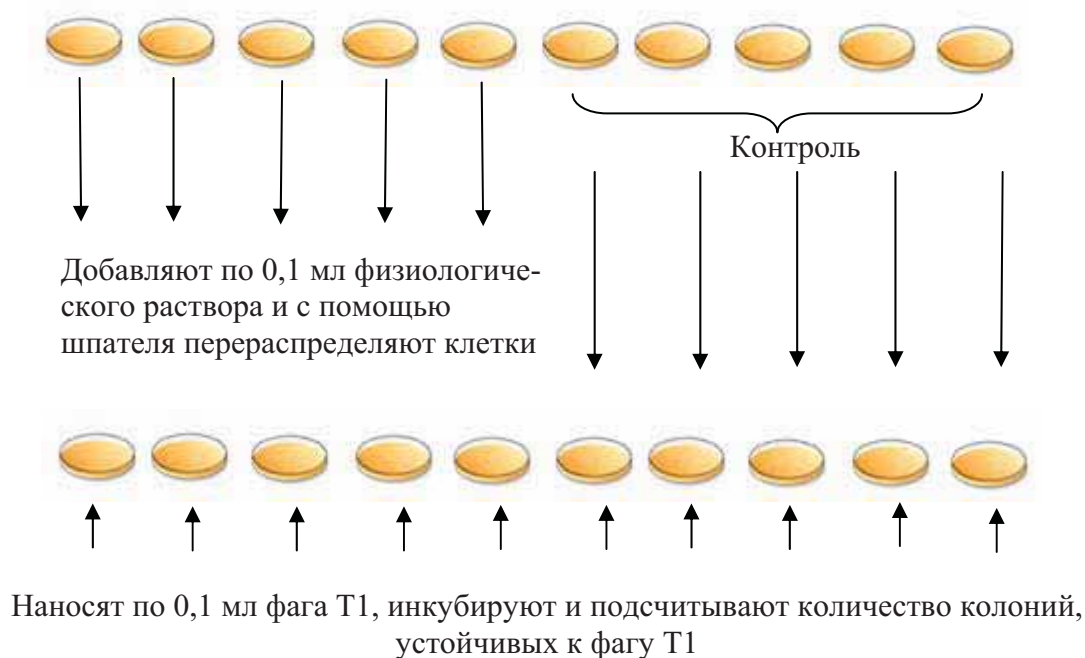


Рис. 54. Перераспределительный тест Ньюкомба

Именно эти результаты и были получены Г. Ньюкомбом, которые прямо свидетельствуют о том, что фагоустойчивые мутанты возникают до контакта с фагом в результате спонтанных мутаций. Бактериофаг в этом случае выступает лишь в качестве селективного агента, позволяющего выявить небольшое количество фагоустойчивых мутантов, присутствующих в популяции.

Таким образом, результаты флуктуационного и перераспределительного тестов доказывают, что мутации у микроорганизмов возникают не-

направленно до воздействия селектирующего агента (в данном случае фага T1).

В 1952 г. супруги Е. и Дж. Ледерберг предложили способ непрямого отбора мутантов *методом реплик*, или *отпечатков*, и использовали его для доказательства спонтанной природы возникновения мутаций у бактерий. Этот метод осуществляется с помощью стерильных кусочков бархата с коротким, жестким и густым ворсом. Бархат помещают на столик для реплик (деревянный или металлический цилиндр) и плотно закрепляют металлическим кольцом так, чтобы поверхность была максимально ровной. Чашку Петри с питательной средой, на которой сформировались колонии микроорганизмов, накладывают поверхностью среды на бархат и слегка прижимают, после этого осторожно снимают ее. Ткань с полученными отпечатками колоний может служить исходным штампом для засева методом реплик других чашек со средой. С одного штампа можно снять отпечаток на серию чашек, содержащих различные агаризованные среды.

Супруги Ледерберг провели следующий эксперимент. Чистую культуру фагочувствительных бактерий *E. coli* выращивали в бульоне до концентрации $1 \cdot 10^8$ кл/мл, после чего ее высевали на поверхность питательной среды в чашке Петри для образования газона сплошного роста. Затем при помощи метода реплик производили пересев бактерий параллельно на две чашки – одну с обычной средой (1); другую – предварительно засеянную фагом (2). Чашки помещали в термостат для инкубирования. На чашке, засеянной фагом, сформировались отдельные колонии фагоустойчивых бактерий. На чашке без фага наблюдался сплошной рост. Чашки 1 и 2 совмещали, и из чашки с обычным агаром (1) производили пересев в бульон участка, соответствующего ареалу фагоустойчивых колоний в чашке с фагом (2). Размножившиеся клетки рассеивали на свежей питательной среде в чашках и после инкубации переносили с помощью стерильного бархатного штампа в две чашки (с обычной средой и со средой, засеянной фагом) (рис. 55).

Такую процедуру повторяли многократно, и в итоге была получена суспензия фагоустойчивых мутантов, никогда не имевших контакта с фагом. Этот эксперимент явился еще одним доказательством мутационной природы изменчивости у бактерий.

Мутационная изменчивость относится к *генотипической*, или *наследственной, изменчивости*, так как при этом возникающие изменения в генетическом аппарате бактерий передаются по наследству.

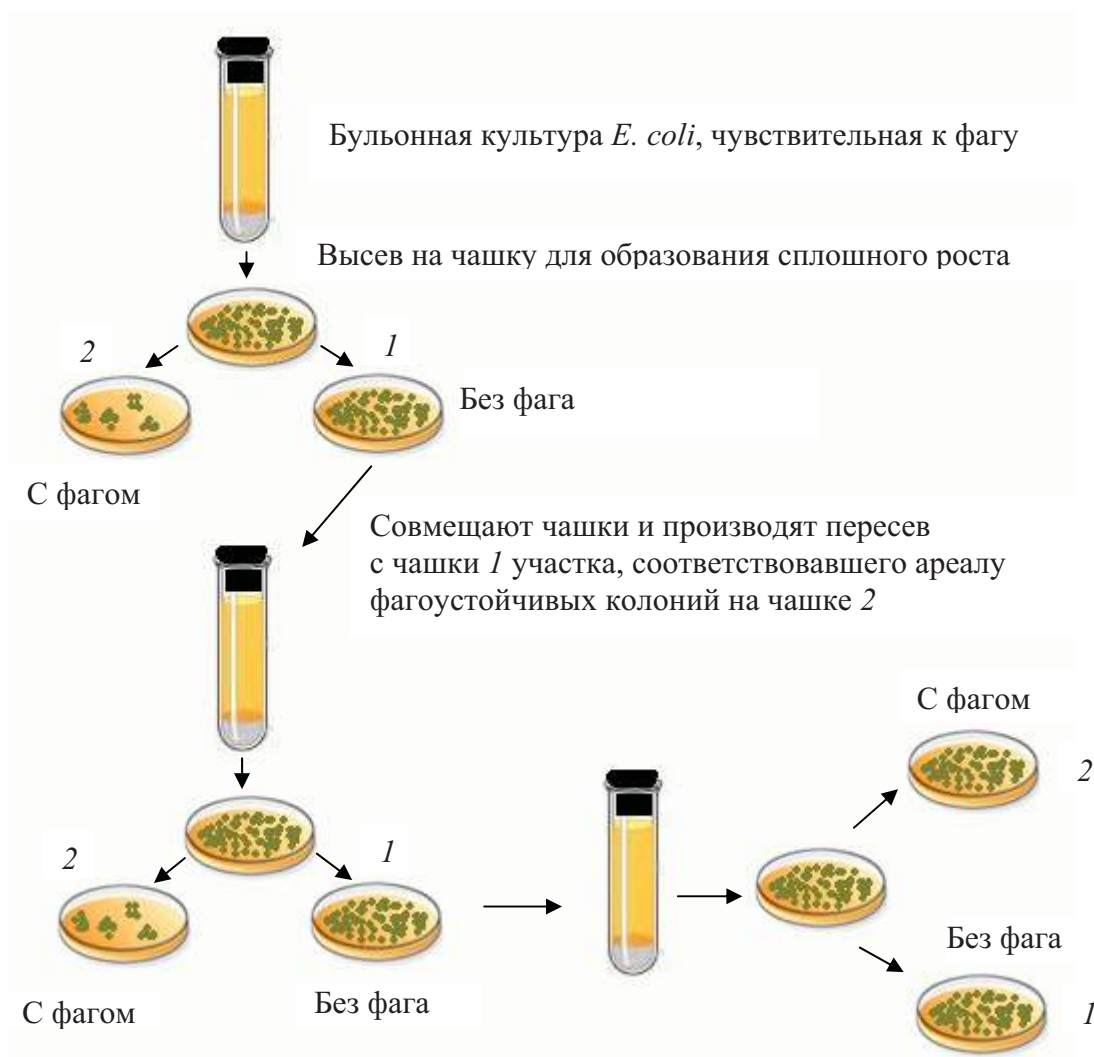


Рис. 55. Непрямой отбор фагоустойчивых мутантов методом реплик

Кроме генотипической, существует **модификационная изменчивость**, которая рассматривается как ответ на изменение условий окружающей среды и наблюдается до тех пор, пока действует фактор, вызывающий эти изменения. Модификационная изменчивость (ее называют еще фенотипической изменчивостью) проявляется на уровне фенотипа и не затрагивает генотип. Фенотипическая изменчивость проявляется у подавляющего большинства особей в популяции, в то время как при мутационной изменчивости изменение генотипа происходит только у единичных клеток.

Существует несколько проявлений модификационных изменений. Наиболее известны **адаптивные модификации**, т. е. ненаследственные изменения, полезные для организма и способствующие его выживанию. Их примером может служить адаптация клеток бактерий *E. coli* к лактозе как новому субстрату: в этих условиях начинают синтезироваться инду-

цибельные ферменты, т. е. происходит фенотипическое проявление генов, «молчащих» при отсутствии лактозы в среде.

У ряда бактерий обнаружена универсальная адаптивная реакция в ответ на различные стрессовые воздействия (высокие и низкие температуры, резкий сдвиг pH и др.). В данном случае адаптивная реакция проявляется в интенсивном синтезе небольшой группы сходных белков, получивших название *белков теплового шока*, а явление – *синдромом теплового шока*. При стрессовых воздействиях на бактериальную клетку в ней ингибируется синтез обычных белков, но индуцируется синтез небольшой группы белков, функции которых заключаются в противодействии стрессовому воздействию путем защиты важнейших клеточных структур, в первую очередь нуклеоида и мембран. Считается, что адаптивные модификации расширяют возможности организма к выживанию и размножению в более широком диапазоне условий внешней среды.

Тем не менее не все модификации можно рассматривать как адаптивные. При интенсивном воздействии многих агентов наблюдаются ненаследуемые изменения, случайные по отношению к вызвавшему их воздействию. Причины появления таких фенотипически измененных клеток связаны с ошибками процесса трансляции, вызванными этими агентами.

Возникающие модификации могут быть относительно стабильными и могут сохраняться в течение нескольких поколений или, наоборот, очень лабильными.

7.2. Классификация бактериальных мутаций.

Молекулярные механизмы мутационного процесса. Мутагенные факторы

Мутации – изменения, возникающие в генетическом аппарате бактерий и передающиеся по наследству. Они бывают спонтанные и индуцированные. Мутации, возникающие в популяции бактерий без целенаправленного экспериментального вмешательства, называют *спонтанными*. Как правило, спонтанные мутации можно объяснить случайными ошибками при репликации ДНК. Например, тимин, который обычно спаривается с аденином, может перейти в енольную форму и образовать водородные связи с гуанином. В результате во вновь синтезированной молекуле ДНК вместо пары Т–А появляется пара Г–Ц. Возникают такие мутации довольно редко. В среднем частота спонтанных мутаций составляет 10^{-4} – 10^{-10} , т. е. измененной оказывается одна клетка на 10^4 – 10^{10} клеток.

Индукцированные мутации возникают с помощью воздействия тех или иных факторов – мутагенных агентов, которые существенно повышают частоту возникновения мутаций. Мутагенами могут быть химические, физические и биологические агенты, действующие на генетический аппарат бактерий. К ним относятся УФ-лучи, ионизирующее излучение, азотистая кислота, нитрозогуанидин, аналоги азотистых оснований, некоторые антибиотики, акридиновые красители, сернистый иприт, транспозоны, IS-элементы, бактериофаг М₁ и др. Мутагенные агенты характеризуются неспецифичностью действия, т. е. используя какой-то мутаген, нельзя надеяться на выделение клеток с определенным типом или характером мутаций: мутагены способны только повышать частоту возникновения мутаций.

По фенотипическим последствиям мутации подразделяют на прямые и обратные (или реверсии). Мутации, приводящие к утрате или изменению какой-то функции клетки, относятся к классу **прямых**, так как они вызывают появление у клеток другого фенотипа, который отличает их от бактерий дикого типа. Например, бактерии *E. coli*, способные в норме сбраживать лактозу (Lac⁺-фенотип), могут утрачивать данный признак, и поэтому мутация Lac⁺ → Lac⁻, будет считаться прямой.

В результате **обратной** мутации у мутантного организма восстанавливается исходный (или дикий) фенотип:

Lac⁻ → Lac⁺ – обратная мутация, или реверсия.

Обратные мутации бывают истинными (истинные реверсии) и вторичными. Об истинных обратных мутациях говорят лишь в тех случаях, когда в результате второй мутации восстанавливается исходный генотип, т. е. когда измененный при первой мутации триплет нуклеотидов будет вновь восстановлен. Однако эффект первой мутации может быть компенсирован мутацией в другой части этого же или расположенного рядом гена. Такие мутации называют **вторичными реверсиями**. Иногда возникают также мутации в других участках генома, которые за счет различных механизмов обеспечивают обходные пути для снятия эффекта первой мутации. Их называют **супрессорными мутациями**. Супрессорные мутации восстанавливают у мутантов только дикий фенотип, не восстанавливая первоначального состояния самого мутантного гена.

По фенотипическим проявлениям (характер проявления измененного признака) мутации подразделяют:

1) на морфологические, в результате которых изменяется ряд морфологических признаков (наличие капсулы, утрата жгутиков, изменение характерных особенностей колоний и др.);

2) биохимические, среди которых:

- определяющие зависимость от дополнительных факторов роста, или ауксотрофные;
- обеспечивающие устойчивость к ингибиторам, антибиотикам, бактериоцинам, ядам или бактериофагам;
- связанные с чувствительностью к повышенной температуре (условно-летальные);
- изменяющие способность использовать определенный субстрат или сбраживать какой-либо углевод;
- нарушающие регуляцию или синтез ферментов катаболизма либо анаболизма;
- изменяющие вирулентность клеток, их антигенные свойства, т. е. связанные со взаимоотношениями с другими организмами.

В соответствии с характером изменений в первичной структуре ДНК различают точковые и хромосомные мутации.

Точковые мутации – мутации, затрагивающие только одну пару оснований и приводящие к замене одной пары оснований на другую. Например, пара А–Т может быть заменена Г–Ц или наоборот. Для точковых мутаций характерна высокая частота реверсии. Мутации такого рода могут быть двух типов:

- **транзиции**, в результате которых происходит замена пурина на другой пурин или же пиримидина на другой пиримидин (простая замена). Например, пара Г–Ц может быть заменена на пару А–Т, или наоборот. Это наиболее часто встречающийся класс точковых мутаций;

- **трансверсии**, приводящие к замене пурина пиримидином, и наоборот (сложная замена), т. е. вместо пары А–Т появляется пара Т–А или Г–Ц.

Мутации, связанные с заменой оснований, часто оказываются **миссенс-мутациями** (мутациями с изменением смысла), в которых кодирующий триплет оснований после замены обеспечивает включение в белок уже другой аминокислоты. Значительная часть мутаций с заменой оснований представляет собой **нонсенс-мутации** (бессмысленные мутации), характеризующиеся тем, что кодирующий какую-либо аминокислоту триплет превращается в триплет, не кодирующий никакой аминокислоты, или стоп-кодон.

Под влиянием некоторых мутагенов могут происходить вставки или выпадения оснований, а возникающие в результате этого мутации называются **мутациями со сдвигом рамки считывания**. Если в молекулу ДНК при репликации включается или утрачивается из нее основание, то это приводит к сдвигу рамки при считывании генетической информации

и, как следствие, изменение последовательности аминокислот в белке мутантного штамма. Ревертанты в данном случае получить трудно.

Мутации, затрагивающие вножество пар нуклеотидов, называют **хромосомными**. Они делятся на дупликации, делеции, инсерции, инверсии, транслокации. **Дупликации** – возникновение в данной нуклеотидной последовательности одного или, чаще, нескольких повторов. **Делеции** – утрата двух или нескольких пар оснований. **Инверсии** – изменение порядка нуклеотидов в ДНК на обратный по отношению к ориентации в штаммах дикого типа, возникающее обычно в результате рекомбинации с переворотом (flip-flop). **Транслокации** – перенос фрагмента ДНК в новое положение.

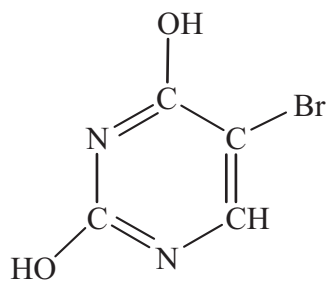
В настоящее время расшифрованы механизмы действия некоторых мутагенов.

Азотистая кислота (HNO_2) дезаминирует (отщепляет аминогруппу и замещает другой группой) аденин, гуанин или цитозин, что приводит к ошибкам при репликации ДНК. В частности, в результате замещения аминогруппы гидроксильной группой аденин превращается в гипоксантин, который структурно сходен с гуанином. При репликации ДНК гипоксантин спаривается с цитозином вместо тимина, что приводит к мутации АТ–ЦГ. Таким образом, происходит простая замена оснований, или транзиция. Если HNO_2 взаимодействует с цитозином, то он дезаминируется с образованием урацила и при репликации образуется пара с аденином (вместо гуанина), что приводит к мутации ГЦ–АТ (транзиция).

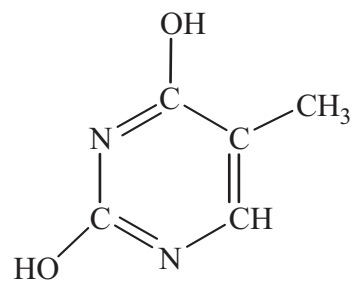
Гидроксиламин (NH_2OH) вступает в реакцию главным образом с цитозином и изменяет его так, что он при репликации ДНК предпочтительно спаривается с аденином вместо гуанина и происходит замена ЦГ–АТ (транзиция).

Аналоги азотистых оснований очень сходны по строению с нормальными пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями и, поглощаясь клетками, способны включаться в ДНК. В молекуле ДНК они могут находиться в двух таутомерных формах – обычной кето-, или аминокетоне, и реже встречающейся – енольной, или иминоформе. Переход в другую таутомерную форму может привести к неправильному образованию пар во время репликации ДНК. Часто для выделения мутантов используют 5-бромурацил и 2-аминопурин.

5-Бромурацил представляет собой соединение, сходное по строению с тиминам:



5-Бромурацил



Тимин (5-метилурацил)

Он может включаться вместо тимина в цепь ДНК как комплементарное аденину основание (1 – родительская цепь, 2 – дочерняя цепь (после репликации)):

| | | | |
|---|---|----|---|
| 1 | A | БУ | 2 |
| | A | T | |
| | Г | Ц | |
| | Г | Ц | |
| | T | A | |
| | A | БУ | |

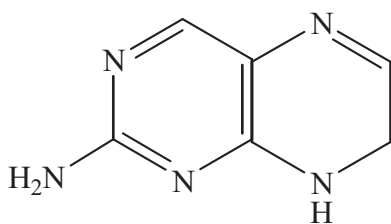
При переходе в енольную форму 5-бромурацил (БУ*) ведет себя при репликации ДНК как цитозин и спаривается с гуанином:

| | |
|-----|---|
| БУ | A |
| T | A |
| Ц | Г |
| Ц | Г |
| A | T |
| БУ* | Г |

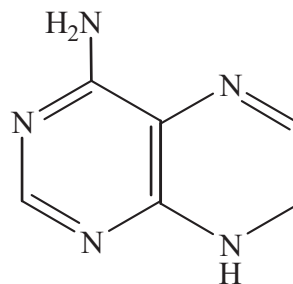
После третьего цикла репликации вместо пары А–Т в молекуле ДНК обнаруживается пара Г–Ц (транзиция АТ–ГЦ):

| | |
|---|---|
| A | T |
| A | T |
| Г | Ц |
| Г | Ц |
| T | A |
| Г | Ц |

2-Аминопурин по структуре напоминает аденин и может включаться вместо аденина в молекулу ДНК:



2-Аминопурин



Аденин (6-аминопурин)

Как и аденин, 2-аминопурин обычно спаривается с тиминном, но при переходе в енольную форму может образовывать связи с цитозином, что приводит к изменению пар оснований в ДНК.

Алкилирующие агенты – нитрозогуанидин, нитрозометилмочевина, этилэтансульфонат, этилметансульфонат, сернистый иприт и другие – принадлежат к наиболее эффективным мутагенам. Они модифицируют (алкилируют) в области репликативной вилки преимущественно пуриновые основания, в первую очередь гуанин, вызывая его спаривание с тиминном вместо цитозина. В результате этого возникают главным образом транзиции типа ГЦ–АТ.

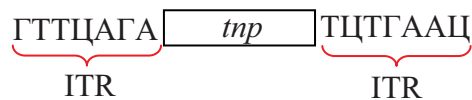
Молекулы **акридиновых красителей** (акридиновый оранжевый, акрифлавин, трипофлавин) внедряются между соседними азотистыми основаниями в цепи ДНК и увеличивают расстояние между ними. Такое пространственное изменение при репликации ДНК может вызывать ошибки двух типов – утрату нуклеотида или включение дополнительной пары нуклеотидов. Мутации этого типа приводят к очень серьезным последствиям, так как при этом нарушается порядок считывания кодонов: начиная с места выпадения или вставки нуклеотида, информация считывается в «неправильных» триплетах, что приводит к формированию мутаций со сдвигом рамки считывания.

УФ-лучи действуют на тиминовые основания, следствием чего является образование димеров тимина в ДНК. Такие димеры служат источником возникновения ошибок при репликации ДНК. УФ-лучи вызывают мутации типа транзиций, трансверсий или делеций.

Как мутагенные факторы биологической природы рассматривают **перемещающиеся (мобильные, мигрирующие) генетические элементы бактерий** – дискретные сегменты ДНК, способные к самостоятельному перемещению из одного участка в другой в пределах репликона, а также к перемещению из одного репликона (хромосомного, плазмидного или фагового) в другой. К таким элементам относятся простые вставочные последовательности (IS-элементы), транспозоны (Тп-элементы) и фаги-

транспозоны (Mu, D3112 и др.). Интеграция их в репликоны осуществляется независимо от системы общей рекомбинации клеток, которая требует гомологии у рекомбинирующих структур.

IS-элементы представляют собой линейные фрагменты двухцепочечной ДНК длиной от 200 до 2000 п. н. Они содержат только гены *tnp*, кодирующие синтез фермента транспозазы, необходимого для их перемещения, или транспозиции. По концам IS-элементов расположены инвертированные повторы (ITR) (инвертированный – значит перевернутый, т. е. расположение нуклеотидов на разных концах перевернутое или противоположно ориентированное). У разных IS-элементов длина концевых повторов ITR варьирует от 8 до 40 п. н. Инвертированные повторы также принимают участие и важны для транспозиции. Схематично строение IS-элемента можно изобразить следующим образом:



Различают несколько типов IS-элементов: IS1, IS2, IS3, IS4 и др. Они отличаются друг от друга по длине (или количеству составляющих их пар оснований) и структурой концевых повторов.

IS-элементы являются нормальными компонентами бактериальных хромосом и плазмид. В разных репликонах может содержаться различное, и часто множественное, число копий IS-элементов. Например, в F-факторе, который определяет донорные свойства бактерий, имеется одна копия IS2- и две копии IS3-элементов.

IS-элементы могут перемещаться из одного участка генома в другой, в частности из бактериальной хромосомы в плазмиду и, наоборот, от плазмиды к плазмиде, включаясь в различные участки генома. При перемещениях они могут встраиваться в пределах одного гена и инактивировать его или изменять его регуляцию.

Транспозоны – сложные перемещающиеся элементы. От IS-элементов они отличаются тем, что кроме генов, ответственных за транспозицию, содержат структурные гены, определяющие функции, не имеющие отношения к процессу транспозиции, т. е. отвечающие за проявление какого-либо фенотипа. Транспозоны могут контролировать резистентность к антибиотикам и ионам тяжелых металлов, способность к катаболизму лактозы, раффинозы, деградации толуола, синтезу энтеротоксинов и т. п. (табл. 8), поэтому их легче обнаружить, чем IS-элементы. Длина транспозонов свыше 2000 п. н. Как и IS-элементы, транспозоны имеют концевые повторы (ITR), которыми часто служат IS-элементы. Поскольку IS-

элементы сами заканчиваются ITR, то любой транспозон всегда имеет на концах инвертированные повторы.

Таблица 8

**Фенотипические признаки,
детерминируемые некоторыми транспозонами**

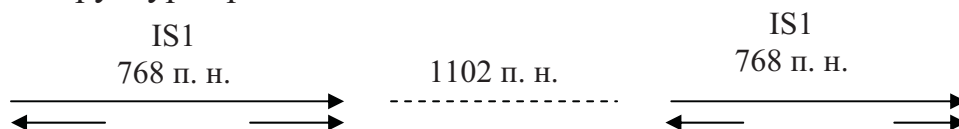
| Транспозон | Контролируемое свойство |
|---------------|-------------------------|
| Tn1, Tn2, Tn3 | Ap |
| Tn4 | Ap, Sm, Su, Hg |
| Tn5 | Km |
| Tn6 | Km, Nm |
| Tn7 | Tr, Sm |
| Tn9 | Cm |
| Tn10 | Tc |
| Tn501 | Hg |
| Tn903 | Km |
| Tn951 | Lac |
| Tn1681 | Ent |
| Tn1699 | Gm, Km, Cb, Ap |

П р и м е ч а н и е: Ap – устойчивость к ампициллину; Sm – устойчивость к стрептомицину; Su – устойчивость к сульфаниламидам; Hg – устойчивость к ионам ртути; Km – устойчивость к канамицину; Nm – устойчивость к неомицину; Tr – устойчивость к триметоприму; Cm – устойчивость к хлорамфениколу; Tc – устойчивость к тетрациклину; Lac – сбраживание лактозы; Ent – синтез энтеротоксина; Gm – устойчивость к гентамицину; Cb – устойчивость к карбенициллину.

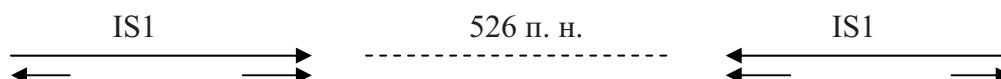
В зависимости от того, какие из IS-элементов и в какой ориентации ограничивают транспозон, можно выделить несколько групп.

1. Транспозоны, фланкированные (ограниченные) двумя IS1-элементами. Такие транспозоны подразделяют на две подгруппы:

а) IS1-элементы на концах транспозона находятся в прямой ориентации. Поскольку каждый IS1-элемент в свою очередь ограничен короткими инвертированными последовательностями, то на концах целого транспозона оказываются противоположно ориентированные ITR-повторы. Такова структура транспозона Tn9:



б) IS1-элементы находятся на концах транспозона в противоположной ориентации. Представителем транспозонов этой группы является Tn1681 :



2. Транспозоны, фланкированные другими IS-элементами в прямой ориентации. Примером таких транспозонов является Tn2680.

3. Транспозоны, фланкированные длинными инвертированными повторами, не идентичными известным IS-элементам. К этой группе относится Tn5.

Транспозоны различают и по степени специфичности при выборе мест интегрирования в репликоны. Различают транспозоны с высокой, региональной, средней и низкой специфичностью. При **высокой специфичности** транспозон интегрируется только в один или несколько сайтов в составе репликона, таким является транспозон Tn7. При **региональной специфичности** транспозон интегрируется в многочисленные сайты преимущественно внутри некоторых районов, что характерно для транспозона Tn1. В том случае, если вставки транспозона осуществляются во многие участки, но имеются некоторые более предпочтительные сайты, говорят о **средней специфичности** транспозиции (Tn9 и Tn10). При **низкой специфичности** практически каждый акт транспозиции происходит в новый сайт (Tn5). Однако следует отметить, что специфичность транспозиции одного и того же транспозона для разных видов бактерий и репликонов может быть различной.

Частота транспозиции транспозонов и IS-элементов происходит с вероятностью 10^{-4} – 10^{-7} на одно деление бактериальной клетки, что для одного и того же транспозона может зависеть от характера донорного (того, где локализован транспозон) и реципиентного репликонов, а также от генома клетки-хозяина. Кроме того, на перемещение транспозонов могут влиять факторы внешней среды (температура, УФ-лучи, химические соединения и др.).

Механизмы перемещения транспозонов окончательно не изучены. Показано, что перемещение транспозона Tn3 осуществляется в две стадии. Во время первой стадии происходит слияние молекул донорной и реципиентной ДНК, сопровождающееся репликацией транспозона. Образуется коинтегрat, содержащий копии транспозона в местах слияния двух репликонов. Во время второй стадии происходит разрешение коинтеграта, и репликоны разделяются за счет сайт-специфической рекомбинации между идентичными участками двух транспозонов Tn3, находящихся в составе коинтеграта (рис. 56). Участки, в которых происходит рекомбинация Tn3, названы от «*internal resolution site*» – *IRS*, *res* или *tnpS*.

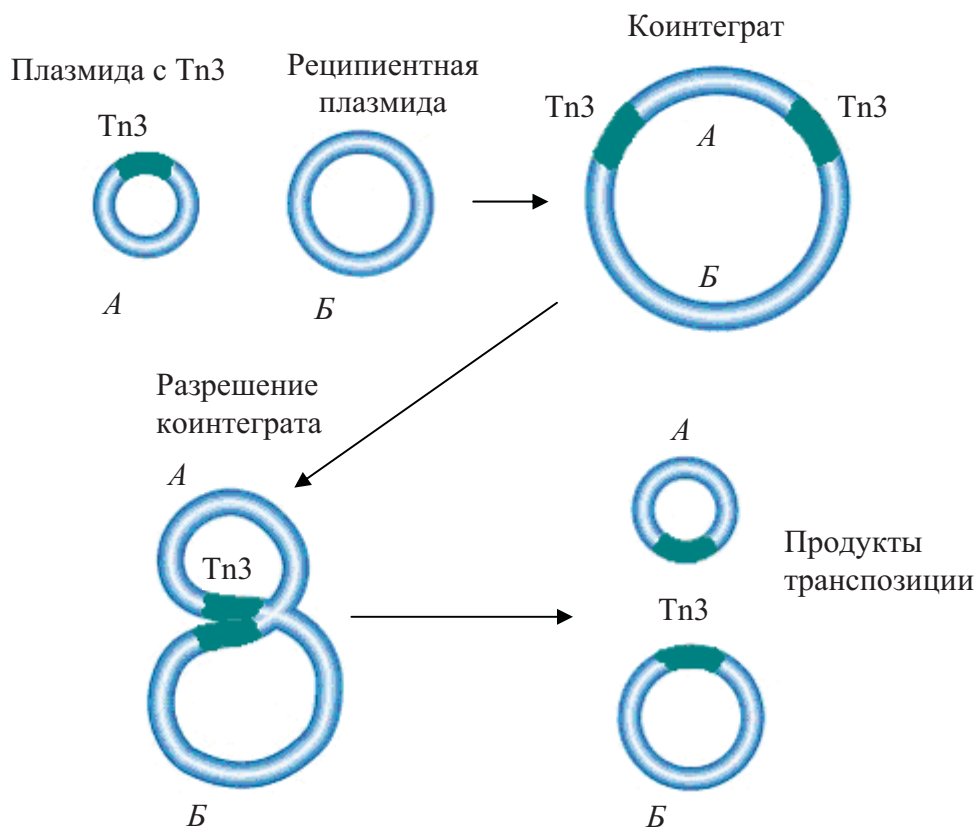
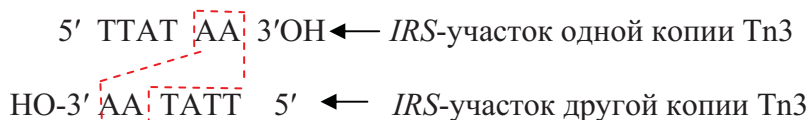


Рис. 56. Схема транспозиции через стадию образования коинтеграта

Для осуществления первой стадии перемещения необходимо наличие фермента транспозазы (продукта гена *tnpA*) и двух концевых инвертированных повторов. Мутации, в результате которых происходит делеция ITR, нарушают транспозицию. По-видимому, транспозаза распознает ITR-участки, специфически взаимодействует с ними в процессе транспозиции и производит разрывы на концах транспозона. Кроме того, она катализирует ступенчатые двунитевые разрывы ДНК, что приводит к образованию фрагментов с «липкими» концами в реципиентной молекуле ДНК, в которую встраивается транспозон. Затем фермент транспозаза осуществляет соединение концов транспозона с «липкими» концами реципиентной ДНК.

Белок, осуществляющий разрешение коинтеграта (*resolution*), т. е. сайт-специфическую рекомбинацию в *IRS* или *res*-сайтах, был назван **резолвазой** или **TnpR-белком**. Синтез этого белка кодируется геном *tnpR*. В опытах *in vitro* показано, что TnpR-белок, «ступенчато» разрезая ДНК в *IRS*-участках, ковалентно связывается с 5'-концами разрыва, оставляя свободными 3'-ОН-группы, после чего происходит обмен концами одного и второго транспозона:



Имеются данные о том, что некоторые IS-элементы (например, IS1) также кодируют ферменты, имеющие нуклеазную активность и участвующие в разрешении коинтегратов. Вместе с тем коинтеграты, образующиеся при транспозиции других перемещающихся элементов, могут диссоциировать только в клетках RecA^+ и оставаться стабильными в клетках RecA^- -хозяев, т. е. разрешение их осуществляется при участии системы гомологичной рекомбинации.

Описанный механизм перемещения транспозонов называется **репликативной транспозицией**. Наряду с ним существует способ транспозиции, предполагающий выщепление (эксцизию) перемещающегося элемента из молекулы донора и внедрение его (инсерцию) в молекулу реципиента. Этот механизм получил определение **консервативной транспозиции**. Она осуществляется также при участии сайт-специфической рекомбинации, однако здесь репликация транспозона необязательна (рис. 57).

Значение транспозонов и IS-элементов определяется тем, что они:

1) способны индуцировать образование мутаций. Включаясь в разные участки генома, они могут нарушать нуклеотидную последовательность гена, вызывать делеции, инверсии. В результате может синтезироваться функционально неполноценный белок или же его синтеза не происходит, в результате возникают соответственно делеционные или инсерционные мутанты. Мутации, вызываемые интеграцией транспозонов или IS-элементов, являются полярными (противоположны дикому типу) и ревертируют чрезвычайно редко.

Интеграция IS-элементов и транспозонов может привести и к прямо противоположному эффекту – экспрессии соседнего «молчащего» гена. Это свойство впервые было обнаружено у IS2-элемента, интегрированного в начале *gal*-оперона. В случае прямой ориентации IS2-элемент инактивирует данный оперон, а в инвертированной – может заменить отсутствующий промотор и способствовать экспрессии структурных генов *gal*-оперона. Следовательно, многие транспозоны и IS-элементы являются носителями «блуждающих» промоторов;

2) участвуют в слиянии и диссоциации репликонов (например, в объединении трансмиссивных и нетрансмиссивных плазмид, в интеграции плазмид в хромосому и т. д.);

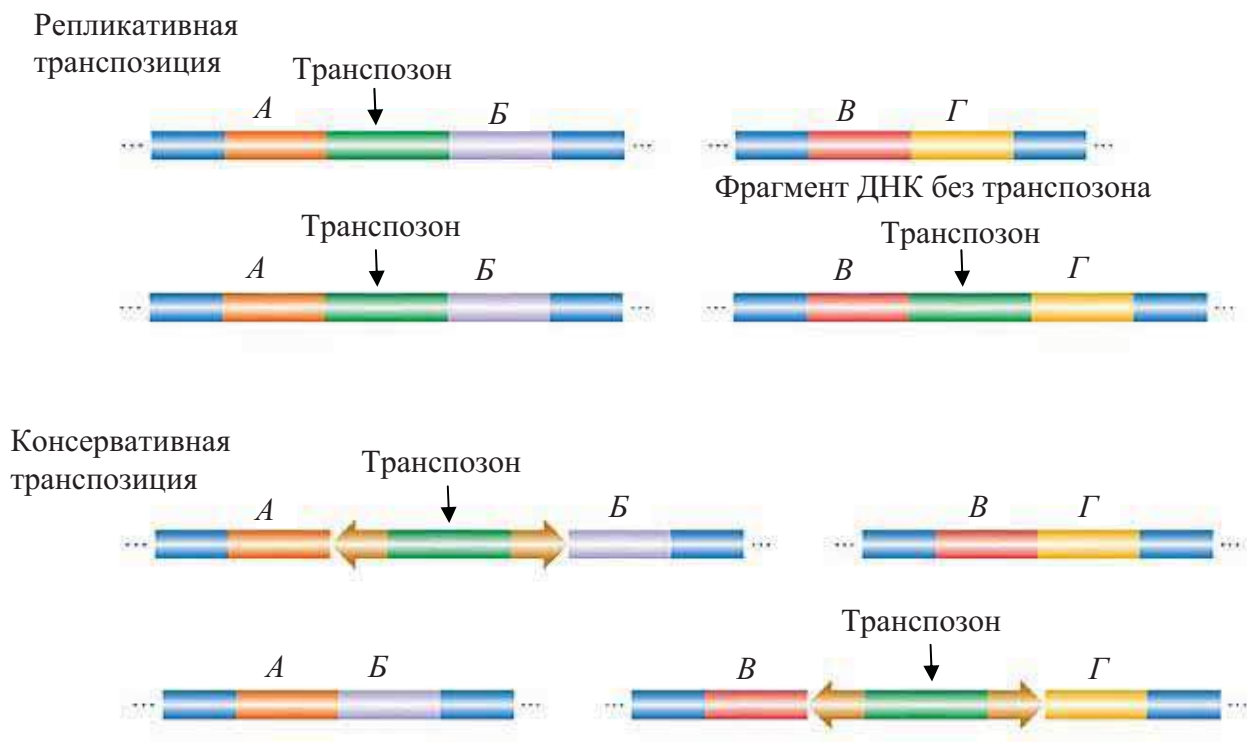


Рис. 57. Механизмы перемещения транспозонов

3) наряду с плазмидами и фагами могут обеспечивать перенос генов между различными видами бактерий, иногда весьма отдаленными, и, следовательно, играют важную роль в эволюции микроорганизмов;

4) используются в генетической инженерии *in vivo* и *in vitro*;

5) существенно ускоряют разработку частной генетики бактерий, имеющих важное промышленное значение.

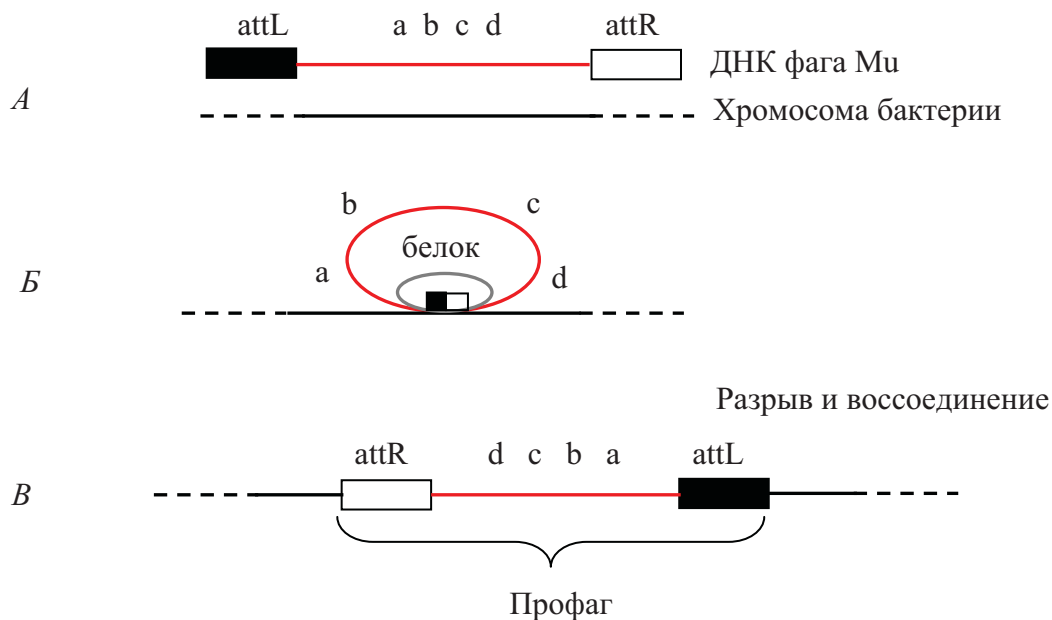
Бактериофаг Mu относится к умеренным бактериофагам. Характерной его особенностью является мутагенность, что отражено в названии Mu (*mutator*). Этот бактериофаг был впервые обнаружен у бактерий *E. coli*, но он размножается также на клетках *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Salmonella* и др. Он причисляется к перемещающимся генетическим элементам, так как во многих отношениях сходен с IS-элементами и транспозонами и отличается, по существу, только тем, что может формировать вирусные частицы. Сходство с IS-элементами и транспозонами в первую очередь выражается в том, что геном фага Mu (линейная двуспиральная ДНК – 38 т. п. н.) также имеет на концах инвертированные повторы, но только всего из двух нуклеотидных пар:

5' ТГ ЦА 3'ОН

Особенностью ДНК фага Mu, включенной в вирионы, является то, что на ее концах находятся участки бактериальной ДНК, которые захватываются при индукции профага и упаковываются вместе с фаговой ДНК в вирион.

Как и другие умеренные фаги, фаг Mu при заражении бактерий может развиваться по литическому пути с образованием 50–100 частиц на клетку, которая при этом погибает, или же может интегрироваться в хромосому с образованием лизогенной клетки, содержащей его. Интегрироваться фаг Mu может в разные места бактериальной хромосомы, вызывая мутации разных генов. «Горячих» участков включения фага Mu в ДНК бактерий не обнаружено. К интеграции фага Mu не применим кемпбелловский механизм, которым объясняется интеграция фага λ в хромосому *E. coli*. В данном случае не обнаружено образования ковалентно-замкнутых колец из линейной ДНК фага Mu как предварительной стадии интеграции. Электронно-микроскопические наблюдения показали, что геном Mu образует кольцо лишь в момент прикрепления обоих своих концов к одной точке бактериальной ДНК. Эти концы названы Mu-attL и Mu-attR, они соединяются не ковалентно, а удерживаются рядом на одной точке бактериальной ДНК белками.

Схему интеграции генома фага Mu в бактериальную хромосому можно представить следующим образом:



Следует отметить, что фрагменты бактериальной хромосомы, которыми фланкирована вирионная ДНК, при интеграции ДНК фага Mu в ре-

ципиентную хромосому не встраиваются. Они элиминируются нуклеазами бактериальной клетки.

Под воздействием различных факторов происходит индукция профага, при которой ДНК фага μ не вырезается, как у фага λ из бактериальной хромосомы, а реплицируется в интегрированном состоянии, не покидая хозяйскую ДНК. Образующиеся при репликации копии ДНК фага μ передаются в другие участки генома клетки бактерий.

Таким образом, ДНК- μ связана с геномом хозяина в течение всех раундов репликации и транспозиции как во время литического цикла после индукции профага, так и при заражении клеток извне. В этом отношении фаг μ не отличается от других перемещающихся генетических элементов бактерий, но принципиально отличается от остальных умеренных фагов, вырезающихся при индукции и размножающихся вне связи с хозяйской хромосомой. После заражения клетки вирионами фага μ его геном, прежде всего, интегрируется, и затем только в таком виде реплицируется, тогда как другие умеренные фаги могут размножаться без предварительной интеграции.

7.3. Методы выделения мутантов бактерий

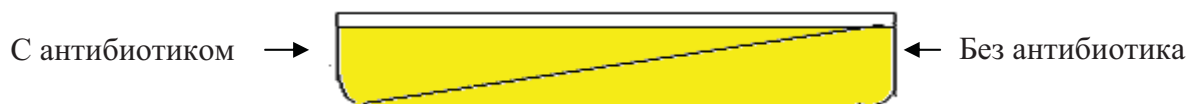
Частота спонтанных мутаций для многих признаков бактерий очень мала, и для того, чтобы выявить мутантные клетки, необходимо обследовать или проверить от 10^4 до 10^{10} клеток. Повысить частоту мутаций можно с помощью воздействия мутагенными факторами. Однако возникновение мутаций даже в том случае, когда они вызываются сильными мутагенами, — относительно редкое событие, и выделить или отобрать мутант, присутствующий на обильном фоне немутировавших клеток, нелегко. Все методы отбора мутантов подразделяются на две группы: методы прямого отбора и методы непрямого отбора.

Методы прямого отбора предполагают высеивание популяции бактерий на среду, содержащую тот или иной селективный агент. Прямым отбором можно выявить мутанты, устойчивые к различным антибиотикам, бактериофагам или химическим ингибиторам, т. е. агентам, обладающим в норме бактерицидным или бактериостатическим действием по отношению к немутировавшим родительским клеткам. Прямым отбором могут быть выделены также мутанты, способные к утилизации нетрадиционных источников углерода или азота. Благодаря высокой разрешающей способности (т. е. способности выявлять немногочисленные мутантные клетки на обильном фоне немутировавших) при использовании метода прямого отбора обычно не возникает необходимости в каких-либо прие-

мах по обогащению культуры мутантами. Одна из основных трудностей при прямом отборе состоит в выборе оптимальной концентрации селективного агента. Например, при отборе мутантов, устойчивых к различным антибиотикам, важно подобрать такую концентрацию антибиотика, которая полностью блокировала бы рост бактерий дикого типа, но в то же время позволяла бы развиваться устойчивым мутантам. Определение оптимальной концентрации методом проб и ошибок может потребовать много времени и сил. Для устранения этого разработаны более эффективные приемы селекции таких мутантов. Одним из них является селекция мутантов на твердой питательной среде с градиентом концентрации антибиотика (или какого-то другого ингибитора). Среда с градиентом антибиотика готовят следующим образом: питательную агаризованную среду заливают в чашку Петри, расположенную под углом к поверхности лабораторного стола:



После затверждения среды чашку устанавливают горизонтально и поверх первого слоя наносят слой среды с антибиотиком в какой-то определенной концентрации:



В результате диффузии антибиотика в нижний слой среды его концентрация становится пропорциональной толщине слоя среды, и таким образом устанавливается линейный градиент концентрации. Для того чтобы выделить устойчивые мутанты, бактериальную суспензию (в концентрации приблизительно $1 \cdot 10^{10}$ кл/мл) высевает на верхний слой среды. Чашки помещают в термостат при оптимальной для роста бактерий температуре. Образующаяся на чашке зона сплошного роста распространяется до линии градиента в соответствии с допустимой, но неизвестной концентрацией антибиотика. Вне этой зоны в местах, содержащих более высокие концентрации ингибитора, можно обнаружить отдельные многочисленные колонии:



Клоны, образованные клетками устойчивых мутантов, можно либо повторно высеять штрихом по направлению к областям с более высокой концентрацией антибиотика, либо использовать как исходный материал для посева на другую среду с линейным градиентом концентрации антибиотика, причем в данном случае ингибитор берется в таком количестве, чтобы его концентрация была в 2–5 раз выше, чем в первой чашке.

После отбора устойчивых к антибиотику мутантов нужно проверить уровень устойчивости, т. е. определить ту максимальную концентрацию антибиотика, к которой клетки являются устойчивыми. Это делают следующим образом: в чашки с различными концентрациями антибиотика в агаризованной среде засевают отобранный или выделенный мутант. После инкубации при оптимальной для роста исследуемых бактерий температуре определяют концентрацию антибиотика, при которой еще наблюдается рост мутантных бактерий:



Кроме селекции устойчивых мутантов на средах с градиентом концентрации ингибитора, используют и другие методы. Например, на поверхность агаризованной питательной среды в чашке Петри, засеянной исследуемыми бактериями, помещают диск фильтровальной бумаги, пропитанной раствором антибиотика или другим каким-то бактерицидным агентом. Антибиотик диффундирует в среду, в результате чего концентрация его линейно зависит от расстояния от диска. Рост бактерий будет наблюдаться там, где концентрация антибиотика еще не ингибирует рост бактерий, вокруг диска может быть зона отсутствия роста бактерий, в которой могут обнаруживаться отдельные колонии устойчивых клеток:



Большинство типов мутантных клеток нельзя выявить методами прямого отбора – это ауксотрофные мутанты, мутанты с измененной способностью к сбраживанию углеводов и некоторые условно-летальные мутанты. Самым распространенным приемом **непрямого выявления** таких мутантов являются случайный поиск соответствующих колоний и метод перепечатывания колоний с одной чашки Петри на другую (метод отпечатков, или реплик). Оба приема требуют проверки свойств большого числа бактериальных колоний, что утомительно и требует больших затрат времени.

Одним из способов повышения вероятности выявления нужного мутанта является посев бактерий на среды, содержащие индикаторы. Существуют методы, повышающие вероятность обнаружения нужных мутантов. Например, для выявления мутантов бактерий кишечной группы с измененной способностью к сбраживанию углеводов используют среду ЕМВ, в состав которой входит соответствующий углевод и индикатор, состоящий из эозина и метиленового синего. На этой среде колонии бактерий, сбраживающих углевод, окрашиваются в фиолетовый цвет с металлическим блеском, а колонии бактерий, не сбраживающих углевод, – в светло-розовый цвет.

Часто для повышения вероятности выделения нужных мутантов используют **пенициллиновый метод** обогащения популяции бактерий мутантами. Этот метод был предложен в 1948 г. независимо Дж. Ледербергом и Б. Дэвисом для обогащения популяции бактерий ауксотрофными мутантами. Его можно применять по отношению ко всем видам бактерий, чувствительным к пенициллину. Принцип метода основывается на том, что пенициллин лизирует растущие бактерии, но не повреждает бактерии, не способные к делению, например, такие, которые не размножаются из-за отсутствия в среде определенного фактора роста. Если смесь ауксотрофных и прототрофных бактерий инкубировать в минимальной среде, содержащей летальную дозу пенициллина, то прототрофные клетки будут погибать, так как они способны к делению, тогда как ауксотрофные мутанты, не способные к росту в этих условиях, выживут и сохраняться, несмотря на присутствие в среде пенициллина. В

результате такой обработки доля ауксотрофных клеток в популяции резко увеличивается относительно общего числа клеток.

После обогащения популяции бактерий мутантными клетками их необходимо изолировать. Для этого суспензию бактерий освобождают от пенициллина путем центрифугирования и отмывания свежей средой или добавлением пенициллиназы, а затем высевают на полноценную питательную среду. Сформировавшиеся колонии методом отпечатков проверяют на способность к росту на минимальной среде. Клетки клонов, которые растут на полноценной среде, но не растут на минимальной, и являются ауксотрофными мутантами.

Если бактерии устойчивы к пенициллину, то для обогащения можно применить другие антибиотики (новобиоцин, циклосерин, канамицин, налидиксовую кислоту и др.).

С помощью подобных приемов можно обогащать популяцию бактерий не только ауксотрофными мутантами, но и мутантами других типов, например температуроустойчивыми (при этом антибиотик вызывает гибель клеток дикого типа, растущих при более высокой температуре), неспособными использовать определенный субстрат и др.

7.4. Плазмиды бактерий

Основным и обязательным генетическим элементом бактериальной клетки является хромосома (или несколько хромосом) – структура, способная к самостоятельной репликации. Наряду с хромосомой в бактериальной клетке могут присутствовать плазмиды – стабильно наследуемые внехромосомные генетические элементы.

В большинстве случаев плазмиды бактерий представляют собой двухцепочечные суперскрученные ковалентнозамкнутые кольцевые молекулы ДНК. Благодаря такой структуре они не подвергаются действию клеточных нуклеаз. Существуют также линейные плазмиды, на которые нуклеазы не действуют, поскольку их концевые участки защищены специфическими белками. У некоторых плазмид имеется теломероподобные концы, в которых соединяются ковалентнозамкнутые двухцепочечные ДНК. Ферменты, участвующие в замыкании таких концов плазмид, называются *теломеразами*.

Размеры плазмид весьма переменны. В качестве примера можно отметить, что молекулярная масса одной из самых мелких плазмид, обнаруженных в штаммах бактерий *E. coli*, составляет 1,5 МД. Клетки псевдомонад могут содержать плазмиды, молекулярная масса которых

близка к 500 МД, что составляет около 20 % молекулярной массы хромосомы этих бактерий.

Следует отметить, что плазмиды не являются жизненно важными (или абсолютно необходимыми) наследственными структурами бактериальной клетки. Показано, что клетки бактерий можно «излечить» от плазмид (а плазмиды элиминировать) с помощью УФ-облучения, митомицина С, акридиновых красителей и других агентов. Жизнеспособность бактерий при этом сохраняется, но у них не проявляются признаки, которые детерминируются плазмидными генами.

Одним из основных свойств плазмид является **способность к автономной репликации**. Молекулы плазмидной ДНК приобретают ее в том случае, если в составе их имеется сайт начала репликации – *ori* и набор генов, необходимых для ее осуществления. Различают плазмиды со строгим и ослабленным контролем репликации. Плазмиды со **строгим контролем** репликации удваиваются синхронно с бактериальной хромосомой и, по-видимому, за счет использования одних и тех же репликативных комплексов, в которых главную роль играет ДНК-полимераза III. Таких плазмид в бактериальной клетке может насчитываться от одной до трех копий в расчете на одну копию бактериальной хромосомы. Строгий контроль репликации характерен для крупных плазмид, молекулярная масса которых превышает 20 МД.

Репликация плазмид с **ослабленным контролем** происходит с участием ДНК-полимеразы I. В каждой бактериальной клетке содержится в среднем 40–50 копий таких плазмид. В связи с этим плазмиды с ослабленным контролем репликации еще называют мультикопийными. Молекулярная масса таких плазмид, как правило, не более 15–20 МД.

Среди важнейших свойств плазмид рассматривают также их способность передаваться из клетки в клетку при конъюгации, или **трансмиссивность**. В зависимости от этого плазмиды подразделяют на конъюгативные (или трансмиссивные) и неконъюгативные (или нетрансмиссивные). Конъюгативные плазмиды способны передаваться из одной клетки в другую, их молекулярная масса обычно превышает 25 МД и они имеют гены, ответственные за перенос (*tra*-гены), объединенные в *tra*-опероны. Гены *tra*-оперонов детерминируют ряд свойств: синтез половых пилей, которые необходимы для образования конъюгативных пар; сам перенос ДНК и постконъюгативный синтез ДНК, что придает клетке донорные свойства.

подавляющее большинство конъюгативных плазмид имеет ограниченный круг клеток-хозяев, в которые они могут передаваться. Плазмиды с широким кругом клеток-хозяев называются **космополитными** или

промыскуютными. Примером таких плазмид является плазида RP4, относящаяся к классу R-плазмид, выделенная из клеток псевдомонад. Эта плазида с высокой частотой передается в клетки других грамотрицательных бактерий, принадлежащих к различным родам: *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Shigella* и др.

Неконъюгативные плазмиды не содержат *tra*-генов, придающих бактериальным клеткам свойства генетических доноров, и поэтому они неспособны самостоятельно передаваться от одних клеток к другим. Неконъюгативные плазмиды – это мелкие плазмиды с молекулярной массой менее 25 МД. Однако неконъюгативные плазмиды могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид. Перенос неконъюгативных плазмид с помощью конъюгативных называется **мобилизацией**. При этом неконъюгативная плазида является мобилизуемой, а конъюгативная – мобилизующей. Мобилизация может осуществляться из-за наличия в плазмидах IS-элементов и транспозонов, которые обеспечивают объединение двух плазмид друг с другом, т. е. образование коинтегратов. Коинтеграты передаются в реципиентную клетку за счет функционирования *tra*-генов конъюгативной плазмиды. В реципиентных клетках коинтеграты распадаются на два репликона, которые существуют автономно друг от друга.

Многие плазмиды способны к **интеграции в бактериальную хромосому**. Интеграция осуществляется с помощью IS-элементов и транспозонов, которые имеются и в хромосоме, и в плазмиде. Плазмиды, которые могут находиться как в автономном, так и в интегрированном состоянии по отношению к хромосоме клетки-хозяина, т. е. вести двойной «образ жизни», получили название **эписом**. При интеграции конъюгативной плазмиды в хромосому образуются доноры типа Hfr, способные с высокой частотой передавать хромосомные гены в клетки реципиента.

Нельзя не указать на такое свойство плазмид, как их **несовместимость**. Родственные плазмиды не могут сосуществовать в одной клетке, поскольку они несовместимы. Несовместимость плазмид обуславливается или блокированием репликации ДНК родственной плазмиды, или блокированием распределения дочерних молекул ДНК по клеткам. Все известные плазмиды относятся к определенной группе несовместимости, число которых достигает нескольких десятков, и соответственно в одну группу входят несовместимые друг с другом плазмиды. Несовместимыми могут быть плазмиды как с одними и теми же, так и с разными фенотипическими особенностями. Например, в группу несовместимости F1 входят плазмиды F-типа, Col-типа и R-типа.

Конъюгативным плазмидам присуще еще одно свойство – **поверхностное исключение**, приводящее к тому, что при наличии в клетке плазмиды определенного типа, контролирующей соответствующий признак, при конъюгации другая плазмидная ДНК с трудом преодолевает барьер клеточной стенки. Частота переноса плазмид при этом падает в 10–100 раз по сравнению с таковой в бесплазмидные клетки. Плазмиды, преодолевшие поверхностное исключение, стабильно сосуществуют с плазмидой реципиентной клетки, если они, конечно, совместимы.

Плазмиды придают клеткам различные **фенотипические признаки**:

1) устойчивость к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, мутагенам (R-плазмиды);

2) способность вызывать биodeградацию камфоры, ксилола, нафталина, салицилата, толуола, *n*-алканов и других неприродных и природных соединений (ксенобиотиков). Такие плазмиды получили название плазмид биodeградации или D-плазмид;

3) способность синтезировать антибиотики, бактериоцины, пигменты, инсектициды, гемолизины, токсины, фибринолизины, сероводород, поверхностные антигены;

4) способность использовать в качестве источника углерода различные углеводы и необычные аминокислоты;

5) способность вызывать образование опухолей у растений (Ti-плазмиды);

6) способность конъюгировать с реципиентными штаммами бактерий или донорные свойства;

7) способность осуществлять рестрикцию и модификацию ДНК и др.

Однако существует большое количество плазмид, фенотипические свойства которых неизвестны, такие плазмиды получили название **криптических**.

7.4.1. F-плазида

F плазида представляет собой конъюгативную эписому клеток *E. coli* K-12 со строгим контролем репликации (рис. 58). Размер ее кольцевой ДНК составляет 94,5 т. п. н. Молекулярная масса F-фактора равна $45 \cdot 10^6$ Д. Попадая в F⁻-клетки, эта плазида изменяет их фенотипические свойства и клетки приобретают половые пили, а также чувствительность к фагам MS2, f1, f2, Q β , становятся донорами ДНК, перестают поддерживать развитие фагов T3 и T7. При конъюгации таких клеток блокируется проникновение в них донорной ДНК (проявляется свойство поверхностного исключения).

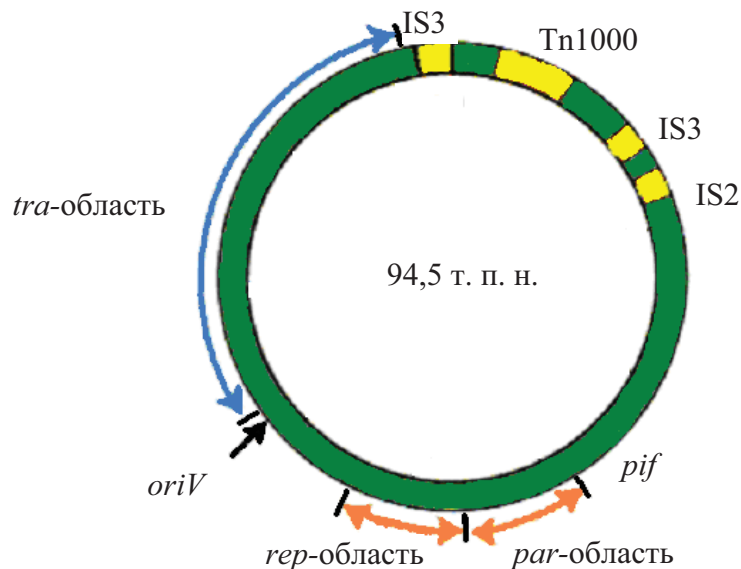


Рис. 58. F-плазмида бактерий *E. coli*

За конъюгативные свойства F-плазмиды отвечает *tra*-область, в которую входят 24 гена, сгруппированные в три оперона. Автономную репликацию F-плазмиды детерминируют *rep*-гены. За распределение молекул плазмидной ДНК по дочерним клеткам отвечают гены области *par*, вблизи которой находится ген *pif*, обеспечивающий исключение развития в клетке фагов Т3 и Т7. Структурными компонентами, с помощью которых осуществляется интеграция F-плазмиды в бактериальную хромосому, являются элементы IS2, IS3 и Tn1000. Они взаимодействуют с аналогичными элементами бактериальной ДНК в результате сайт-специфической рекомбинации и обеспечивают встраивание в нее F-плазмиды в разных локусах и направлениях, в зависимости от локализации и направления расположения бактериальных элементов. Клетка после интеграции в ее ДНК F-плазмиды приобретает свойства Hfr-клетки и способна с высокой частотой ориентированно передавать генетический материал в реципиентные клетки.

F-плазмида, интегрированная в хромосому, может из нее исключаться. При неправильном исключении F-плазмиды образуется F'-плазмида, т. е. F-плазмида, содержащая в своем составе гены бактериальной хромосомы. Если при вырезании F'-плазмиды из бактериальной хромосомы *tra*-оперон хотя бы частично делетируется, то образовавшаяся F'-плазмида будет неконъюгативной. Для сохранения свойств репликона F'-плазмида обязательно должна содержать область *rep*.

7.4.2. Плазмиды бактериоциногенности

В 1925 г. А. Грация обнаружил колицины – вещества белковой природы, синтезируемые бактериями *E. coli* и обладающие антибактериальным действием в отношении других штаммов *E. coli*. Они характеризовались узким спектром действия и были активны только в отношении близкородственных бактерий. Продукция подобных веществ была затем выявлена и у других бактерий, и в 1953 г. все они получили название «бактериоцины». В настоящее время способность к синтезу бактериоцинов обнаружена у различных видов как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. В большинстве случаев Бактериоцины называют в соответствии с видовой принадлежностью бактерий-продуцентов: колицины – *Escherichia coli*; марцесцины – *Serratia marcescens*; флюоцины – *Pseudomonas fluorescens* и т. д. Некоторые авторы используют родовое название бактерий-продуцентов: стафилококкцины – *Staphylococcus epidermidis*, вибриоцины – *Vibrio comma* и т. д.

Бактериоцины – это вещества белковой природы или представленные белком в комплексе с липополисахаридами, но в любом случае за антибактериальную активность бактериоцина отвечает белок. Бактериоцины различаются не только по спектру действия, но и по физико-химическим, морфологическим и некоторым другим свойствам. Согласно наиболее принятой классификации Д. Бредли (1967), бактериоцины делят на три группы :

1) бактериоцины с низкой молекулярной массой, которые не осаждаются при ультрацентрифугировании, чувствительны к протеолитическому ферменту трипсину, термостабильны и неразличимы в электронном микроскопе;

2) бактериоцины с высокой молекулярной массой, которые легко осаждаются при ультрацентрифугировании, резистентны к ферменту трипсину, термолабильны, выявляются в электронном микроскопе как фагоподобные структуры или их компоненты;

3) бактериоцины, для которых четко показана ферментативная активность.

По механизму действия на бактериальную клетку бактериоцины подразделяют на четыре основные группы:

- ингибирующие окислительное фосфорилирование в цитоплазматической мембране;
- разрушающие ДНК;
- блокирующие синтез белков;
- нарушающие полупроницаемость цитоплазматической мембраны.

Показано, что большинство бактериоцинов проявляет активность, не проникая внутрь клетки. Они передают сигнал на мишень действия посредством цитоплазматической мембраны.

Синтез большинства бактериоцинов детерминируется особыми плазмидами, названными **бактериоциногенными факторами**. Некоторые плазмиды бактериоциногенности передаются при конъюгации, но большинство данных плазмид относится к разряду неконъюгативных. В качестве примера одной из плазмид бактериоциногенности рассмотрим плазмиду ColE1, детерминирующую синтез колицина E1 у бактерий *E. coli* (рис. 59).

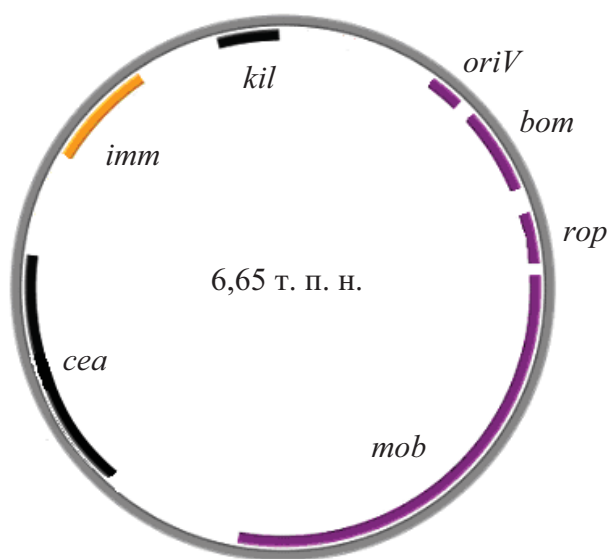


Рис. 59. Генетическая карта плазмиды ColE1

Плазмида ColE1 относится к классу неконъюгативных плазмид с ослабленным контролем репликации. Размер плазмиды ColE1 равен 6,65 т. п. н. В составе плазмиды содержится сайт *ori*, с которого начинается однонаправленная репликация, гены *cea*, отвечающие за синтез колицина E1, гены *imm*, обеспечивающие клетке иммунитет к действию этого колицина, а также ген *kil*, детерминирующий синтез белка, который вносит нарушения в структуру внешней мембраны, что обуславливает освобождение колицина E1 из бактерий в окружающую среду без разрушения клеток. Ген *rop* регулирует количество копий плазмиды в клетке. Синтез колицина в норме репрессирован, но индуцируется агентами, влияющими на ДНК.

Плазмида ColE1 при наличии в клетке конъюгативной плазмиды может передаваться в реципиентные клетки, т. е. происходит ее мобилизация. У плазмиды ColE1 за процесс мобилизации отвечают четыре белка, кодируемые областью *mob* (**mobilization**). Роль каждого из белков по-

ка не установлена. Предполагается, что один из этих белков делает разрыв одной из нити ДНК плазмиды ColE1 в сайте *bom*, необходимый для начала переноса. После этого разорванная нить переходит в реципиентную клетку, начиная с 5'-конца. Перенос осуществляется за счет *tra*-генов конъюгативной плазмиды. Образование коинтеграта между плазмидой ColE1 и конъюгативной плазмидой не происходит, так как плазида ColE1 не имеет в своем составе ни IS-элементов, ни транспозонов. При такой мобилизации перенос конъюгативной плазмиды в реципиентную клетку может и не происходить.

Следует отметить, что синтез некоторых бактериоцинов детерминируется генами, локализованными в хромосоме. Это характерно для грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia chrysanthemi* и др.

7.4.3. R-плазмиды или факторы резистентности

Бактерии *Shigella*, устойчивые сразу к нескольким антибиотикам, были впервые выделены в 1950-е годы в Японии от больных дизентерией, в лечении которых использовали антибиотики. Поскольку от одного и того же больного выделялись штаммы бактерий, как чувствительные к антибиотикам, так и полирезистентные, объяснить возникновение множественной резистентности путем мутационной изменчивости было трудно. К тому же оказалось, что множественная резистентность трансмиссильна и может передаваться от одних клеток *Shigella* к другим, а также к бактериям *E. coli*. Было показано, что передача признаков лекарственной устойчивости происходит при контакте клеток в результате конъюгации; перенос не зависит от наличия F-фактора, а лекарственная устойчивость утрачивается, если проводить элиминацию акридиновыми красителями.

Только в 1963 г. японский ученый Т. Ватанабе опубликовал первый обзор, в котором были суммированы результаты исследований по лекарственной устойчивости у бактерий, свидетельствующие в пользу того, что лекарственная устойчивость контролируется внехромосомными генетическими детерминантами, которые были названы **R-плазмидами** или **R-факторами**.

R-плазмиды, как и другие плазмиды, представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. Молекулярная масса R-плазмид различна — от 3 до 300 МД. В клетке может присутствовать до нескольких десятков копий мелких плазмид (плазмид с ослабленным контролем реп-

фикации), тогда как число копий крупных R-плазмид с молекулярной массой ≥ 20 МД, как правило, составляет одну-две на хромосому.

Большая часть известных R-плазмид клинических изолятов грамотрицательных бактерий конъюгативна, у грамположительных штаммов выделяют как конъюгативные, так и неконъюгативные R-плазмиды.

Плазмиды резистентности могут контролировать устойчивость к одному или нескольким антибиотикам, причем комбинации антибиотиков могут быть самыми различными.

Для некоторых R-плазмид характерен широкий круг хозяев (возможен их перенос в клетки бактерий разных родов). К таким R-плазмидам относится уже упоминаемая нами плазмида RP4.

Любая конъюгативная R-плазмида несет две группы генов. Первая группа – гены, ответственные за передачу плазмиды путем конъюгации (гены *tra*), они образуют так называемый «фактор переноса устойчивости» (RTF, *resistense transfer factor*). Область RTF по своей молекулярной структуре гомологична *tra*-оперону F-фактора *E. coli*. Вторая группа – гены, обуславливающие собственно резистентность (*r-det*).

На примере конъюгативной плазмиды R100 со строгим контролем репликации можно рассмотреть общие особенности строения R-плазмид (рис. 60).

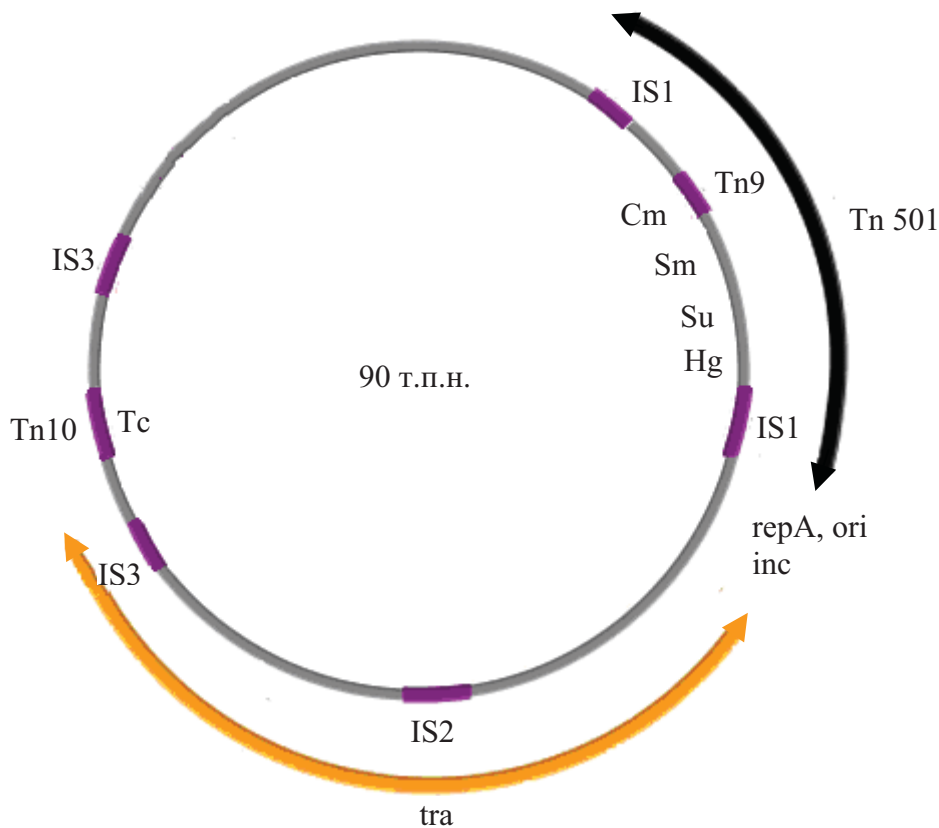


Рис. 60. Генетическая карта плазмиды R100

Размер плазмиды R100 составляет 90 т. п. н. Эта плазида относится к классу плазмид с множественной лекарственной резистентностью и содержит гены, определяющие устойчивость клеток к тетрациклину (Tc), хлорамфениколу (Cm), стрептомицину (Sm), сульфаниламидам (Su) и к ионам ртути (Hg). Почти все эти гены (кроме Tc) располагаются в одной области (r-det), ограниченной прямыми повторами IS1-элементов. Благодаря этому область r-det превращается в подвижный генетический элемент и может переноситься в различные репликоны. Другая часть плазмиды R100, называемая RTF, может быть самостоятельной конъюгативной плазмидой, содержащей ген Tc. В этой части располагаются также гены, отвечающие за репликацию (*repA* и *repB*) и несовместимость (*inc*) плазмид.

Некоторые R-плазмиды за счет транспозонов и IS-элементов могут встраиваться в бактериальную хромосому, что обуславливает передачу хромосомных генов. При эксцизии таких плазмид из хромосомы могут образовываться доноры R'-типа.

Механизмы устойчивости к антибиотикам, определяемые R-плазмидами, как правило, отличаются от механизмов резистентности, детерминируемых хромосомными генами. Наглядным примером этому служит резистентность к стрептомицину. Если устойчивость определяется генами, локализованными в хромосоме, то она связана с изменением некоторых белков 30S-субъединиц рибосом, в результате чего в клетках изменяется мишень для действия стрептомицина. В отличие от этого, устойчивость, обусловленная R-плазмидами, основана на инактивации антибиотика в результате его аденилирования, фосфорилирования или ацетилирования под влиянием соответствующих ферментов трансфераз.

Такая ферментативная инактивация антибиотиков часто бывает причиной устойчивости к ним, обусловленной R-плазмидами. Например, хлорамфеникол подвергается ацетилированию, канамицин и неомицин – фосфорилированию и ацетилированию, а пенициллин инактивируется пенициллиназой. Устойчивость к антибиотикам тетрациклинам обусловлена изменением проницаемости клеточной мембраны для них.

7.4.4. Ti-плазмиды

Ti-плазмиды – это плазмиды, ответственные за образование опухолей у некоторых представителей голосеменных и большинства двудольных покрытосеменных растений. Эти плазмиды обнаружены в клетках вирулентных штаммов бактерий *Agrobacterium tumefaciens*, вызывающих ра-

ковое заболевание растений, получившее название «корончатый галл». Ti-плазмиды – кольцевые молекулы ДНК длиной до 500 т. п. н. и молекулярной массой в среднем $1,3 \cdot 10^8$ Д. Относятся к классу конъюгативных плазмид.

После заражения растения бактериями *Agrobacterium tumefaciens* Ti-плазмиды проникают из бактерий в клетки растения. Далее часть их ДНК, так называемая Т-ДНК, встраивается в хромосому инфицируемого растения. В таком состоянии Т-ДНК вызывает образование опухоли, гиперпродукцию фитогормонов, а также синтез ряда производных аминокислот, которые называются **опинами**. Опины, выделяемые клетками опухоли, бактерии используют в качестве источников углерода и азота.

Многообразие плазмид не ограничивается вышеупомянутыми примерами. Все они имеют существенное значение для клетки бактерий в том смысле, что определяют ряд ее фенотипических свойств, позволяющих более гибко и быстро реагировать на изменение условий окружающей среды. Кроме того, плазмиды бактерий находят широкое применение при теоретических исследованиях и выполнении ряда практических задач:

1. Широко применяются в генетической инженерии. С их помощью можно получить рекомбинантные молекулы ДНК, вероятность образования которых в природе крайне низка или возникновение их вообще невозможно.

2. Играть значительную роль в эволюции бактерий.

3. Представляют большую ценность как материал для исследования структуры и функционирования генетического аппарата бактериальной клетки.

4. Важны с учетом фенотипов, которые они детерминируют:

- наличие плазмид биodeградации позволяет бактериям развиваться в средах, содержащих необычные или неприродные источники углерода. Такие бактерии используют для биологической очистки сточных вод;

- бактериоциногенность, определяемая в основном наличием плазмид, имеет большое значение для развития популяций бактерий. Бактериоциногенные бактерии подавляют развитие других бактерий, преимущественно обладающих сходными пищевыми потребностями (т. е. родственные виды микроорганизмов), что обеспечивается бактериоцином, который в норме продуцируют отдельные клетки бактериоциногенной популяции. В результате синтеза бактериоцина эти клетки погибают, в то время как большинство клеток сохраняет иммунитет к его действию и вытесняет микроорганизмы других видов, чувствительных к нему. Таким образом, бактерии, имеющие бактериоциногенные факторы, обладают

важным селективным преимуществом в условиях микробных ассоциаций, естественно складывающихся в процессе эволюции. Эти селективные преимущества реализуются только на уровне популяции и обеспечиваются ценой гибели отдельных ее особей.

Бактериоциногенные штаммы микроорганизмов используют в медицинской практике для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта. Выпускаются бактериоциногенные препараты: колибактерин (высушенная суспензия живых бактерий антагонистически активного штамма *E. coli* М-17), бифидумбактерин (высушенная суспензия живых антагонистически активных бифидобактерий), бификол (высушенная суспензия живых антагонистически активных штаммов бифидобактерий и бактерий *E. coli* М-17) и др. Такие препараты используют в тех случаях, когда антибиотики при чрезмерном их употреблении приводят к нарушениям витаминного баланса, дисбактериозу (нарушению состава естественной микрофлоры кишечника) и т. п.

Бактериоциногенные микроорганизмы используются для типирования штаммов бактерий;

- R-плазмиды обеспечивают бактериям, их содержащим, селективные преимущества по сравнению с бесплазмидными;
- плазмиды, детерминирующие токсинообразование, и бактерии, обладающие такими плазмидами, способны вызывать заболевания у человека, животных и растений;
- Ti-плазмиды обеспечивают трансформацию нормальных клеток растений в раковые. Этим они приносят вред сельскому хозяйству, особенно виноградарству.

7.5. Способы генетического обмена у бактерий

Бактерии для воспроизведения себе подобных особей не нуждаются в партнерах. Их удвоившийся после репликации геном каждый раз передается клетке «по вертикали» в бесконечном ряду поколений. Но наряду с таким, бесполом, способом передачи генов от предков к потомкам у бактерий существует и горизонтальный перенос генов, при котором из клетки-донора в клетку-реципиента передается часть генетического материала (хромосомы), в результате образуется неполная зигота, или **мерозигота**. Затем переданный фрагмент хромосомы донора спаривается с хромосомой реципиента с последующей рекомбинацией. За рекомбинацией следует процесс репликации ДНК и деления клетки, в результате чего возникают клетки, содержащие только рекомбинантную хромосому, которые называются **рекомбинантами**.

Существуют три основных способа обмена генетической информацией, или горизонтального переноса генов: трансформация, трансдукция и конъюгация. Эти процессы отличаются друг от друга способом транспортировки ДНК.

Трансформация – перенос генетической информации, при котором ДНК, выделенная из клетки-донора, поступает в клетку-реципиент. Начальным этапом генетической трансформации является необратимая адсорбция ДНК на поверхности клетки и ее поглощение. К необратимой адсорбции и поглощению ДНК способны лишь клетки бактерий, находящиеся в состоянии компетентности. Последующие этапы, как и при других парасексуальных процессах, связаны с рекомбинацией трансформирующей хромосомной ДНК донора с хромосомой реципиента и пострекомбинационными событиями. Получаемые при этом способе генетического обмена рекомбинанты называются **трансформантами**. Количество переносимой при трансформации ДНК составляет около 10 т. п. н. Генетическая трансформация у бактерий может осуществляться не только хромосомной, но и плазмидной ДНК.

Трансформация – это не только процесс, происходящий *in vitro*, она может осуществляться и за счет ДНК, спонтанно выделившейся из клетки без участия экспериментатора. Это спонтанная, или естественная, трансформация. Выход ДНК из клетки обусловлен, главным образом, аутолизом и при естественной трансформации бактерия-донор ДНК обязательно погибает. Естественная трансформация является одним из способов горизонтального переноса генов в природных условиях.

Трансдукция – перенос генетической информации (хромосомных генов или плазмид) от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при участии бактериофагов. При трансдукции фрагменты хромосомы или плазмиды должны упаковаться в головку бактериофага; выйти в составе этой фаговой частицы из клетки-донора в результате ее лизиса и попасть в другую клетку (клетку-реципиент) при новом акте заражения. Белковый капсид фаговой головки предохраняет находящуюся в ней ДНК от разрушения внеклеточными нуклеазами. В этом отношении трансдуцирующая ДНК более «сохранна», чем «голая» ДНК, при трансформации. Поскольку адсорбция хвостового отростка фага на рецепторах поверхности клетки видоспецифична, то и перенос генетического материала при трансдукции может происходить, главным образом, между близкородственными бактериями.

При трансдукции размеры переносимого фрагмента ДНК определяются размерами головки бактериофага. Различные фаги могут переносить фрагменты ДНК от 20 до 40 т. п. н. Таким образом, при трансдук-

ции передаются как единичные гены, как и сцепленные маркеры. Рекомбинанты, получаемые при данном способе обмена генетической информацией, называются **трансдуктантами**.

Конъюгация – генетический обмен, сопровождающийся переносом генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при их непосредственном контакте.

При конъюгации перенос генетического материала обеспечивается конъюгативными плазмидами, такими, например, как F-плазида у бактерий *E. coli*. Конъюгативные плазмиды содержат *tra*-опероны, ответственные за перенос (*transfer*) генетического материала. Ряд генов *tra*-оперонов определяет синтез половых пилей, другие отвечают за перенос самой плазмиды или мобилизацию переноса хромосомной ДНК из клетки в клетку. Передача плазмиды или хромосомы начинается с одностороннего разрыва в области *oriT* плазмиды, которая называется точкой начала передачи. Для того чтобы произошла передача хромосомных генов, плазида F (или другая конъюгативная плазида) должна интегрироваться в хромосому. Разорванная в области *oriT* нить ДНК разматывается, и односторонняя ДНК, начиная с 5'-конца, переносится в реципиентную клетку. Одновременно на обеих нитях плазмидной и хромосомной ДНК – и той, которая остается в донорной клетке, и той, которая поступила в клетку-реципиент, – синтезируются комплементарные им нити. Благодаря этому в клетке-доноре восстанавливается целостность хромосомы и F-плазмиды. Заключительной стадией передачи F-плазмиды является рециркуляризация ее ДНК в клетке-реципиенте, а передачи хромосомной ДНК – рекомбинация ее с хромосомой реципиента.

Процесс переноса хромосомных генов при конъюгации может осуществляться также при участии содержащихся в хромосоме конъюгативных транспозонов. Такие транспозоны, кроме генов, отвечающих за транспозицию, и генов, детерминирующих фенотипические признаки, несут *tra*-гены, напоминающие соответствующие гены конъюгативных плазмид. Конъюгативные транспозоны могут выщепляться из хромосомы, образовывать плазмидоподобные структуры и, как и конъюгативные плазмиды, индуцировать (мобилизовать) перенос мелких плазмид в клетку партнера, а также сами переходить в нее.

Процессы конъюгации, особенно ведущие к передаче плазмид, очень широко распространены среди бактерий. Конъюгация – наиболее эффективный механизм для горизонтального переноса генов в любой среде обитания бактерий. Конъюгировать могут бактерии, весьма далекие в систематическом отношении. Плазмиды, осуществляющие конъюгацию между неродственными бактериями и успешно поддерживающиеся в

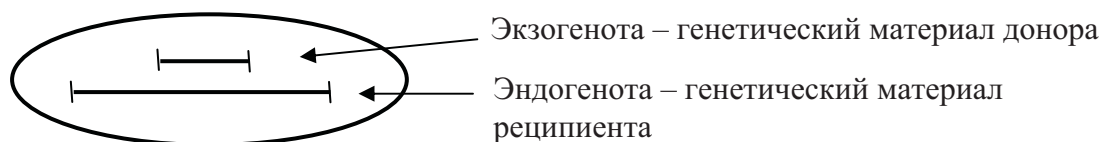
них, как уже отмечалось, называются плазмидами широкого круга хозяев. Конечно, интеграция переданной хромосомной ДНК в геном реципиента за счет гомологичной рекомбинации при межродовых скрещиваниях практически всегда исключается; однако у бактерий имеются «обходные пути», функционирующие за счет незаконной (или нехомологичной) рекомбинации.

Количество переносимой ДНК при конъюгации больше, чем при трансформации и трансдукции. В «мягких» условиях скрещивания может переноситься вся хромосома. Получаемые при этом способе обмена генетической информацией рекомбинанты называются **трансконъюгантами**.

Общими особенностями для всех способов обмена генетической информацией у бактерий являются следующие.

1. Процесс переноса ДНК всегда односторонний, или однонаправленный: от донорных бактерий к реципиентным.

2. Полного обмена генетической информацией не наблюдается, результатом чего является образование мерозиготы



Состояние мерозиготы носит относительно непродолжительный характер, в конечном итоге экзогенота должна встроиться в эндогеноту. Если этого не происходит, то экзогенота элиминируется эндонуклеазами клетки-реципиента.

3. Для образования рекомбинантного потомства процесс генетического переноса должен обязательно закончиться рекомбинацией.

Кроме трех основных способов обмена генетической информацией, имеются и другие способы, которые еще недостаточно изучены и не так успешно применяются в лабораторной практике. Одним из таких способов обмена является слияние бактериальных протопластов или (и) сферопластов. Это так называемый **искусственный обмен генетической информацией**, так как здесь участвуют не интактные клетки, а протопласты или сферопласты. Исследователь должен сначала получить протопласты или сферопласты из клеток обоих родителей, а на следующем этапе смешать и индуцировать их слияние путем обработки полиэтиленгликолем либо другими агентами. Первичный продукт такого слияния – клетка, объединяющая в себе геномы обоих родительских клеток. Слившиеся протопласты или сферопласты высевают на специальные среды, на которых создаются условия для регенерации их в морфологи-

чески полноценные клетки. В процессе последующей рекомбинации возникают стабильные рекомбинанты, совмещающие некоторые признаки обоих родительских штаммов.

Метод слияния протопластов или сферопластов пока успешно применяется только в отношении грамположительных бактерий. В последнее время разработаны условия для слияния сферопластов таких грамотрицательных бактерий, как *Pseudomonas*, *Erwinia* и др.

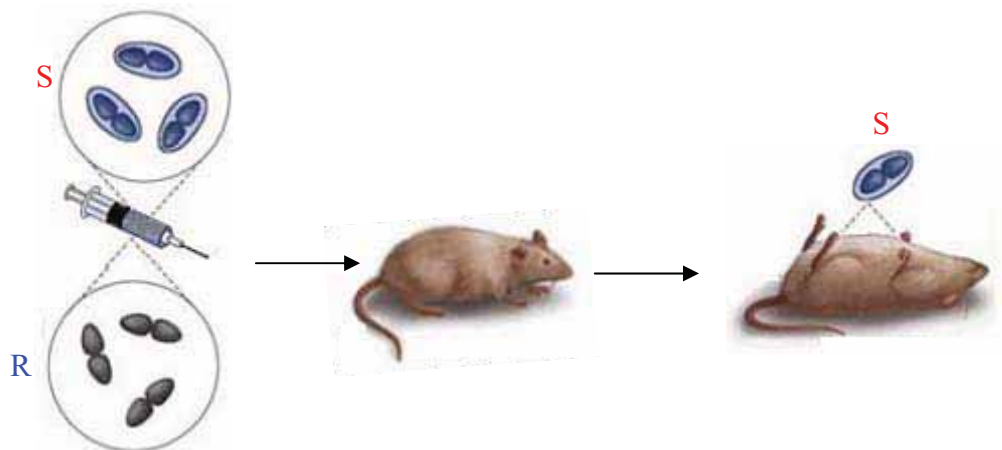
В отличие от конъюгации, трансформации и трансдукции, при которых ДНК передается от донора реципиенту, перенос генетической информации при слиянии протопластов или сферопластов не носит однонаправленного характера, а родительские клетки вносят равноценный вклад в образование рекомбинантов.

7.5.1. Трансформация

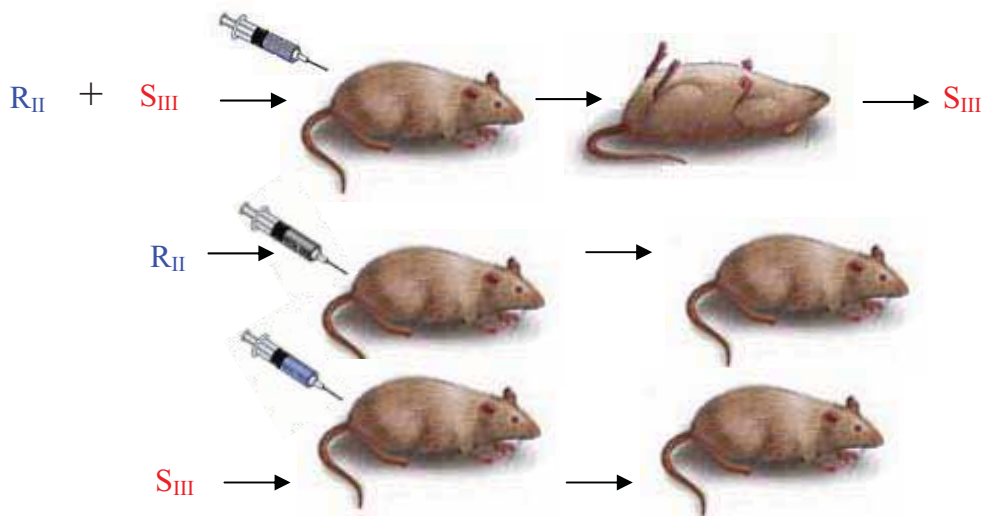
Явление трансформации было открыто Ф. Гриффитом в 1928 г. в опытах на пневмококках (*Streptococcus pneumoniae*) – грамположительных бактериях, относящихся к группе молочнокислых бактерий. Ко времени открытия явления трансформации свойства пневмококков были изучены достаточно хорошо. В частности, было известно, что среди пневмококков одного и того же вида, кроме штаммов, имеющих полисахаридную капсулу, обычно есть и бескапсульные варианты, получающиеся в результате мутаций. Было также установлено, что наличие и отсутствие капсулы определяет некоторые важные свойства клеток. Клетки, обладающие капсулой, растут в виде так называемых S-колоний: слизистых, довольно крупных и с гладкой поверхностью. Бескапсульные клетки дают начало мелким, с неровной поверхностью (шероховатым) R-колониям. За счет наличия капсулы бактерии из S-колоний обладают вирулентными свойствами и вызывают септицемию, размножаясь практически беспрепятственно в организме хозяина так как капсула защищает их от фагоцитирующих клеток. Бескапсульные клетки являются авирулентными. Было установлено, что существует большое число различных штаммов пневмококков, которые отличаются друг от друга по химическому составу полисахаридной капсулы и которые можно различить серологически. Сейчас известно около 70 серотипов пневмококков.

Трансформация была открыта в одном из вариантов опытов по иммунизации мышей вакциной, состоящей из пневмококков, убитых нагреванием при температуре 60–80 °С. Ф. Гриффит обнаружил, что если мышам подкожно ввести смесь живых бескапсульных клеток (R) и убитых нагреванием вирулентных пневмококков (S), имеющих капсулу, то мы-

ши погибают. Из органов мышей при этом можно выделить живые капсульные клетки пневмококков.



Если мышам вводили живые авирулентные (**R**) клетки пневмококков и убитые вирулентные (**S**) клетки пневмококков разных серотипов (клетки имели разные антигены), то выделенные из органов мыши капсульные клетки имели измененный серотип – тот, к которому принадлежали убитые **S**-пневмококки. В контрольных опытах введение по отдельности такого же количества живых авирулентных пневмококков или убитых вирулентных не приводило к появлению живых капсульных форм.



Чтобы доказать отсутствие случайного загрязнения бескапсульной культуры отдельными капсульными клетками, был поставлен эксперимент с использованием клеток пневмококков, меченых специфическим соматическим белковым антигеном или маркерами лекарственной устойчивости. Известно, что эти свойства клеток изменяются независимо от капсульного полисахарида.



Так было доказано отсутствие случайного загрязнения бескапсульной культуры отдельными капсульными клетками.

На основании полученных результатов Ф. Гриффит сделал вывод, что существует трансформирующее начало, которое превращает бескапсульные клетки одного серотипа в капсульные клетки другого серотипа.

В 1930 г. М. Даусон установил, что выдерживание суспензии клеток в течение двух суток при температуре 37 °С уничтожает трансформирующую активность таких бактерий. В 1931 г. М. Даусон и Р. Сиа осуществили трансформацию не в организме мыши, а *in vitro*, смешав убитые нагреванием капсульные клетки и живые бескапсульные пневмококки в жидкой питательной среде с добавлением крови. Позднее в 1932 г. Дж. Аллоуэй осуществил специфическую трансформацию *in vitro* в присутствии бесклеточных экстрактов, полученных из клеток S -типа. Пневмококки были разрушены замораживанием-оттаиванием или дезоксиголатом натрия, и лизат несколько раз переосаждали спиртом. Полученный осадок растворяли и смешивали с бескапсульными живыми клетками, в результате с высокой частотой происходило образование капсульных клеток.

Таким образом, в работах 1928–1933 гг. доказано существование трансформации у пневмококков. Было установлено, что это явление может происходить как в организме животного, так и *in vitro*, а также, что для трансформации необходим какой-то фактор, который не инактивируется при обработке лизата клеток спиртом.

Интерес к опытам по трансформации возродился в 1944 г., когда была опубликована классическая работа О. Эвери, К. Мак-Леода и М. Мак-Карти. Они установили, что трансформацию можно воспроизвести, используя в качестве трансформирующего агента препарат очищенной ДНК, полученный из капсульных клеток. Методика эксперимента заключалась в следующем. Капсульные клетки пневмококков типа III (S_{III}), убитые нагреванием при температуре 65 °С, лизировали с помощью дезоксиголата натрия и лизат осаждали спиртом. Полученный осадок растворяли и из него удаляли белок и полисахариды. После нескольких дополнительных переосаждений спиртом получали препарат ДНК, содержащий только 3 % белка. Этим препаратом ДНК обрабатывали бескапсульные клетки типа II (R_{II}). Частота выявления трансформантов (S_{III} -

типа) была высокой. В этой же работе и в работах двух последующих лет изучены некоторые типы воздействий, инактивирующих полученный препарат из капсульных клеток, убитых нагреванием. Оказалось, что протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, проназа) и РНКазы не снижали трансформирующую активность препарата, но действие ДНКазы ингибировало ее полностью. Был сделан вывод, что **трансформирующим началом** является ДНК. Позднее было показано, что при использовании в качестве трансформирующих препаратов меченой радиоактивным фосфором (^{32}P) ДНК, метка необратимо встраивается в ДНК бактерий-реципиентов. Более того, между степенью включения метки и числом образующихся трансформантов существует прямая зависимость.

В настоящее время трансформация, кроме пневмококков, воспроизведена и на других видах микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, гемофильных бактериях (*Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*) и др. Трансформацию удалось осуществить не только между бактериями одного и того же вида, но и между бактериями, принадлежащими к разным видам. Однако межвидовая трансформация наблюдается, как правило, лишь у близкородственных бактерий и происходит с меньшей частотой, чем внутривидовая. В начале 1970-х годов было показано, что трансформировать клетки можно не только хромосомной, но и плазмидной ДНК. Плазмиды после этого нормально функционировали и реплицировались в реципиентных клетках.

Процесс трансформации, начиная с момента добавления ДНК из клеток донорного штамма к культуре реципиента, в общих чертах включает следующие этапы, или стадии.

1. Адсорбцию донорной ДНК на поверхности реципиентной клетки. На этом этапе трансформирующий фактор чувствителен к ДНКазе.

2. Поглощение донорной ДНК реципиентной клеткой. Причем ДНК может поглощаться только теми клетками, которые находятся в состоянии компетентности. На этой стадии ДНК уже нечувствительна к действию ДНКазы.

3. Образование в реципиентной клетке однопитевых фрагментов донорной ДНК.

4. Синапс одноцепочечной донорной ДНК с двухцепочечной хромосомой реципиента.

5. Интеграцию части донорной молекулы ДНК в реципиентную ДНК в результате рекомбинации.

6. Репликацию рекомбинантной молекулы ДНК.

7. Экспрессию генов, переданных от донора, т. е. образование трансформантов.

Состояние компетентности у бактерий

Компетентностью при генетической трансформации обычно называется способность бактериальных клеток адсорбировать и поглощать чужеродную ДНК. Однако в последние годы в это понятие включают и все последующие стадии, вплоть до рекомбинации трансформирующей ДНК с хромосомой реципиентной бактерии.

У многих видов бактерий компетентность возникает лишь на определенном этапе роста культуры. Например, культуры стафилококков находятся в стадии компетентности в ранней логарифмической фазе роста. Культуры бактерий *Bacillus subtilis* находятся в стадии компетентности на более поздних этапах экспоненциального роста, гемофильные бактерии – в стационарной фазе роста. У некоторых бактерий клетки компетентны в любой фазе роста (например, у гонококков и менингококков).

Установлено, что в компетентных культурах стрептококков, гемофильных бактерий к трансформации способна почти каждая клетка. В то же время у *B. subtilis* в этих же условиях ДНК могут поглощать только 10–15 % клеток популяции, у *Aspergillus niger* – 0,1–0,2 %, у *Rhizobium japonicum* – до 0,1 % клеток всей популяции.

Состояние компетентности регулируется множеством генов (у бацилл их не менее 40), которые принято подразделять на ранние и поздние. К **ранним** относятся гены «настраивающие» (подготавливающие) клетку на приобретение компетентности; к **поздним** – гены, детерминирующие механизмы связывания и поглощения ДНК, преобразования (или процессинга) ДНК по ходу поглощения; и наконец, гены, управляющие рекомбинацией трансформирующей ДНК с хромосомой реципиентной клетки.

В ряде научных лабораторий (Р. Пакула, Р. Хочкисс, Р. Томас и др.) было показано, что состояние компетентности у стрептококков можно передать от компетентных клеток некомпетентным. Передача состояния компетентности не требует физического контакта бактерий, потому что его можно индуцировать посредством фильтратов суспензий бактериальных культур. Было сделано заключение, что существует какой-то внеклеточный фактор, обеспечивающий состояние компетентности.

В тех же лабораториях были изучены некоторые свойства фактора компетентности бактерий *S. pneumoniae*, который мог быть выделен после осаждения сульфатом аммония или этиловым спиртом. Было установлено, что это пептид, чувствительный к протеазам и относительно ус-

тойчивый к высокой температуре (при нагревании до 100 °С инактивировался за 30 мин).

В работах 1990-х годов вместо «фактор компетентности» употребляется термин «феромон». Показано, что феромоны стрептококков являются катионными пептидами небольшой величины. Например, у *S. pneumoniae* они состоят из 17 аминокислотных остатков, у других стрептококков – от 14 до 23 остатков. У *B. subtilis* феромоны – это пептиды из 9–10 аминокислотных остатков, что объясняет их сравнительно высокую термоустойчивость.

В поведении феромонов компетентности бацилл и стрептококков есть общие особенности. Эти небольшие пептиды выходят из компетентных клеток в среду и индуцируют развитие компетентности, активируя все гены компетентности у почти всех клеток популяции стрептококков или части клеток бацилл.

Восприятие клеткой феромонного сигнала осуществляется за счет двухкомпонентной передающей системы, состоящей из сенсорного белка и белка-регулятора ответа (рис. 61).

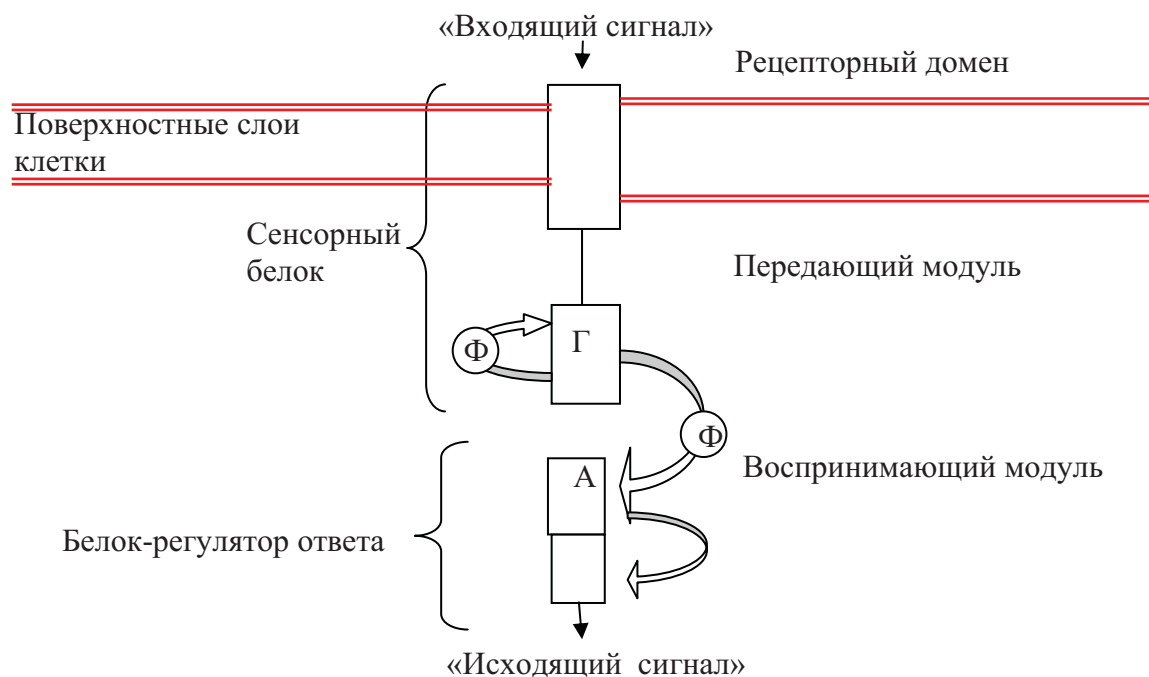


Рис. 61. Двухкомпонентная передающая система (по А. А. Прозорову, 2001):
 —(Ф)— — реакция фосфорилирования; Г, А – остатки гистидина и аспартата

Сенсорный белок состоит из трансмембранного рецепторного домена, пронизывающего поверхностные слои клетки и соприкасающегося с внешней средой, и передающего модуля, находящегося в цитоплазме. Сенсорными белками часто служит семейство ферментов гистидинкиназ,

обладающих способностью к фосфорилированию. Феромон контактирует с рецептором, имеющим к нему сродство; сигнал идет к передающему модулю и от него – к второму компоненту этой системы, белку-регулятору ответа. Передача сигнала происходит посредством фосфорилирования белка-регулятора с использованием остатков аминокислот гистидина и аспартата. Фосфорилированный регулятор взаимодействует с промотором того или иного оперона и активирует экспрессию ряда «молчащих» до сих пор генов, отвечающих за компетентность. В результате метаболизм клетки меняется, иногда коренным образом. К этому и сводится ответ на феромонный сигнал, полученный рецептором.

Хотя естественная трансформация описана более чем у 50 видов бактерий, феромоны компетентности известны лишь у стрептококков и бацилл. Возможно, что у некоторых видов они еще просто не обнаружены; однако можно считать установленным, что трансформация у таких хорошо изученных микроорганизмов, как гонококки и менингококки, осуществляется без феромонов. Это вполне объяснимо, так как клетки гонококков и менингококков способны к трансформации в любой стадии роста культуры: компетентность является их постоянным свойством.

Компетентные клетки у различных видов бактерий отличаются от некомпетентных не только способностью к поглощению ДНК, но и другими свойствами:

- обладают сниженным уровнем метаболизма;
- более устойчивы к пенициллину, чем остальные клетки в популяции;
- сниженным темпом репликации ДНК или вообще ее отсутствием;
- меньшими размерами, чем некомпетентные;
- изменением наружных слоев, наличием обнаженных участков цитоплазматической мембраны;
- повышенной чувствительностью к осмотическому шоку, тепловой обработке;
- сниженным поверхностным зарядом.

Однако существует много видов бактерий, у которых отсутствует естественная компетентность. Примером таких бактерий являются *E. coli*, бактерии рода *Erwinia* и другие, но несмотря на это, они также могут быть трансформированы. Для этого их клетки обрабатывают тем или иным способом, индуцируя у них способность к поглощению ДНК. Наибольшую известность приобрел метод индукции компетентности с помощью ионов кальция – **кальцевый метод**. Клетки бактерий выдерживают в присутствии ионов Ca^{2+} (50 мМ) при 0 °С с последующим кратковременным тепловым воздействием при 37 °С или 42 °С. В этих условиях

возникает общее состояние компетентности и появляется возможность осуществления хромосомной и плазмидной трансформации.

Эффективность трансформации повышается при совместном действии ионов Ca^{2+} с ионами Mg^{2+} , Mn^{2+} или Rb^{+} . Кроме того, эффективность трансформации повышается при увеличении времени инкубирования с ионами Ca^{2+} , а также при добавлении диметилсульфоксида.

Широко используется также способ индукции компетентности за счет глубокого замораживания с последующим оттаиванием клеток. При этом осуществляется трансформация как хромосомной, так и плазмидной ДНК. Такой способ трансформации получил название **криотрансформации**. Чтобы получить трансформанты с помощью этого метода, смесь реципиентных клеток и ДНК донора в присутствии криопротектора (0,5 % раствора твина-80) замораживают (до -196°C), а затем отогревают при $+42^{\circ}\text{C}$ и высевают на селективные среды, позволяющие отобрать трансформанты.

Механизмы индукции компетентности изучены недостаточно. Показано, что высокие концентрации ионов кальция и других щелочно-земельных металлов вызывают структурную реорганизацию клеточных мембран, а также плазмолиз. В мембранах обнаруживаются полиморфные структурные изменения, образуются участки соединения и слияния мембран. При этом усиливается мембранная проницаемость, увеличиваются размеры периплазматического пространства. В связи с этим предполагается, что ДНК поступает в цитоплазму за счет дефектов в мембранах, а также в участках их слияния.

Возможно, что аналогичные изменения возникают в клетках и под влиянием других воздействий, индуцирующих компетентность. Высказывается предположение, что в процессе замораживания-оттаивания молекулы ДНК поступают в цитоплазму путем диффузии через временные быстро репарируемые дефекты мембран.

В последнее время трансформацию успешно осуществляют с помощью **электропорации**. Существуют специальные приборы – электропораторы, которые за счет кратковременного воздействия (обычно 5–20 мс) электрического поля высокой напряженности (1–15 кВ/см) на клеточную мембрану приводят к образованию в ней пор (электропробой). Время существования и размер пор достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. Объем клетки при этом увеличивается. Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и клеток-реципиентов для каждой системы клеток подбирают экспериментально, для того чтобы до-

биться высокой частоты поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество образованных трансформантов может достигать 80 % выживших клеток.

Характеристика этапов трансформации

Взаимодействие трансформирующей ДНК с компетентной клеткой бактерий начинается с адсорбции ДНК на поверхности клетки. Адсорбировать ДНК могут и некомпетентные клетки, однако с поверхности этих клеток она может быть легко удалена при отмывании и даже при разведении культуры. Такая адсорбция называется **обратимой** или **неспецифической**. У компетентных клеток образуется более прочная связь ДНК с клеточной поверхностью: для удаления или инактивации ДНК недостаточно простого отмывания, нужна обработка ДНКазой или антителами к ДНК. Адсорбция ДНК на поверхности компетентных клеток называется **необратимой** или **специфической**.

Адсорбция ДНК на компетентной клетке происходит в течение короткого промежутка времени. Например, трансформирующая ДНК на компетентных клетках *B. subtilis* адсорбируется за 2 мин (рис. 62).

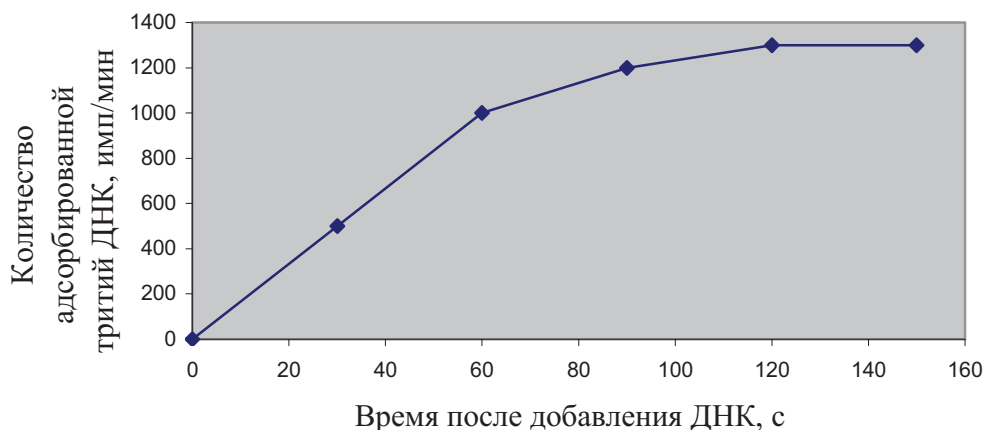


Рис. 62. Динамика адсорбции меченой ДНК на клетках компетентной культуры *B. subtilis* (по Д. Дубнау, 1976)

При адсорбции у *B. subtilis*, пневмококков и других стрептококков молекулы трансформирующей ДНК прикрепляются к рецепторным участкам — белкам мембраны, причем ДНК адсорбируется одним концом в немногих точках, второй конец остается свободным. Такой способ взаимодействия определяет порядок вхождения молекулы ДНК в компетентные клетки, т. е. имеется определенная полярность ее проникновения.

В процессе адсорбции ДНК претерпевает определенные изменения. Примерно через 30 с после начала адсорбции высокомолекулярная трансформирующая ДНК массой в несколько мегадальтон распадается на крупные двунитевые фрагменты массой около 1 МД каждый. ДНК на этой стадии еще чувствительна к ДНКазе, так как ее фрагменты находятся на клеточной поверхности.

За адсорбцией следует проникновение ДНК в клетку бактерий. В настоящее время наиболее популярна модель С. Лекса, объясняющая этот процесс. Согласно этой модели, проникновение ДНК у бактерий *B. subtilis* осуществляется путем активного транспорта с участием нуклеазы (или нуклеаз). Транспорт облегчается предварительным разрезанием молекулы адсорбированной ДНК на фрагменты меньшей длины. Кроме того, нуклеазы в процессе транспорта разрушают одну из цепей трансформирующей ДНК.

Модель С. Лекса основана на многочисленных данных, прямо или косвенно свидетельствующих об участии нуклеаз в процессах трансформации, а именно:

- отсутствии компетентности у мутантов с нарушением нуклеазной активности;
- выделении нуклеаз, специфических лишь для клеток, находящихся в состоянии компетентности, из некомпетентных клеток такие нуклеазы не выделяются.

У гемофильных бактерий *Haemophilus influenzae* адсорбция и поглощение трансформирующей ДНК осуществляется по-другому. По достижении в процессе роста культурой состояния компетентности на поверхности клеток появляются пузырьковидные выпячивания цитоплазматической мембраны диаметром 80–100 мкм, в количестве 5–13 на клетку. Эти пузырьки названы **трансформосомами**. Трансформосомы содержат на своей поверхности белок с молекулярной массой 25 кД. При участии этого белка на них и происходит адсорбция ДНК. Транспорт ДНК из трансформосомы внутрь клетки не ясен, его также пытаются объяснить свойствами нуклеаз, «объедающих» одну нить ДНК и одновременно способствующих транспорту второй нити.

Гемофильные бактерии другого вида *Haemophilus parainfluenzae* в стадии компетентности также имеют поверхностные трансформосомы. Однако в отличие от трансформосом бактерий *Haemophilus influenzae*, они как только захватывают ДНК, мигрируют в периплазматическое пространство. ДНК может длительное время находиться внутри этих образований. Постепенно в трансформосомах образуются одонитевые фрагменты ДНК, которые переходят в цитоплазму.

Таким образом, у всех изученных к настоящему времени бактерий, способных трансформироваться, показано наличие однопонитевых фрагментов донорной ДНК в цитоплазме клетки-реципиента.

Период между поглощением ДНК и включением ее в хромосому реципиента называется *эклипс-фазой* или *фазой затмения*. В эту фазу биологическая активность поглощенной ДНК резко падает, т. е. из реципиентных клеток нельзя выделить ДНК, обладающую трансформирующей активностью. Считают, что наличие эклипс-фазы связано с образованием однопонитевых ДНК.

Однопонитевая ДНК вступает в стадию синапса с гомологичным участком хромосомы реципиента. Донорную и реципиентную ДНК в этом комплексе удерживают водородные связи, ковалентного связывания не происходит. При тепловой денатурации этот комплекс распадается. Образующийся синапс приводит к интеграции однопонитевой молекулы ДНК в хромосому. При этом наблюдается вытеснение соответствующей нити ДНК реципиента. Между флангами включенного фрагмента и ДНК реципиента образуются ковалентные связи; их уже невозможно разрушить в результате денатурации. Таким образом завершается процесс рекомбинации, в результате чего образуется гетеродуплексная структура (гибридная ДНК), в которой одна нить ДНК принадлежит донору, а другая – реципиенту (рис. 63).

После включения однопонитевого фрагмента ДНК донора в хромосому реципиента может происходить явление *коррекции*. Оно сводится к выщеплению одной из нитей, принадлежащих донору или реципиенту, из двупонитевого гибридного участка ДНК, и репаративному синтезу на месте образовавшейся брешки новой нити, полностью комплементарной нити-матрице. Одной из причин выщепления является, по-видимому, неполное соответствие оснований в определенных участках нитей ДНК донора и реципиента. Коррекция, как и различные аномалии рекомбинации, может сильно влиять на частоту трансформации по некоторым маркерам.

Трансформация имеет практическое использование:

- для картирования бактериальной хромосомы;
- для конструирования промышленно-полезных штаммов микроорганизмов;
- для введения в геном бактерий определенных маркеров или элиминирования нежелательных мутаций;
- выступать в качестве модели в различных генетических и молекулярно-биологических экспериментах на изолированной ДНК, так как уровень трансформирующей активности ДНК является очень чувствительным показателем ее структурной целостности, в результате чего

можно исследовать механизмы инактивирующего или мутагенного действия различных агентов и природу вызываемых ими повреждений в ДНК.

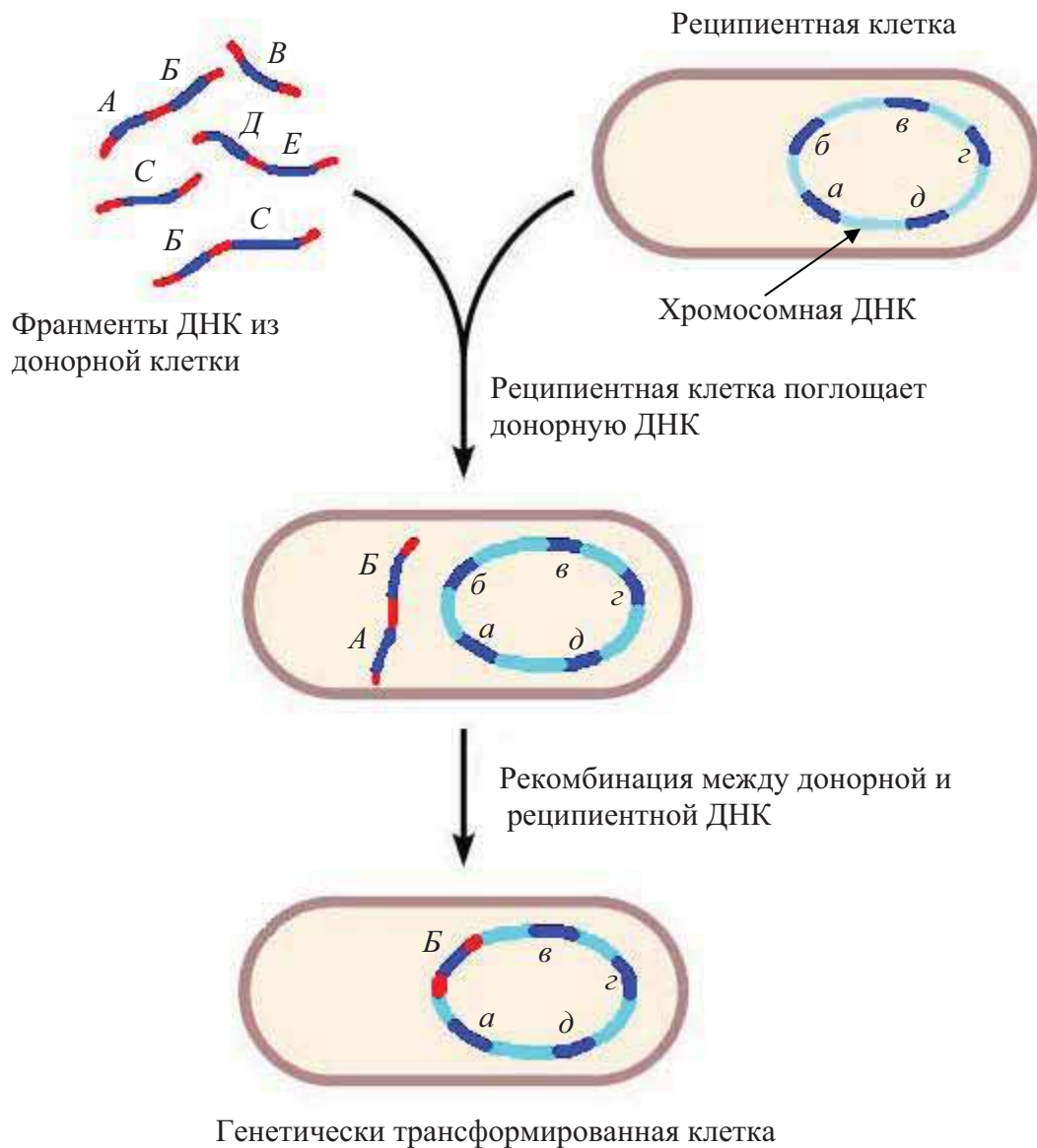


Рис. 63. Схема процесса трансформации

7.5.2. Конъюгация

Конъюгация – процесс генетического обмена, сопровождающийся переносом генетической информации от клетки донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при непосредственном контакте клеток между собой.

Явление конъюгации было открыто Дж. Ледербергом и Э. Татумом в 1946 г. в экспериментах с полиауксотрофными штаммами бактерий *E. coli*. Они пытались доказать существование генетической рекомбинации у бактерий *E. coli*. Классический эксперимент Ледерберга и Татума заключался в следующем. Два ауксотрофных мутантных штамма *E. coli* со следующими генотипами:

штамм А – $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$,

штамм В – $met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-$

выращивали в течение ночи в жидкой полноценной среде. Культуры обоих штаммов смешивали и инкубировали при оптимальных условиях в течение определенного промежутка времени. Затем смешанную культуру центрифугировали для того, чтобы отмыть клетки от полноценной среды, и высевали на агаризованную минимальную глюкозо-солевую среду. После инкубирования при температуре 37 °С на этой среде с частотой 10^{-6} – 10^{-7} сформировались колонии, клетки в которых имели генотип $met^+ bio^+ thr^+ leu^+ thi^+$ (рис. 64).

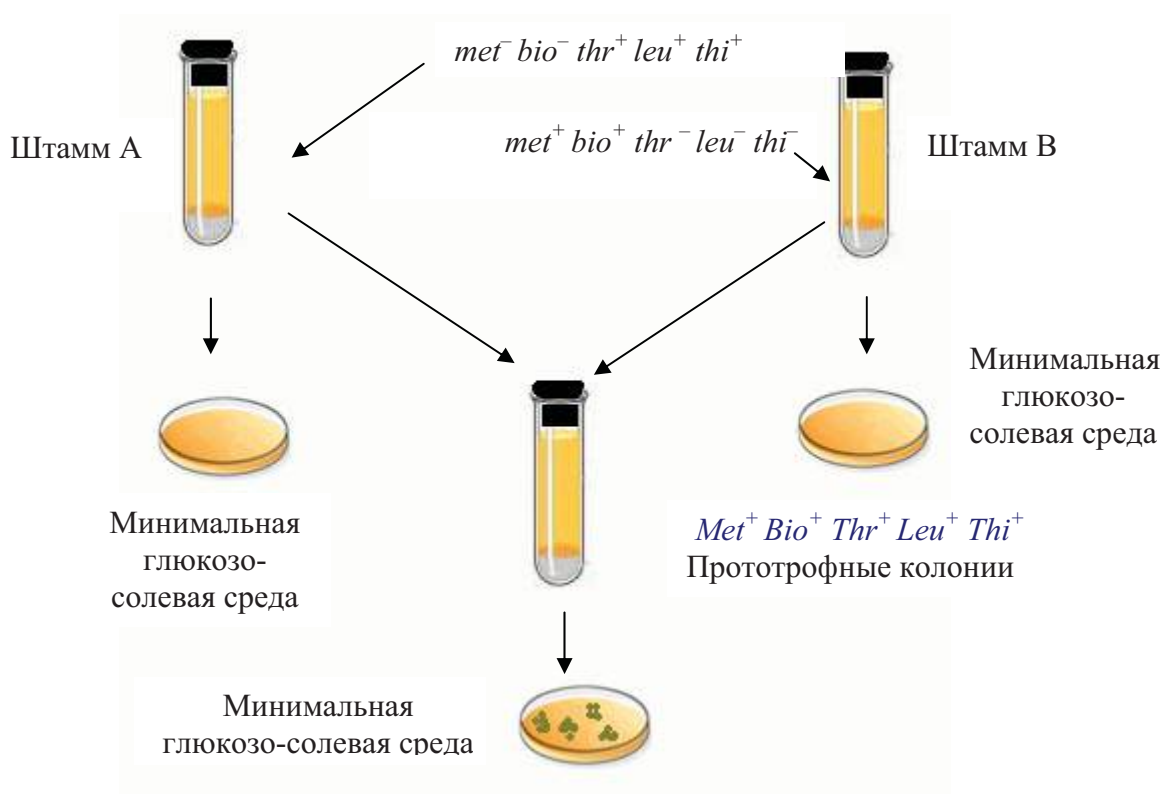


Рис. 64. Схематическое изображение классического опыта по скрещиванию ауксотрофных мутантов, проведенного Дж. Ледербергом и Э. Татумом

Для того чтобы доказать, что спонтанной реверсии исходных ауксотрофных мутантов к прототрофности не наблюдалось, клетки штаммов А и В по отдельности также отмывали от полноценной среды и высевали

на минимальную глюкозо-солевую среду. Такие спонтанные обратные мутации практически не могут осуществляться, поскольку для их возникновения необходимо, чтобы мутации произошли одновременно в двух генах штамма А и трех генах штамма В. Следует учитывать, что спонтанные мутации от ауксотрофности к прототрофности обычно происходят с частотой $1 \cdot 10^{-7}$, а одновременная реверсия двух ауксотрофных признаков к прототрофности должна происходить с частотой порядка $1 \cdot 10^{-14}$, трех – $1 \cdot 10^{-21}$. В экспериментах же Ледерберга и Татума при совместном посеве родительских штаммов на минимальную среду прототрофные клоны появлялись с частотой приблизительно 10^{-6} – 10^{-7} .

На основании полученных результатов Ледерберг и Татум сделали вывод, что прототрофы, образующиеся при смешивании культур, представляют собой генетические рекомбинанты. Иными словами, у таких прототрофов, по-видимому, произошло включение в геном генов *met bio* штамма В и генов *thr leu thi* штамма А:

$$\begin{array}{l} \text{В } \boxed{met^+ bio^+} thr^- leu^- thi^- \\ \text{А } met^- bio^- \boxed{thr^+ leu^+ thi^+} \end{array}$$

К моменту проведения этого эксперимента уже была известна генетическая трансформация у пневмококков и было установлено, что она осуществляется бактериальной ДНК. Поэтому на первый взгляд казалось вероятным, что Ледерберг и Татум столкнулись всего лишь с другим случаем такой трансформации. Однако скоро выяснилось, что происхождение таких рекомбинантов нельзя объяснить трансформацией, так как Ледерберг и Татум показали, что для их появления необходим непосредственный контакт между бактериями штаммов А и В. Это было установлено следующим образом. Клетки одного из ауксотрофных штаммов (штамм А) обрабатывали стерильным фильтратом среды, в которой был выращен другой штамм (штамм В). Смесь высевали на минимальную глюкозо-солевую среду, инкубировали при температуре 37 °С, но прототрофные клетки не образовывались, и даже в том случае, если клетки штамма В были разрушены непосредственно перед фильтрацией среды.

В 1949 г. Б. Дэвис получил дополнительные данные, подтверждающие результаты Дж. Ледерберга и Э. Татума о том, что для образования прототрофов необходим контакт родительских клеток. Б. Дэвис провел эксперимент в U-образной пробирке (рис. 65).

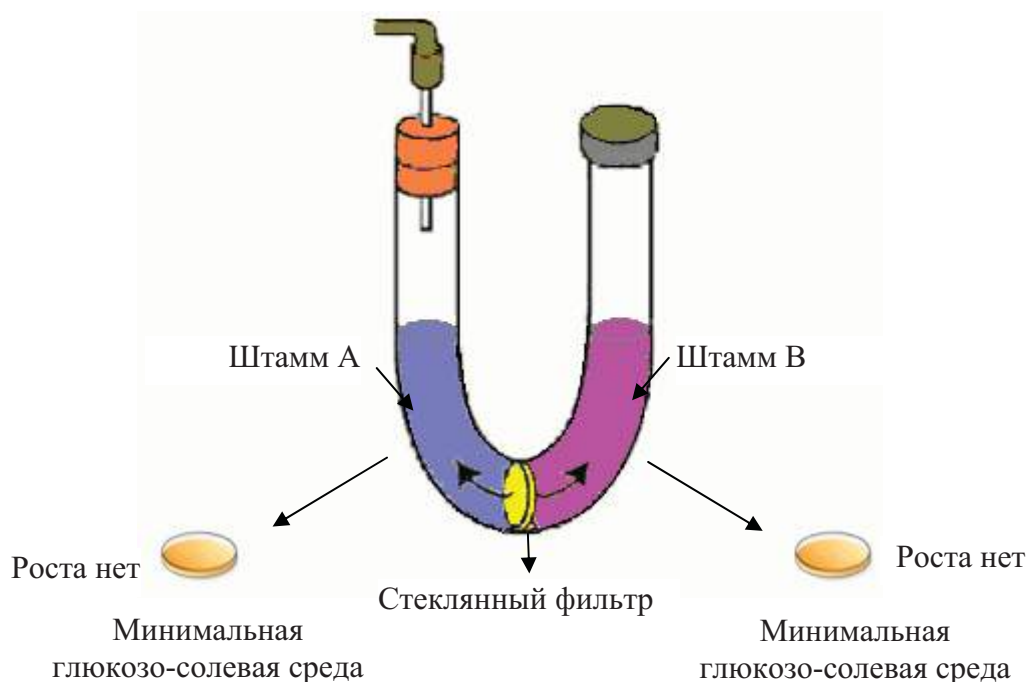


Рис. 65. Схема эксперимента Б. Дэвиса

Бактерии двух ауксотрофных штаммов А и В засеивали в разные ветви U-образной пробирки, которые были разделены в нижней части пористым стеклянным фильтром, непроницаемым для клеток бактерий *E. coli*, но пропускающим частицы размером менее 0,1 мкм, а следовательно, и свободные молекулы ДНК. Повышая и понижая поочередно на одном из концов U-образной пробирки давление, Дэвис медленно перегонял культуральную жидкость из одной ветви в другую. В результате два ауксотрофных штамма использовали одну и ту же питательную среду, но между клетками непосредственного контакта не было. При высеве бактерий на минимальную глюкозо-солевую среду ни в одной из ветвей U-образной пробирки прототрофы не были обнаружены. На основании полученных результатов был сделан вывод, что для образования рекомбинантов необходимо, чтобы клетки двух родительских штаммов пришли в физический контакт. Во время контакта происходит перенос генетической информации и в результате последующей рекомбинации формируются прототрофные трансконъюганты.

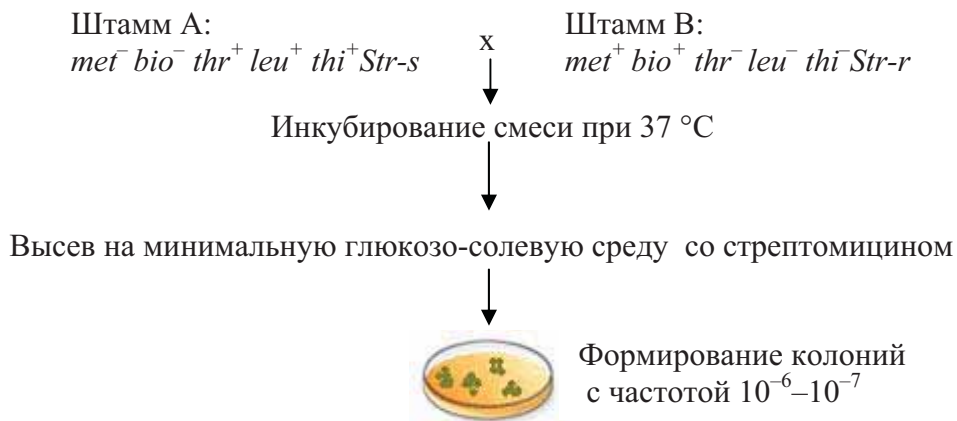
Дж. Ледерберг и Э. Татум полагали, что доля участия обоих родительских штаммов в образовании прототрофных клеток одинакова, т. е. что половой дифференциации у бактерий *E. coli* нет.

Однако позднее У. Хейс показал, что существуют бактерии мужского (доноры) и женского (реципиенты) типа и вклад их в конъюгацию не равнозначен. У. Хейс работал со штаммами Ледерберга и Татума, но в опытах дополнительно использовал признак стрептомицинустойчивости

и один из скрещиваемых штаммов был устойчивым к этому антибиотику. Если штамм А являлся стрептомицинустойчивым, а штамм В – стрептомицинчувствительным, то после их смешивания и совместного выращивания с последующим высевом на минимальную глюкозо-солевую среду со стрептомицином прототрофные колонии не формировались:



Если стрептомицинустойчивым был штамм В, а штамм А – стрептомицинчувствительным, то на минимальной глюкозо-солевой среде со стрептомицином формировались клоны прототрофных клеток:



На основании полученных результатов Хейс сделал вывод о том что для образования рекомбинантов необходимо сохранение жизнеспособности одного из родительских штаммов, другой может погибнуть. Это позволило различить два типа половых клеток донорные и реципиентные. Перенос генетического материала происходит в одном направлении – от донора к реципиенту и процесс рекомбинации протекает в клетках штамма-реципиента. Рекомбинанты наследуют большинство своих признаков от реципиента, а от донора получают только отдельные

фрагменты генома. В эксперименте Хейса штамм А был донором, а штамм В – реципиентом.

У. Хейс ввел понятие о наличии в донорных клетках F-фактора (*fertility* – плодовитость) и обозначил доноры F^+ -клетками, а реципиенты – F^- -клетками.

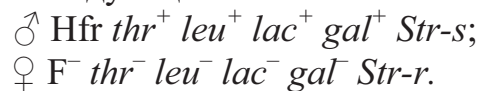
Если взять F^- -клетки и добавить к ним F^+ -клетки, смесь поместить в оптимальные условия, то через несколько часов F^- -клетки превратятся в клетки F^+ . Это значит, что при контакте клеток F-фактор быстро передается из F^+ -клеток в F^- -клетки, а частота передачи F-фактора близка к 100 %. Таким образом, клетки-реципиенты в результате конъюгации превращаются в потенциальных доноров, но при этом хромосомные признаки не передаются или передаются с крайне низкой частотой (ниже 10^{-5}).

Механизм передачи хромосомных генов при конъюгации был объяснен Ф. Жакобом и Е. Вольманом в середине 1950-х годов. Этому способствовало получение определенных экспериментальных данных:

- во-первых, выделение донорных штаммов, которые с высокой частотой передавали хромосомные гены в реципиентные клетки ($1 \cdot 10^{-2}$ и выше). В результате рекомбинации генов донорной хромосомы с хромосомой реципиента образовывались рекомбинанты по разным признакам. Такие донорные штаммы получили название Hfr соответственно первым буквам от английского *high frequency of recombination* (высокая частота рекомбинации). Такие штаммы были получены в лабораториях Л. Кавалли и У. Хейса;

- во-вторых, разработка в лаборатории А. Львова метода скрещивания с прерыванием конъюгации, суть которого заключается в том, что если в процессе скрещивания производить механическое встряхивание, то формирующиеся конъюгационные пары разрушаются и перенос генов прерывается.

Используя этот прием, Жакоб и Вольман определили последовательность переноса генов при скрещивании. Проводилось скрещивание прототрофных Hfr-штаммов донорных бактерий с реципиентными полиауксотрофными бактериями следующих генотипов:



Из инкубационной смеси через определенные промежутки времени отбирали пробы и встряхивали их для прерывания конъюгации. Пробы разводили и высевали на селективные среды, позволяющие отобрать рекомбинанты только одного какого-то типа. Например, для отбора Thr^+ -рекомбинантов в минимальную глюкозо-солевую среду добавляли

все необходимые для роста реципиентных бактерий факторы, кроме треонина, так как предполагалась передача маркера, ответственного за его синтез, от донора. В среду также добавляли антибиотик стрептомицин для того, чтобы ограничить рост клеток донорных бактерий, которые являются прототрофными и способны формировать колонии на минимальной глюкозо-солевой среде.

Таким образом, в состав селективной среды для отбора:

- *Thr*⁺-рекомбинантов – минимальная глюкозо-солевая среда + лейцин + стрептомицин;
- *Leu*⁺-рекомбинантов – минимальная глюкозо-солевая среда + треонин + стрептомицин;
- *Lac*⁺-рекомбинантов – минимальная солевая среда + лактоза + лейцин + треонин + стрептомицин;
- *Gal*⁺-рекомбинантов – минимальная солевая среда + галактоза + треонин + лейцин + стрептомицин.

В проведенных экспериментах Жакоб и Вольман получили следующие результаты: через 5 мин после прерывания скрещивания ни по каким маркерам рекомбинантов отобрано не было, что означает отсутствие их передачи от донорных в реципиентные клетки. Через 10 мин скрещивания сформировались колонии *Leu*⁺- и *Thr*⁺-рекомбинантных клеток. Рекомбинанты *Lac*⁺ появились спустя 15 мин, а рекомбинанты *Gal*⁺ – только через 25 мин. В итоге через 25 мин скрещивания было зарегистрировано образование прототрофных клеток по всем анализируемым маркерам.

На основании полученных данных Жакоб и Вольман сделали вывод, что перенос генетического материала от Hfr-донора в реципиентные F⁻-клетки происходит ориентированно, т. е. в том же порядке, в каком гены расположены на хромосоме. В приведенном примере сначала передается участок *thr-leu*, затем гены *lac*-оперона, и в последнюю очередь гены *gal*-оперона, что соответствует линейному расположению генов в хромосоме. Точка, с которой начинается передача хромосомы, называется точкой **начала переноса** или **ориджин** (обозначается «*ori*» или «*o*»). Чем ближе (проксимальнее) гены расположены к точке начала переноса, тем выше вероятность их передачи и частота рекомбинаций с геномом реципиентной клетки. Чем дальше (дистальнее) расположены гены от точки *ori*, тем ниже вероятность их переноса и включения в геном реципиентной клетки (рис. 66).

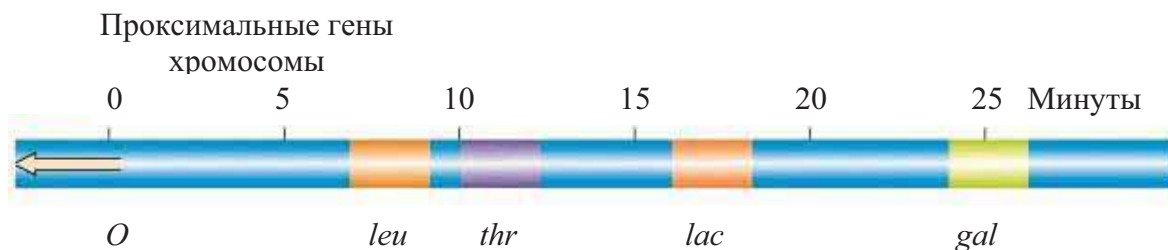


Рис. 66. Ориентированный перенос генетического материала

При использовании Жакобом и Вольманом донорного Hfr-штамма другого типа было обнаружено, что он передает хромосомные гены в ином порядке. Для объяснения полученных результатов по скрещиванию F^+ - и Hfr-клеток с F^- -клетками исходили из предположения о том, что хромосома бактерий *E. coli* имеет кольцевую структуру, гены на ней располагаются в определенном порядке, но F-фактор в Hfr-клетках находится в ином состоянии, чем в F^+ -клетках.

Впоследствии было показано, что акридиновый оранжевый способен элиминировать F-фактор, т. е. исцелять F^+ -клетки от F-фактора и превращать их в F^- -клетки. При обработке же Hfr-клеток F-фактор не элиминируется и, следовательно, в таких клетках он каким-то образом ассоциирован с хромосомой. Присоединяясь к хромосоме, половой фактор способствует переносу всей или некоторой части хромосомы, а порядок переноса хромосомных генов определяется местом присоединения к хромосоме F-фактора.

В настоящее время образование Hfr-штаммов объясняют моделью, предложенной А. Кемпбеллом, в которой постулируется интеграция F-фактора в хромосому. Согласно этой модели, F-фактор, имеющий, как и хромосома, кольцевую структуру, в своем составе несет нуклеотидные последовательности, гомологичные последовательностям бактериальной хромосомы. Ими являются IS2-, IS3-элементы и транспозон Tn1000. В F-факторе присутствуют два IS3-элемента – один IS2-элемент и один транспозон Tn1000, а в хромосоме бактерий *E. coli* имеются шесть или более копий IS2-элемента, до пяти копий IS3-элемента и несколько копий Tn1000, которые могут локализоваться в различных ее участках. За счет IS-элементов, транспозонов F-фактора и хромосомы происходит гомологичная рекомбинация с последующей интеграцией F-фактора в хромосому.

В связи с тем что в хромосоме бактерий *E. coli* имеется несколько IS-элементов и транспозонов, а располагаются они в разных ее участках, встраивание F-фактора может происходить в различных участках генома (\approx в 20 генных локусах) в различных ориентациях и, как следствие этого,

могут образовываться разные типы Hfr-штаммов, отличающиеся друг от друга точкой начала переноса хромосомы. Это происходит вследствие того, что ген *ori*, определяющий точку начала переноса хромосомы в штамме Hfr, находится в составе F-фактора. Кроме того, перенос хромосомы у различных штаммов Hfr может происходить в разном направлении, или ориентации: у одних – по часовой стрелке, у других – против часовой стрелки, что определяется тем, между какими из цепей ДНК фактора F и хромосомы произошел синапс.

Было также замечено, что при скрещивании Hfr-клеток с F⁻-клетками передача F-фактора происходит очень редко и клетки рекомбинантов почти всегда остаются женскими. Передача F-фактора наблюдается только в тех случаях, когда при скрещивании формируются рекомбинанты как по проксимальным, так и по дистальным маркерам, т. е. когда передается вся хромосома донора. Однако передача всей хромосомы – событие весьма редкое, так как в многочисленных исследованиях показано, что возможны случайные разрывы хромосомы в процессе ее переноса из мужской клетки в женскую, и дистальный конец бактериальной хромосомы при этом не входит в реципиентную клетку. На основании вышеизложенных результатов было высказано предположение, что при конъюгационном переносе разрыв хромосомы происходит в пределах генома F-фактора и его часть с сайтом *ori* находится в начальном участке передающейся хромосомы штамма Hfr, а другая часть – на ее дистальном участке. Это приводит к тому, что при скрещивании Hfr-штаммов с F⁻-бактериями образуются рекомбинанты по хромосомным маркерам (частота их формирования определяется расположением данного маркера от точки начала переноса), в основном не содержащие в своем геноме F-фактора (F⁻-клетки).

Таким образом, можно считать, что в зависимости от состояния F-фактора различают два типа донорных клеток:

- **F⁺-доноры**, у которых F-фактор находится в автономном от хромосомы состоянии. При скрещивании F⁺-доноров с F⁻-реципиентами передается, как правило, только F-фактор:



- **доноры Hfr-типа**, у которых F-фактор интегрирован в хромосому. При скрещивании Hfr-доноров с F⁻-реципиентами передаются хромосомные гены с образованием рекомбинантов:



Интеграция F-фактора в бактериальную хромосому обратима. F-фактор может исключаться из хромосомы, и в этом случае клетка Hfr становится F⁺-клеткой. Процесс вырезания, или эксцизии, F-фактора происхо-

дит примерно с такой же частотой, что и интеграция. При правильной эксцизии разрыв и воссоединение молекул ДНК происходят в том же участке, что и интеграция. Однако в редких случаях может происходить неправильная эксцизия F-фактора из бактериальной хромосомы, что связано с незаконной или запрещенной рекомбинацией, возникающей между негомологичными генетическими участками полового фактора и хромосомы. В результате такого процесса незаконной рекомбинации в состав полового фактора включается фрагмент бактериальной хромосомы. F-факторы, содержащие фрагменты хромосомной ДНК, получили название F'-факторов, а штаммы содержащие такие F'-факторы – **F'-донорами** или **донорами промежуточного типа**.

Первый F'-донор был получен Ф. Жакобом и Е. Адельбергом у бактерий *E. coli*. Клетки этого штамма содержат автономно локализованный половой фактор, в состав которого включены хромосомные гены *lac*-оперона, в бактериальной хромосоме *lac*-оперон отсутствует (рис. 67).

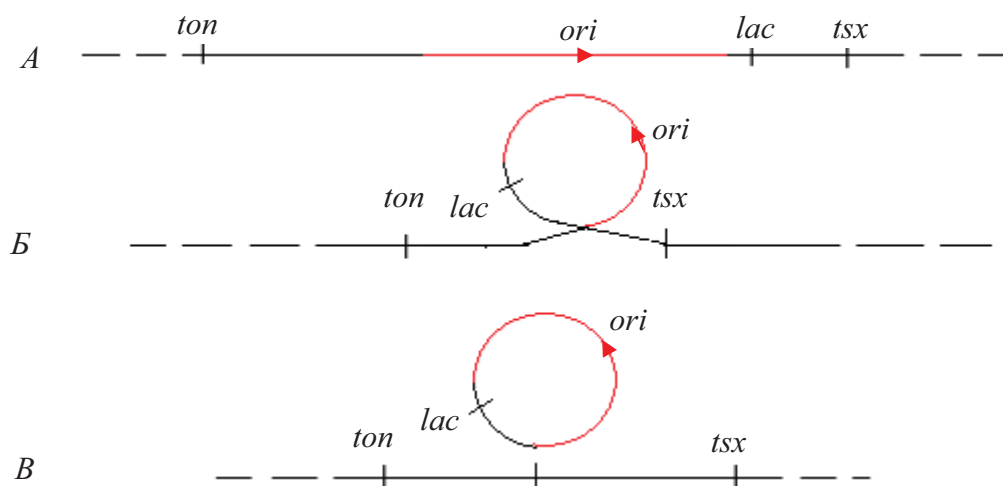


Рис. 67. Схема образования F' lac⁺-доноров промежуточного типа:

A – F-фактор, включенный в хромосому Hfr-бактерий между геном *ton* и *lac*-опероном; B – при «вырезке» F-фактора образуется неправильная петля, вовлекающая участок бактериальной хромосомы с *lac*-опероном; B – образовавшаяся кольцевая ДНК F'-фактора содержит бактериальный *lac*-оперон. В бактериальной хромосоме этот оперон отсутствует

В соответствии с величиной фрагмента хромосомы, интегрированного в состав F'-фактора, различают малые и большие F'-факторы. **Малые F'-факторы** несут в своем составе один ген, **большие** – до половины бактериальной хромосомы.

F'-факторы, как и обычные F-факторы, с высокой эффективностью передаются при конъюгации F[–]-клеткам. При этом они с высокой частотой переносят в реципиентные клетки и бактериальные гены, которые включены в их состав. Такой тип передачи генов получил название **сек-**

сдукции или *F-дукции*, что схематично можно изобразить следующим образом:



В результате скрещивания такого типа реципиентная клетка приобретает способность к сбраживанию лактозы и несет аллель как lac^+ (находится в составе F'-фактора), так и аллель lac^- (в хромосоме). Клетки, в которых определенные нуклеотидные последовательности представлены в двойном наборе – в составе хромосомы и в F'-факторе, называются *гетерогенотами*. У них обнаружена повышенная способность к образованию Hfr-клеток. При этом интеграция F'-фактора осуществляется в области хромосомы, гомологичной фрагменту, включенному в состав F'-фактора. Осуществляется гомологичная рекомбинация и F'-фактор включается в хромосому. Таким образом, наличие небольшой части хромосомного материала в F'-факторе сообщает ему так называемый «инстинкт дома» в отношении специфического участка хромосомы, т. е. осуществление интеграции всегда в определенном месте. В противоположность этому, F-фактор F⁺-клетки не имеет предпочтительного места соединения с хромосомой.

F'-факторы, как и F-факторы, могут спонтанно утрачиваться бактериальными клетками, и тогда клетки мужского типа превращаются в клетки женского типа. Частоту элиминации можно увеличить, действуя на бактерии рядом веществ, таких как акридиновые красители, антибиотик рифампицин, тиминовое голодание и т. п.

Механизм передачи генетического материала при конъюгации

На первых этапах после смешивания донорных и реципиентных клеток в результате случайных контактов формируются конъюгационные пары. Контакты клеток беспорядочны, так как, по-видимому, не существует специфических факторов, обуславливающих притяжение между бактериями противоположных полов. Однако установлено, что скорость конъюгации в определенных пределах пропорциональна концентрации бактерий. Поэтому для скрещивания берут культуры бактерий с концентрацией $5 \cdot 10^7$ – $5 \cdot 10^8$ кл/мл. Обычно донорных бактерий в конъюгационной смеси содержится примерно в 10 раз меньше, чем реципиентных.

Перенос генетического материала от донора к реципиенту происходит только в том случае, когда образуются эффективные конъюгационные пары. С помощью электронного микроскопа показано, что между клетками в таких парах образуется конъюгационный мостик. Структуры,

с помощью которых обеспечивается образование эффективных конъюгационных пар, были открыты после выделения F-донорспецифических бактериофагов (фагов, репродуцирующихся только в клетках, содержащих F-фактор), первый такой бактериофаг был выделен в 1960 г. из сточных вод. Это РНК-содержащий икосаэдрический бактериофаг f2 кишечной палочки. Кроме бактериофага f2, к F-донорспецифическим фагам *E. coli* относятся f1, MS2, Q β , R17 и др. Из них фаг f1 является нитевидным ДНК-содержащим, а все остальные относятся к РНК-содержащим икосаэдрическим бактериофагам. В отличие от всех известных бактериофагов, которые адсорбируются на клеточной стенке, эти вирусы адсорбируются на половых ворсинках, или F-пилях.

Половые пили обеспечивают взаимное узнавание при контакте донорных и реципиентных клеток. Они прикрепляются к специфическим рецепторам, находящимся на поверхности реципиентных клеток. Благодаря способности половых пилей сокращаться, клетки донора и реципиента вступают в контакт «клеточная стенка к клеточной стенке», а затем между клетками возникает более сложное образование – конъюгационный мостик, по которому ДНК переходит из клетки-донора в клетку реципиента (рис. 68).

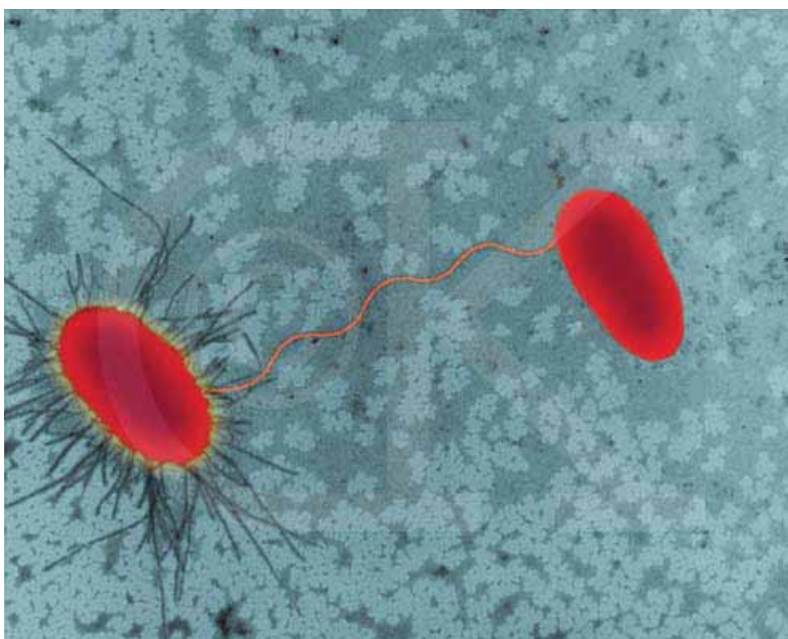


Рис. 68. Подкрашенная микрофотография конъюгирующих клеток *E. coli* (из www.DennisKunkel.com)

Во время конъюгации в донорных клетках осуществляется репликация ДНК по типу «катящегося кольца» или «разматывающегося рулона». Для этого фермент эндонуклеаза в точке начала передачи F-фактора разрезает одну из нитей ДНК с образованием 5'- и 3'-ОН-концов. На 3'-ОН-конце с помощью ДНК-полимеразы III происходит наращивание нуклеотидов, комплементарных нуклеотидам неповрежденной нити ДНК. Второй конец (5'-конец) разрезанной нити начинает отходить в виде «хвоста» и переходит по конъюгационному мостику в реципиентную клетку, где служит матрицей для синтеза второй нити (рис. 69).

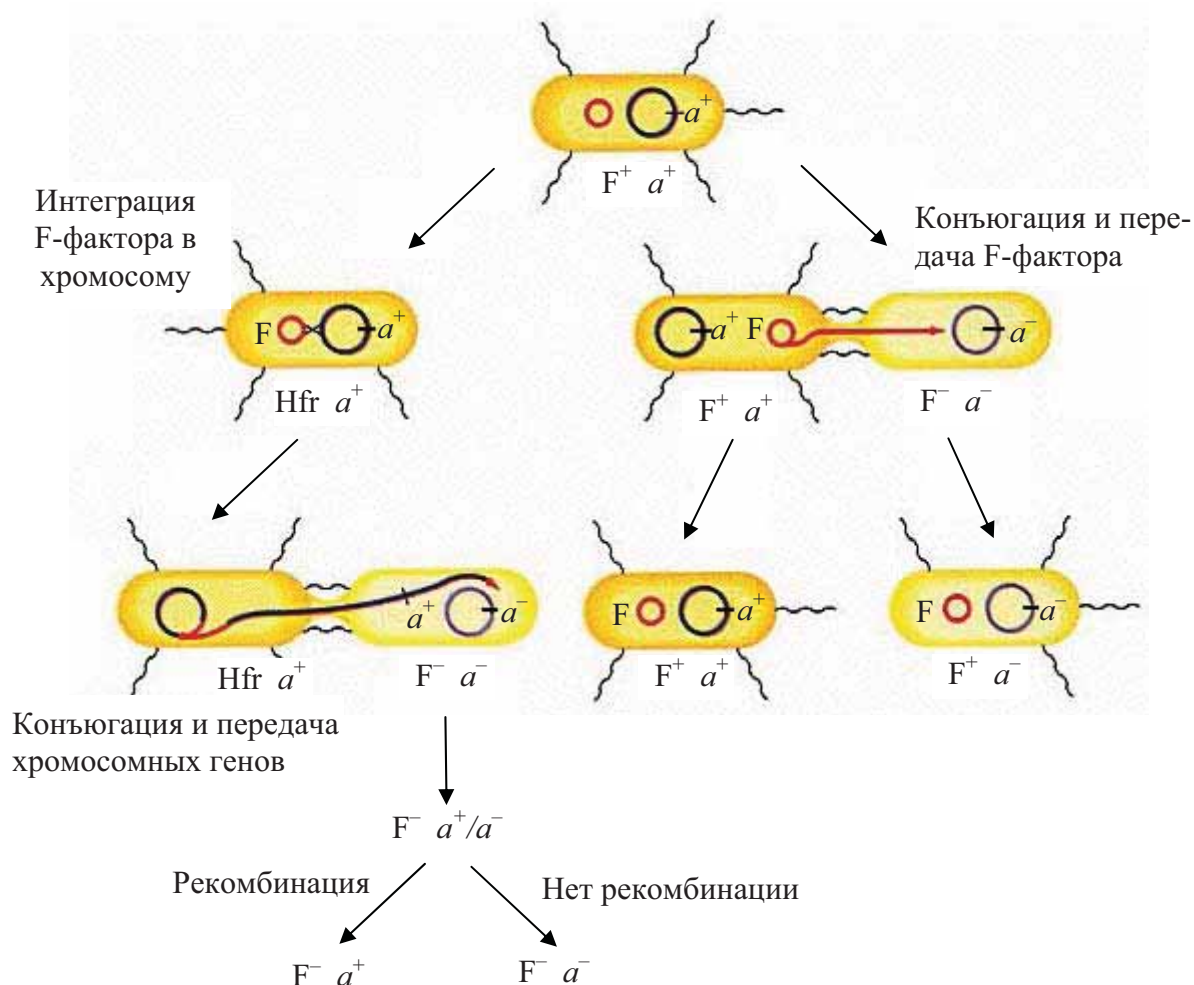


Рис. 69. Передача генетического материала при конъюгации

После репликации в реципиентной клетке двухцепочечная ДНК вступает в гомологичную рекомбинацию с ДНК реципиентной клетки. Образуются рекомбинанты, которые при данном способе обмена генетической информацией называются трансконъюгантами.

Таким образом, в процессе конъюгации можно различить следующие стадии:

- образование неэффективных пар;
- образование эффективных конъюгационных пар;
- перенос генетического материала из донорных клеток в реципиентные;
- постконъюгационный синтез донорной ДНК в реципиентной клетке;
- гомологичная рекомбинация перенесенного фрагмента донорной ДНК с ДНК реципиентной клетки.

Как способ генетического обмена конъюгация используется в следующих направлениях.

1. Передача многих генетических маркеров из одних клеток в другие. Показано, что при конъюгации вся хромосома бактерий *E. coli* передается за 100 мин. В «мягких» условиях можно добиться переноса всей хромосомы и даже повторной ее передачи по механизму «катящегося кольца», если в хромосоме нет профага.

2. Метод конъюгационного скрещивания удобен для картирования хромосомы. Карта хромосомы у бактерий строится в минутах. У бактерий *E. coli* началом карты (0 мин) являются точки локализации генов, ответственных за синтез треонина и лейцина.

3. Изучение генетического аппарата у бактерий.

4. Конъюгация эффективно происходит в природе и поэтому является важной составляющей изменчивости бактерий.

7.5.3. Трансдукция

Трансдукция была открыта в 1952 г., после того как была уже описана трансформация у пневмококков и конъюгация у бактерий *E. coli*.

Н. Циндер, будучи еще студентом, работал в лаборатории Дж. Ледерберга и занимался исследованием наличия конъюгации у бактерий *Salmonella typhimurium*. В его распоряжении было 20 моноауксотрофных штаммов *S. typhimurium*. Смешивая их попарно в различных комбинациях, Н. Циндер пытался выявить прототрофное потомство. В результате в 9 случаях из 79 исследованных комбинаций с частотой 10^{-5} – 10^{-6} были выявлены клоны прототрофных клеток. Поскольку ни один из исходных штаммов на минимальной среде ревертантов не образовывал, то был сделан вывод, что между штаммами *S. typhimurium* осуществляется конъюгация, при которой происходит передача наследственной информации. Для подтверждения этого Циндер и Ледерберг повторили опыт Б. Дэвиса с U-образной пробиркой, разделенной стеклянным фильтром,

не пропускающим бактериальные клетки. В опыте использовались два штамма бактерий: *S. typhimurium* 2A^{his⁻} и *S. typhimurium* 22A^{trp⁻}.

В одну ветвь U-образной пробирки вносили культуру штамма 22А в концентрации $1 \cdot 10^8$ кл/мл, в другую – такое же количество клеток штамма 2А. После определенного периода инкубации в той части пробирки, в которую были внесены клетки штамма 22А, Циндер и Ледерберг обнаружили прототрофные клетки, которые формировались с частотой $1 \cdot 10^{-5}$. В той ветви пробирки, в которую были внесены клетки штамма 2А, прототрофы отсутствовали (рис. 70).

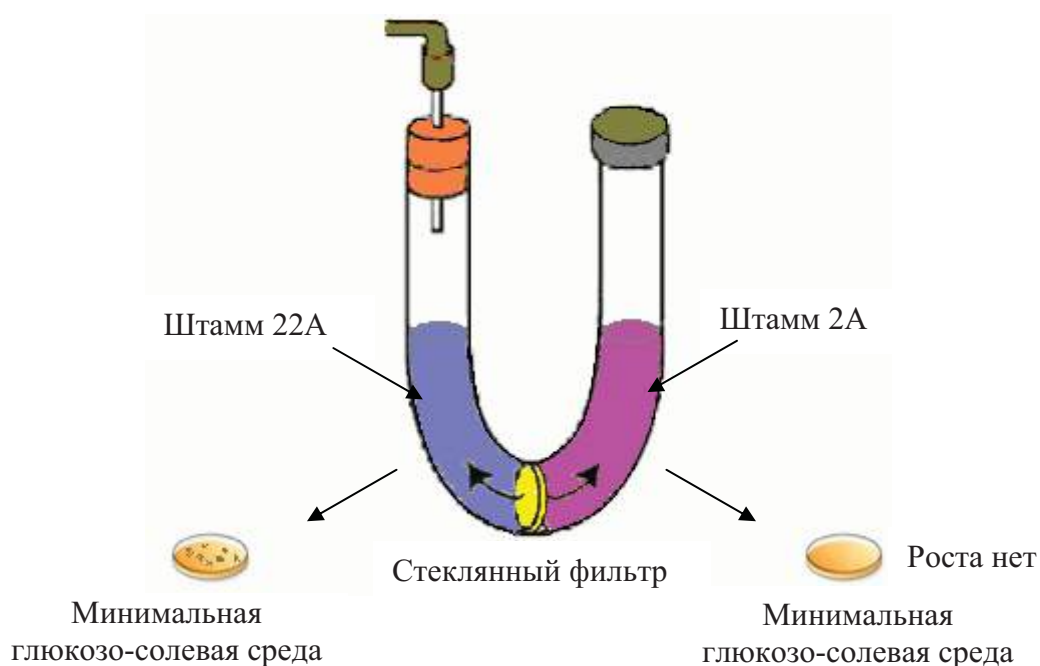


Рис. 70. Схематическое изображение классического опыта Н. Циндера и Дж. Ледерберга

Полученные результаты не подтвердили предположение Н. Циндера и Дж. Ледерберга о конъюгационном переносе наследственной информации у штаммов 2А и 22А *S. typhimurium*. Последующая проверка этих штаммов показала, что штамм 22А заражен фагом Р22. Этот фаг способен инфицировать и лизировать клетки штамма 2А. После проникновения через стекланный фильтр он инфицировал клетки штамма 2А, репродуцировался и лизировал их. При этом освобождался фильтрующий агент (ФА) (так его называли Циндер и Ледерберг), который в свою очередь проникал через стекланный фильтр. Под влиянием ФА некоторые клетки штамма 22А приобретают специфические наследственные свойства, характерные для того штамма (штамма 2А), из которого выделялся ФА, – способность синтезировать триптофан. Было установлено,

что активность агента, способного к фильтрации, не утрачивается при обработке его ДНКазой, что исключало возможность трансформации. Вместе с тем показано, что свойства ФА идентичны свойствам фага Р22. Был сделан вывод, что фаг Р22 переносит наследственную информацию от клеток штамма 2А в клетки штамма 22А.

Явление переноса генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту с помощью фага было названо *трансдукцией*.

Трансдукция основана на том, что в процессе размножения фагов в бактериях могут образовываться фаговые частицы, которые наряду с фаговой ДНК или вместо нее содержат фрагменты бактериальной ДНК. Такие фаговые частицы называются *трансдуцирующими*. По морфологии и адсорбционным свойствам они ничем не отличаются от обычных фаговых вирионов, но при заражении ими новых клеток передают генетические детерминанты предыдущего хозяина. Таким образом, чтобы осуществить трансдукцию, необходимо размножить фаг на клетках штамма-донора, а затем заразить полученным фаголизатом клетки-реципиента. Отбор трансдуктантов проводят на селективных средах, где не могут расти исходные реципиентные клетки (рис. 71).

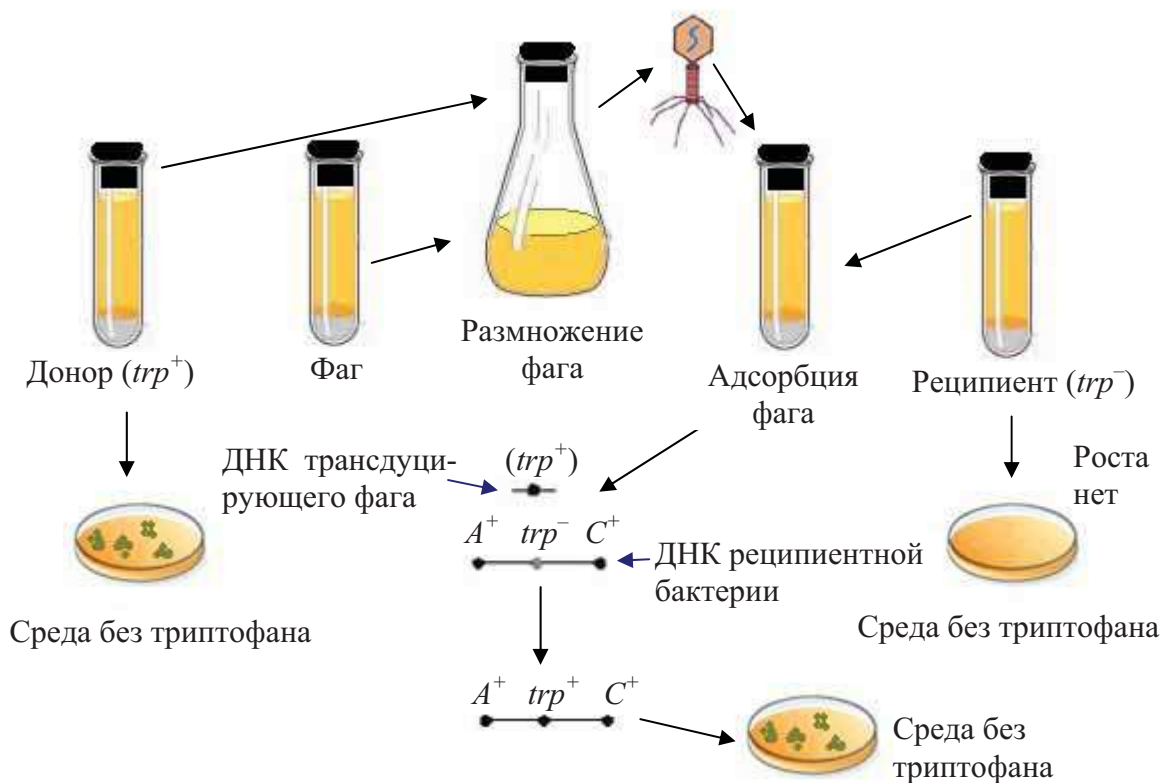


Рис. 71. Схема опыта по трансдукции

Изучение трансдукции показало, что одни фаги могут переносить разные бактериальные гены, а другие – только определенные. В соответствии с этим принято выделять два типа трансдукции:

- генерализованную (неспецифическую, или общую);
- специфическую, или ограниченную.

При генерализованной трансдукции может трансдуцироваться любой фрагмент бактериальной хромосомы примерно с одинаковой частотой. При специфической трансдукции могут переноситься строго определенные гены.

В осуществлении генерализованной трансдукции бактериальный вирус является только переносчиком генетического материала бактерий. При специфической трансдукции вирус включает ДНК бактерий в свой геном и передает ее, лизогенизируя бактерии-реципиенты.

Рассмотрим механизмы осуществления генерализованной и специфической трансдукции.

Генерализованная трансдукция

Одним из умеренных бактериофагов, осуществляющих генерализованную трансдукцию, является уже упоминаемый фаг P22 *S. typhimurium*, с которым работали Н. Циндер и Дж. Ледерберг. К фагам, осуществляющим генерализованную трансдукцию, относятся также фаги P1 *E. coli*, PBS1 *B. subtilis* и др.

Генерализованная трансдукция осуществляется дефектными частицами фагов. Образование таких частиц происходит в ходе репродукции фагов, сопровождающейся распадом бактериальной хромосомной ДНК. Следует отметить, что образование их может происходить как при литическом развитии фага (фаги P22 *S. typhimurium* и P1 *E. coli*), так и после индукции профага (фаг P1 *E. coli*). При этом в часть фаговых частиц начинает упаковываться не фаговая, а бактериальная ДНК. Размеры фрагментов бактериальной ДНК, включающейся в такие частицы, не превышают объема головки, а упаковываться могут самые разнообразные фрагменты бактериальной хромосомы. Фаговые частицы, несущие фрагменты ДНК бактерий, называются дефектными или трансдуцирующими.

Если полученным фаголизатом, содержащим как нормальные, так и дефектные частицы, обработать клетки штамма-реципиента, то заражение их нормальным фагом ведет, как правило, к лизису клеток. Однако некоторые клетки инфицируют дефектные трансдуцирующие фаги. В клетки поступают короткие фрагменты двунитевой ДНК донора. Циркуляризации бактериальной ДНК при этом не происходит, т. е. рекомби-

нируют с ДНК реципиента линейные фрагменты ДНК донора. Рекомбинация, происходящая при общей трансдукции, находится под контролем *recA*-гена, т. е. это общая гомологичная рекомбинация, осуществляемая путем реципрокного обмена соответствующими гомологичными участками. Возникают рекомбинанты, называемые трансдуктантами. Трансдуктанты нелизогенны и не обладают иммунитетом к фагам, так как трансдуцирующие частицы, вызвавшие их образование, не содержат фаговой ДНК (рис. 72).

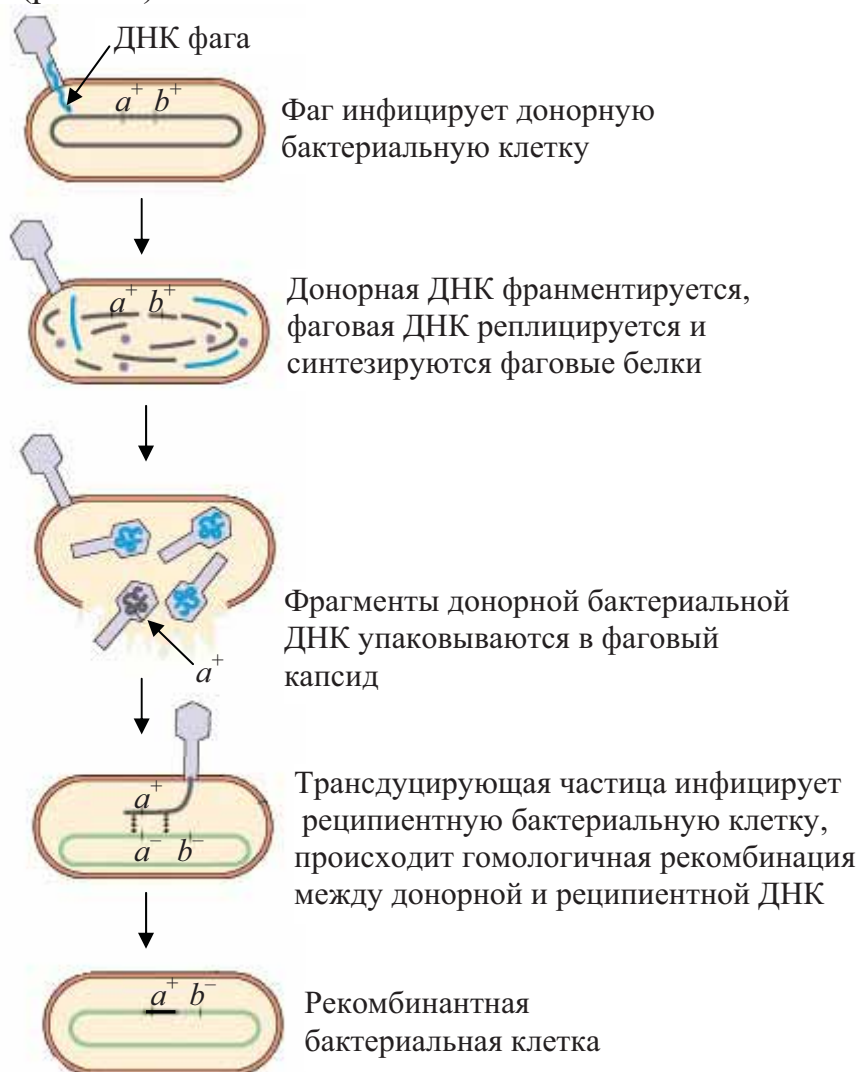


Рис. 72. Схема генерализованной трансдукции

При генерализованной трансдукции может переноситься любой бактериальный признак с частотой 10^{-5} – 10^{-6} . Количество бактериальной ДНК, которое может переноситься фагом обычно составляет 1–2 % всей

ДНК, содержащейся в клетке. Исключение составляет бактериофаг PBS1 *B. subtilis*, который может трансдуцировать до 8 % генома хозяина.

Однако при генерализованной трансдукции могут возникать не только истинные рекомбинанты-трансдуктанты, в которых привнесенный ген наследуется стабильно из поколения в поколение (полная, или завершенная, трансдукция), но и абортивные трансдуктанты. При **абортивной**, или **незавершенной**, трансдукции внесенный дефектным фагом фрагмент бактериальной хромосомной ДНК донора не рекомбинирует с хромосомной ДНК реципиентной клетки. Находясь в реципиентной клетке, привнесенный ген экспрессируется, что придает клетке новый фенотип, например способность к синтезу какой-то аминокислоты. Однако ген экзогеноты (привнесенный ген) не способен реплицироваться. Вследствие этого при делении клетки он передается только одной из дочерних особей, но во второй клетке сохраняется белок – продукт экспрессии привнесенного гена, и эта клетка в известной степени сохраняет приобретенный фенотип. С ростом числа делений идет разведение данного продукта, поэтому абортивные трансдуктанты на селективной среде формируют микроколонии по сравнению с колониями истинных трансдуктантов. Такие микроколонии абортивных трансдуктантов содержат только одну клетку, несущую экзогеноту, или привнесенный фагом ген донорной ДНК.

Впервые абортивную трансдукцию обнаружили при передаче генов, ответственных за жгутикообразование, по образованию на питательной среде «ползущих следов», или шлейфов. При исследовании под микроскопом таких клонов оказалось, что жгутик, а следовательно, и подвижность сохраняет одна клетка. Такие клетки делятся и оставляют по ходу движения неподвижное потомство.

Установлено, что соотношение между частотой осуществления завершенной и абортивной трансдукции составляет примерно 1:10, т. е. абортивная трансдукция происходит чаще, чем полная завершенная.

Специфическая трансдукция

Специфическая трансдукция была открыта в 1956 г. М. Морзе и супругами Е. и Дж. Ледерберг. Характерной особенностью специфической трансдукции является то, что каждый трансдуцирующий фаг передает только определенную, весьма ограниченную область бактериальной хромосомы. Если в генерализованной трансдукции фаг выступает в качестве «пассивного» переносчика генетического материала бактерий, а генетическая рекомбинация у трансдуцируемых бактерий происходит по

общим закономерностям рекомбинационного процесса, то при специфической трансдукции фаг не только переносит генетический материал, но и обеспечивает его включение в бактериальную хромосому.

Наиболее известным примером специфической трансдукции является трансдукция, осуществляемая фагом λ , который способен заражать клетки бактерий *E. coli* с последующей интеграцией его ДНК в геном бактерий.

Умеренный фаг λ при лизогенизации бактерий в результате сайт-специфической рекомбинации (разрыв и перекрестное воссоединение цепей ДНК) встраивается в их хромосому только в одном месте: на участке между локусами *bio* и *gal*. Этот участок получил название *att λ* . Вырезание (эксцизия) профага из хромосомы при индукции профага осуществляется также по механизму сайт-специфической рекомбинации.

Сайт-специфическая рекомбинация происходит точно, но не безошибочно. Приблизительно один раз на миллион событий при эксцизии профага рекомбинация осуществляется не в *att λ* -сайте, а захватывает участки *gal* либо *bio*. Полагают, что это обусловлено «неправильным» образованием петли при дезинтеграции профага. В результате этого прилегающая к профагу область бактериального генома выщепляется из состава хромосомы и переходит в состав генома свободного фага. Соответствующая по расположению в петле область генома профага остается в бактериальной хромосоме. Таким образом, между профагом и бактериальной хромосомой осуществляется генетический обмен. Встраивающийся в геном фага бактериальный генетический материал может заместить до 1/3 генетического материала фага.

После упаковки фаговой ДНК, часть которой замещена бактериальной, в фаговую головку образуются дефектные фаговые частицы. Фаг является дефектным вследствие того, что объем головки ограничен и при включении в его геном фрагмента бактериальной ДНК часть фагового генома остается в хромосоме бактерий. Если дефект незначителен, то фаг сохраняет жизнеспособность, так как его белковая оболочка остается неповрежденной и обеспечивает адсорбцию на клетках. Такой дефектный фаг может заражать другие клетки, но не может вызывать репродуктивную инфекцию, так как гены, ответственные за репродукцию, отсутствуют. Если в таком дефектном фаге в ДНК сохранились липкие концы, обеспечивающие превращение ее в циркулярную форму, то ДНК дефектного фага вместе с фрагментом бактериальной ДНК может интегрироваться в ДНК реципиентных бактерий и вызывать их лизогенизацию (рис. 73).

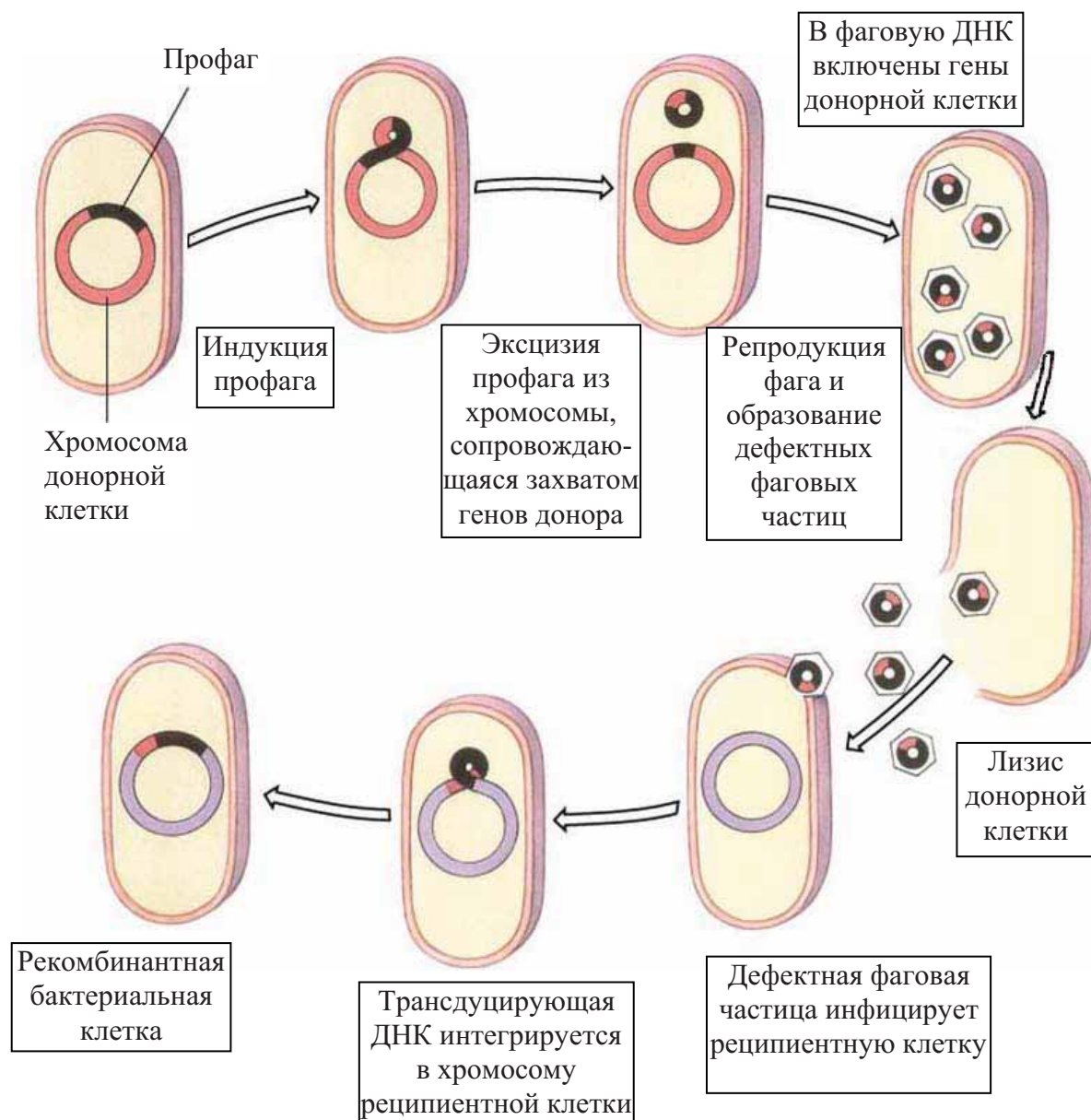


Рис. 73. Схема специфической трансдукции

Было установлено, что при индукции профага λ чаще образуются дефектные частицы, содержащие гены локуса *gal*. Такие дефектные частицы обозначают $\lambda dgal$ (фаг λ , *defective*, *gal*). Если в геноме фага λ содержится ген, ответственный за синтез биотина, то – $\lambda dbio$. Следовательно, если фаголизатом, полученным после заражения донорных бактерий фагом λ , в котором содержится дефектные частицы, обработать реципиентные клетки bio^- или gal^- , то с частотой 10^{-5} – 10^{-6} образуются трансдуктанты bio^+ или gal^+ .

Специфическая трансдукция у *E. coli* осуществляется не только фагом λ , но и родственными ему фагами, получившими наименование лямбдоидных фагов, к числу которых относятся ф80, 434, 82 и др. В частности, фаг ф80 включается в хромосому вблизи генов, кодирующих образование ферментов, ответственных за синтез триптофана. По этой причине фаг ф80 пригоден для переноса генов *trp*.

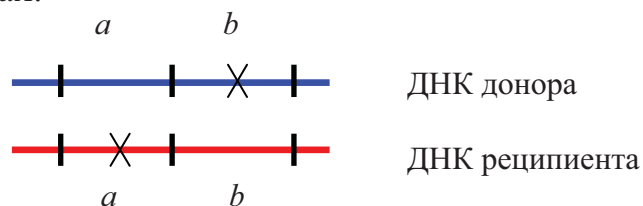
Было установлено, что фаг P22 *S. typhimurium*, кроме общей трансдукции, может осуществлять и специфическую трансдукцию. При литическом цикле развития бактериофаг P22 может осуществлять общую трансдукцию, а при лизогенизации – специфическую. ДНК фага P22 интегрируется в участок хромосомы рядом с генами, ответственными за синтез пролина. Интеграция профага резко стимулирует образование специфических трансдуцирующих частиц.

Таким образом, для осуществления специфической трансдукции необходима предварительная лизогенизация бактерий-доноров и последующая индукция профага из клеток. Образовавшиеся при этом дефектные трансдуцирующие частицы фагов заражают клетки реципиентного штамма, происходит их лизогенизация и встраивание профага с участком генома бактерий донора в хромосому реципиента.

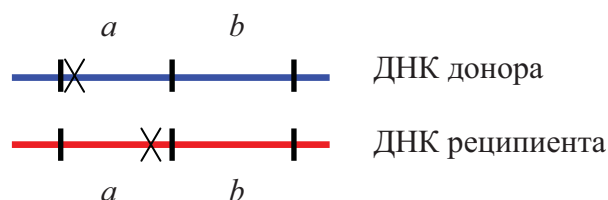
Использовать трансдукцию можно в следующих направлениях:

- трансдуцировать плазмиды и короткие фрагменты хромосомы донора;
- для конструирования штаммов заданного генотипа, в частности изогенных штаммов. Здесь малый размер передаваемых фрагментов обеспечивает преимущество трансдукции перед конъюгацией. Изогенные штаммы, сконструированные при помощи генерализованной трансдукции, различаются только по участку хромосомы, переносимому трансдуцирующим фагом;
- для точного картирования бактериальных генов, установления порядка и их расположения в оперонах и тонкой структуры отдельных генетических детерминант, что осуществляют с помощью **комплементационного теста**. Известно, что для синтеза определенной группы продуктов необходимо функционирование нескольких генов. Допустим, что синтез какого-то фермента определяется продуктами генов *a* и *b*. Пусть имеются два фенотипически одинаковых мутанта, не способных к синтезу фермента, но неизвестно, идентичны или различны они генетически. Для идентификации генотипа проводят трансдукцию, т. е. размножают фаг на клетках одной популяции, а затем фаголизатом заражают клетки второй популяции. Если при высеве на селективную среду формируются как большие колонии истинных трансдуктантов, так и маленькие коло-

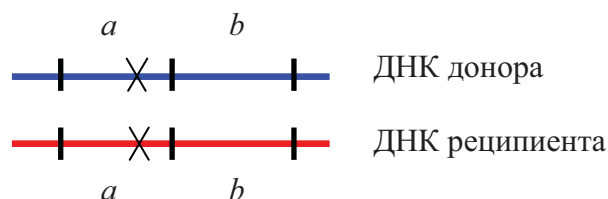
нии abortивных трансдуктантов, делают вывод, что мутации локализованы в разных генах:



Если образуются колонии только истинных трансдуктантов, делают вывод, что мутации находятся в одном гене, но в разных его сайтах:



Если образование трансдуктантов вообще не происходит, то делают вывод об идентичности исследуемых мутаций:



7.6. Репарация повреждений ДНК у бактерий

Явление репарации (восстановления) жизнеспособности клеток после действия на них γ - и рентгеновых лучей было открыто в 1949 г. в опытах на дрожжах, а затем и на бактериях.

Если бактериальные клетки облучить УФ-светом, то они в основном гибнут, так как УФ-лучи поглощаются ДНК с образованием в ней димеров тимина, что приводит к частичному или полному блокированию репликации. Тем не менее выявлены три основных механизма репарации ДНК после повреждений такого типа: фотореактивация, эксцизионная репарация и пострепликационная, или рекомбинационная репарация.

Эксцизионную и пострепликационную репарации называют еще темновой репарацией.

Фотореактивация – восстановление молекул ДНК, поврежденных УФ-лучами, в результате последующего воздействия на них видимого света. Бактериальные клетки содержат фермент фотореактивации – де-

зоксипиридинфототиазу, синтез которого у бактерий *E. coli* детерминруется геном *phr*. Субстратом для этого фермента служат димеры тимина. Фермент находит в ДНК образовавшийся под действием УФ-лучей пиримидиновый димер и прочно связывается с ним. Если клетки перенести на видимый свет, то комплекс фермента фотореактивации и димеров тимина распадается, при этом происходит восстановление нормальной структуры ДНК, т. е. мономеризация или расщепление димеров тимина.

Следует отметить, что фотореактивация может работать как на двунитевых, так и на однонитевых ДНК.

Системы **эксцизионной репарации** удаляют неправильно спаренные или поврежденные основания из ДНК и затем синтезируют новую последовательность ДНК, замещающую их.

Основной тип эксцизионной репарации, состоящей из нескольких этапов, схематически изображен на рис. 74. На первом этапе узнавания поврежденная структура распознается эндонуклеазой, которая разрезает цепь ДНК на расстоянии восьми фосфодиэфирных связей с 5'-стороны и четырех-пяти связей с 3'-стороны от повреждения. На стадии вырезания 5'-3'-эксонуклеаза удаляет поврежденный участок. Образующийся одноцепочечный участок служит в качестве матрицы для ДНК-полимеразы I при синтезе цепи, замещающей вырезанную последовательность. Наконец, ДНК-лигаза ковалентно связывает 3'-конец нового материала со старым материалом.

Системы эксцизионной репарации включают у бактерий *E. coli* три гена: *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*. Эти гены кодируют компоненты репарационной эндонуклеазы (*uvrABC*-эндонуклеазы).

Если повреждение в ДНК представляет собой структурное изменение (например, образование в результате УФ-облучения димера тимина), то поврежденные основания в процессе эксцизионной репарации удаляются, что ведет к восстановлению последовательности нуклеотидов, характерной для ДНК дикого типа. Однако если нарушение заключается в неправильном спаривании оснований, возникающем в результате мутирования одного из них, репарирующая система не может определить, какое именно основание представляет дикий тип, а какое – мутантный. Все это узнается как два неправильно спаренных основания, каждое из которых может служить объектом для эксцизионной репарации. Если вырезается мутантное основание, то восстанавливается дикий тип последовательности. Если же случается, что вырезается исходное основание (дикого типа), то новая (мутантная) последовательность закрепляется.

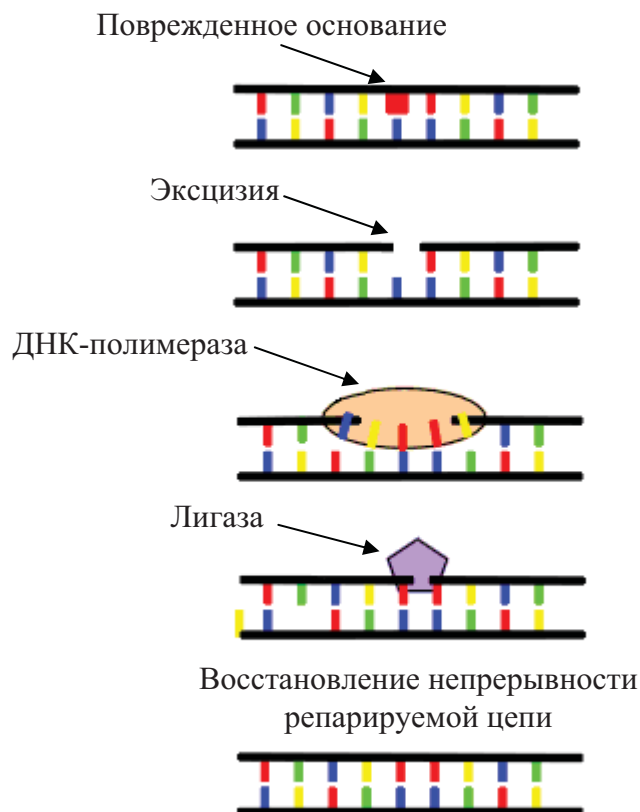
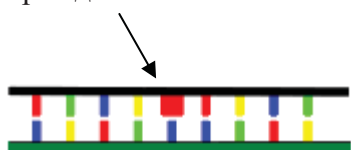


Рис. 74. Эксцизионная репарация ДНК

Клетки *E. coli* облученные ультрафиолетом, могут выжить с образованием жизнеспособного потомства даже в том случае, когда они не способны вырезать димеры тимина, т. е. когда у них не функционирует механизм эксцизионной репарации ДНК. Из этого можно заключить, что кроме механизма «иссечения и заполнения», в клетках должен существовать другой механизм, спасающий от генетических повреждений. Как показал П. Говард-Фландерс (1968), этот механизм заключается не в исправлении повреждения в облученной ДНК, а в исправлении дефектной дочерней ДНК, образующейся после репликации поврежденной родительской ДНК. В результате репликации поврежденной нити ДНК образуется ДНК-копия с односторонними пробелами или брешами напротив димера тимина в родительской матричной цепи ДНК. Это говорит о том, что наличие димера тимина в матричной нити ДНК препятствует продвижению ДНК-полимеразы. Через 1 ч после синтеза таких разорванных дочерних цепей эти брешы превращаются в непрерывные цепи ДНК нормальной длины. Брешы в дочерних нитях заполняются за счет **пострепликационной репарации**. Так как этот тип репарации не происходит в клетках, дефектных по рекомбинации (*recA*-мутантах), ее называют также **рекомбинационной репарацией**.

Пострепликационная репарация происходит следующим образом. При репликации дефектной (поврежденной) ДНК фермент ДНК-полимераза останавливается перед димером тимина, а затем «перескакивает» через этот димер и продолжает репликацию, оставив за собой пробел (брешь) в дочерней цепи. Этот пробел заполняется в результате рекомбинации со второй дочерней молекулой ДНК, образующейся при репликации. Обмен цепями между молекулами ДНК осуществляет белок РесА. Возникающий пробел на второй молекуле заполняется ДНК-полимеразой, считывающей комплементарную нить с матричной неповрежденной нити. Лигаза окончательно восстанавливает непрерывность цепи (рис. 75).

Поврежденное основание



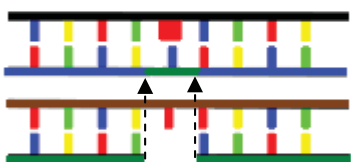
Репликация поврежденной ДНК



Дочерняя молекула ДНК с повреждением в одной цепи и брешью в другой

Нормальная дочерняя молекула ДНК

Обмен между цепью с брешью и нормальной цепью в другой дочерней молекуле



Репарация образовавшейся брешы с помощью ДНК-полимеразы и лигазы



Рис. 75. Рекомбинационная репарация ДНК

Многие воздействия, которые повреждают ДНК или ингибируют ее репликацию у бактерий *E. coli*, индуцируют серию фенотипических изменений, получивших название **SOS-ответа**. Начало такого ответа определяется взаимодействием белка RecA с белком репрессором LexA. Ответ клетки на повреждающее воздействие начинается с активации протеазной активности белка RecA. Активирующим сигналом может быть присутствие одноцепочечной области в сайте повреждения. Активируясь, RecA-протеаза разрезает белок-репрессор LexA. Белок LexA относительно стабилен в неповрежденных клетках, где он функционирует как репрессор многих оперонов, гены которых отвечают за различные репарационные функции. Протеолитическое разрезание репрессора координированно индуцирует все эти опероны. В настоящее время идентифицировано 11 генов, которые участвуют в SOS-ответе в результате активации их продуктов. Это пять генов *din* (от англ. **damage inducible**), гены *recA*, *lexA*, *uvrA*, *uvrB*, *umuC* и *hima*. Некоторые из *sos*-генов активны только в поврежденных клетках; другие активны в необработанных, но уровень их экспрессии увеличивается при разрезании белка LexA. Установлено, что белок LexA репрессирует гены-мишени, связываясь с последовательностью ДНК длиной около 20 пар оснований, названной **SOS-блоком**. Эта последовательность симметрична, и ее копия представлена в каждом локусе-мишени. Подобно другим операторам, SOS-блоки перекрываются с соответствующими промоторами.

Белки RecA и LexA являются взаимными мишенями в SOS-цикле. RecA разрезает LexA, который в свою очередь репрессирует RecA. SOS-ответ вызывает амплификацию обоих белков.

При прекращении индуцирующего сигнала белок RecA теряет свою протеазную активность. В этот момент ген *lexA* имеет высокий уровень экспрессии; в отсутствие RecA-протеазы белки LexA быстро накапливаются в неразрезанной форме и выключают *sos*-гены. Этим можно объяснить обратимость SOS-ответа.

7.7. Система рестрикции и модификации бактериальной клетки

Явление рестрикции и модификации было подробно исследовано В. Арбером в конце 1960-х годов при изучении развития бактериофага λ в различных штаммах кишечной палочки.

Известно, что бактериофаги, как правило, проявляют специфичность в отношении хозяев, т. е. они инфицируют ограниченное число родственных штаммов, видов или родов бактерий. Это в первую очередь зави-

сит от того, имеются или нет на бактериальных клетках рецепторы для адсорбции бактериофага. Кроме того, у бактерий есть и другие механизмы, обуславливающие специфичность взаимоотношений с фагами. К ним относятся системы рестрикции и модификации.

Рассмотрим функционирование этой системы на примере бактериофага λ и клеток штамма *E. coli* K-12. Развитие фага приводит к эффективности посева, равной единице: каждая частица бактериофага заражает бактериальную клетку, репродуцируется в ней и дает потомство, фиксируемое визуально по наличию на газоне чувствительных бактерий зон лизиса или бляшек. Если фаголизатом, полученным после цикла развития фага λ на бактериях *E. coli* K-12, инфицировать бактерии *E. coli* штамма С, то эффективность посева будет значительно ниже (10^{-4} – 10^{-5}). Следовательно, не каждая фаговая частица по каким-то причинам способна размножиться в клетках нового хозяина. Если же фаговые частицы, образовавшиеся после цикла репродукции на клетках *E. coli* С, использовать для заражения такой же культуры (*E. coli* С), то размножение бактериофага λ вновь будет проходить нормально и эффективность посева составит единицу. Однако если перед заражением бактерий *E. coli* С фаг пропассировать на клетках *E. coli* K-12, то на штамме *E. coli* С он будет развиваться с низкой эффективностью.

Таким образом, при смене хозяина наблюдается значительное ограничение размножения фага λ , которое получило название **рестрикции**. Рестрикция обусловлена расщеплением инфицирующей ДНК фага под действием фермента, специфичного для штамма-хозяина. Ферменты эти получили название **рестрикционных эндонуклеаз** или **рестриктаз**. Благодаря своему нуклеазному действию они препятствуют поддержанию чужеродной ДНК в бактериальной клетке.

Если фаг проделал полный цикл репродукции в новом хозяине (в нашем примере штамм *E. coli* С), то в дальнейшем в этом же хозяине он не подвергается ограничению, или рестрикции. Объяснить подобные факты можно следующим образом. В бактериальной клетке, кроме рестриктаз, синтезируются другие ферменты – метилазы, которые призваны защищать собственную ДНК от действия клеточных рестриктаз. Метилазы изменяют или модифицируют собственную ДНК путем метилирования или гликозилирования аденина либо цитозина. Этот процесс известен под названием **модификации**. ДНК бактериофага, прошедшего полный цикл развития в новом хозяине, под действием метилаз модифицируется таким же образом, как и ДНК клетки-хозяина. Она метилируется и приобретает свойства, защищающие ее от воздействия рестрикционных ферментов данного штамма бактерий (рис. 76).

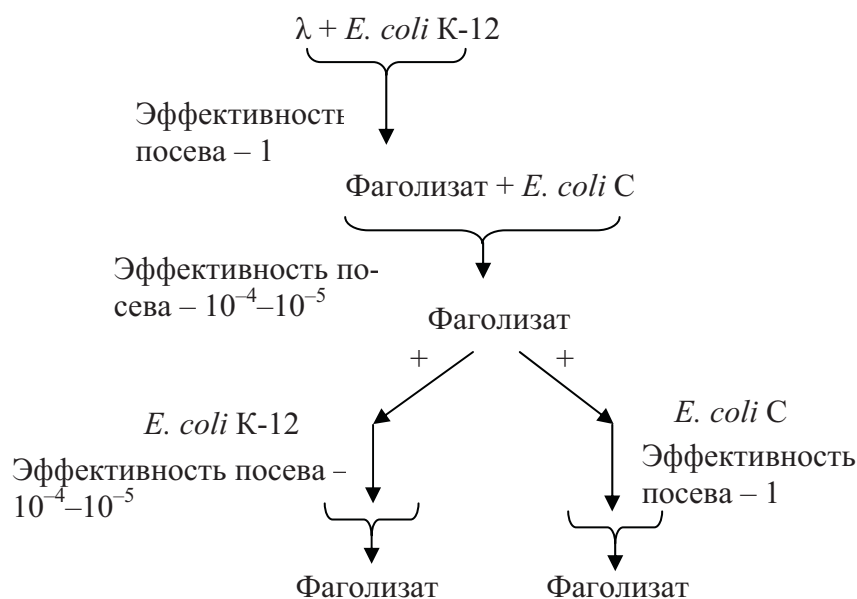


Рис. 76. Эксперимент по выявлению системы рестрикции и модификации у бактерий *E. coli*

Следовательно, работающая в клетках бактерий система рестрикции-модификации (система R-M) образована двумя специфическими для определенного штамма микроорганизма ферментами – ДНК-модифицирующим (аденин- или цитозинметилаза) и расщепляющим (рестриктаза). Эти ферменты узнают в ДНК одни и те же определенные короткие последовательности нуклеотидов – *сайты*. Метилаза, модифицируя определенные основания внутриклеточной ДНК, защищает ее от действия рестриктазы, узнающей ту же нуклеотидную последовательность.

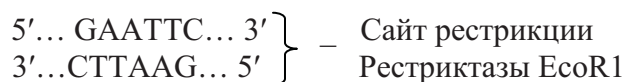
Системы рестрикции и модификации широко распространены среди бактерий и найдены практически у всех исследованных видов. Недавно рестриктазы обнаружены и у некоторых видов дрожжей. Из разных штаммов микроорганизмов выделяют рестриктазы, различающиеся между собой характером действия на ДНК.

В научной литературе рестриктазы обозначаются буквой R. Название фермента складывается из первой буквы рода и двух первых букв вида бактерий, из которого был выделен фермент, например *Bacillus subtilis* – Bsu, *Escherichia coli* – Eco. Если же в определенном штамме имеется несколько систем рестрикции и модификации, то вводится дополнительное числовое обозначение. Ферменты систем рестрикции и модификации могут кодироваться плазмидными и фаговыми генами, и тогда к названию фермента добавляется название внехромосомного элемента. Например,

название EcoR1 относится к ферменту рестриктазе, детерминированному плазмидой R1; название EcoP1 – к ферменту, кодируемому фагом P1. В настоящее время все известные рестриктазы в зависимости от потребности в кофакторах и характера расщепления нуклеотидных последовательностей ДНК разделяют на три типа: I, II и III.

Рестриктазы I типа являются сложными белками с тремя различными типами субъединиц (эндонуклеаза, метилаза, фермент узнавания). Для действия этих ферментов в качестве кофакторов требуются АТФ, S-аденозинмонофосфат и ионы Mg^{2+} . Расщепление ДНК совмещено с гидролизом АТФ. Рестриктазы I типа узнают сайт рестрикции, но расщепляют последовательность ДНК на произвольном расстоянии от сайта узнавания (от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов). В результате образуются самые разнообразные фрагменты ДНК, или рестрикты. Такие рестриктазы невозможно использовать для решения генно-инженерных задач.

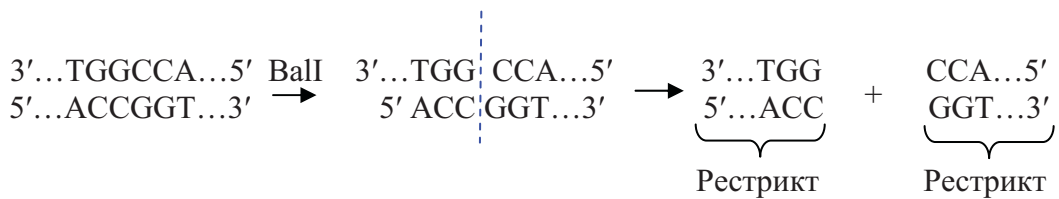
Системы рестрикции и модификации II типа представлены двумя отдельными белками (рестриксионная эндонуклеаза, модификационная метилаза). **Рестриктазы II типа** – относительно просто организованные белки, состоящие из двух субъединиц одного типа со сравнительно небольшой молекулярной массой. Для специфического действия этих ферментов нужны только ионы Mg^{2+} . Рестриктазы II типа характеризуются тем, что у них сайты узнавания и места рестрикции совпадают. Обычно рестриктаза II типа узнает определенную последовательность ДНК и вызывает ее разрыв внутри этой последовательности. Сайты рестрикции рестриктаз II типа представлены симметричными при повороте на 180° последовательностями – **палиндромами**:



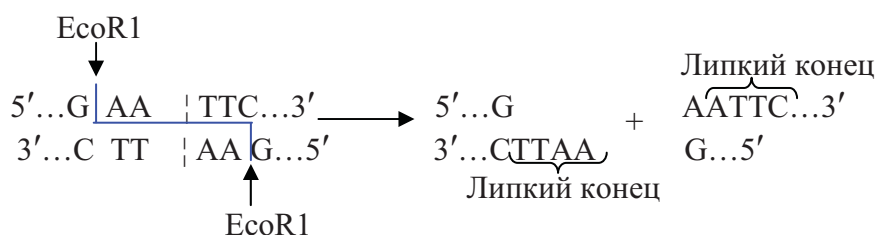
Рестриктазы II типа делятся на несколько классов в зависимости от размера сайта рестрикции и длины получаемых фрагментов ДНК:

- 1) мелкощепящие – сайт рестрикции представлен 4 п.н.;
- 2) среднещепящие – сайт рестрикции – 6–8 п.н.;
- 3) крупнощепящие – сайт рестрикции – 10–14 п.н.

Рестриктазы II типа делятся на две группы в зависимости от того, каким образом они расщепляют последовательность ДНК. Одни из них осуществляют прямой разрез ДНК (по оси симметрии). В результате образуются фрагменты ДНК с тупыми или ровными концами. Примером таких рестриктаз является эндонуклеаза BalI:



Рестриктазы, относящиеся ко второй группе, осуществляют ступенчатый разрез (на некотором расстоянии от оси симметрии). В результате этого в месте разреза образуются неровные, или липкие, концы, т. е. рестрикты имеют на своих концах односторонние взаимно комплементарные участки. Примером таких рестриктаз является фермент EcoR1:



Рестрикты, полученные после воздействия на разные молекулы ДНК определенной рестриктазы, имеют одинаковые липкие концы. Такие рестрикты могут объединяться друг с другом с образованием рекомбинантных молекул ДНК, что широко используется в генетической инженерии.

Рестриктазы III типа имеют некоторое сходство с рестриктазами I типа. Фермент состоит из двух различных субъединиц (эндонуклеаза, метилаза), и поэтому бифункционален, т. е. обладает как рестриктазной, так и метилазной активностью. Для проявления эндонуклеазной активности требуются только АТФ и ионы Mg^{2+} . Расщепление ДНК не сопровождается гидролизом АТФ. Рестриктазы III типа гидролизуют ДНК на расстоянии 20–39 п.н. от сайтов узнавания и поэтому также довольно редко используются для практических целей.

Ферментативная активность рестриктаз измеряется в единицах активности. Это такое количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза за один час 1 мкг ДНК фага λ при оптимальных условиях. Оптимальные условия рестрикции для каждой рестриктазы являются индивидуальными и зависят от pH, ионной силы раствора, присутствия определенных ионов, температуры проведения реакции.

7.8. Генетическая инженерия. Клонирование генов в клетках бактерий

Генетическая инженерия – совокупность методов, позволяющих создавать *in vitro* рекомбинантные молекулы ДНК, с последующим введением этих новых генетических структур в живую клетку.

Так как с химической точки зрения ДНК всех организмов однотипна, то *in vitro* возможно воссоединение фрагментов ДНК из любых организмов. В этом смысле рекомбинация *in vitro* отличается от обычной генетической рекомбинации, которая требует гомологии ДНК и, как правило, осуществляется в пределах одного или близкородственных видов. Другими словами, обычные методы обмена генетической информацией (конъюгация, трансдукция, трансформация) позволяют провести обмен генами внутри одного вида, тогда как генетическая инженерия, в принципе, открывает возможность, для перемещения генов в пределах всех живых организмов.

Для того чтобы осуществить генно-инженерный эксперимент, т. е. создать рекомбинантную ДНК и ввести ее в клетку другого организма, необходимо соблюсти следующие условия:

- иметь инструменты для разрезания молекул ДНК на фрагменты;
- иметь инструменты для соединения фрагментов ДНК, выделенных из различных источников;
- подобрать переносчик, или вектор генов, предназначенных к введению в клетку другого организма. Этот вектор должен самостоятельно реплицироваться в клетке и обеспечивать репликацию введенного фрагмента ДНК;
- разработать способ введения гибридных или рекомбинантных молекул ДНК в живую клетку;
- определить метод отбора (селекции) клона реципиентной клетки, воспринявшей гибридную молекулу ДНК.

Самыми удобными векторами являются плазмиды, так как они, во-первых, способны реплицироваться независимо от хромосомной ДНК бактерий. Во-вторых, плазмиды содержат гены, благодаря которым по фенотипу можно отделить бактерии, содержащие плазмиды, от бактерий, лишенных плазмид. Например, R-плазмиды содержат структурные гены, ответственные за устойчивость к антибиотикам. При высеве бактерий, содержащих такие R-плазмиды, на среду с антибиотиком они будут расти и формировать колонии, бактерии, лишенные их, на среде с антибиотиком не вырастут.

Резать молекулы ДНК на фрагменты можно с помощью ферментов рестриктаз. Необходимо подобрать специфическую рестриктазу, которая имела бы сайты узнавания на двух молекулах ДНК (плазмиде и ДНК, из которой вырезаются переносимые гены) и резала бы их с образованием липких концов. Рестриктаза не должна резать ДНК плазмиды в области, ответственной за репликацию, и в области структурных генов, детерминирующих фенотип плазмиды.

Соединять или сшивать фрагменты ДНК можно с помощью ферментов полинуклеотидлигаз.

Вводить рекомбинантные молекулы ДНК можно с помощью трансформации. Рекомбинантной ДНК обрабатывают реципиентные клетки (клетки, в которые клонируется нужный ген) и через определенный промежуток времени выдерживания при оптимальной температуре смесь высевает на селективную среду, позволяющую отобрать по фенотипу клоны, воспринявшие плазмиду.

Схема эксперимента по конструированию рекомбинантной ДНК и клонированию генов в клетках бактерий представлена на рис. 77.

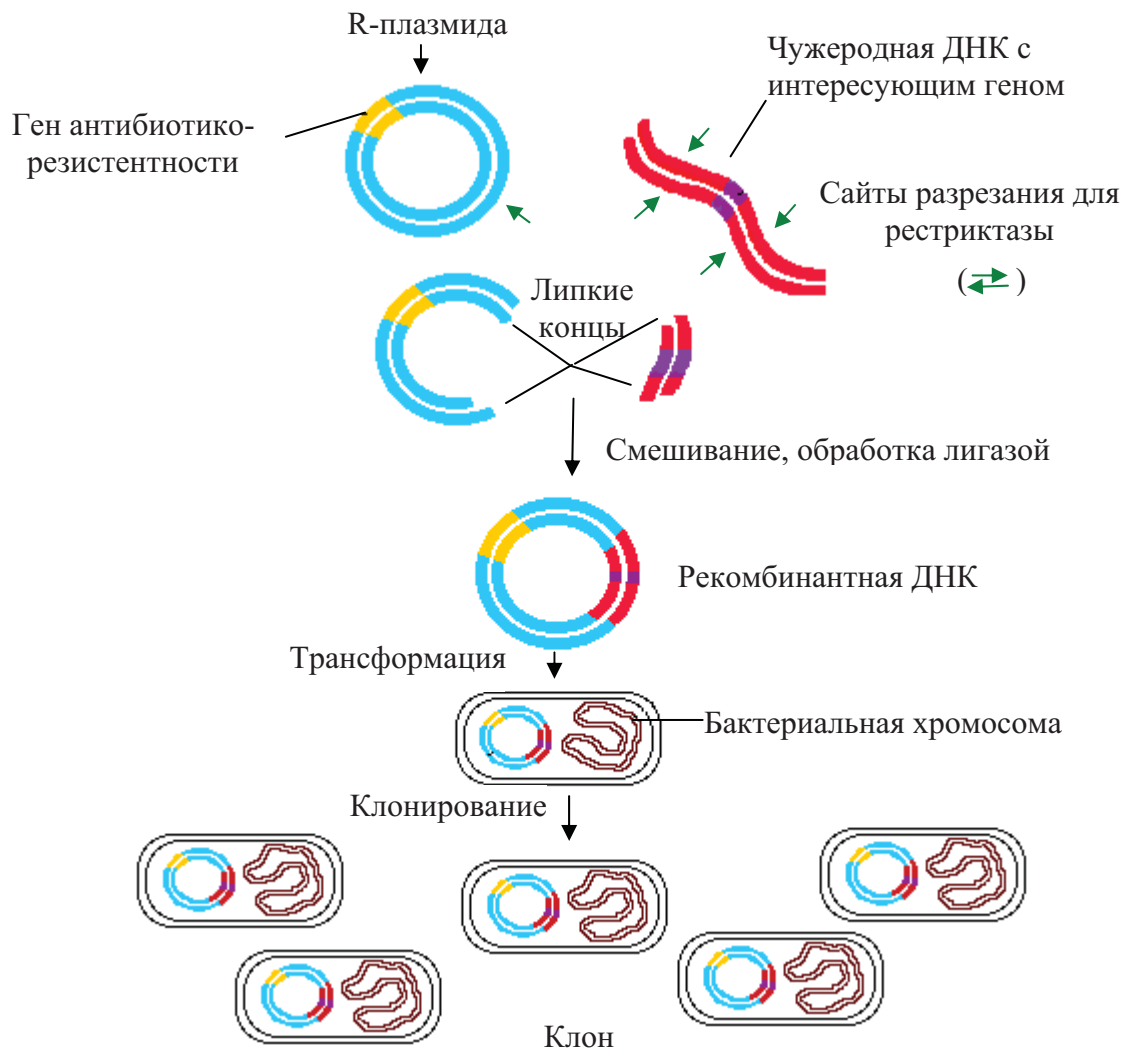


Рис. 77. Получение и клонирование рекомбинантной ДНК

Метод клонирования нашел широкое применение. С его помощью можно получать микробиологическим путем продукты, используемые

человеком. В настоящее время разработаны методы микробиологического получения гормона инсулина, в котором нуждаются больные диабетом. Раньше его получали путем экстрагирования из поджелудочных желез коров, свиней, что очень сложно и дорого. Разработаны методы получения интерферонов – белков, обладающих антивирусным действием; соматостатина – гормона роста и др. Гены, детерминирующие синтез этих веществ, клонированы в основном в клетках *E. coli*.

7.9. Регуляция метаболизма у бактерий

Клетка бактерий *E. coli* содержит около 10^7 молекул белка. Однако, в ДНК этих бактерий зашифрована информация о структуре примерно 3 тыс. разных белков. Если бы все 3 тыс. бактериальных генов работали одинаково эффективно, т. е. все типы клеточных белков синтезировались в одинаковом количестве, то каждая клетка бактерий *E. coli* содержала бы около 3 тыс. копий каждой белковой молекулы, закодированной в ее геноме. Однако анализ относительного количества разных белков в клетке на определенных стадиях роста бактерий показал, что содержание некоторых из них не превышает 10 молекул на клетку, в то время как содержание других видов белков доходит до 500 тыс. молекул на клетку. Это свидетельствует о том, что в клетке *E. coli* различные белки синтезируются не в одинаковых количествах, т. е. не все гены клетки в одно и то же время экспрессируются одинаково эффективно. Следовательно, существуют механизмы, обеспечивающие регуляцию биохимической активности бактериальной клетки.

В начале XX в. было выяснено, что ферментативные свойства микроорганизмов зависят от того, на какой среде они были выращены, т. е. клетки можно «тренировать» или «воспитывать». Если дрожжи выращивать в среде с лактозой, то они утилизируют ее за счет ферментов лактозного метаболизма. При переносе дрожжей в среду с глюкозой эти ферменты исчезают, так как в них отпадает необходимость, и синтезируются ферменты глюкозного метаболизма, что обеспечивает утилизацию глюкозы в качестве источника углерода и энергии. В 1930-е годы Х. Карстром, изучив образование ряда ферментов углеводного метаболизма у бактерий, разделил их на два класса: **адаптивные ферменты**, которые образуются только в присутствии своего субстрата в среде, и **конститутивные ферменты**, образующиеся независимо от состава среды.

Одним из ферментов бактерий *E. coli*, отнесенных к классу адаптивных, является β-галактозидаза. Этот фермент катализирует реакцию гид-

ролиза своего естественного субстрата лактозы, а также других β -галактозидов. Установлено, что клетки бактерий *E. coli* содержат β -галактозидазу только тогда, когда они растут на среде, содержащей лактозу в качестве источника углерода и энергии; на среде, содержащей вместо лактозы какой-нибудь другой естественный углевод (например, глюкозу), клетки бактерий *E. coli* не синтезируют этого фермента. Исследованиями адаптационного образования β -галактозидазы у *E. coli* занимался Ж. Моно в 1950-е годы. В результате он переименовал феномен адаптации в «**индукцию ферментов**», а вещества, в присутствии которых в клетках образовывались соответствующие ферменты (например, лактоза), были названы **индукторами**. Ферменты, синтезируемые в присутствии индукторов, получили название индуцибельных. Следовательно, в настоящее время различают конститутивные и индуцибельные ферменты.

Существуют два способа регуляции метаболизма у бактерий:

- 1) на уровне активности ферментов или регуляция активности ферментов;
- 2) на уровне генов или регуляция синтеза ферментов.

7.9.1. Регуляция активности ферментов

Наиболее быстрым и тонким механизмом регуляции активности ферментов является регуляция, которой подвергаются **аллостерические ферменты**. Это белки с высокой молекулярной массой, состоящие из нескольких субъединиц одного или разного типа. Каждая субъединица содержит, как правило, каталитический центр, который связывается с субстратом, и регуляторный, или аллостерический, центр. Последний соединяется с веществами-эффекторами, которые могут повышать или понижать активность фермента. Связывание эффектора с аллостерическим центром вызывает конформационные изменения молекулы фермента, происходящие на уровне третичной структуры, в результате чего изменяется сродство фермента к субстрату (рис. 78).

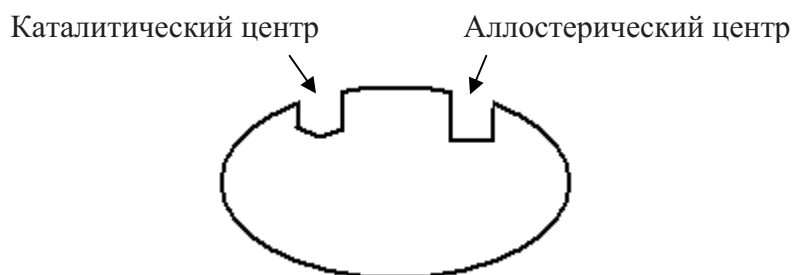


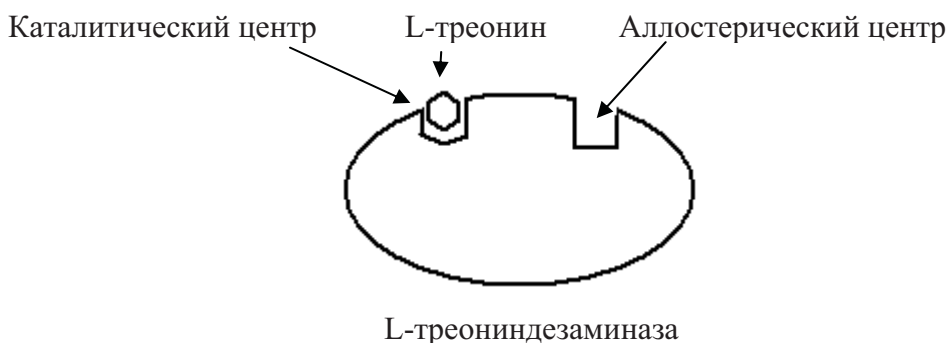
Рис. 78. Субъединица аллостерического фермента

Эффекторами могут быть конечные продукты данного метаболического пути, субстраты ферментов, а также некоторые конечные продукты родственных метаболических путей. Если действие эффектора приводит к понижению каталитической активности фермента, такой эффектор называется отрицательным или ингибитором. Положительным называют эффектор, действие которого повышает каталитическую активность фермента. Положительным эффектором, или активатором, чаще всего бывает субстрат данного регуляторного фермента.

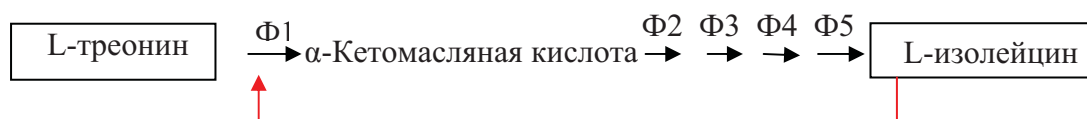
Наиболее простой случай аллостерической регуляции – регуляция конечным продуктом активности первого (ключевого) фермента неразветвленного биосинтетического пути. Если конечный продукт накапливается в избытке, он подавляет активность первого фермента. Этот процесс называется *ретроингибированием* или ингибированием по принципу обратной связи. Примером такого типа регулирования является ингибирование биосинтеза изолейцина. Превращение L-треонина в L-изолейцин включает пять ферментативных реакций:

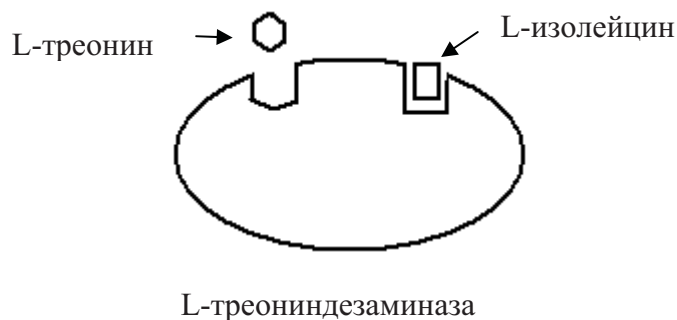


Первый фермент на пути синтеза L-изолейцина L-треониндезаминаза является аллостерическим и ингибируется только L-изолейцином. На поверхности молекулы L-треониндезаминазы имеются два вида участков: каталитический – для связывания субстрата (L-треонина) и регуляторный – для связывания эффектора (L-изолейцина):

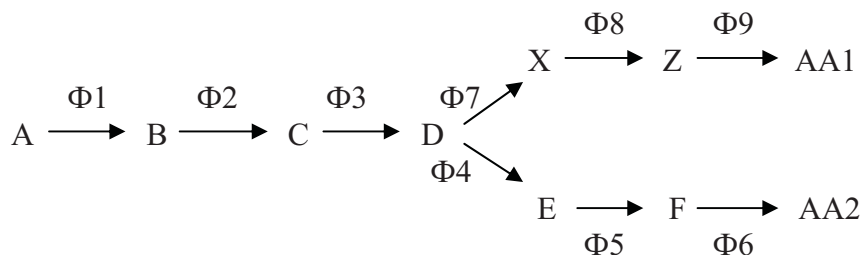


При накоплении в клетке L-изолейцина он связывается с аллостерическим центром фермента L-треониндезаминазы, подавляя его активность, и синтез L-изолейцина прекращается:



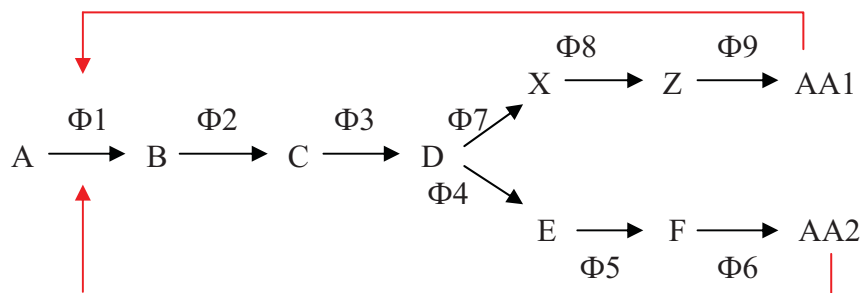


В разветвленных метаболических путях активность аллостерических ферментов регулируется сложнее, так как от активности первого фермента зависит биосинтез нескольких конечных продуктов. Например:

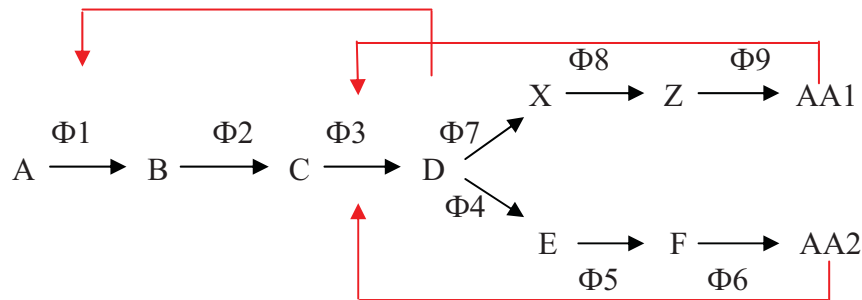


В этом случае на поверхности молекулы фермента (Φ1), катализирующего первый этап биосинтетического пути, имеются различные аллостерические центры, с каждым из них связывается один из конечных продуктов, выполняющих функцию эффектора. Ингибирование активности этого фермента может происходить двояко:

- **мультивалентное ингибирование** – необходимо связывание с аллостерическими центрами всех конечных продуктов. Каждый конечный продукт (эффектор) по отдельности, связавшись со «своим» аллостерическим центром, не меняет активности фермента;
- **кумулятивное, или аддитивное, ингибирование** – присоединение к ферменту одного конечного продукта частично снижает его активность, с присоединением каждого последующего конечного продукта эффект ингибирования нарастает:



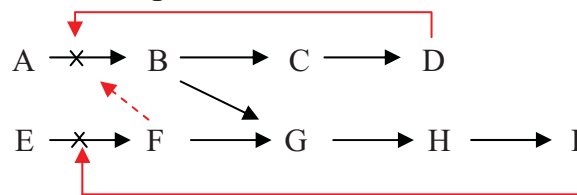
В некоторых разветвленных биосинтетических путях ингибирование первого фермента осуществляется не конечными продуктами каждой из ветвей, а промежуточным продуктом, образующимся непосредственно перед разветвлением. Накопление его в свою очередь контролируется конечными продуктами. Такой вид ингибирования получил название **последовательного**:



Примером такого ретроингибирования является ингибирование фермента ДАГФ-синтетазы (3-дезоксид-D-арабиногептулозо-7-фосфата) у бактерий *B. subtilis* префенатом:



Существуют разветвленные метаболические пути, в которых регуляция осуществляется таким образом, что одновременно происходит и активация, и ингибирование:



Метаболит В является общим для двух путей синтеза конечных продуктов D и I. Вещество D ингибирует аллостерический фермент, который катализирует превращение А в В ($A \rightarrow B$), но вещество F является активатором этой же реакции. Поэтому вещество D продолжает синтезироваться. Количества вещества В после активации достаточно для синтеза продукта I. Затем, когда синтез продукта I будет завершен, он блокирует реакцию $E \rightarrow F$. Концентрация продукта F падает, и поэтому активность фермента реакции $A \rightarrow B$ снижается. Такой двойной контроль

обеспечивает необходимое количество продукта В, которое обеспечивает синтез двух конечных продуктов D и I.

В настоящее время в селекции микроорганизмов – продуцентов аминокислот и других биологически активных продуктов – используются методы получения мутантов нечувствительных к ретроингибированию. Такие мутанты все время синтезируют нужный конечный продукт.

7.9.2. Регуляция на уровне генов, или регуляция синтеза ферментов

Этот тип регуляции был открыт благодаря исследованиям Ф. Жакоба и Ж. Моно, которые пытались выяснить, каким образом бактериальные клетки реагируют на изменение условий окружающей среды. В частности, изучался синтез фермента β -галактозидазы у бактерий *E. coli*. Если бактерии *E. coli* выращивать на среде с глюкозой, то β -галактозидаза не синтезируется. Если клетки перенести в среду с лактозой, то содержание фермента β -галактозидазы, участвующего в расщеплении лактозы, увеличивается в 1000 раз. Такая активация транскрипции называется **индукцией**. Одновременно с β -галактозидазой индуцируется синтез еще двух ферментов: β -галактозидпермеазы, обеспечивающей транспорт лактозы внутрь клетки через цитоплазматическую мембрану, и β -галактозид-трансацетилазы. Установлено, что дефект в любом из трех генов, ответственных за синтез одного из этих ферментов, приводит к неспособности утилизировать лактозу. При наличии в среде лактозы синтез трех ферментов начинается одновременно. Это позволило предположить, что гены, ответственные за их синтез, располагаются на хромосоме рядом (образуют кластер) и запускаются одним механизмом в ответ на воздействие индуктора – лактозы. Следовательно, в клетке бактерий должен быть какой-то репрессор, который блокирует транскрипцию структурных генов в отсутствие индуктора. Как только индуктор инактивирует репрессор, структурные гены, ответственные за синтез ферментов, выходят из-под репрессии и начинается их транскрипция.

На основании полученных данных Ф. Жакоб и Ж. Моно предположили, что хромосома бактерий состоит из групп отдельных генов, имеющих общую регуляцию и объединяемых в опероны. **Опероном** называют группу функционально связанных между собой генов. Белки, кодируемые генами одного оперона, – это, как правило, ферменты, катализирующие разные этапы одного метаболического пути. Транскрипция генов оперона ведет к синтезу одной общей молекулы иРНК.

Рассмотрим строение оперона на примере лактозного оперона (*Lac*-оперона) (рис. 79).

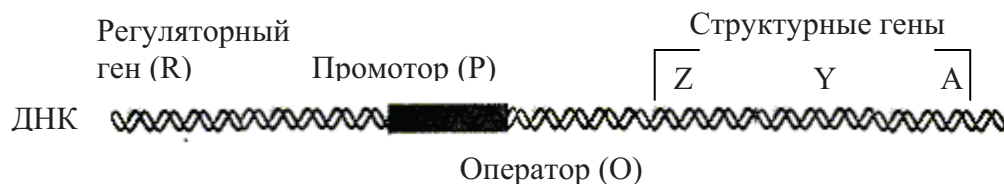


Рис. 79. Схематическое изображение лактозного оперона бактерий *E. coli*

Lac-оперон состоит из кодирующей области, представленной тремя структурными генами, ответственными за синтез ферментов: β -галактозидазы, β -галактозидпермеазы и β -галактозидтрансацилазы; а также из промоторно-операторной области. **Оператор** представляет собой небольшой участок ДНК, граничащий с первым структурным геном. С оператором может связываться белок-репрессор, блокируя инициацию (начало) транскрипции. **Промотор** – это небольшой участок ДНК перед оператором. Он служит местом связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы (транскриптазы) и от него начинается транскрипция ДНК. Оператор и промотор в некоторой степени перекрываются таким образом, что когда репрессор связан с ДНК в области оператора, то РНК-полимераза не может связаться с промотором и транскрипция структурных генов не происходит. Следовательно, промотор, оператор и структурные гены образуют оперон.

Транскрипционная активность входящих в оперон генов регулируется специальным **геном-регулятором**, или **регуляторным геном** (ген R), который может располагаться рядом со структурными генами или на некотором расстоянии от них. Ген R кодирует синтез специфического белка-репрессора. **Репрессор** – аллостерический белок, имеющий два центра связывания: один центр узнает оператор, другой – взаимодействует с эффектором или индуктором. Для *Lac*-оперона индуктором является лактоза, которая связывается с репрессором, переводит его в неактивную форму, в результате чего репрессор отсоединяется от оператора.

Различают опероны индуцибельные и репрессибельные. **Индукцибельные опероны** ответственны за катаболизм лактозы, арабинозы, галактозы и других углеводов. Рассмотрим работу индуцибельного оперона на примере *Lac*-оперона (рис. 80).

В основе индукции синтеза ферментов лактозного оперона лежит механизм негативной, или отрицательной, регуляции. В отсутствие лактозы молекула репрессора, активная в свободном состоянии, связывается с оператором, закрывая при этом промотор, что препятствует связыванию с ним РНК-полимеразы и началу транскрипции структурных генов. При

наличии в среде внешнего индуктора лактоза транспортируется с помощью β -галактозидпермеазы внутрь клетки и с помощью фермента β -галактозидазы превращается в аллолактозу, которая действует как внутренний индуктор. Ферменты β -галактозидпермеаза и β -галактозидаза присутствуют и в неиндуцированных клетках, но в концентрациях, составляющих менее 0,001 от их концентраций после полной индукции. Аллолактоза связывается с репрессором, который при этом претерпевает конформационное изменение, уменьшающее его сродство к ДНК оператора, и в результате репрессор отсоединяется от *lac*-оператора. Начинается транскрипция структурных генов, приводящая к синтезу ферментов катаболизма лактозы. При удалении из клетки индуктора репрессор снова переходит в активное свободное состояние, связывается с оператором, что приводит к прекращению синтеза соответствующих ферментов.

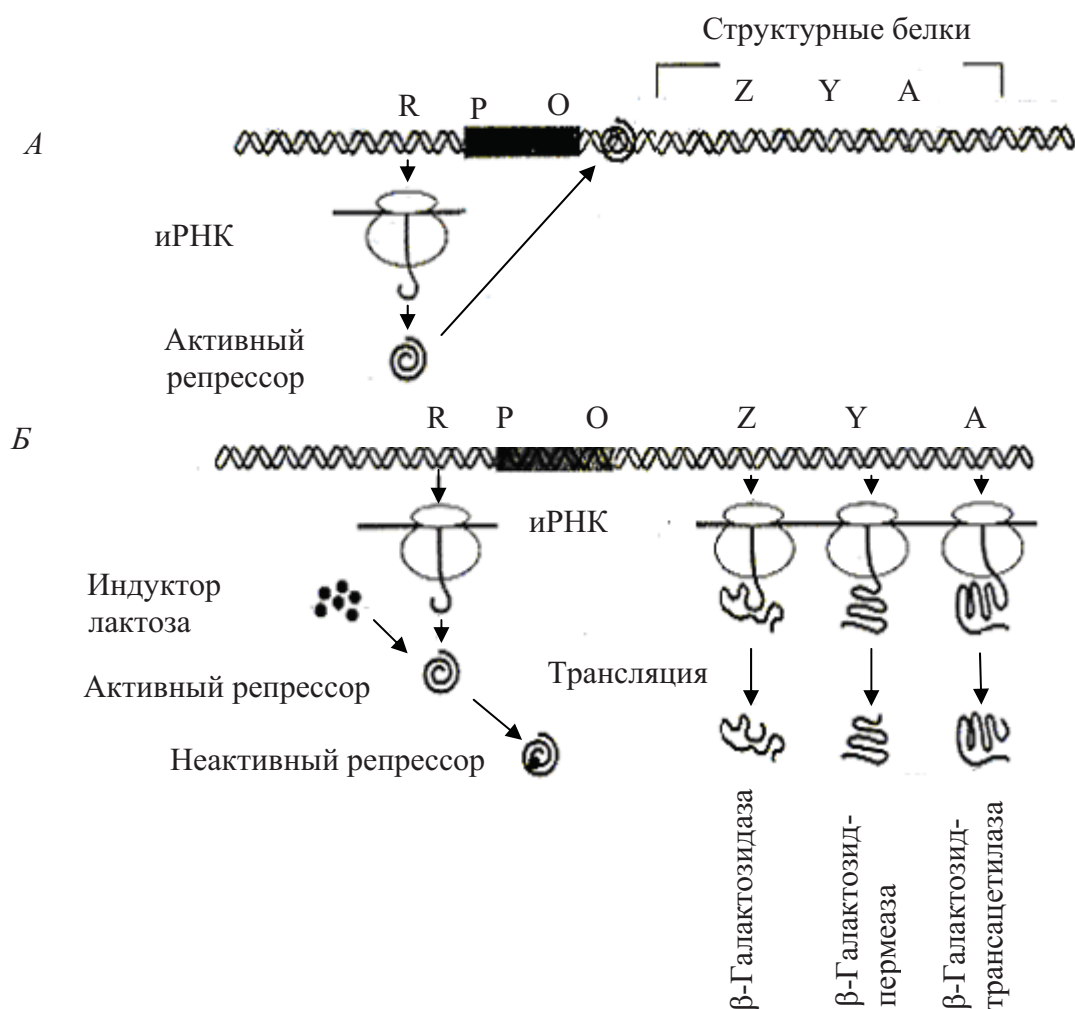


Рис. 80. Работа лактозного оперона бактерий *E. coli*:
А – без лактозы; В – с лактозой

Лактозный оперон подвержен также регуляции другого типа – позитивной, или положительной. Дело в том, что РНК-полимераза может связаться с промотором лишь тогда, когда к нему присоединен регуляторный белок БАК (белок, активирующий катаболизм), или CAP (*catabolite activator protein*). Однако БАК может связаться с промотором только в том случае, если в клетке в достаточно высокой концентрации присутствует циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), т. е. БАК связывается с промотором только в комплексе с цАМФ. Если в клетке цАМФ отсутствует, то БАК не способен взаимодействовать с промотором. Это было установлено с использованием феномена *диауксического роста* (или диауксии) – при наличии в среде глюкозы и лактозы клетки бактерий вначале используют глюкозу, а затем после ее полного израсходования начинают катаболизировать лактозу. Оказалось, что глюкоза репрессирует синтез β -галактозидазы. При наличии в среде глюкозы в клетке резко снижается количество цАМФ. Это явление называют *катаболитной репрессией*. Оно наблюдается и в тех случаях, когда вместо лактозы используется какой-то другой углевод. Катаболитная репрессия глюкозой может быть снята, если в среду добавить цАМФ. Образуется комплекс цАМФ с БАК, и РНК-полимераза присоединяется к промотору, а далее идет синтез ферментов катаболизма лактозы, даже в присутствии глюкозы.

Кроме индуцибельных оперонов, управляющих катаболизмом углеводов, у бактерий имеются и *репрессибельные опероны*. Это опероны, ответственные за синтез аминокислот аргинина, гистидина и триптофана. Максимальная транскрипция структурных генов этих оперонов достигается только при отсутствии в клетке конечных продуктов или эффекторов этих биосинтетических путей. Такие эффекторы, которыми являются конечные продукты, называют *корепрессорами*, а соответствующие регуляторные белки – *апорепрессорами*. Синтез ферментов репрессибельного оперона включается посредством дерепрессии структурных генов.

Разберем строение триптофанового оперона *E. coli* (рис. 81). Он состоит из пяти структурных генов, ответственных за синтез пяти ферментов, участвующих в превращении хоризмовой кислоты в триптофан, а также из промоторно-операторной области. Ген-регулятор (*trpR*) расположен на хромосоме на некотором расстоянии от оперона. Он ответственен за синтез регуляторного белка – апорепрессора, который неактивен в свободном состоянии, не может связываться с оператором и неспособен, таким образом, препятствовать началу транскрипции.

Когда конечный продукт метаболического пути – триптофан – накапливается выше определенного уровня, взаимодействует с апорепрессо-

ром и активирует его. Активированный апорепрессор (апорепрессор + корепрессор) присоединяется к оператору и подавляет транскрипцию структурных генов триптофанового оперона. Синтез триптофана прекращается.

Установлено, что отсутствие активированного репрессора вызывает примерно 70-кратное увеличение актов инициации транскрипции. Но даже в условиях репрессии структурные гены сохраняют низкий уровень экспрессии. Для того чтобы понизить уровень транскрипции в присутствии триптофана в еще большей степени, в клетках бактерий *E. coli* имеется дополнительный механизм регуляции транскрипции, который называется **аттенуацией**, в осуществлении его принимает участие продукт гена *trpL*. В условиях избытка триптофана только одна из десяти молекул РНК-полимеразы, начавшая транскрибирование с промотора, взаимодействует со структурными генами и продолжает транскрипцию. Таким образом, действие аттенуатора проявляется в терминании транскрипции, а сам процесс аттенуации классифицируется как регулируемая терминация транскрипции.

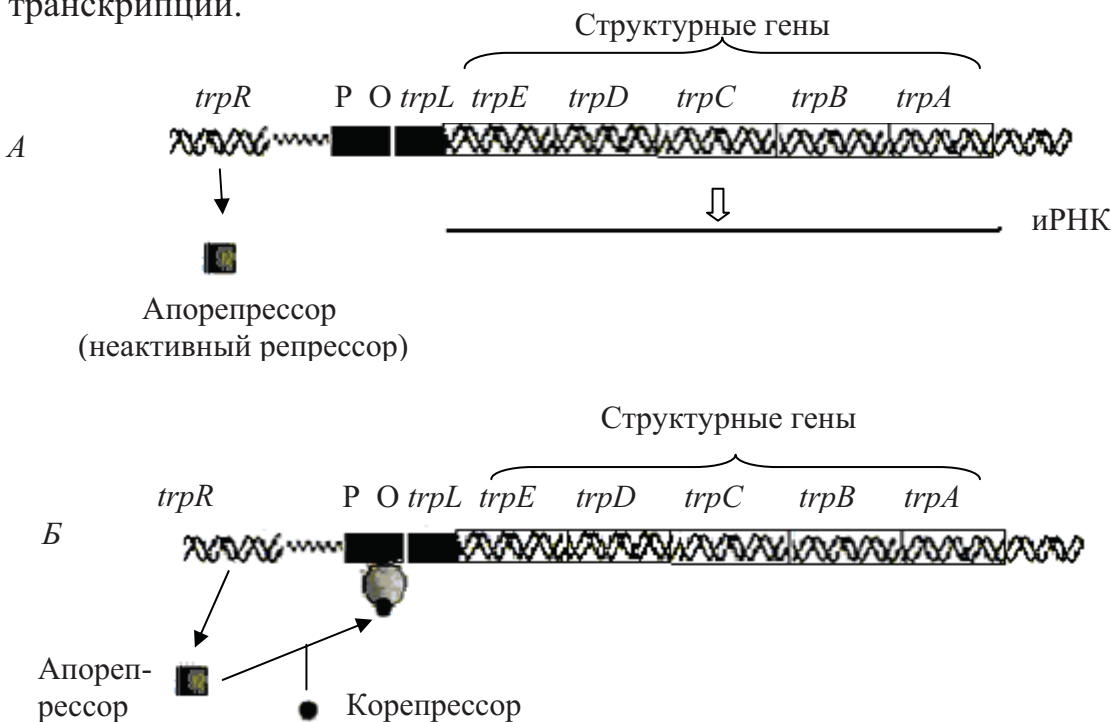


Рис. 81. Работа триптофанового оперона бактерий *E. coli*:
А – нет триптофана; Б – избыток триптофана

Установлено, что в отличие от репрессии, аттенуация зависит не от самой аминокислоты, а от образования триптофанил-тРНК, т. е. активированной аминокислоты, присоединенной к транспортной РНК.

При уменьшении внутриклеточной концентрации триптофана сначала осуществляется дерепрессия. Это значит, что образуется возможность связывания молекул РНК-полимеразы с промотором *Trp*-оперона. При более глубоком голодании снижается уровень триптофанил-тРНК и возникают условия для преодоления аттенуатора.

Таким образом, и в случае индукции путем негативной регуляции (*Lac*-оперон), и в случае репрессии синтеза ферментов (*Trp*-оперон) взаимодействие репрессора с оператором приводит к подавлению транскрипции соответствующих структурных генов. Различие заключается в том, что при индукции путем негативной регуляции эффектор (индуктор), взаимодействуя с репрессором, понижает сродство репрессора к оператору, а в случае репрессии эффектор (корепрессор) повышает это сродство.

Глава 8. ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ДРУГ С ДРУГОМ И С МАКРООРГАНИЗМАМИ

8.1. Взаимоотношения между микроорганизмами

В природных условиях микроорганизмы образуют сложно взаимодействующие между собой популяции, среди которых еще С. Н. Виноградский выделил два типа: автохтонные (местные) и аллохтонные (зимогенные). *Автохтонные* микроорганизмы обычно встречаются в данной экосистеме в значительных количествах, которые относительно постоянны во времени. *Аллохтонные* микроорганизмы – нетипичные представители данной экосистемы. Их численность подвержена значительным колебаниям, зависящим от наличия источников питания, или ограничена действием других лимитирующих факторов. Биоценозы, в состав которых входят только представители микрофлоры, называются *микробоценозами*.

При исследовании микробоценозов существуют специфические методы определения как минимум двух их особенностей, позволяющие проводить количественный анализ и определять видовое разнообразие.

Для количественной оценки прежде всего используются методы прямого подсчета клеток микроорганизмов под микроскопом. Основное достоинство метода – простота выполнения, однако во многих природных материалах (вода, почва) клетки микроорганизмов прикреплены к частицам детрита и плохо различимы при микроскопии. В последнее время для окрашивания используют флуоресцирующие красители, специфически связывающиеся с биополимерами клетки, обычно белками или нуклеиновыми кислотами, и обеспечивающие свечение клеток. Красители другого типа начинают флуоресцировать только в том случае, если претерпевают метаболическую модификацию внутри клетки, т. е. они позволяют выявить только физиологически активные клетки, которые могут быть обнаружены также с помощью радиоизотопных методов, методов стабильных изотопов и т. п.

Численность клеток в микробоценозах можно определить чашечным методом Коха (микробиологическим), позволяющим одновременно по-

лучить чистую культуру бактерий и начать ее фенотипическую характеристику. Однако нельзя не отметить, что данный метод эффективен только при высокой плотности клеток того или иного типа. Следует помнить, что микроорганизмы имеют различные требования к составу среды или физическим условиям выращивания, и для более полного их выявления применяют параллельные высевы на среды различного состава. Клетки жизнеспособных микроорганизмов можно также определить количественно методом предельных разведений. В настоящее время разработано более тысячи питательных сред для выявления бактерий, грибов, водорослей, простейших, как аэробных, так и анаэробных. Однако несмотря на это, микробиологический метод имеет весьма ограниченное применение, так как только около 0,1–1 % клеток микробного сообщества могут формировать колонии даже на средах, максимально соответствующих природным условиям. Кроме того, в микробиологию была введена и получила повсеместную поддержку гипотеза о так называемых **некультивируемых формах бактерий** (НФБ). Предполагается, что многие неспорообразующие бактерии могут переходить в особое состояние, при котором они уже не регистрируются методами посева, но не погибают и могут быть выделены и учтены только после специальных воздействий. В природе они ведут активный образ жизни, патогенные формы сохраняют вирулентность по отношению к животным и человеку.

При изучении особенностей поведения микроорганизмов в природных популяциях существенное значение имеет определение связей между отдельными членами сообщества и взаимодействия сообщества с окружающей средой. Современным подходом для этого являются методы, основанные на достижениях молекулярной биологии, которые в применении к микробоценозам позволили сформировать новое направление – **молекулярную экологию**, изучающую генотипическое разнообразие всех представителей определенного природного сообщества. Принцип молекулярной экологии – изучение биоразнообразия без выделения микроорганизмов, а только на основании анализа отдельных элементов их генетического материала.

Взаимоотношения между микроорганизмами могут быть разделены на симбиотические и конкурентные (антибиоз).

Симбиотические взаимоотношения, возникающие между микроорганизмами, и в которых хотя бы один из них извлекает выгоду, иногда называют кооперацией. Это более редкая форма взаимоотношений, чем конкуренция. При наибольшей степени связей (кооперации) говорят о формировании консорциума – структурированной симбиотической ассо-

циации двух или более видов, предполагающей тесную интеграцию их метаболизма.

В результате симбиотических связей приобретается возможность выигрыша в борьбе за существование у одного или всех его членов. Основой для возникновения симбиозов могут быть трофические, пространственные, защитные или другие типы связей. Границы между различными типами симбиозов часто трудно различимы, а разные формы симбиотических взаимоотношений могут переходить друг в друга.

Типы симбиозов классифицируют по нескольким признакам:

- по обязательности симбиотической связи выделяют факультативный (каждый организм может существовать самостоятельно) и облигатный (один или оба партнера крайне зависимы друг от друга и не могут развиваться отдельно);
- по расположению партнеров различают экзосимбиозы и эндосимбиозы;
- по характеру образующихся взаимоотношений выделяют собственно симбиоз, метабиоз, сателлитизм и синергизм.

Собственно симбиоз – такой тип взаимоотношений между микроорганизмами, когда два или более их вида при совместном развитии создают взаимовыгодные условия для развития друг друга. Примером собственно симбиоза являются взаимоотношения цианобактерий и микроскопических грибов, наблюдающиеся в лишайнике. Оба организма – и цианобактерии, и грибы – способны к самостоятельному существованию, но только в условиях чрезвычайного дефицита питательных веществ и крайних пределах увлажнения или высыхания формирующаяся их ассоциация приводит к взаимному выигрышу. Польза, получаемая грибом от симбиоза в таких условиях, очевидна: он использует продукты метаболизма цианобактерий как источник органических питательных веществ. Кроме того, цианобактерии способны фиксировать атмосферный азот, который используется и грибом. Вклад гриба в ассоциацию состоит в том, что он облегчает поглощение воды и минеральных веществ, а также защищает фотосинтезирующего партнера от высыхания и избыточной интенсивности света.

Метабиоз – тип взаимоотношений, при котором пользу из них извлекает только один партнер, не причиняя вреда другому; чаще всего один организм развивается за счет продуктов жизнедеятельности другого, как бы продолжая начатый им процесс. Например, аммонифицирующие бактерии разлагают органические азотсодержащие соединения с образованием аммиака, который является субстратом для развития нитрификаторов. Последние окисляют аммиак до нитритов и нитратов, выступающих ак-

цепторами электронов при нитратном дыхании денитрифицирующих бактерий. Аналогичные взаимоотношения возникают между группой целлюлозоразрушающих бактерий и азотобактером, который не обладает способностью использовать клетчатку, но прекрасно развивается за счет глюкозы и органических кислот, образующихся при ее разложении целлюлозоразрушающими бактериями. Таким образом, часто метабиотические отношения микроорганизмов лежат в основе круговорота биогенных элементов в природе.

Сателлитизм является разновидностью метабиоза, при которой развитие одного микроорганизма стимулируется другим за счет выделения последним факторов роста (витамины, аминокислоты, азотистые вещества). Так, сарцины, продуцирующие различные витамины и аминокислоты, способствуют росту и размножению уксуснокислых бактерий, которые более требовательны к содержанию и составу субстрата.

При **синергизме** члены ассоциации стимулируют развитие друг друга за счет выделения продуктов жизнедеятельности. Примером синергизма могут служить взаимоотношения между молочнокислыми бактериями и дрожжами в кумысе, хлебном квасе, кислом ржаном тесте. Бактерии образуют молочную кислоту, которая создает кислую среду, благоприятную для развития дрожжей. Кроме того, молочная кислота служит хорошим источником углеродного питания. В свою очередь дрожжи стимулируют развитие молочнокислых бактерий, устраняя избыток молочной кислоты и обогащая субстрат витаминами. Отмирающие клетки дрожжей содержат много белков, являющихся хорошим источником азота для бактерий. Сходные взаимоотношения можно наблюдать в чайном грибе, состоящем из уксуснокислых бактерий и дрожжей: образуемый дрожжами спирт бактерии используют в качестве энергетического субстрата, окисляя его до уксусной кислоты и создавая тем самым благоприятную для дрожжей кислую среду.

Конкурентные взаимоотношения предполагают невозможность сосуществования двух видов микроорганизмов, обусловленную борьбой за источники питания или другие факторы среды. Если организмам необходимы одинаковые ресурсы или другие факторы среды, их конкуренция называется пассивной. В том случае, когда один из микроорганизмов подавляет развитие другого за счет образования продуктов обмена, говорят об активной конкуренции. Среди конкурентных взаимоотношений выделяют антагонизм, хищничество и паразитизм.

Антагонизм как форма конкурентных взаимоотношений может возникать:

- при совместном развитии микроорганизмов разных видов, нуждающихся в одних и тех же питательных веществах. Активно размножающиеся клетки первыми поглощают питательные вещества и занимают пространство. Например, флуоресцирующие псевдомонады за счет синтеза сидерофоров поглощают ионы железа, тем самым ограничивая рост других бактерий;

- образовании микроорганизмами веществ (органические кислоты, спирты и др.), которые изменяют среду, делая ее непригодной для развития других микроорганизмов. Характерным примером являются взаимоотношения между молочнокислыми и гнилостными бактериями в молоке. Парное молоко содержит 94–96 % гнилостных бактерий и только 4–6 % молочнокислых. Однако через 24–26 ч картина изменяется. Молочнокислые бактерии, продуцирующие молочную кислоту, подавляют развитие гнилостной микрофлоры и сводят ее содержание до минимума;

- продуцировании веществ, обладающих бактерицидным или бактериостатическим действием по отношению к другим микроорганизмам (антибиотики, бактериоцины).

Хищничество – форма взаимоотношений, при которых одна группа микроорганизмов использует клетки других в качестве питательного субстрата. Это редко встречающийся тип взаимоотношений у микроорганизмов. Между хищником и жертвой существуют только пищевые, но не пространственные отношения. Примером могут служить миксобактерии, лизирующие с помощью выделяемых ими экзоферментов бактерии других видов. Образующиеся при этом питательные вещества используются ими для жизнедеятельности. Примеры хищничества наиболее часто наблюдаются между протистами и бактериями, например амебы поедают бактерии *E. coli*.

Паразитизм как форма взаимоотношений предполагает существование одного вида (паразита) в клетках другого (хозяина) и использование его как источника питания и среды обитания. Хозяин для паразита является средой обитания первого порядка, именно через хозяина происходит регуляция взаимоотношений паразита с внешней средой. Отсюда следует основное отличие паразитизма от других типов биотических связей: опосредованное влияние на состояние экосистем не за счет трофических, а за счет патогенных их воздействий на популяции хозяина. Примером таких взаимоотношений в мире микроорганизмов могут служить бактериофаги, не способные к активному существованию вне бактерии-хозяина. В 1963 г. Г. Стольп и М. Старр описали бактерий-паразитов *Bdellovibrio bacteriovorus* (впоследствии были описаны и бактерии-паразиты других родов: *Micavibrio*, *Vampirovibrio*). Это очень мелкие грамотрицательные

бактерии с одним полярным жгутиком, покрытым чехлом. Они являются облигатными аэробами и облигатными паразитами, живущими в периплазматическом пространстве других грамотрицательных бактерий (хотя в качестве редких вариантов могут возникать и независимые от хозяина штаммы).

Жизненный цикл бактерий рода *Bdellovibrio* необычен. Он начинается с энергичного столкновения паразита с клеткой хозяина: скорость движения клеток бделловибрионов так велика, что во много раз превышающая по размерам клетка хозяина по инерции проходит после толчка значительное расстояние. Паразит сразу же прикрепляется к клеточной стенке хозяина безжгутиковым концом и начинает вращаться вокруг своей длинной оси со скоростью, превышающей 100 об/с. Вскоре после этого клетка хозяина округляется. В клеточной стенке в месте прикрепления паразита появляется отверстие, и клетка бактерий рода *Bdellovibrio* проникает в периплазматическое пространство. Проникновение происходит за счет того, что клетка паразита синтезирует ферменты протеазы, липазы и лизоцимоподобную мурамидазу. Кроме того, активное вращение клетки бделловибриона вносит вклад в общий процесс проникновения паразита в клетку хозяина в результате эффекта механического сверления. Бделловибрион, потерявший жгутик в процессе проникновения в клетку хозяина, начинает цикл развития в периплазматическом пространстве. Цитоплазматическая мембрана становится пористой и пропускает клеточные компоненты, служащие питательными веществами для паразита. Бделловибрион превращается в нить, длина которой в несколько раз превышает первоначальную клетку. На завершающей стадии эта нить фрагментируется на клетки, имеющие жгутики. Весь процесс размножения занимает около 4 ч. К этому времени клетка хозяина подвергается дальнейшему разрушению, и потомство бделловибриона легко освобождается. На поверхности твердой среды, покрытой газоном клеток-хозяев, клетки бделловибриона дают пятна лизиса, внешне сходные со стерильными пятнами или бляшками, которые образуются при фаговой инфекции. Бделловибрионов можно выявить в самых разных природных материалах. Они найдены в образцах почвы из многих географических частей света, в сточных водах, в пресноводных водоемах и морях. С этими микроорганизмами связывают самоочищение вод.

8.2. Взаимоотношения микроорганизмов с макроорганизмами

Характер взаимоотношений микроорганизмов с различными макроорганизмами определяется посредством формирования соответствующих

биотических связей, причем один многоклеточный организм вступает в связь с несколькими микроорганизмами одновременно.

Тесное сожительство микроорганизмов с растениями и животными в широком смысле называется **симбиозом** (от греч. *symbiosis* – совместная жизнь). При длительном сосуществовании между микро- и макроорганизмом происходит процесс их совместной коэволюции. Это приводит к увеличению генетической пластичности популяции, переносу генов и т. п. На примере энтеробактерий показано, что в симбиотических популяциях их клетки более разнообразны, чем в свободноживущих. Также показано, что хозяин обычно оказывает более сильное влияние на структуру популяций микросимбионта, чем условия внешней среды.

В популяциях микросимбионтов наблюдается одновременное присутствие клеток как симбиотически активных, так и асимбиотических. Такое явление получило название экотипического полиморфизма и связано с наличием или отсутствием «симбиотических генов», которые могут быть компактно локализованы на хромосомах, образуя «островки патогенности», или находиться на специальных плаزمидках.

В ряде случаев симбиоза микробные клетки дифференцированы на две формы: участвующие в образовании симбиоза и ответственные за размножение популяции. Кроме того, в симбиозах у микроорганизмов проявляются свойства и признаки, не нужные для них самих, но повышающие жизнеспособность хозяина. В силу совместной коэволюции облигатные симбионты не способны развиваться вне организма-хозяина. Особенностью симбиозов между микро- и макроорганизмами следует считать также общий поток энергии, совместную регуляцию экспрессии генов и наличие взаимной передачи физиологической, клеточной, организменной информации через различные регуляторные системы.

Если говорить об относительной пользе, извлекаемой партнерами из симбиоза, то можно выделить несколько его видов:

- **мутуализм** или взаимовыгодный симбиоз;
- **паразитизм** – один из партнеров по симбиозу испытывает вредное воздействие другого;
- **комменсализм** – микроорганизмы питаются за счет своего хозяина, не нанося ему особого ущерба.

Между видами симбиоза существуют переходные формы взаимоотношений. Иногда трудно определить, является ли данный тип взаимоотношений мутуалистическим или паразитическим. Степень пользы или вреда, получаемого каждым из партнеров можно оценить, сравнив состояние двух партнеров при независимом существовании с их состоянием при жизни в ассоциации. Кроме того, природа взаимоотношений мо-

жет изменяться при смене условий окружающей среды, так что взаимоотношения, начавшиеся как взаимовыгодные, могут стать паразитическими, и наоборот.

При тесном сожительстве микроорганизмов с макроорганизмами могут складываться также различные пространственные отношения. Если микроорганизм находится вне клеток макроорганизма, то говорят об **экзосимбиозе**, а если внутри клеток и тканей – об **эндосимбиозе**. Макроорганизм обычно называют хозяином.

Рассмотрим примеры взаимовыгодных, или **мутуалистических**, взаимоотношений, относящихся к типу **эндосимбиозов**, при которых клетки микроорганизмов находятся в клетках и тканях макроорганизма.

Одним из них является симбиоз клубеньковых бактерий с бобовыми растениями. Давно известно, что плодородие сельскохозяйственных земель можно поддерживать путем севооборота. Если определенный участок почвы из года в год засевать злаками, такими, как пшеница или ячмень, его продуктивность начинает снижаться. Однако ее можно восстановить, посеяв на данном участке какое-либо бобовое растение, например клевер или люцерну. Известно также, что на корнях бобовых растений образуются особые клубеньковые структуры, или наросты (рис. 82).



Рис. 82. Клубеньки на корнях бобовых растений (симбиоз с *Rhizobium sp.*)

Эти клубеньки напоминают галлы, образующиеся на побегах некоторых растений в результате их повреждения насекомыми. Однако насекомых в

клубеньках бобовых растений не обнаруживается. В середине XVII в. было показано, что бобовые растения могут расти на почве, не содержащей связанного азота. Кроме того, если бобовые растения выращивать на стерильной почве, то они не образуют клубеньков на корнях. Это позволило предположить, что образование клубеньков – результат деятельности бактерий; было высказано предположение, что бобовые растения через клубеньки способны фиксировать атмосферный азот. При микроскопическом изучении содержимого клубеньков обнаружено, что в них имеется большое количество «бактероидов» – мелких палочковидных или разветвленных телец, по своим размерам и форме напоминающих бактерии. Окончательное доказательство того, что в формировании клубеньков бобовых растений принимают участие бактерии, получено в 1888 г. М. Бейеринком, который выделил чистую культуру клубеньковых бактерий и показал, что стерильные семена образуют растения с характерными клубеньками, если их обрабатывать чистыми культурами выделенных бактерий.

Клубеньковые бактерии относятся к роду *Rhizobium*. Их видовое название обычно соответствует латинскому названию того растения, из клубеньков которого выделены бактерии. Например, *Rhizobium trifolii* – растение-хозяин клевер, *Rhizobium phaseoli* – растение-хозяин фасоль, *Rhizobium leguminosarum* – растение-хозяин горох, кормовые бобы, вика, чина и т. д.

Клубеньковые бактерии – это грамотрицательные подвижные палочки. Они относятся к микроаэрофильным микроорганизмам, способным развиваться при низком парциальном давлении кислорода в среде. Оптимальная для роста клубеньковых бактерий температура 24–26 °С. Клубеньковые бактерии хемогетеротрофы, т. е. в качестве источника углерода и энергии используют органические вещества, часто нуждаются в некоторых витаминах – тиамине, пантотеновой кислоте, биотине. Они обычно существуют свободно в почве, их количество зависит от характера почвы и ее предшествующей сельскохозяйственной обработки. При свободном существовании в почве используют связанный азот, т. е. утрачивают способность фиксировать азот атмосферы.

Клубеньковые бактерии обладают выраженной специфичностью в отношении бобовых растений: каждый их вид вызывает образование клубеньков на корнях одного или группы близких видов бобовых. В основе специфичности такого симбиоза лежит способность бобовых растений синтезировать лектины – гликопротеины, обладающие свойством обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без образования ковалентной связи и изменения их струк-

туры. Лектины находятся на наружной поверхности корневых волосков. Видоспецифичные же углеводы входят в состав наружной мембраны клеточной стенки клубеньковых бактерий. Взаимодействие поверхностных лектинов корневого волоска с углеводами мембраны бактерий рода *Rhizobium* определяет процесс дальнейшего инфицирования корневого волоска.

Симбиоз устанавливается при прорастании семян бобовых растений. При их развитии корни выделяют органические питательные вещества, которые стимулируют размножение ризосферных микроорганизмов, в том числе и клубеньковых бактерий. Из почвы клубеньковые бактерии проникают через корневые волоски в корень. Процесс инфицирования начинается с адгезии клеток бактерий на поверхности корневых волосков. В клетках корневых волосков бобовых синтезируются особые вещества – хемоаттрактанты для бактерий. К таким соединениям, в частности, относятся флавоноиды и изофлавоноиды. В процессе распознавания принимают также участие уже упоминаемые лектины, способствующие прикреплению бактерий к корневым волоскам. Флавоноиды и изофлавоноиды индуцируют экспрессию бактериальных *nod*-генов, которые отвечают за синтез Nod-факторов (белков-нODULEинов), обеспечивающих межвидовое взаимодействие.

В корневой волосок проникает сразу несколько клеток клубеньковых бактерий. Проникновение сопровождается инвагинацией мембраны корневого волоска, образуется трубка, выстланная целлюлозой, вырабатываемой клетками хозяина. В этой трубке, называемой инфекционной нитью, находятся интенсивно размножающиеся бактерии. Инфекционная нить проникает в кору корня, проходя прямо через ее клетки, а не между ними. Развитие собственно клубенька начинается, когда инфекционная нить достигает тетраплоидной клетки ткани коры. При этом происходит усиленная пролиферация как самой тетраплоидной клетки, так и соседних диплоидных клеток. Индуцирует пролиферацию индолилуксусная кислота – растительный гормон, который синтезируют клубеньковые бактерии.

В молодых клубеньках большинство бактерий представляет собой палочковидные клетки, однако в дальнейшем они приобретают неправильную форму и становятся разветвленными, булабовидными или сферическими и называются **бактероидами**. На стадии бактериоидов происходит фиксация молекулярного азота. В конце периода роста растения бактерии часто полностью исчезают из клубеньков; они отмирают, а вещества клеток поглощает растение-хозяин.

У клубеньковых бактерий за фиксацию атмосферного азота ответствен *nif*-оперон, который локализован в Sym-плазмидах (от англ. *symbiosis inducing*). В Sym-плазмидах также находятся *hos*-гены, обуславливающие узнавание хозяина, и *nod*-гены, определяющие способность образовывать клубеньки. Гены *nif*-оперона детерминируют синтез **нитрогеназы** – основного фермента, участвующего в фиксации молекулярного азота. Нитрогеназа состоит из двух компонентов: Fe-белка и FeMo-белка. Fe-белок, содержащий $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -центр, служит окислительно-восстановительной системой, которая принимает электроны от ферредоксина и передает их на второй компонент – FeMo-белок. Этот молибденсодержащий белок переносит электроны на N_2 , в результате чего через ряд промежуточных стадий синтезируется аммиак. Часть восстановительных эквивалентов переносится в побочной реакции на H^+ , поэтому наряду с аммиаком всегда образуется большое количество молекулярного водорода. Нитрогеназа очень чувствительна к наличию молекулярного кислорода и инактивируется им, поэтому в клубеньках бобовых растений синтезируется защитное вещество – пигмент **леггемоглобин**, обладающий высоким сродством к кислороду. Образование леггемоглобина – это специфический результат симбиоза: простетическая группа (протогем) синтезируется бактериоидами, а белковый компонент – при участии растения. Благодаря связыванию избытка кислорода леггемоглобином бактериоиды снабжаются им в количестве, достаточном для роста клеток и получения энергии, не препятствуя при этом фиксации азота.

Клубеньки с леггемоглобином имеют розовый цвет и способны фиксировать молекулярный азот. При разрушении леггемоглобина образуются зеленые пигменты биливердины, а клубеньки, содержащие такие пигменты, молекулярный азот не фиксируют.

Значение клубеньковых бактерий в сельском хозяйстве очень велико. За вегетационный период на 1 га поля, засеянного многолетними бобовыми растениями (клевер, люцерна), связывается 150–200 кг атмосферного азота. Часть его выделяется из клубеньков во время вегетации, в основном в виде аминокислот. Остающиеся после уборки урожая корни, особенно у многолетних бобовых, содержат также много азота. Эти остатки подвергаются аммонификации, благодаря чему происходит обогащение почвы доступными для растений соединениями азота.

Для обогащения почвы клубеньковыми бактериями в промышленных масштабах производятся препараты нитрагин, ризоторфин и сапронин, которые используются для предпосевной обработки семян бобовых.

Другим примером эндосимбиотических мутуалистических взаимоотношений является взаимоотношение бактерий рода *Bradyrhizobium* с бо-

бобовыми растениями тропического и в ряде случаев умеренного поясов. Все штаммы брадиризобий обнаруживают сродство к определенному кругу хозяев. Например, вторая по экономической значимости и по занимаемым площадям сельскохозяйственная культура в США – соя – формирует симбиотические отношения с бактериями *Bradyrhizobium japonicum*. На корневых волосках образуются клубеньки, в которых клетки бактерий имеют раздутую форму (бактероиды) и продуцируют фермент нитрогеназу.

Значительно хуже изучены симбиозы между другими азотфиксирующими бактериями и растениями. К симбиотическим азотфиксаторам относятся также актиномицеты, принадлежащие к роду *Frankia*. Хозяевами актиномицетов-симбионтов могут быть более 200 видов двудольных древесных растений, принадлежащих к 8 семействам, среди которых ольха (*Alnus*), облепиха (*Hippophae*), стланник (*Dryas*), казуарина (*Casuarina*) и др. Накопление азота в почве при участии таких растений может достигать 150–300 кг/га в год и имеет поэтому большое хозяйственное значение. На корнях растений в результате симбиоза с актиномицетами рода *Frankia* образуются клубеньки, которые могут достигать в диаметре 5 см. Актиномицеты проникают в корни через корневые волоски. В клубеньках, так же как и у бобовых, образуется леггемоглобин, защищающий нитрогеназу от избыточного количества молекулярного кислорода. Химизм фиксации азота у *Frankia* аналогичен таковому у клубеньковых бактерий, однако он более экономичен с точки зрения потребления АТФ. Следует отметить, что бактерии рода *Frankia* способны к азотфиксации и в свободноживущем состоянии, т. е. без контакта с растением.

Примером взаимовыгодных эндосимбиозов являются взаимоотношения азотфиксирующих бактерий родов *Chromatium* и *Klebsiella* с тропическими растениями *Peretta* и *Psichoteria*. На листьях этих растений в результате симбиоза с бактериями образуются своеобразные клубеньки, в которых осуществляется азотфиксация.

Азотфиксирующие представители встречаются и среди цианобактерий, способных образовывать симбиозы с широким кругом растений, включающим покрытосеменные, голосеменные, папоротники, мхи и даже одноклеточные морские диатомовые водоросли. Наиболее изученными являются эндосимбиозы цианобактерий *Anabaena azollae* с водным папоротником *Azolla*. У папоротника, растущего на поверхности стоячих тропических водоемов, цианобактерии содержатся в полостях листьев. Цианобактерии – многоклеточные организмы, отдельные их клетки при отсутствии связанного азота превращаются в специализированные формы, получившие название *гетероцисты*, в которых и происходит фикс-

сация атмосферного азота. В гетероцистах нитрогеназа защищена от ингибирующего действия молекулярного кислорода за счет образования дополнительных поверхностных оболочек. Папоротник *Azolla* растет на поверхности затопленных рисовых полей и может при надлежащей агротехнике полностью удовлетворять потребность риса в азоте. Накопление азота в почве в результате симбиоза цианобактерий с водным папоротником составляет около 300 кг/га в год.

Одним из примеров **взаимовыгодных экзосимбиозов** является симбиоз микроорганизмов и жвачных животных. Как известно, жвачные животные подобно другим млекопитающим не синтезируют ферменты целлюлазы, однако при использовании растительной пищи, прежде всего, должны быть расщеплены целлюлозосодержащие клеточные стенки растений, которые состоят из гемицеллюлозы, лигноцеллюлозы и т. п. В пищеварительном тракте жвачных животных выделяют не менее четырех последовательно расположенных отделов желудка. Два первых, называемых рубцом, содержат большое количество микроорганизмов (концентрация 10^{10} кл/мл). Микрофлора рубца очень разнообразна и представлена пектолитическими, молочнокислыми, метаногенными, пропионовокислыми, маслянокислыми, целлюлолитическими бактериями, простейшими, микроскопическими грибами. Микроорганизмы в рубце находятся в оптимальных условиях существования: во-первых, они обеспечены питательной средой, которая в изобилии содержит сбраживаемые углеводы и хорошо забуферена слюной; во-вторых, они находятся в условиях постоянной благоприятной температуры – температуры тела животного; в-третьих, в желудке поддерживаются оптимальные условия влажности; в-четвертых, осуществляется постоянное перемешивание субстрата и отток непереваренных остатков корма и метаболитов в нижележащие отделы пищеварительного тракта. Это позволяет расщеплять растительную пищу с высоким содержанием (до 85 % сухой массы) клетчатки примерно за двое суток. Микроорганизмы рубца расщепляют целлюлозу и другие сложные углеводы, присутствующие в поглощенном животным корме, образуя жирные кислоты (сукцинат, лактат, пропионат, бутират) и газы (CO_2 и CH_4). Жирные кислоты всасываются через слизистую оболочку рубца, поступают в кровоток и, циркулируя с кровью, достигают различных тканей тела, где используются в процессе дыхания. От образующихся в рубце газов жвачные животные избавляются путем частого отрыгивания. Бактерии рубца изменяют также растительные жиры, подвергая их гидрированию, в результате чего образуются насыщенные жирные кислоты, которые всасываются в кишечнике, а затем включаются в собственные жиры организма крупного рогатого скота, входя-

щие в состав мяса, молока и масла. Жиры становятся более тугоплавкими и имеют более низкую температуру плавления. Жиры же нежвачных млекопитающих содержат ненасыщенные жирные кислоты с более короткой цепью, поступающие с растительным кормом, и не гидрируются. Микробная популяция рубца быстро растет, и клетки микроорганизмов переходят из рубца вместе с непереваренным растительным материалом в следующие отделы пищеварительного тракта животного. В самом рубце пищеварительные ферменты не образуются, но в других отделах выделяются протеазы, которые разрушают и переваривают микробные клетки, поступающие из рубца. Образующиеся при этом азотистые соединения и витамины используются животным. По этой причине потребности в соединениях азота у жвачных животных реализуются значительно проще, чем у остальных групп млекопитающих. Они могут существовать, используя в качестве источника азота мочевины или аммиак, которые у большинства млекопитающих являются продуктами выделения.

Взаимовыгодные экзосимбиотические взаимоотношения складываются у высших растений с микроорганизмами, находящимися на поверхности листьев, стеблей и плодов, а также корней и в прикорневой зоне.

На поверхности надземной части растений (в филлосфере) всегда находится большое количество бактерий и грибов, получивших название **эпифитных** (от греч. *epi* – вокруг, *phitos* – растение). Видовой состав филлосферы разнообразен, но в количественном отношении обычно преобладают клетки бактерий вида *Pantoea agglomerans* и молочнокислых бактерий. Микробы-эпифиты питаются веществами (углеводами, аминокислотами), выделяемыми растениями. Продукты жизнедеятельности эпифитных микроорганизмов могут поглощаться высшими растениями с каплями росы и влиять на их рост. К микробным метаболитам, положительно влияющим на развитие растения, относятся ауксины, витамины, антибиотики.

На поверхности корней (в ризоплане) и в почве, окружающей корни (в ризосфере), содержится в десятки и сотни раз больше микроорганизмов, чем в остальной почве. В ризосфере и ризоплане сапрофитные микроорганизмы находят благоприятный субстрат, обогащенный органическими веществами за счет отмирающих клеток корневого чехлика, корневых волосков и первичной коры, а также корневых выделений. Среди корневых выделений обнаружены органические кислоты, углеводы, аминокислоты, витамины и другие соединения. В связи со специфичностью метаболизма разных видов растений в ризосферу выделяются различные вещества. В результате этого качественный состав микроорганизмов,

развивающихся на поверхности корней разных растений и в прикорневой зоне, неодинаков.

Микроорганизмы ризосферы и ризопланы оказывают большое влияние на жизнедеятельность растения за счет минерализации органических остатков; выделения кислот, растворяющих труднорастворимые соли; фиксации молекулярного азота. Кроме того, ряд других микробиологических процессов приводит к обогащению почвы доступными для растений питательными веществами. Многие микроорганизмы вырабатывают ауксины, гиббереллины, витамины, сидерофоры и другие физиологически активные вещества, которые поглощаются корнями и благотворно влияют на рост растений.

Примером мутуалистических экзосимбиозов является также формирование и развитие нормальной микрофлоры человека, млекопитающих и других животных.

У млекопитающих и человека кожа, полость рта, дыхательные пути, пищеварительный тракт, мочеполовая система всегда заселены большим количеством разнообразных микроорганизмов, которые приспособились для развития в таких условиях. Они и составляют нормальную микрофлору конкретного органа у определенного вида, состав которой постоянен. Бактерии нормальной флоры не вызывают заболеваний, если не происходит их случайного внедрения в обычно защищенные области тела человека или не наступают нежелательные физиологические изменения в организме хозяина. Например, радикальная перемена питания или вирусная инфекция могут привести к созданию таких условий внутри организма, в которых представитель нормальной бактериальной флоры способен вызывать то или иное заболевание.

Каждый участок тела представляет особую экологическую нишу, в которой формируется характерная микрофлора. Например, на коже поселяются главным образом пропионовокислые бактерии, микрококки, микобактерии, негемолитические стрептококки и стафилококки, дрожжи. Наиболее частыми представителями кожной микрофлоры являются бактерии *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* и грибы рода *Candida*. Микроорганизмы кожи развиваются за счет питательных веществ, содержащихся в поте. Нормальная кожная флора не вызывает нежелательных явлений, если не считать выработки «пахучих» веществ. Она играет решающую роль в защите от патогенных и других посторонних микроорганизмов, оказывая на них антимикробное или конкурентное действие за счет синтеза бактериоцинов, антибиотиков, органических кислот и других соединений. Полезные функции кожной флоры становятся очевидными в тех случаях, когда при наружном применении

антибиотиков или внутреннем перенасыщении ими организма поражаются и кожные бактерии. В этом случае начинается размножение дрожжей и других патогенных грибов, что приводит к возникновению дерматитов.

Нормальными обитателями ротовой полости и горла являются грамположительные кокки, к которым относятся микрококки, пневмококки, стрептококки. Кроме того, здесь обнаруживается большое количество грамотрицательных и грамположительных палочек, главным образом лактобацилл, спирохет, актиномицетов, пропионовокислых бактерий. Дрожжи также являются постоянными обитателями этого участка желудочно-кишечного тракта. Все эти организмы, как правило, безвредны, но при повреждении слизистых оболочек многие из них могут внедриться в ткани тела и вызвать то или иное заболевание.

В желудке здорового человека и многих млекопитающих развивается специфическая микрофлора, что обусловлено действием желудочного сока. Нормальную микрофлору желудка составляют дрожжи, сарцины, лактобактерии, стафилококки, стрептококки, кампилобактерии и другие (всего до 30 видов), но не гнилостные бактерии. Изменение состава микрофлоры, в частности появление гнилостных бактерий, а также бактерий вида *Helicobacter pylori* (возбудители гастрита, язвы и рака желудка) – признак нарушения нормальной функции желудка. В двенадцатиперстной кишке и верхних отделах тонкого кишечника на микроорганизмы губительно действуют желчь и пищеварительные ферменты. Нижние отделы тонкого кишечника и толстый кишечник населены чрезвычайно обильной и постоянной микрофлорой. Содержание микроорганизмов может достигать 10^{12} /г фекальных масс. Природа этой микрофлоры изменяется в зависимости от питания и возраста человека. Например, у грудных младенцев при естественном вскармливании в кишечной микрофлоре всегда преобладают гетероферментативные молочнокислые бактерии *Bifidobacterium bifidum*. Это связано с потребностью данных бактерий в углеводах, содержащих N-ацетилглюкозамин, которые имеются только в женском, но не в коровьем молоке. У новорожденных, находящихся на искусственном вскармливании, доминируют бактерии *Lactobacillus acidophilus*.

В толстом кишечнике взрослых людей обнаружено более 260 видов микроорганизмов. Микрофлору толстого кишечника можно разделить на четыре группы.

1. Основную массу микрофлоры составляют грамположительные бактерии рода *Bifidobacterium* и грамотрицательные бактерии семейства

Bacteroidaceae. На долю бифидобактерий и бактероидов приходится до 96–99 % всей микрофлоры толстого кишечника.

2. Факультативные анаэробы, представленные главным образом кишечной палочкой, грамположительными энтерококками и молочнокислыми бактериями рода *Lactobacillus*, на долю которых приходится до 1–4 % всей микрофлоры толстого кишечника.

3. Микроорганизмы родов *Staphylococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Candida* составляют 0,001–0,01 % всех микроорганизмов толстого кишечника.

4. Другие представители семейства *Enterobacteriaceae*, которые могут временно или постоянно обнаруживаться в кишечнике и вызывать кишечные инфекции (*Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* и др.).

Соотношение микроорганизмов разных типов в основном зависит от режима питания. Серьезные изменения в кишечной микрофлоре может вызвать непродуманное применение в лечебных целях антибиотиков и сульфаниламидов, что приводит к нарушению качественного и количественного состава кишечной флоры. При этом развитие дрожжеподобных грибов активизируется, а бактерий – подавляется. Явление, когда происходит качественное и количественное нарушение состава микрофлоры в организме, получило название **дисбактериоза**.

В крови и лимфе здоровых людей и животных микроорганизмы, как правило, не обнаруживаются, но если они имеются, то этот факт рассматривают как показатель болезненного состояния.

В средних и нижних дыхательных путях (трахеи и бронхи) также не должно быть микроорганизмов, от их попадания у живых организмов имеется ряд приспособлений и механизмов. Во-первых, большинство бактерий задерживается на слизистой оболочке носоглотки и не может свободно продвигаться к легким, так как клетки реснитчатого эпителия, выстилающие трахею, постоянно вырабатывают слизь, откуда она поступает вверх. Во-вторых, легкие – место активного фагоцитоза – механизма, посредством которого инородные частицы захватываются и разрушаются особыми клетками-фагоцитами.

Микробный ценоз органов мочеполовой системы несравненно более скуден. Верхние отделы мочевыводящих путей у здорового человека обычно стерильны; в нижних отделах доминируют *Staphylococcus epidermidis*, негемолитические стрептококки, дифтероиды; также достаточно часто выделяют грибы родов *Candida*, *Torulopsis* и *Geotrichum*. В наружных отделах доминирует *Mycobacterium smegmatis*.

Роль нормальной микрофлоры в организме сводится к следующему.

1. Выполняет важную роль в защите организма от патогенов за счет различных механизмов: синтеза антибиотиков, бактериоцинов, органических кислот, спиртов, лизоцима и т. д.

2. Активирует иммунную систему: в отсутствие нормального микробного биоценоза наблюдаются многочисленные ее дисфункции, что было показано на экспериментально выращенных в специальных камерах безмикробных животных, названных *гнотобионтами*. Развитие безмикробного животного сопровождается отклонениями от нормы, значительным увеличением слепой кишки, слабым развитием лимфатической системы. Существенной особенностью таких животных является повышенная чувствительность к микроорганизмам: заражение их совершенно безвредными для обычных животных микроорганизмами нередко приводит к смертельному исходу.

3. Обеспечивает макроорганизм ионами Fe^{2+} , Ca^{2+} и витаминами. Считают, что кишечная микрофлора обеспечивает потребности человека и животных в витаминах (B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , К, никотиновой, пантотеновой, фолиевой кислоте и др.) и незаменимых аминокислотах.

4. Участвует в инаktivации токсичных продуктов, проникающих извне и/или образующихся эндогенно. Кислоты и газы, выделяющиеся в ходе жизнедеятельности микрофлоры желудочно-кишечного тракта, благоприятно влияют на перистальтику кишечника.

5. Участвует в процессах пищеварения, в том числе в обмене холестерина и желчных кислот.

Однако в определенных условиях отдельные представители нормальной микрофлоры могут стать возбудителями некоторых заболеваний. К примеру, кишечная палочка может вызвать перитонит, аппендицит, заболевания желчного пузыря и другие; обитающие на коже стрептококки нередко вызывают фурункулез. Это происходит в тех случаях, когда повреждены органы и ткани, снижен иммунитет человека или животного. Представители нормальной микрофлоры, которые при определенных условиях могут вызвать заболевания макроорганизма, относятся к *оппортунистической микрофлоре*, а заболевания, вызываемые ими, называются *эндогенными инфекциями*.

На основании вышеизложенного можно заключить, что нормальная микрофлора млекопитающих представляет собой один из примеров симбиотических взаимоотношений, которые имеют ряд переходных форм от мутуализма к паразитизму и наоборот.

Паразитизм широко распространен в мире микроорганизмов и заключается в том, что микроорганизмы не только живут за счет хозяина (растения или животного), используя его как источник питания и среду

обитания, но и причиняют ему вред, вызывая те или иные заболевания, т. е. паразитизм сопровождается развитием патологических процессов. Микроорганизмы, вызывающие заболевания, называются **патогенными**. Все паразитические микроорганизмы характеризуются определенной степенью специфичности по отношению к хозяину. Например, брюшным тифом болеют только люди; пневмококки паразитируют на мышах и на людях, но патогенез заболевания различается в зависимости от организма.

Большинство патогенов – паразиты, но встречаются и патогенные сапрофиты, не способные проникать в живые ткани и размножающиеся в отмерших тканях. Примером таких бактерий являются возбудители столбняка (*Clostridium tetani*) и ботулизма (*Clostridium botulinum*). Для развития заболевания достаточно, чтобы в организм попал только яд, синтезируемый ими.

Способность микроорганизма вызывать заболевание называется **патогенностью**. Патогенность – важное в таксономическом отношении свойство, поскольку оно является видовым признаком и качественной характеристикой болезнетворного микроорганизма. Однако отдельные штаммы внутри вида бактерий могут сильно различаться по степени патогенности. Степень патогенности называется **вирулентностью**, т. е. вирулентность является количественным проявлением патогенности. В соответствии с этим вирулентность – признак штамма, а не вида; можно говорить о высоковирулентном, низковирулентном и даже авирулентном штамме патогенных бактерий. За единицу измерения вирулентности приняты минимальная летальная доза (МЛД) и LD₅₀.

Минимальная летальная доза – наименьшее число патогенных микроорганизмов, способное вызвать гибель подопытного лабораторного животного. **LD₅₀** – количество патогенных микроорганизмов, способное вызывать гибель 50 % экспериментально зараженных подопытных животных.

Вирулентность определенного штамма патогенного микроорганизма определяется рядом факторов, из которых наибольшее значение имеют **инвазивность** – способность проникать и распространяться в организме хозяина, **агрессивность** – способность выживать в организме, размножаться и поражать и **токсигенность** – способность синтезировать токсины – высокоспецифические ядовитые вещества, повреждающие, убивающие клетки или нарушающие клеточные процессы макроорганизма в малых дозах.

Вклад инвазивности микроорганизма в его повреждающее действие на макроорганизм может быть самым разнообразным. Для некоторых

микроорганизмов он незначителен, так как они настолько токсичны, что даже местная инфекция приводит к образованию и диффузии в организме хозяина такого количества токсина, которое оказывается смертельным. Классический пример заболевания данного типа – дифтерия. Возбудитель *Corynebacterium diphtheriae* размножается в тканях глотки и образует диффундирующий токсин, который поражает практически все ткани организма. Другие микроорганизмы оказывают свое повреждающее действие лишь при интенсивном размножении во многих тканях. К таким заболеваниям относится сибирская язва. Возбудитель этого заболевания *Bacillus anthracis* обнаруживается в крови больных в огромном количестве.

Инвазивность обеспечивается адгезией и продукцией веществ, способствующих проникновению микробов в макроорганизм. Под адгезией понимают способность микроорганизма адсорбироваться (или прилипать) на чувствительных клетках. Большинство инфекций начинается на слизистых оболочках дыхательной, пищеварительной или мочеполовой системы. Взаимодействие патогенов и слизистой оболочки высокоспецифично, т. е. микроорганизм не адгезируется на всех эпителиальных клетках в равной степени. Существуют комплементарные молекулы на поверхности клеток возбудителя и хозяина. Роль рецепторов у бактерий играют ворсинки и жгутики, тейхоевые кислоты (у грамположительных бактерий), липопотеины и липополисахариды (у грамотрицательных бактерий). Клетки макроорганизма также обладают довольно сложным рецепторным аппаратом. Например, в кишечнике энтеробактерии «прилипают» к гликопротеиновому покрову ворсинок клеток энтероцитов – гликокаликсу. При этом энтеропатогенные кишечные палочки, вызывающие колиэнтериты у детей, а также холерные вибрионы, взаимодействуя с микроворсинками энтероцитов, колонизируют их, размножаясь на поверхности данных образований. Шигеллы и дизентериеподобные кишечные палочки, некоторые сальмонеллы в процессе адгезии изменяют микроворсинки энтероцитов и проникают в клетку, где происходит их размножение.

Патогенные микроорганизмы проникают в организм с помощью ферментов гидролаз, повышающих проницаемость тканей. Хорошо изучены следующие ферменты инвазивности:

- 1) **гиалуронидаза** – расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав соединительной ткани и обеспечивающую ее прочность и непроницаемость для микробов. Обнаружена у многих патогенных микроорганизмов: у палочек газовой гангрены, стафилококков, стрептококков, у возбудителей дифтерии, бруцеллеза и др.

2) **коллагеназа** – разрушает тканевый белок коллаген и вызывает распад мышц; обнаружена у возбудителей газовой гангрены и др.;

3) **фибринолизин** – растворяет сгустки фибрина, которые образуются в крови в процессе воспалительных реакций и препятствуют распространению микроорганизмов. Продуцируется стрептококками (стрептокиназа), стафилококками и другими микроорганизмами (стрептокиназу используют для лечения тромбозов);

4) **нейраминидаза** – разрывает кетосвязь между нейраминовой (сиаловой) кислотой и другими моносахаридами, входящими в состав гликопротеинов, гликолипидов, полисахаридов. Обнаружена у бактерий, размножающихся на поверхности эпителия, например у холерного вибриона.

Вирулентность микроорганизмов определяется также **агрессивностью** штамма, что зависит от синтеза ферментов:

- **коагулазы**, свертывающей плазму крови;
- **уреазы**, гидролизующей мочевины с образованием аммиака;
- **ДНКазы**, вызывающей деполимеризацию ДНК;
- **декарбоксилазы** аминокислот.

Агрессивные свойства обеспечиваются также химическими веществами, входящими в состав капсул. Капсулы предохраняют микроорганизмы от взаимодействия с антителами и подавляют фагоцитарную реакцию как в микробном очаге, так и далеко за его пределами. Капсульные микроорганизмы дольше сохраняются в организме, чем бескапсульные, и вызывают более тяжелые заболевания.

Патогенные стрептококки и стафилококки способны продуцировать особые агрессивные – **лейкоцидины**. С помощью лейкоцидинов они разрушают лейкоциты, в которых осуществляется фагоцитоз. Масса разрушенных лейкоцитов образует гной, вследствие чего эти бактерии получили название **гноеродных**.

Однако самым важным фактором вирулентности является способность микробов синтезировать ядовитые продукты метаболизма – токсины. Попадая в ток крови, они разносятся по организму и оказывают на него повреждающее, вплоть до летального, действие. Бактериальные токсины делят на две группы – экзотоксины и эндотоксины. Экзотоксины продуцируются клеткой и выделяются в окружающую среду. Эндотоксины, напротив, прочно связаны с клеткой и обнаруживаются только после ее разрушения.

Экзотоксины называют истинными токсинами. Они впервые были обнаружены в 1890 г. у двух патогенных для человека микроорганизмов: *Corynebacterium diphtheriae* – возбудителя дифтерии (дифтерийная па-

лочка) и *Clostridium tetani* – возбудителя столбняка (столбнячная палочка). Для доказательства продукции экзотоксинов в обоих случаях были поставлены одинаковые эксперименты: бактерии выращивали в питательной среде *in vitro* и бесклеточный фильтрат, приготовленный из выросшей культуры, вводили опытным животным. Животные погибали, а при их вскрытии обнаруживали поражения, характерные для соответствующей естественной инфекции. Токсичные вещества оказались чувствительными к нагреванию и, как выяснилось позже, являлись белками. Поскольку они присутствуют в среде и не связаны с бактериальными клетками, их называли экзотоксинами.

Впоследствии с помощью сходных методов было показано, что экзотоксины, оказывающие специфическое действие на организм, образуются и другими патогенными бактериями. Была также установлена их роль в возникновении соответствующих болезней. Однако у многих патогенных бактерий образования экзотоксинов не обнаружено.

По химической природе экзотоксины принадлежат к белкам. Они термолабильны и разрушаются при температуре 60–80 °С в течение 10–60 мин. Легко разрушаются под влиянием пищеварительных ферментов. При обработке формалином (0,3–0,4 %) при температуре 38–40 °С экзотоксины обезвреживаются, но сохраняют при этом антигенность. Такие лишенные активности экзотоксины называются **анатоксинами**. Они используются как вакцины для профилактики столбняка, дифтерии и других инфекционных заболеваний, возбудители которых выделяют экзотоксины. При парентеральном введении анатоксинов в организме вырабатываются **антитоксины** (антитела), специфически нейтрализующие соответствующие яды (экзотоксины).

Гены, определяющие синтез бактериальных экзотоксинов, во многих случаях локализованы на плазмидах или в составе профагов, а не в бактериальной хромосоме. В настоящее время установлено, что дифтерийный и столбнячный токсины, а также токсин ботулизма детерминируются генами профагов. Патогенные бактерии продуцируют их лишь в том случае, когда в хромосоме находится профаг. Синтез некоторых токсинов, продуцируемых штаммами *Escherichia coli* и других энтеробактерий, детерминируется плазмидными генами (Ent-плазмиды). Во всех этих случаях утрата профага или плазмиды делает клетку нетоксигенной.

Экзотоксины высокотоксичны, их действие направлено на разрушение определенных субклеточных структур или на нарушение определенных клеточных процессов. Механизм действия многих экзотоксинов до сих пор полностью не расшифрован, хотя для некоторых из них установлена и мишень, и характер действия. Например, α -токсин одного из воз-

будителей газовой гангрены (*Clostridium perfringens*) является гидролитическим ферментом лецитиназой. Лецитин – важный липидный компонент клеточных и митохондриальных мембран, его гидролиз под действием α -токсина приводит к разрушению мембран самых разнообразных клеток, что может быть первичной причиной разрушения тканей при газовой гангрене.

Дифтерийный токсин, синтезируемый *Corynebacterium diphtheriae*, образует комплекс с НАД⁺, который взаимодействует с одним из факторов трансляции белка (трансферазой II) в рибосомах, в результате чего происходит нарушение синтеза белка и клетка хозяина погибает.

Столбнячный и ботулинический токсины относятся к нейротоксинам, которые поражают нервную систему и вызывают паралич мышц. При ботулизме токсин поражает периферическую нервную систему, при столбняке – центральную нервную систему. В норме мышцы сокращаются и расслабляются попеременно. Столбнячный токсин блокирует импульс расслабления, в результате чего сокращаются сразу все мышцы, ботулинический действует за счет общего расслабления мышц. В обоих случаях наступает смерть от паралича дыхания.

Холерный токсин проникает в кровь, активирует мембранную аденилатциклазу, что вызывает резкое увеличение концентрации цАМФ в клетке; это в свою очередь приводит к тому, что ионы Na⁺ не проникают в кровь. В кишечнике создаются гипертонические условия и вода поступает из тканей в кишечник. Потеря тканевой жидкости приводит к ацидозу и шоку. Если своевременно не восполнить потерю жидкости и ионов Na⁺, циркулирующих в организме, может наступить смерть.

Токсин палочки чумы ингибирует респираторную активность митохондрий, что приводит к гибели клетки.

Эндотоксинами являются комплексы липополисахаридов с белками (липополисахаридпротеиновый комплекс), находящиеся в наружных слоях клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Они вырабатываются возбудителями брюшного тифа, паратифов, дизентерии и рядом других энтеробактерий (в том числе патогенными штаммами кишечной палочки).

Эндотоксины термостабильны, выдерживают кипячение и автоклавирование при температуре 120 °С в течение 30 мин, под действием формалина и температуры обезвреживаются частично, т. е. анатоксины из них не образуются. Действие эндотоксинов неспецифично и при введении в организм они всегда вызывают резкое повышение температуры. В липополисахаридпротеиновом комплексе за токсигенность и пирогенность (повышение температуры) отвечает липополисахаридная часть молеку-

лы, а белковый фрагмент только за антигенные свойства. Эндотоксины – менее токсичны, чем экзотоксины.

Иногда эндотоксины вызывают воспалительные реакции, которые проявляются в увеличении проницаемости капилляров и разрушении клеток. При попадании значительного количества эндотоксинов в кровоток возможен эндотоксиновый шок, обычно заканчивающийся смертью больного. Бактериальные эндотоксины проявляют сравнительно слабое иммуногенное действие, и иммунные сыворотки не способны полностью блокировать их токсические эффекты.

Следует отметить, что имеются микроорганизмы, которые образуют экзо- и эндотоксины (холерный вибрион, гемолитические штаммы кишечной палочки и др.).

Болезни растений, вызываемые бактериями, называются **бактериозами**. Пути проникновения фитопатогенных бактерий в растение различны. В основном они проникают через раневую поверхность, устьица, чечевички, либо с помощью переносчиков. Выделяют несколько основных типов бактериозов:

- **увядания** – поражение проводящей и корневой систем. Возбудитель локализуется и развивается в проводящих сосудах, вызывая механическую закупорку. Увядание томатов, или «бактериальный рак», вызывают бактерии *Clavibacter michiganensis*;

- **гнили** – размягчение и разрушение тканей растений. «Мокрые», или «мягкие», гнили вызывают, например, фитопатогенные бактерии *Erwinia carotovora*;

- **пятнистости**, или **некрозы**, – отмирание листовой пластинки в местах поражения бактериями. Некрозы плодовых деревьев вызывают бактерии *Pseudomonas syringae*;

- **гипертрофии** – усиленное деление клеток и неправильное разрастание тканей, при которых возникают опухоли у растений. К их возбудителям в первую очередь следует отнести *Agrobacterium tumefaciens*, вирулентные штаммы которых содержат в клетках Ti-плазмиды.

Основными факторами вирулентности фитопатогенных бактерий являются:

- 1) продукция **пектолитических ферментов** (пектиназ, протопектиназ, полигалактуроназ), разрушающих пектиновые вещества, из которых состоит межклеточное пространство растительной ткани. Это приводит к мацерации, или распаду, растительной ткани и образованию «мокрой» гнили;

- 2) выделение **целлюлолитических ферментов** (целлюлаз, гемицеллюлаз), разрушающих клеточные стенки растений;

3) образование **токсинов**, воздействующих на восприимчивые растения, и нарушающих соответствующие ферментативные системы, обмен веществ и вызывающих отмирание либо увядание пораженных тканей или органов. Токсины фитопатогенных бактерий – вещества различной химической природы. Токсин, синтезируемый бактериями *Pseudomonas syringae*, является низкомолекулярным пептидом, ингибирующим синтез глутаминсинтетазы, которая необходима для образования хлорофилла. В результате на листьях появляются пятнистости. В качестве токсинов могут выступать полисахариды и гликопептиды слизистых слоев бактерий;

4) синтез **фитогормонов**, стимулирующих разрастание тканей растения с образованием опухолей, например, гетероауксин индолилуксусная кислота, синтезируемая бактериями *Agrobacterium tumefaciens*. Опухоли могут вызывать сжатие проводящих сосудов с последующей гибелью растения. К фитогормонам относится также гиббереллин, который синтезируется бактериями и вызывает ненормальное удлинение побегов.

Растения имеют определенные механизмы, противодействующие заражению и размножению в них фитопатогенов. Основным из них является наличие плотного поверхностного барьера у растений. Кутикула, покрывающая эпидермис всех наземных стеблей и листьев травянистых растений, обеспечивает практически полную защиту от фитопатогенных бактерий. Поэтому чаще всего проникновение фитопатогенов происходит через пораженные участки. Защитным механизмом растений является и выделение клеточного сока, имеющего кислую реакцию. Растения также продуцируют вещества, подавляющие или тормозящие рост фитопатогенов. Наиболее активными из них являются фенолы. В тканях растений фенолы встречаются в виде эфиров и гликозидов. Это пирокатехин, гидрохинон, пирогаллол, фенольные спирты, альдегиды и кислоты.

Важное значение в устойчивости растений к поражению бактериями имеют и **фитонциды** – вещества различной химической природы, летучие или растворенные в цитоплазме клеток растения, обладающие широким антибиотическим действием.

В развитии устойчивости растений к заболеваниям большое значение имеют **фитоалексины**, которые образуются в растении только в процессе заболевания, т. е. при внедрении или контакте микроорганизма с клетками растения. Примером фитоалексина является **пишиитин**, синтезирующийся в клубнях картофеля, сдерживающий распространение «мокрой» гнили и уменьшающий поражение.

Фитопатогенные микроорганизмы причиняют большой ущерб сельскому хозяйству, вызывая снижение урожая и ухудшение его качества. Среди заболеваний растений почти половину составляют бактериозы. В

настоящее время известно свыше 200 экономически важных болезней растений, которые вызываются бактериальными возбудителями. Для борьбы с болезнями растений проводятся следующие мероприятия:

- выведение новых устойчивых сортов;
- чередование сельскохозяйственных культур в расчете на то, что специализированные паразиты при длительном нахождении в почве без растения-хозяина гибнут;
- карантинные мероприятия – контроль за качеством семян, особенно импортных;
- применение ядохимикатов для уничтожения болезнетворных микроорганизмов;
- использование микробов-антагонистов или препаратов антибиотиков;
- повышение устойчивости растений путем применения микроэлементов;
- удаление из растения пораженных мест; выкорчевка больных деревьев и т. д.;
- применение здорового посадочного материала (клубни, корневища и т. д.);
- борьба с переносчиками бактерий. Если насекомые являются переносчиками бактерий или облегчают их проникновение в растения (например, листовые тли), борьба с ними может существенно сдержать распространение болезни.

Глава 9. ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ГРУПП БАКТЕРИЙ

Материал, изложенный в этой главе, сгруппирован и рассмотрен таким образом, что в одних случаях характеризует отдельные таксономические группы бактерий, а в других – определенные физиологические их группы. Это обусловлено тем, что среди бактерий нельзя выделить наиболее важные или наиболее полезные виды. Все известные, а тем более еще не изолированные штаммы представляют существенный научный и практический интерес, выполняют свои функции и занимают свою экологическую нишу.

9.1. Фототрофные бактерии

Физиологическая группа фотосинтезирующих прокариотических организмов представлена пурпурными и зелеными бактериями, большой группой цианобактерий и недавно обнаруженными организмами – гелиобактериями и прохлорофитами. На основании использования энергии света в эту группу могут быть включены и галобактерии. Преобразование световой энергии в энергию химических связей может осуществляться при фотосинтезе трех типов:

- с помощью бактериохлорофиллов без выделения молекулярного кислорода (бескислородный, или аноксигенный, фотосинтез). Этот тип фотосинтеза осуществляют пурпурные и зеленые бактерии, гелиобактерии;
- зависимо от наличия хлорофилла, сопровождающегося выделением молекулярного кислорода (кислородный, или оксигенный, фотосинтез). Кислородный фотосинтез, связанный со способностью использовать в качестве донора электронов молекулы воды, присущ большой группе цианобактерий и прохлорофитам;
- с помощью белка бактериородопсина, ковалентно связанного с каротиноидом ретиналем (бесхлорофилльный фотосинтез). Этот процесс

не сопровождается выделением молекулярного кислорода. Он характерен для галобактерий, которые относятся к архебактериям.

Способность организмов существовать за счет энергии света в первую очередь связана с наличием у них специфических пигментов.

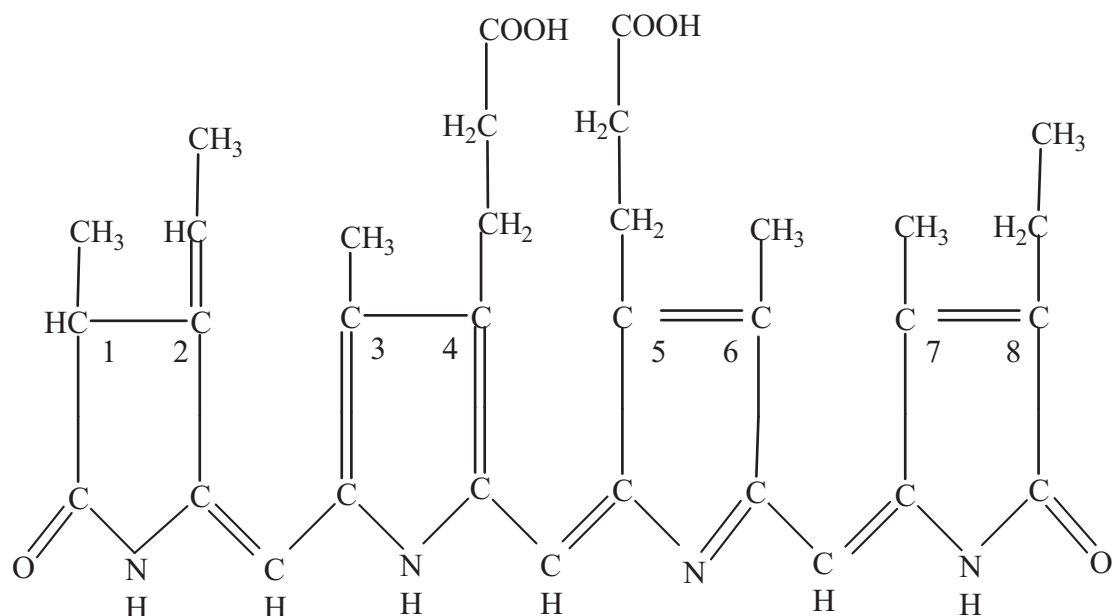
Набор пигментов специфичен и постоянен для определенных групп фотосинтезирующих прокариот. Соотношения же между отдельными типами пигментов колеблются в зависимости от вида и условий культивирования. В целом фотосинтетические пигменты прокариот обеспечивают поглощение света с длиной волны 300–1100 нм. Все фотосинтетические пигменты относятся к двум химическим классам соединений: 1) пигменты, в основе которых лежит тетрапиррольная структура (хлорофиллы, фикобилипротеины); 2) пигменты, основу которых составляют полиизопреноидные цепи (каротиноиды).

У фотосинтезирующих прокариот известно более десяти видов хлорофиллов. Хлорофиллы прокариот, осуществляющих бескислородный фотосинтез (пурпурные и зеленые бактерии, гелиобактерии), получили общее название **бактериохлорофиллов**. В настоящее время идентифицировано шесть основных видов бактериохлорофиллов: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* и *g*. Клетки пурпурных бактерий в зависимости от вида содержат только одну форму бактериохлорофилла – либо *a*, либо *b*. Клетки зеленых бактерий всегда содержат два типа бактериохлорофилла – основной и минорный. В зависимости от вида бактерий основным может быть бактериохлорофилл *c*, *d* или *e*. Роль основного бактериохлорофилла заключается в поглощении света. Минорным пигментом у всех зеленых бактерий является бактериохлорофилл *a*; он и входит в состав фотохимических реакционных центров. Необычный бактериохлорофилл *g* с максимумом поглощения 790 нм обнаружен у облигатных анаэробных фотосинтезирующих бактерий *Heliobacterium chlorum* и *Heliobacillus mobilis*, выделенных в группу гелиобактерий.

Прокариоты, фотосинтез которых сопровождается выделением молекулярного кислорода (цианобактерии и прохлорофиты), содержат хлорофиллы, характерные для фотосинтезирующих эукариотических организмов. У цианобактерий – это хлорофилл *a*; в клетках прохлорофит – хлорофиллы *a* и *b*.

К фотосинтетическим пигментам относятся и фикобилипротеины – красные и синие пигменты, содержащиеся только у одной группы прокариот – цианобактерий. Хромофорная группа пигмента называется фикобилином. Различают два типа хромофорных групп: фикоцианобилин и фикоэритробилин (рис. 83)

А



Б

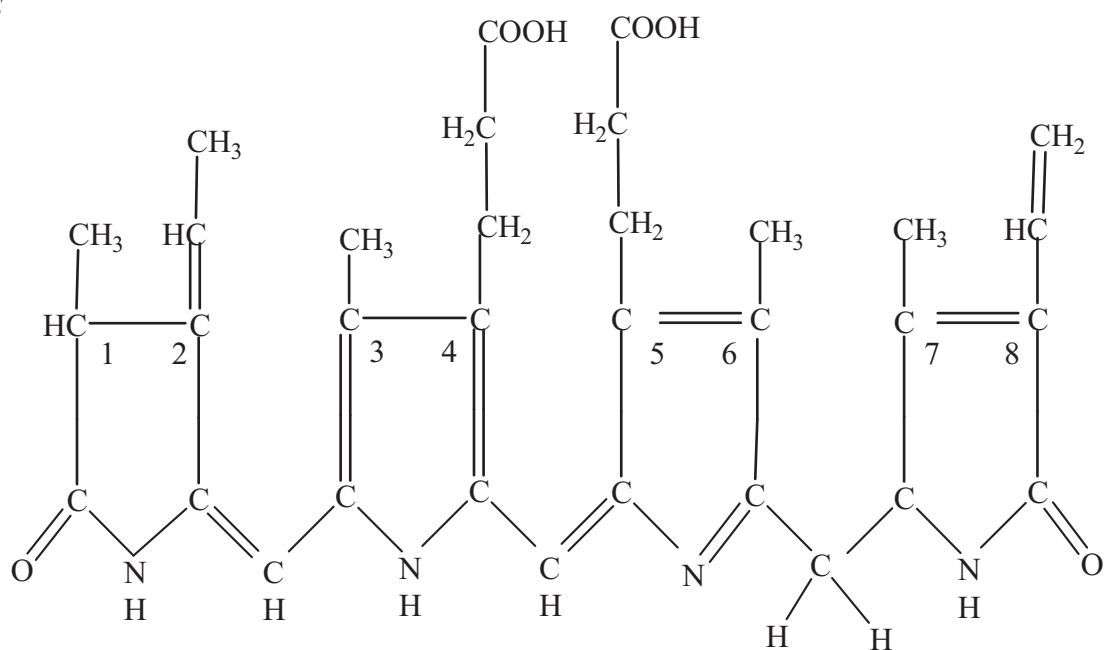


Рис. 83. Фикобилины фикобилипротеинов у цианобактерий:
А – фикоцианобилин; Б – фикоэритробилин

Фикобилипротеины поглощают свет в широком диапазоне длин волн (450–700 нм) и разделяются по спектрам поглощения на три класса. Два голубых пигмента аллофикоцианин и фикоцианин, максимумы поглощения которых находятся в области относительно больших длин волн,

встречаются у всех цианобактерий. У некоторых представителей этих групп имеется и красный пигмент, фикоэритрин, поглощающий в более коротковолновой области спектра. Фикобилипротеины находятся в особых гранулах, называемых **фикобилисомами**, которые расположены на внешней поверхности тилакоидов. Энергия поглощаемого этими пигментами света с очень высокой эффективностью переносится в содержащие хлорофилл фотохимические реакционные центры, расположенные в тилакоидах. Эти три класса фикобилипротеинов, различающихся по спектрам поглощения, составляют цепь переноса энергии в фикобилисомах (рис. 84).

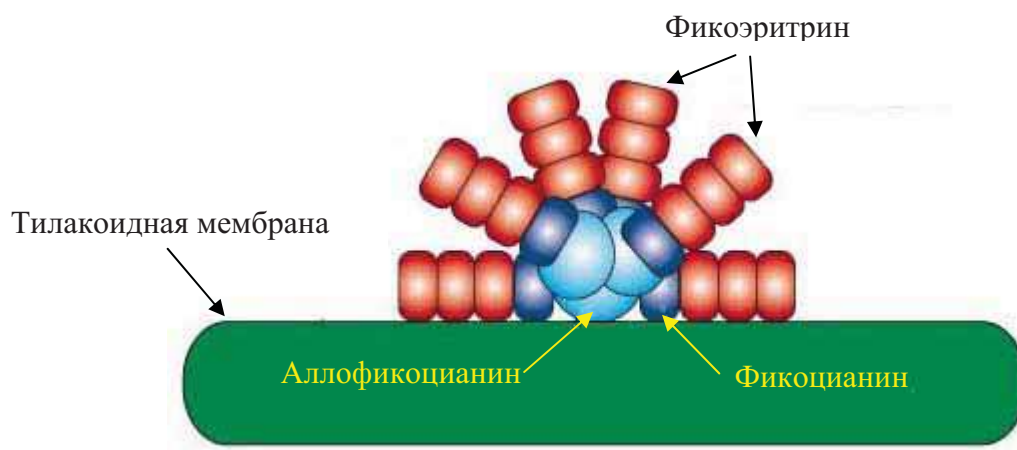


Рис. 84. Схематическое изображение части тилакоида с прикрепленной фикобилисомой

К вспомогательным фотосинтетическим пигментам, которые содержат все прокариоты, относятся каротиноиды. Большинство из них построено на основе конденсации восьми изопреноидных остатков. У некоторых каротиноидов полиизопреноидная цепь открыта и не содержит циклических группировок. Такие каротиноиды называются **алифатическими**. У большинства каротиноидов на одном или обоих концах цепи расположено по ароматическому (**арильные**) или β -ионовому (**алициклические**) кольцу. Выделяют также каротиноиды, не содержащие в молекуле кислорода и кислородсодержащие, которые называются **ксантофиллами**.

Состав каротиноидов фотосинтезирующих прокариот весьма разнообразен. Наряду с пигментами, одинаковыми у разных групп, для каждой из них обнаружены уникальные каротиноиды или их наборы. Наиболее разнообразен состав каротиноидных пигментов у пурпурных бактерий, из клеток которых выделено свыше 50 типов каротиноидов. В клетках большинства пурпурных бактерий содержатся только алифатические каротиноиды, многие из которых принадлежат к группе ксантофиллов. Зе-

ленные бактерии по составу каротиноидов отличаются от пурпурных. Основные каротиноиды зеленых бактерий – арильные, содержащие одно или два ароматических кольца.

Каротиноидные пигменты поглощают свет в синем и зеленом участках спектра, т. е. в области длин волн 400–550 нм. Как и хлорофиллы, эти пигменты локализованы в мембранах и связаны с мембранными белками без образования ковалентных связей. Функции каротиноидов фотосинтезирующих прокариот многообразны. В качестве вспомогательных фотосинтетических пигментов каротиноиды поглощают кванты света в коротковолновой области спектра, которые затем передаются на хлорофилл. Для некоторых галофильных бактерий показана ретиналя в комплексе с бактериородопсином осуществлять особый бесхлорофилльный тип фотосинтеза. Известно участие каротиноидов в осуществлении реакций фототаксиса, а также в защите клетки от токсических эффектов синглетного (атомарного) кислорода.

Рассмотрим структурную организацию фотосинтетического аппарата прокариот.

У каждой из основных групп прокариот фотосинтетический аппарат организован по-разному. Это определяется тем, какие пигменты входят в его состав, какие вещества являются переносчиками электронов и где локализованы фотохимические реакционные центры.

Фотосинтетический аппарат состоит из трех основных компонентов:

- светособирающих пигментов, поглощающих энергию света и передающих ее в реакционные центры;
- фотохимических реакционных центров, где происходит трансформация электромагнитной формы энергии в химическую;
- фотосинтетических электронтранспортных систем, обеспечивающих перенос электронов, сопряженный с запасанием энергии в молекулах АТФ.

Два первых компонента фотосинтетического аппарата состоят из пигментов (табл. 9). Фотосинтетические электронтранспортные системы у разных групп бактерий содержат свои специфические переносчики и будут рассмотрены ниже.

Фотосинтезирующие бактерии отличаются друг от друга и по расположению в клетке компонентов фотосинтетического аппарата. Два компонента этого аппарата – фотохимические реакционные центры и фотосинтетические электронтранспортные системы – у всех фототрофных бактерий локализованы в цитоплазматической мембране и ее производных (тилакоидах). Локализация же светособирающих пигментов в разных группах фотосинтезирующих прокариот различна. У пурпурных

бактерий, гелиобактерий и прохлорофит светособирающие пигменты в виде комплексов с белками интегрированы в мембранах. В клетках зеленых бактерий основная масса светособирающих пигментов находится в хлоросомах, у цианобактерий – в фикобилисомах.

Таблица 9

**Функции различных пигментов в фотосинтезе
(по М. В. Гусеву и Л. А. Минеевой, 2003)**

| Пигменты | | Пурпурные бактерии | Зеленые бактерии | Гелиобактерии | Цианобактерии | Прохлорофиты |
|---|----------------------|---|---|---|---|-------------------------|
| Светособирающие пигменты | Хлорфиллы | Бактериохлорофилл <i>a</i> или <i>b</i> | Бактериохлорофиллы <i>a + c</i> , <i>a + d</i> , <i>a + e</i> | бактериохлорофилл <i>g</i> | Хлорофилл <i>a</i> | Хлорофиллы <i>a + b</i> |
| | Фикобилипротеины | Нет | Нет | Нет | Фикоцианин, аллофикоцианин, фикоэритрин | Нет |
| | Основные каротиноиды | Алифатические и арильные | Арильные и алициклические | Единственный алифатический: нейроспорин | Алициклические | Алициклические |
| Хлорофиллы, входящие в состав реакционного центра | | Бактериохлорофилл <i>a</i> или <i>b</i> | Бактериохлорофилл <i>a</i> | Бактериохлорофилл <i>g</i> | Хлорофилл <i>a</i> | Хлорофилл <i>a</i> |

9.1.1. Фотосинтез у прокариот

Под **фотосинтезом** понимают происходящее в клетках фототрофных организмов преобразование световой энергии в биохимически доступную энергию (АТФ) и восстановительную силу (НАДФ·Н₂), а также связанный с этими процессами синтез клеточных компонентов.

Фотосинтез начинается с поглощения квантов света молекулами хлорофилла, бактериохлорофилла и другими пигментами. Молекула пигмента, воспринявшая квант света, переходит в возбужденное состояние, которое длится очень недолго ($\leq 10^{-9}$ с) и заканчивается возвращением ее к исходному, стабильному уровню. Этот переход сопровождается либо передачей возбужденного состояния другой молекуле пигмента, либо потерей сообщенной энергии в виде тепла, флуоресценции или фосфоресценции. Если энергия электронных возбужденных состояний передается по комплексу пигментов, то некоторое ее количество может дости-

гать фотохимических реакционных центров, где происходит превращение световой энергии в химическую (табл. 10).

Таблица 10

Фотохимические реакционные центры фототрофных бактерий
(по М. В. Гусеву и Л. А. Минеевой, 2003)

| Группы фотосинтезирующих эубактерий | | Состав фотохимических реакционных центров | | |
|--|----------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | | Первичный донор электронов | Первичный акцептор электронов | Вторичный акцептор электронов |
| Пурпурные серные и несерные бактерии | | Б/хл <i>a</i> (П ₈₇₀) Б/хл <i>b</i> (П ₉₆₀) | Б/феоф <i>a</i> Б/феоф <i>b</i> | Убихинон, менахинон |
| Зеленые бактерии | нитчатые | Б/хл <i>a</i> (П ₈₆₅) | Б/феоф <i>a</i> | Менахинон |
| | серные | Б/хл <i>a</i> (П ₈₄₀) | Б/хл <i>c</i> (П ₆₆₃) | FeS |
| Гелиобактерии | | Б/хл <i>g</i> (П ₇₉₈) | Б/хл <i>g</i> (П ₆₇₀) | Хинон в комплексе с FeS |
| Цианобактерии | ФС I | Хл <i>a</i> (П ₇₀₀) | Хл <i>a</i> | FeS |
| | ФС II | Хл <i>a</i> (П ₆₈₀) | Феоф <i>a</i> | Пластохинон |
| Прохлорофиты | ФС I | Хл <i>a</i> (П ₇₀₀) | Информация отсутствует | Информация отсутствует |
| | ФС II | Хл <i>a</i> (П ₆₈₀) | Информация отсутствует | Информация отсутствует |

П р и м е ч а н и е: ФС – фотосистема; б/хл – бактериохлорофилл; хл – хлорофилл; б/феоф – бактериофеофитин; феоф – феофитин; П – фотохимически активные формы хлорофилла с указанием длины волны, при которой происходит индуцированное светом изменение поглощения пигмента; FeS – железосеросодержащие белки.

Молекулы хлорофилла или бактериохлорофилла (первичные доноры электронов) фотохимического реакционного центра тесно сопряжены с молекулами первичного акцептора электронов и поэтому возбужденная молекула хлорофилла или бактериохлорофилла может отдавать им электрон. Отдав электрон, молекула хлорофилла или бактериохлорофилла приобретает способность акцептировать электрон. Чтобы предотвратить возвращение электрона на молекулу донора, вторичный акцептор принимает электрон от первичного акцептора и стабилизирует таким способом разделение зарядов. Реакции обратимого окисления-восстановления хлорофилла под воздействием света происходят в фотосинтетическом реакционном центре и являются «первичными» химическими реакциями фотосинтеза.

Электрон со вторичного акцептора поступает в фотосинтетическую электронтранспортную цепь и по ее переносчикам может возвращаться на хлорофилл или бактериохлорофилл фотохимического реакционного центра. Последними переносчиками фотосинтетической электронтранс-

портной цепи, т. е. непосредственными донорами, с которых электроны поступают на хлорофилл или бактериохлорофилл реакционного центра, у фотосинтезирующих организмов в большинстве случаев служат цитохромы типа *c*. Возвращение электрона на хлорофилл фотохимического реакционного центра – темновой процесс. Электрон перемещается по цепи переносчиков в соответствии с электрохимическим градиентом. Такой транспорт электронов получил название **циклического**.

Кроме циклического транспорта электронов, у фотосинтезирующих прокариот существует нециклический путь переноса электронов. При этом электрон, «оторванный» от молекулы хлорофилла реакционного центра (первичного донора), по электронтранспортной цепи, состоящей из переносчиков электронов, не возвращается к молекуле хлорофилла реакционного центра, а передается на такие центральные метаболиты клетки, как НАДФ⁺ или окисленный ферредоксин. Таким образом, электрон покинувший молекулу хлорофилла, выводится из «системы». Возникает однонаправленный незамкнутый электронный поток, получивший название **нециклического** пути переноса электронов.

Показано, что у пурпурных и зеленых нитчатых бактерий функционирует только циклический светозависимый поток электронов. У остальных групп фотосинтезирующих прокариот фотоиндуцируется как циклический, так и нециклический перенос электронов.

Поток электронов по цепи переносчиков при фотосинтезе на определенных этапах сопряжен с направленным перемещением протонов через мембрану, что приводит к созданию протонного градиента, который при участии фермента АТФ-синтазы используется для синтеза молекул АТФ.

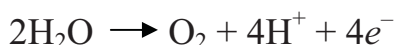
Фосфорилирование, сопряженное с циклическим потоком электронов, получило название **циклического фотофосфорилирования**. Соответственно **нециклическим фотофосфорилированием** называют синтез АТФ, сопряженный с нециклическим электронным транспортом.

Рассмотрим, как происходит кислородный и анакислородный фотосинтез.

Кислородный фотосинтез характерен для цианобактерий и прохлорофит. При кислородном фотосинтезе работают две пигментные системы, включающиеся последовательно. Пигментную систему цианобактерий, возбуждаемую более длинноволновым светом ($\lambda < 730$ нм), называют фотосистемой I. Она содержит хлорофилл (хл a_1) (P₇₀₀) – первичный донор электронов в первой фотореакции. Световая энергия, поглощаемая светособирающими пигментами фотосистемы I, передается в реакционный центр и переводит в возбужденное состояние хл a_1 . Далее хл a_1 отдает один электрон, при этом он окисляется и превращается в хл a_1^+ .

Вторичным акцептором отданного электрона служит железосерный белок. Он обладает еще более отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом и в свою очередь способен отдавать электрон ферредоксину, а с восстановленного ферредоксина восстановительная сила может передаваться на НАДФ⁺ или другие акцепторы. Наряду с этим возможен и циклический перенос электронов, при котором электрон от железосодержащего белка передается на пластохинон, цитохромы и пластоцианин обратно к хлорофиллу a_1^+ реакционного центра.

Реакционный центр фотосистемы II содержит хлорофилл a_2 (хл a_2) (P₆₈₀*), который служит первичным донором электронов во второй фотосистеме. Получив энергию, поглощенную светособирающими пигментами фотосистемы II, хлорофилл a_2 переходит в возбужденное состояние. Электрон принимает молекула первичного акцептора феофитина a , а затем он передается на молекулу пластохинона, который при этом восстанавливается до семихинона. Донором электронов для фотосистемы II служит вода. «Дырка», образовавшаяся в хл a_2^+ в результате потери электрона, заполняется одним из электронов, освобождающихся в результате образования O₂ при разложении H₂O:



Разложение воды происходит при участии ионов марганца.

Две описанные выше пигментные системы связаны между собой электронтранспортной цепью, важным звеном которой является пластохинон, который находится в большом избытке и выполняет функцию накопителя (депо) электронов. Этот накопитель может связывать не менее 10 электронов. Окисление пластохинона осуществляет фотосистема I, т. е. электроны «накопителя» расходуются на заполнение «дырок» в хл a_1^+ . От пластохинона электроны передаются последовательно железосерному белку, комплексу b_6/f , затем пластоцианину и, наконец, хлорофиллу a_1^+ . Таким образом, пластохинон выполняет важную функцию накопления и дальнейшей передачи электронов, поступающих из нескольких электронтранспортных цепей. Схематически пространственную ориентацию электронтранспортной системы внутри тилакоидной мембраны можно изобразить следующим образом (рис. 85).

Таким образом, две фотосистемы вместе со связывающей их электронтранспортной цепью обеспечивают направленный поток электронов от воды (с внутренней стороны тилакоидной мембраны) к НАДФ⁺ (с внешней стороны). В результате происходит восстановление НАДФ⁺ и образование заряда на мембране. Иными словами, световые реакции выступают в роли протонного насоса, который работает за счет энергии

The diagram illustrates the electron transport chain in photosynthesis, showing the flow of electrons (e^-) and the resulting proton gradient across the thylakoid membrane.

Energy Levels (E_0 , mV):

- +1000 mV: $H_2O \rightarrow \frac{1}{2}O_2 + 2e^-$
- 1000 mV: P_{680}^* (excited state of Photosystem II)
- 0 mV: P_{700} (ground state of Photosystem I)

Electron Flow Path:

- Electrons from H_2O are transferred to P_{680} in Photosystem II.
- Excitation of P_{680} by light (Свет) leads to the excited state P_{680}^* .
- Electrons from P_{680}^* are transferred to $\Phi_{eo\phi}$ (primary electron acceptor) and then to PX (plastoquinone).
- Electrons from PX are transferred to Φ_D (secondary electron acceptor) and then to the FeS complex.
- The FeS complex transfers electrons to the b_6/f complex, which then transfers them to PC (plastocyanin).
- Electrons from PC are transferred to P_{700} in Photosystem I.
- Excitation of P_{700} by light (Свет) leads to the excited state P_{700}^* .
- Electrons from P_{700}^* are transferred to A_1 (primary electron acceptor) and then to FeS .
- Electrons from FeS are transferred to Φ_D and then to Φ_{VD} (secondary electron acceptor).
- Electrons from Φ_{VD} are transferred to Φ_P (primary electron acceptor) and then to $NADP^+$.
- $NADP^+$ is reduced to $NADPH \cdot H_2$.

Proton Gradient:

The flow of electrons through the chain is coupled with the pumping of protons (H^+) across the thylakoid membrane, creating a proton gradient (Протонный градиент) that drives ATP synthesis.

феоф – феофитин; FeS – железосеросодержащий белок; Фд – ферредоксин; Фвд – флаво-
доксин; Фп – флавопротеин; ПХ – пластохинон; ПЦ – пластоцианин; c_{553} , b_6 , f – цитохромы;
P₇₀₀* – хл a_1 реакционного центра; P₆₈₀* – хл a_2 реакционного центра; A₁ – первичный акцеп-
тор электрона

Рассмотрим фотореакции у пурпурных и зеленых нитчатых бактерий. Энергия, поглощенная светособирающими пигментами (бактериохлорофиллом и каротиноидами) передается бактериохлорофиллу фотохимического реакционного центра. Первичным акцептором электронов служит бактериофеофитин *a* или *b*. Далее электроны возвращаются с участием

ряда переносчиков электронтранспортной цепи на молекулы бактериохлорофилла фотореакционного центра. В результате такого циклического транспорта электронов синтезируется энергия, аккумулируемая в молекулах АТФ. Восстановительная сила ($\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ или $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$) образуется в результате обратного транспорта электронов (переноса против электрохимического градиента) по электронтранспортной цепи за счет энергии, генерируемой в процессе циклического транспорта электронов. Это темновой процесс, донорами электронов которого являются экзогенные вещества (H_2S , тиосульфат, молекулярный водород, органические соединения) (рис. 86).

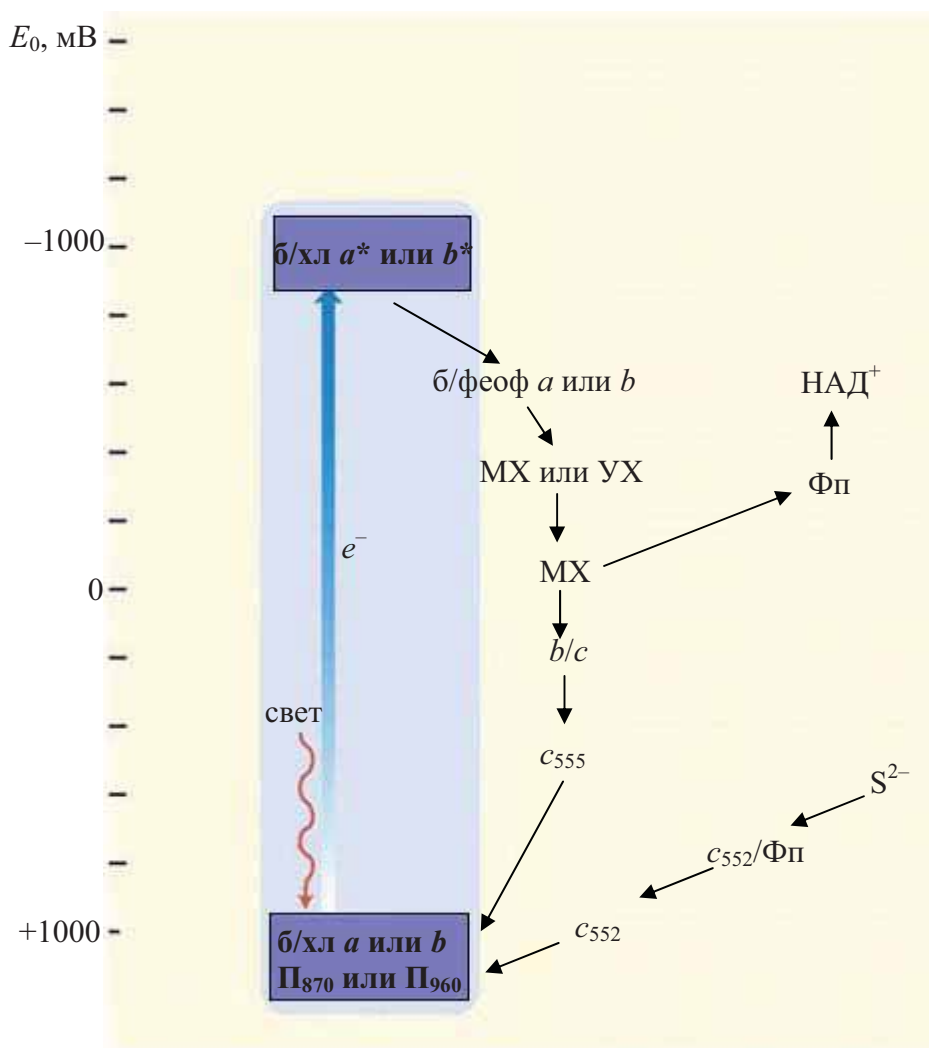


Рис. 86. Организация фотосинтетического аппарата у пурпурных бактерий:
 б/хл – бактериохлорофилл; б/феоф – бактериофеофитин; Фп – флавопротеин;
 МХ – менахинон; УХ – убихинон; b , c , c_{552} , c_{555} – цитохромы

Таким образом, у пурпурных и зеленых нитчатых бактерий имеется циклический транспорт электронов, в процессе которого образуется

АТФ, и обратный транспорт электронов, при котором синтезируется восстановитель НАД · Н₂ или НАДФ · Н₂.

У зеленых серобактерий и гелиобактерий в результате фотохимической реакции одного типа индуцируется как циклический транспорт электронов, приводящий к образованию АТФ, так и нециклический, при котором образуется восстановитель (рис. 87).

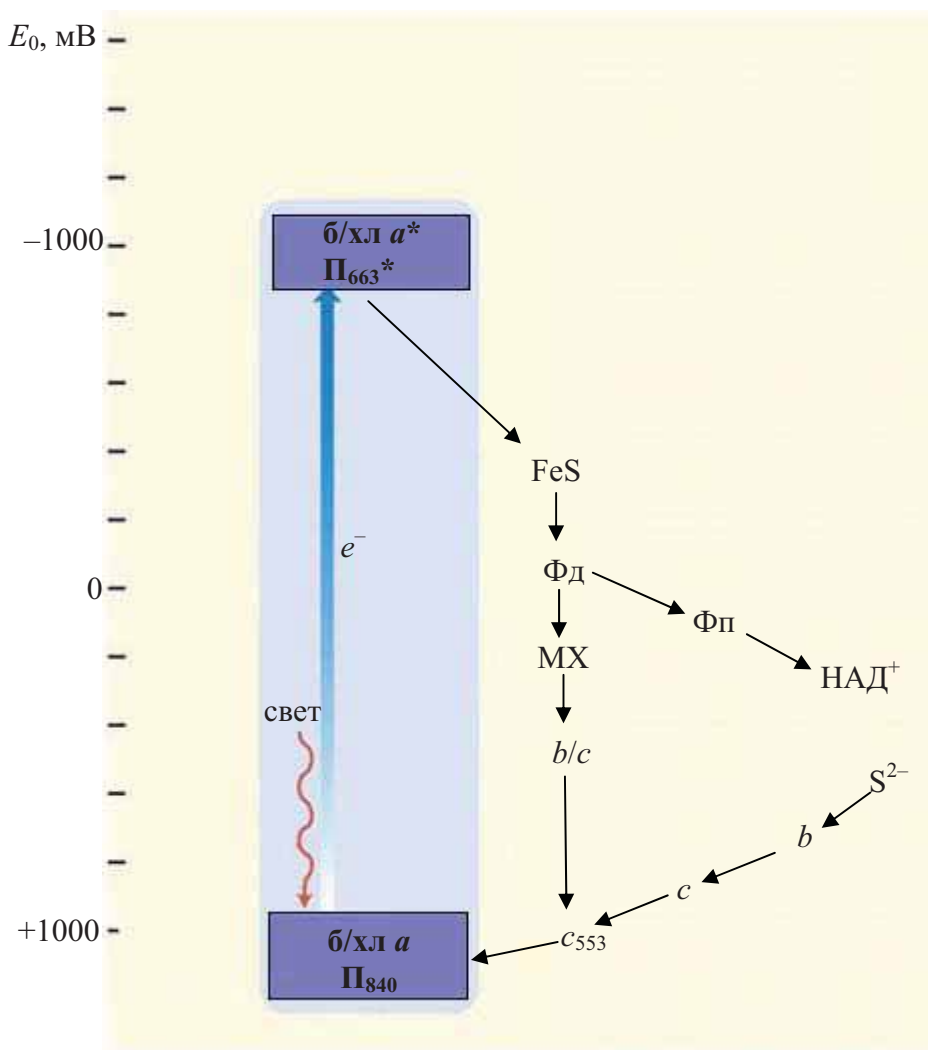


Рис. 87. Организация фотосинтетического аппарата у зеленых серобактерий: б/хл – бактериохлорофилл; б/феоф – бактериофеофитин; FeS – железосеросодержащий белок; Φ_d – ферредоксин; Φ_p – флавопротеин; MX – менахинон; b , c , c_{553} – цитохромы

Таким образом, в процессе фотохимических реакций у различных представителей фототрофных бактерий образуются молекулы АТФ и восстановителей НАД · Н₂ или НАДФ · Н₂. Эти первые стабильные продукты фотосинтеза используются в конструктивном метаболизме бакте-

рий для ассимиляции углекислого газа (фотоавтотрофы) и других соединений (фотогетеротрофы).

9.1.2. Пурпурные бактерии

Пурпурные бактерии осуществляют anoxygenic photosynthesis и относятся к классу *Anoxyphotobacteria*. Общим для всех представителей пурпурных бактерий является то, что компоненты фотосинтетического аппарата находятся в тилакоидах. В большинстве случаев типичным для данной группы бактерий хлорофиллом является бактериохлорофилл *a*. Все эти бактерии способны фиксировать CO_2 в цикле Кальвина. Многие пурпурные бактерии проявляют способность к азотфиксации.

Группа пурпурных бактерий в настоящее время насчитывает более 50 видов. Все пурпурные бактерии – одноклеточные микроорганизмы разной морфологии (рис. 88). Размеры их колеблются от 1 до 20 мкм в длину и от 0,3 до 6 мкм в ширину. Среди пурпурных бактерий есть неподвижные и подвижные формы. Движение осуществляется с помощью одного или пучка жгутиков, расположенных обычно полярно. Большинство пурпурных бактерий размножается бинарным делением, некоторые виды – почкованием. Все пурпурные бактерии окрашиваются отрицательно по Граму.

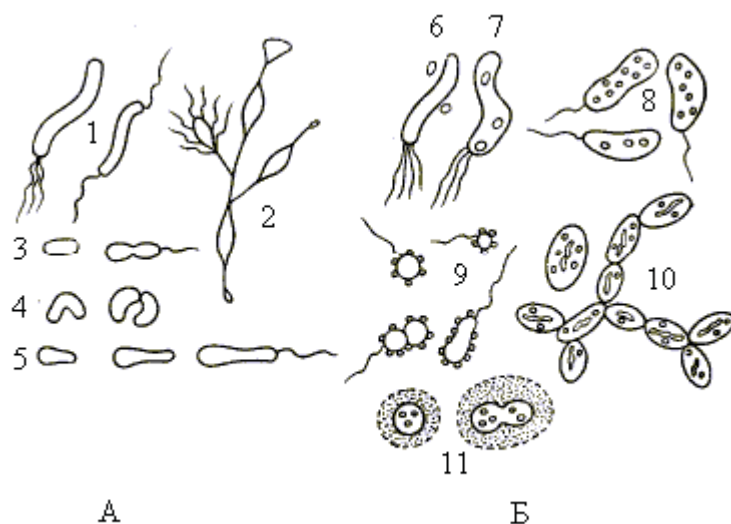


Рис. 88. Основные морфологические типы пурпурных бактерий:

A – несерные пурпурные бактерии: 1 – *Rhodospirillum*; 2 – *Rhodomicrobium*; 3 – *Rhodobacter sphaeroides*; 4 – *Rhodocyclus*; 5 – *Rhodopseudomonas palustris*; *Б* – пурпурные серобактерии: 6 – *Ectothiorhodospira*; 7 – *Thiospirillum*; 8 – *Chromatium*; 9 – *Thiocystis*; 10 – *Thiodictyon*; 11 – *Thiocapsa* (по В. М. Горленко, Г. А. Дубининой, С. И. Кузнецову, 1977)

По способности использовать в качестве доноров электронов элементарную серу в группе пурпурных бактерий выделяют два семейства: пурпурные серные (*Chromatiaceae*) и пурпурные несерные (*Rhodospirillaceae*) бактерии.

Все представители пурпурных серных бактерий могут расти при освещении в анаэробных условиях на минимальной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода CO_2 , используя H_2S в качестве донора электронов. Таким образом, для серных бактерий основной способ существования – фотолитоавтотрофия. Многие виды используют для этой цели молекулярную серу (S^0), сульфит (SO_3^{2-}), тиосульфат ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), молекулярный водород. Сульфид окисляется последовательно до молекулярной серы, далее до сульфата (SO_4^{2-}), при этом капли серы, окруженные белковой мембраной, временно откладываются в периплазматическом пространстве. Это происходит в результате того, что окисление H_2S до S^0 превосходит скорость последующего окисления S^0 до SO_4^{2-} .

Для большинства пурпурных несерных бактерий характерен фотоорганогетеротрофный образ жизни. Донорами электронов и источниками углерода в процессе фотосинтеза являются жирные кислоты, спирты, углеводы, аминокислоты.

Некоторые пурпурные несерные бактерии растут при освещении на минеральной среде, используя в качестве донора электронов H_2S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, или S^0 . В большинстве случаев сульфид окисляется только до молекулярной серы, никогда не откладывающейся в клетке, но в отдельных случаях возможно последующее окисление S^0 до сульфата.

В группе пурпурных несерных бактерий обнаружено большое разнообразие метаболических путей, связанных с получением энергии. Многие представители этой группы способны расти в темноте в микроаэрофильных или аэробных условиях, получая энергию в процессе дыхания. У них активно функционирует замкнутый цикл Кребса, гликолитический путь и другие пути катаболизма органических соединений. Представители рода *Rhodobacter* способны к хемоавтотрофии. Они растут на минеральной среде в темноте при пониженной концентрации O_2 , используя энергию, получаемую при окислении молекулярного водорода, для ассимиляции CO_2 . У представителей рода *Rhodobacter* обнаружена также способность к росту в анаэробных условиях за счет окисления органических соединений в процессе нитратного дыхания. Кроме того, для ряда пурпурных несерных бактерий показана способность расти анаэробно в

темноте, осуществляя сбраживание органических субстратов (углеводы, пируват и др.).

Таким образом, можно заключить, что для пурпурных несерных бактерий источниками энергии могут быть фотосинтез, аэробное дыхание, анаэробное дыхание и брожение.

9.1.3. Зеленые бактерии

Зеленые бактерии осуществляют аноксигенный фотосинтез и относятся к классу *Anoxyphotobacteria*. В группе зеленых бактерий выделяют зеленые серные (*Chlorobiaceae*) и зеленые нитчатые (*Chloroflexaceae*).

Все зеленые серные бактерии – грамтрицательные одноклеточные неподвижные микроорганизмы (рис. 89). Клетки мелкие (0,3–1,2 x 0,5–2,7 мкм), палочковидные, яйцеобразные или слегка изогнутые. Размножение осуществляется бинарным делением. В качестве запасного вещества зеленые серные бактерии накапливают гликогенподобный полисахарид. Поли-β-гидроксимасляная кислота не обнаружена.

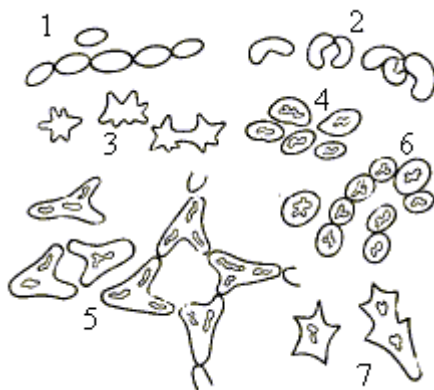


Рис. 89. Основные морфологические формы зеленых серобактерий:
1 – *Chlorobium limicola*; 2 – *Chlorobium vibrioforme*; 3 – *Prosthecochloris aestuarii*;
4 – *Pelodictyon lutecium*; 5 – *Pelodictyon clathratiforme*; 6 – *Clathrochloris sulfurica*;
7 – *Ancalochloris perfilievii* (по В. М. Горленко, Г. А. Дубининой, С. И. Кузнецову, 1977)

Зеленые серные бактерии являются строго анаэробными фотолитоавтотрофами. В качестве доноров электронов они используют H_2S или другие восстановленные неорганические соединения серы, а также молекулярный водород. Получающаяся при окислении H_2S элементарная сера до окисления ее до сульфата откладывается вне клетки.

Многие из них нуждаются в витамине B_{12} . Как правило, зеленые серные бактерии способны фиксировать молекулярный азот.

По всем вышеперечисленным свойствам они похожи на пурпурные серные бактерии. Действительно, пурпурные и зеленые серные бактерии

обычно сосуществуют в освещенной, богатой сульфидами анаэробной водной среде и области их распространения в значительной степени перекрываются. Однако эти две группы заметно различаются по используемым ими источникам углерода. Ни один из видов зеленых серных бактерий не может расти фотогетеротрофно, имея в качестве единственного и основного источника углерода органические соединения, если в среде отсутствуют неорганические восстановители (пурпурные серные могут использовать и органические источники углерода). Зеленые серные бактерии не имеют рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы, поэтому они не могут фиксировать CO_2 в цикле Кальвина. Они фиксируют CO_2 в цикле Арнона, в котором CO_2 фиксируется на органических кислотах с образованием конечного продукта – щавелевоуксусной кислоты (для сравнения, конечный продукт цикла Кальвина – глюкоза, гликоген и другие углеводы).

Зеленые нитчатые бактерии представляют собой передвигающиеся путем скольжения организмы, состоящие из множества палочковидных клеток, которые называются **трихомами** и достигают в длину 100–300 мкм (рис. 90). У некоторых видов трихомы окружены слизистым чехлом. Все описанные представители семейства *Chloroflexaceae* имеют типичную грамотрицательную клеточную стенку, но не ригидную, а гибкую, обеспечивающую скользкое движение со скоростью 0,1–0,4 мкм/с. Клетки размножаются поперечным бинарным делением. Кроме того, как и все нитчатые формы, зеленые скользкие бактерии размножаются путем отделения небольшой части трихома.

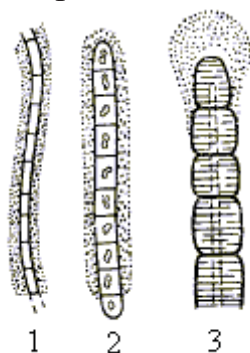


Рис. 90. Основные морфологические формы зеленых скользких бактерий:
1 – *Chloroflexus aurantiacus*; 2 – *Chloronema giganteum*; 3 – *Oscillochloris chrysea*
(по В. М. Горленко, Г. А. Дубининой, С. И. Кузнецову, 1977)

Физиолого-биохимическая характеристика зеленых нитчатых бактерий основана на данных, полученных для одного из представителей этой группы – *Chloroflexus aurantiacus*, поскольку остальные не получены к настоящему времени в чистой культуре. Нитчатые зеленые бактерии

C. aurantiacus являются факультативными анаэробами и фототрофами. На свету они растут в аэробных и анаэробных условиях в присутствии разнообразных органических соединений: углеводов, спиртов, органических кислот и аминокислот. В темноте рост возможен только в аэробных условиях. Таким образом, органические соединения используются этим организмом несколькими путями: в качестве источников углерода, источников энергии и доноров электронов.

Зеленые нитчатые бактерии практически не способны к фототрофному росту на CO_2 и H_2 и, следовательно, эти бактерии являются, скорее, фотогетеротрофами. Фотоассимиляция CO_2 у *Chloroflexus aurantiacus* происходит в цикле Кальвина, на что указывает обнаруженный у них активный фермент рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза. Метаболизм органических углеродных соединений осуществляется в результате функционирования полного цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного цикла. Попытки обнаружить у данных бактерий способность к фиксации молекулярного азота пока не дали положительных результатов.

9.1.4. Гелиобактерии

Гелиобактерии осуществляют аноксигенный фотосинтез благодаря наличию в клетках единственного бактериохлорофилла g, который не обнаружен у других бактерий с бескислородным типом фотосинтеза.

В клетках гелиобактерий, кроме бактериохлорофилла g, имеется небольшое количество каротиноидов.

Гелиобактерии являются единственными грамположительными фототрофами, способными к образованию настоящих эндоспор. Описаны два вида, различающиеся морфологически: *Heliobacterium chlorum* – одиночные длинные палочки (1,0 x 7,0–10 мкм), способные передвигаться скольжением, и *Heliobacillus mobilis* – короткие палочковидные формы с перитрихially расположенными жгутиками.

Гелиобактерии – облигатные фототрофы. Рост возможен только на свету в анаэробных условиях. Источниками углерода могут служить некоторые органические кислоты (уксусная, молочная, масляная, пировиноградная). Фиксация CO_2 осуществляется в цикле Кальвина. Дыхательный метаболизм отсутствует. Гелиобактерии – активные азотфиксаторы. Они обитают в почвах и содовых озерах.

9.1.5. Цианобактерии

Цианобактерии еще недавно рассматривали как синезеленые водоросли – особый тип низших растений. Сходство синезеленых водорослей с бактериями было отмечено давно. В 1875 г. Ф. Кон объединил их с бактериями в отдел *Schyzophyta* – растения-дробянки, т. е. растения, размножающиеся бинарным делением.

В 1978 г. Н. Гиббонс и Р. Меррей, основываясь на ряде свойств, отнесли синезеленые водоросли к прокариотам, а Р. Стейниер предложил отказаться от названия «синезеленые водоросли» и ввести термин «цианобактерии», что обусловлено рядом специфических свойств:

- наличием клеточной стенки, состоящей из пептидогликана муреина;
- отсутствием мембраны, отделяющей наследственный материал от цитоплазмы;
- наличием рибосом 70S-типа;
- способностью развиваться при температуре выше 55 °С;
- способностью фиксировать молекулярный азот;
- наличием в ряде случаев аэросом и карбоксисом – цитоплазматических включений, встречающихся только у прокариот;
- сходством с другими эубактериями по спектрам чувствительности к антибиотикам.

Цианобактерии – морфологически разнообразная группа грамотрицательных прокариот, включающая одноклеточные, колониальные и многоклеточные формы. Клетки могут быть сферическими, палочковидными или изогнутыми, одиночными или образующими скопления, удерживаемые совместно после ряда делений с помощью окружающего их общего чехла. Многоклеточные формы имеют нитевидное строение. Нити (трихомы или филаменты) бывают простые или ветвящиеся. **Простые нити** состоят из одного ряда клеток, имеющих одинаковые размеры, форму и строение, или клеток, различающихся по этим параметрам. **Ветвящиеся трихомы** возникают в результате нескольких механизмов, в связи с чем различают ложное и истинное ветвление. К **истинному ветвлению** приводит способность клеток трихома делиться в разных плоскостях, в результате возникают многорядные трихомы или однорядные нити с однорядными боковыми ветвями. **Ложное ветвление** трихомов не связано с особенностями деления клеток внутри нити, а есть результат прикрепления или соединения нитей под углом друг к другу.

Для разных представителей этой группы прокариот характерна способность к скользящему движению, осуществляющемуся по твердому субстрату без помощи жгутиков.

Основной способ размножения цианобактерий – последовательное бинарное деление. Однако при определенных условиях вегетативная клетка генетически предрасположена к дифференциации в специализированную репродуктивную структуру. Это нанноциты, бaeоциты и экзоспоры у одноклеточных представителей и гормогонии и гормоцисты у нитчатых цианобактерий.

Нанноциты образуются в результате ряда последовательных делений материнской клетки, не сопровождающихся ростом дочерних клеток.

Баеоциты образуются в результате многократного деления клеток внутри общей дополнительной оболочки-чехла, в результате которого образуется спорангий с мелкими баеоцитами. Последние освобождаются после разрыва оболочки спорангия. Освобождающиеся баеоциты окружены либо только обычной для цианобактерий клеточной стенкой грамотрицательного типа, либо имеют дополнительный внешний чехол. Баеоциты могут быть подвижными и неподвижными.

Образование **экзоспор** происходит также путем деления клетки внутри чехла. При этом наблюдается непрерывное последовательное отчленение спор от апикальной части материнской клетки. Базальная часть продолжает расти и, достигнув исходных размеров, делится с образованием экзоспоры.

Гормогонии представляют собой фрагменты трихома, отделившиеся от материнской нити и обладающие подвижностью.

Гормоцисты, или **гормоспоры**, – короткие ряды гранулированных клеток, окруженные самостоятельным плотным толстым слизистым чехлом.

В настоящее время цианобактерии разделены на пять порядков, различающихся морфологическими признаками: *Chroococcales*, *Pleurocapsales* (одиночные клетки или колонии), *Oscillatoriales*, *Nostocales* и *Stigonematales* (многоклеточные нитчатые формы).

Одноклеточные формы цианобактерий отличаются друг от друга способом размножения. Размножение бинарным делением в одной или более плоскостях или почкованием характерно для представителей порядка *Chroococcales*. Цианобактерии, входящие в порядок *Pleurocapsales*, размножаются множественным делением или чередованием бинарного и множественного деления (рис. 91).



A

Б

Рис. 91. Микрофотографии одноклеточных цианобактерий:
А – Chroococcales; Б – Pleurocapsales (из «The Japanese Fresh-water Algae, 1977»;
<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Prokaryotes/Chroococcaceae/>)

В основе деления на порядки многоклеточных форм цианобактерий лежит способность нитей к ветвлению, а также морфология и строение клеток, из которых они образованы. Цианобактерии, входящие в порядок *Oscillatoriales*, имеют неветвящиеся трихомы, состоящие из одного ряда только вегетативных клеток. Рост трихома осуществляется делением клеток в одной плоскости. Неветвящиеся трихомы характерны также для цианобактерий порядка *Nostocales*. Однако их трихомы, помимо вегетативных клеток, содержат гетероцисты и иногда акинеты. Отличительным признаком цианобактерий порядка *Stigonematales* является способность вегетативных клеток трихома к делению более чем в одной плоскости, приводящему к появлению многорядных трихомов или трихомов с истинным ветвлением (рис. 92).

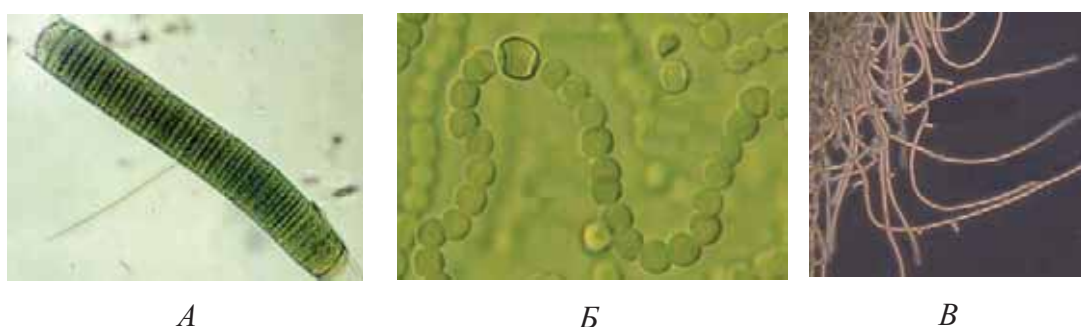


Рис. 92. Микрофотографии нитчатых цианобактерий:
 А – *Oscillatoriales*; Б – *Nostocales*; В – *Stigonematales* (из «The Japanese Fresh-water Algae, 1977»; <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Prokaryotes/Chroococcaceae/>)

подавляющее большинство цианобактерий является облигатными фототрофами, т. е. могут расти только за счет энергии солнечного света. При этом для них характерен фотосинтез, основанный на функционировании двух фотосистем с использованием H_2O в качестве донора электронов и сопровождающийся выделением молекулярного кислорода. Образующиеся в процессе фотосинтеза АТФ и НАДФ · H_2 используются далее в темновых реакциях для фиксации CO_2 в цикле Кальвина. В качестве первого стабильного продукта этого цикла идентифицирован гликоген. Помимо этого пути, у цианобактерий обнаружена активность фосфоенолпируваткарбоксилазы, что позволяет им ассимилировать CO_2 путем карбоксилирования фосфоенолпировиноградной кислотой.

В настоящее время у многих представителей цианобактерий обнаружена способность к бескислородному фотосинтезу, когда функционирует только фотосистема I. Активность ассимиляции CO_2 за счет этого процесса низка и составляет несколько процентов от скорости ассимиляции CO_2 в условиях функционирования обеих фотосистем.

Обнаружение у цианобактерий бескислородного фотосинтеза позволяет ликвидировать «разрыв», существующий между фотосинтезом пурпурных и зеленых бактерий, гелиобактерий и кислородным фотосинтезом цианобактерий, прохлорофит и эукариотических организмов. Способность цианобактерий переключаться при изменении условий с одного типа фотосинтеза на другой служит иллюстрацией гибкости их светового метаболизма. Это имеет важное экологическое значение для цианобактерий.

Хотя подавляющее большинство цианобактерий могут расти, используя только энергию света, т. е. являются облигатными фототрофами, в природе они часто находятся в условиях темноты. В темноте у цианобактерий обнаружен активный эндогенный метаболизм, энергетическим субстратом которого служит запасенный на свету гликоген. В качестве основного пути катаболизирования последнего идентифицирован окислительный пентозофосфатный путь. Другой возможный путь получения цианобактериями в темноте энергии – гликолиз.

Цианобактерии, осуществляющие бескислородный фотосинтез, могут получать энергию в темноте в процессе анаэробного дыхания при наличии в среде серы. При этом происходит перенос электронов на молекулярную серу, восстанавливая ее до сульфида. Установлено, что у таких цианобактерий цикл Кребса «не замкнут» из-за отсутствия α -кетоглутаратдегидрогеназы.

Среди цианобактерий широко распространена способность к азот-фиксации. Это обеспечивается наличием нитрогеназной активности, которая в свою очередь зависит от содержания в среде связанного азота и молекулярного кислорода. Связанный азот репрессирует синтез и ингибирует активность нитрогеназы, молекулярный кислород быстро инактивирует фермент.

Проблема фиксации молекулярного азота в аэробных условиях у цианобактерий решена путем формирования дифференцированных клеток – гетероцист, в которых чувствительный к молекулярному кислороду аппарат фиксации молекулярного азота отделен от кислородовыделяющего фотосинтетического аппарата с помощью определенных ультраструктурных и биохимических перестроек.

При отсутствии в среде связанного азота некоторые клетки нитчатых цианобактерий превращаются в гетероцисты. Образование гетероцист происходит за 24 ч и может быть разделено на два этапа:

1. Формирующиеся на первом этапе *прогетероцисты* не способны защитить нитрогеназу от инактивирующего действия O_2 . Процесс дифференцировки на этой стадии обратим: при внесении в среду аммоний-

ного азота прогетероцисты превращаются в вегетативные клетки, способные к делению.

2. На втором этапе процесс дифференцировки становится необратимым. Сформированные гетероцисты не способны к делению и не могут превращаться в вегетативные клетки.

Формирование гетероцист из вегетативных клеток сопровождается глубокими ультраструктурными и функциональными перестройками. Зрелые гетероцисты окружены тремя дополнительными слоями, внешними по отношению к клеточной стенке (рис. 93).

Фрагмент
гетероцисты вегетативной клетки

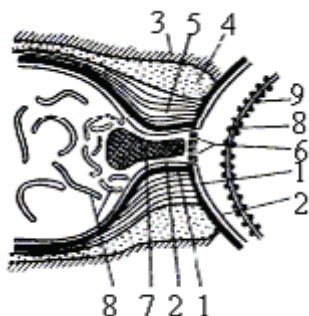


Рис. 93. Схема строения гетероцисты:

1 – клеточная стенка; 2 – цитоплазматическая мембрана; 3 – полярная цианофициновая гранула; 4 – тилакоиды; 5 – фибриллярный слой; 6 – пластинчатый слой оболочки гетероцисты; 7 – гомогенный слой; 8 – фикобилисомы; 9 – микроплазмодесмы
(по М. В. Гусеву и Л. А. Минеевой, 2003)

Гомогенный слой состоит из полисахаридов, пластинчатый – из пептидогликана муреина, для фибриллярного слоя точная химическая природа не установлена.

Предполагается, что пластинчатый слой непроницаем для H_2O , ионов, нейтральных веществ гидрофильной природы и, возможно, для растворенных газов. Дополнительные слои, окружающие гетероцисту, в местах ее контакта с вегетативной клеткой прерываются. Перегородка, отделяющая гетероцисту от вегетативной клетки, пронизана множеством мелких каналов (микроплазмодесм), соединяющих цитоплазмы обеих клеток и обеспечивающих обмен клеточными метаболитами.

В цитоплазме гетероцист в зонах контакта с вегетативными клетками располагаются светопреломляющие полярные гранулы. Терминальные гетероцисты содержат одну, а интеркалярные – две полярные гранулы. Они имеют гомогенное строение и содержат запасной полипептид цианофицин.

Одновременно с ультраструктурной дифференциацией клетки происходят и биохимические изменения. В гетероцистах синтезируется фермент нитрогеназа, исчезают основные светособирающие пигменты фотосистемы II – фикобилипротеины и содержащие их структуры – фикобилисомы; резко снижается содержание ионов марганца – необходимого компонента системы разложения воды; утрачивается способность фиксировать CO_2 , так как в гетероцистах отсутствует рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза в растворимой форме или внутри карбоксисом. Таким образом, в зрелых гетероцистах не функционирует фотосистема II, но сохраняется активность фотосистемы I, так как в них поддерживается значительный уровень хлорофилла и увеличивается количество фотореакционных центров этой системы.

Известно, что для фиксации N_2 необходимы восстановитель в виде молекул восстановленного ферредоксина или $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ и химическая энергия в форме АТФ. Так как в гетероцистах отсутствует нециклический транспорт электронов, то они не могут обеспечивать процесс азотфиксации фотохимически образованным восстановителем и зависят в этом отношении от межклеточного переноса метаболитов. Восстановитель может или непосредственно транспортироваться из соседних вегетативных клеток в готовом виде, или же генерироваться в гетероцистах в темновых ферментативных процессах из исходного транспортируемого субстрата. Чаще всего в качестве такого субстрата служит мальтоза, которая является продуктом восстановительного пентозофосфатного цикла (цикла Кальвина). В гетероцистах мальтоза катаболизируется в окислительном пентозофосфатном пути. При этом образуется $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$. Далее водород с $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ передается на ферредоксин в реакции, катализируемой НАДФ -оксидоредуктазой. Источником АТФ служит зависимое от фотосистемы I циклическое фотофосфорилирование, в темноте – окислительное фосфорилирование.

Нитрогеназная система катализирует восстановление N_2 до аммония (NH_4^+). Последний включается в молекулу глутаминовой кислоты в реакции, катализируемой глутаминсинтетазой:



В таком виде фиксированный азот транспортируется из гетероцист в вегетативные клетки, где с помощью глутаминсинтетазы осуществляется перенос аминогруппы на молекулу α -кетоглутарата:



Одна из молекул глутаминовой кислоты возвращается в гетероцисту для очередного акцептирования NH_4^+ , другая используется в метаболических реакциях вегетативной клетки (рис. 94).

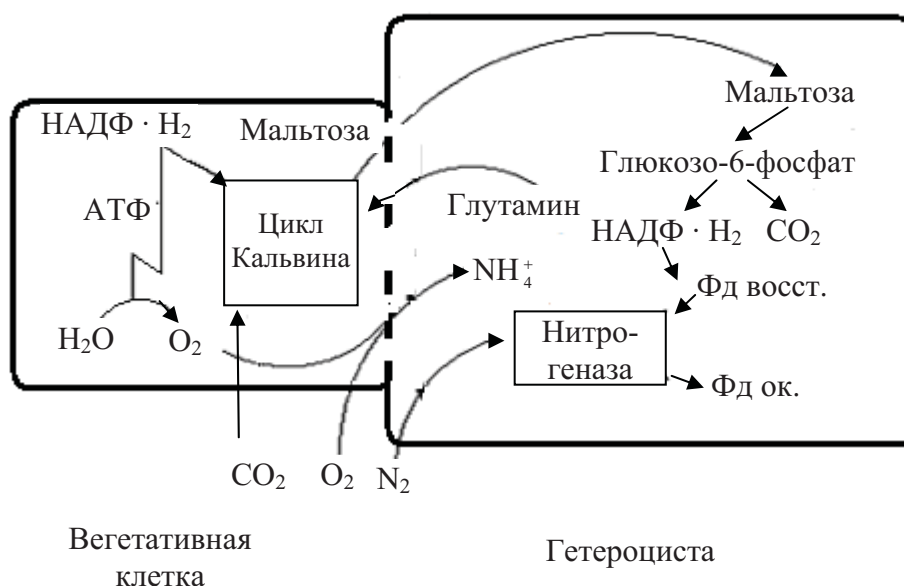


Рис. 94. Схема обмена углеродными и азотными соединениями между гетероцистой и вегетативной клеткой (по М. В. Гусеву и Л. А. Минеевой, 2003)

Таким образом, в гетероцистах создаются специфические условия, при которых снижается парциальное давление молекулярного кислорода, и которые необходимы для функционирования нитрогеназы. Соединения углерода поступают из вегетативных клеток, а связанный азот преимущественно в форме глутамин возвращается к ним.

9.1.6. Прохлорофиты

Это одноклеточные или нитчатые, разветвленные или неразветвленные бактерии, осуществляющие кислородный фотосинтез. От цианобактерий отличаются составом пигментов и организацией фотосинтетического аппарата. Прохлорофиты относятся к порядку *Prochlorales*, который включает два рода: *Prochloron* – одноклеточные организмы и *Prochlorothrix* – нитчатые организмы.

Бактерии рода *Prochloron* представлены клетками сферической формы без выраженного слизистого чехла. Это внеклеточные симбионты (экзосимбионты), обитающие на поверхности тела морских животных – колониальных асцидий (главным образом, дидемнид). Длительное время не удавалось культивировать данные бактерии в лабораторных условиях. Недавно было обнаружено, что зависимость от хозяина определяется по-

требностью бактерий рода *Prochloron* в аминокислотах, в частности в триптофане.

Типовой (и единственный) вид – *Prochloron didemni*.

К роду *Prochlorothrix* относятся свободноживущие прохлорофиты. Они являются обитателями пресных озер и легко культивируются на минеральных средах. Это нитчатые бактерии, у которых отсутствует клеточная дифференцировка.

Типовой (и единственный) вид – *Prochlorothrix hollandica*.

Прохлорофиты осуществляют фиксацию CO_2 в цикле Кальвина. Конечным продуктом углеродного обмена на свету является полисахарид, сходный с гликогеном цианобактерий. Помимо фотоавтотрофии, обнаружена способность прохлорофит к фотогетеротрофии и росту в темноте с получением энергии в процессе дыхания. Для прохлорофит показана способность фиксировать N_2 .

9.1.7. Распространение фототрофных бактерий

Фототрофные, или фотосинтезирующие, бактерии – типично водные микроорганизмы, распространенные в пресных и соленых водоемах. Особенно часто они встречаются в местах, где есть H_2S , как в мелководье, так и на значительной глубине. В почве фототрофных бактерий мало, но при затоплении ее водой они могут расти весьма интенсивно.

Распространение фототрофных прокариот в природе определяют наличием трех основных факторов: света, молекулярного кислорода и питательных веществ. Потребности в световой энергии и диапазоне длин поглощаемого света для фотосинтеза определяются набором светособирающих пигментов. Прокариоты с кислородным типом фотосинтеза поглощают свет в том же диапазоне длин волн, что водоросли и высшие растения. Пурпурные и зеленые бактерии, гелиобактерии часто развиваются в водоемах под более или менее плотным поверхностным слоем, состоящим из цианобактерий и водорослей, эффективно поглощающих свет с длиной волны до 750 нм. Фотосинтез пурпурных и зеленых бактерий, гелиобактерий в этих условиях связан со способностью бактериохлорофиллов поглощать свет в красной и инфракрасной областях спектра за пределами поглощения хлорофиллов. Крайняя граница этой части спектра определяется способностью бактериохлорофиллов некоторых пурпурных бактерий поглощать свет с длиной волны до 1100 нм. Некоторые фотосинтезирующие прокариоты могут расти в водоемах на глубине до 20–30 м за счет активности другой группы пигментов – каротиноидов.

По отношению к молекулярному кислороду среди фототрофных прокариот встречаются строгие и факультативные анаэробы, микроаэрофилы и организмы, у которых O_2 образуется внутриклеточно.

Значительны также различия в питательных веществах, необходимых для конструктивного и энергетического метаболизма. Они могут варьировать от сложных пищевых потребностей до практически минимального уровня.

Фототрофные прокариоты, особенно цианобактерии, играют значительную роль в круговороте углерода и азота, а серобактерии – и серы. В настоящее время фототрофные бактерии широко используют для исследования фотосинтеза в различных аспектах, особенно начальных стадий. Кроме того, пурпурные и зеленые бактерии интересны для выяснения организации фотосинтетического аппарата, путей биосинтеза пигментов, метаболизма углерода, эволюции фотосинтеза и фотосинтезирующих форм.

9.2. Хемолитотрофные бактерии

Хемолитотрофия – способ существования, обнаруженный только у прокариот, при котором источником энергии служат реакции окисления неорганических соединений. Впервые данная группа бактерий была открыта русским микробиологом С. Н. Виноградским.

Хемолитотрофы могут существовать как в аэробных, так и анаэробных условиях и использовать довольно широкий круг неорганических соединений в качестве источников энергии. На основании специфичности хемолитотрофов в отношении субстратов их можно разделить на пять основных групп (табл. 11):

- **нитрифицирующие бактерии** окисляют восстановленные неорганические соединения азота;
- **бактерии, окисляющие серу**, используют в качестве источника энергии H_2S , молекулярную серу (S^0) или ее частично восстановленные окислы;
- **железобактерии** окисляют восстановленное железо или марганец;
- **водородные бактерии** используют в качестве источника энергии молекулярный водород;
- у **карбоксидобактерий** единственный источник углерода и энергии – CO_2 .

К хемолитотрофным можно отнести сульфатвосстанавливающие и метанобразующие бактерии. **Сульфатвосстанавливающие** бактерии получают энергию окислением в анаэробных условиях молекулярного во-

дорода, используя в качестве конечного акцептора электронов сульфат (SO_4^{2-}). **Метаногенные** бактерии используют CO_2 в качестве конечного акцептора электронов при окислении молекулярного водорода. Эти группы бактерий рассмотрены в гл. 6.

Таблица 11

Группы хемолитотрофных прокариот

| Группа прокариот | Характеристика энергетического процесса | | | Способность к автотрофии |
|-----------------------------------|---|---|--|--------------------------|
| | донор электронов | акцептор электронов | конечные продукты | |
| Нитрифицирующие бактерии | $\frac{\text{NH}_4^+}{\text{NO}_2^-}$ | O_2 | NO_2^- NO_3^- | + |
| Железобактерии | Fe^{2+} | O_2 | Fe^{3+} | + |
| Бактерии, окисляющие серу | $\text{H}_2\text{S}, \text{S}^0, \text{SO}_3^{2-}, \text{S}_2\text{O}_3^{2-}, \text{S}_3\text{O}_6^{2-}, \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ | $\frac{\text{O}_2}{\text{NO}_3^-}$ | $\frac{\text{SO}_4^{2-}}{\text{SO}_4^{2-}, \text{NO}_2^-, \text{N}_2}$ | + |
| Водородные бактерии | H_2 | $\frac{\text{O}_2}{\text{NO}_3^-, \text{NO}_2^-}$ | $\frac{\text{H}_2\text{O}}{\text{H}_2\text{O}, \text{NO}_2^-, \text{N}_2}$ | + |
| Карбоксидобактерии | CO | O_2 | CO_2 | + |
| Сульфатвосстанавливающие бактерии | H_2 | SO_4^{2-} | H_2S | ± (у отдельных видов) |
| Метаногенные бактерии | H_2 | CO_2 | CH_4 | ± (у большинства видов) |

9.2.1. Нитрифицирующие бактерии

Нитрифицирующие бактерии получают энергию в результате окисления восстановленных соединений азота (аммиак, азотистая кислота). Они входят в семейство *Nitrobacteriaceae*, которое состоит из восьми родов.

В природе процесс нитрификации проходит в две фазы, за каждую из них ответственны свои возбудители. Первую фазу – окисление солей аммония до солей азотистой кислоты – осуществляют представители родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira* и *Nitrosovibrio*:



Вторую фазу – окисление нитритов в нитраты – осуществляют бактерии из родов *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*:



Нитрифицирующие бактерии – грамотрицательные микроорганизмы, различающиеся формой и размером клеток. В эту группу входят бактерии с палочковидной, сферической, спиралевидной, грушевидной формой клеток. Все нитрифицирующие бактерии, кроме представителей рода *Nitrobacter*, размножаются бинарным делением. Бактерии, принадлежащие к роду *Nitrobacter*, размножаются почкованием. Среди нитрифицирующих бактерий есть подвижные (с полярным или перитрихальным жгутикованием) и неподвижные формы.

Все нитрифицирующие бактерии – облигатные аэробы; большинство – облигатные автотрофы, рост которых ингибируется органическими соединениями в концентрациях, обычных для гетеротрофных прокариот. Ассимиляция CO_2 осуществляется в цикле Кальвина.

Оптимальные условия для роста нитрифицирующих бактерий – температура 25–30 °С при pH 7,5–8,0.

Процесс нитрификации происходит в цитоплазматической мембране. Ему предшествует поглощение аммиака и перенос его через цитоплазматическую мембрану с помощью медьсодержащей транслоказы.

Окисление аммиака в нитрит осуществляется в несколько этапов. На первом этапе аммиак окисляется до гидроксиламина с помощью монооксигеназы. Этот фермент катализирует присоединение к молекуле аммиака одного атома кислорода; второй атом кислорода взаимодействует с НАД · H_2 , что приводит к образованию H_2O :



Этот этап окисления является эндергоническим, так как здесь происходит потребление энергии.

Далее гидроксиламин с помощью гидроксиламиноксиоредуктазы окисляется до нитрита:



В качестве промежуточного продукта предполагается образование нитроксила:



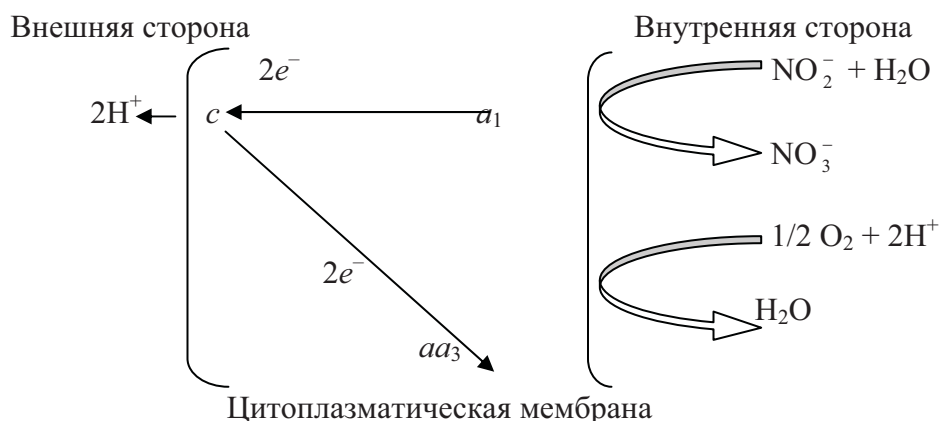
Электроны от NH_2OH поступают в дыхательную цепь на уровне цитохрома *c* и далее на терминальную оксидазу и на конечный акцептор – молекулярный кислород.

Транспорт электронов по электронтранспортной цепи, расположенной в цитоплазматической мембране, сопровождается переносом двух протонов через мембрану. Это приводит к созданию протонного градиента и в конечном итоге к синтезу молекул АТФ (в этом процессе участвует фермент АТФ-синтаза).

Вторая фаза нитрификации – окисление нитрита до нитрата – катализируется молибденсодержащей нитритоксидазой. Это происходит по следующему уравнению:



Электроны поступают на цитохром a_1 и через цитохром c на терминальную оксидазу aa_3 , где акцептируются молекулярным кислородом. При этом происходит перенос через мембрану двух протонов, что приводит к синтезу АТФ. Схематически вторую фазу нитрификации можно представить следующим образом:



Таким образом, суммарно процесс окисления аммиака можно представить в следующем виде:



Энергетически выгодными являются только стадии окисления гидроксиламина в нитрит и нитрита в нитрат, так как в результате происходит образование молекул АТФ.

Каким же образом у нитрифицирующих бактерий происходит образование восстановителя НАД · H_2 , который необходим для ассимиляции CO_2 в цикле Кальвина?

Поскольку субстраты (аммиак, нитриты), которые окисляют нитрифицирующие бактерии, обладают сильно положительным окислительно-восстановительным потенциалом, который для пары $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_2\text{OH}$ составляет +899 мВ, для пары $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ – +420 мВ, а окислительно-восстановительный потенциал НАД / НАД · H_2 имеет отрицательную величину -320 мВ, то окисление NH_4^+ или NO_2^- по термодинамическим причинам не может быть прямо связано с восстановлением НАД. Образование НАД · H_2 в таком случае происходит за счет функционирования обратного транспорта электронов, который имеется у нитрифицирующих

бактерий наряду с прямым транспортом по дыхательной цепи. Обратный транспорт электронов сопровождается затратой энергии.

Схематически перенос электронов у нитрифицирующих бактерий можно представить следующим образом:



Нитрифицирующие бактерии обнаружены в водоемах разного типа (озера, моря, океаны) и в почвах, где они, как правило, развиваются совместно с бактериями, жизнедеятельность которых приводит к образованию исходного субстрата нитрификации – аммиака.

Процесс нитрификации, являясь важным звеном в круговороте азота в природе, имеет как положительные, так и отрицательные стороны. Переведение азота из аммонийной формы в нитратную способствует обеднению почвы азотом, так как нитраты как весьма растворимые соединения легко вымываются из почвы. В то же время известно, что нитраты – это хорошо используемый растениями источник азота. Кроме того, связанное с нитрификацией подкисление почвы улучшает растворимость и, следовательно, доступность некоторых жизненно необходимых элементов, в первую очередь фосфора и железа.

Нитрифицирующие бактерии косвенно участвуют в разрушении разного рода сооружений, для которых строительным материалом служат известь и цемент (т. е. различных зданий, автострад и т. д.). Это связано с тем, что нитрифицирующие бактерии окисляют аммиак, присутствующий в атмосфере или выделяющийся из фекалий животных, до азотной кислоты.

9.2.2. Бактерии, окисляющие соединения серы

Способность окислять восстановленные соединения серы обнаружена у многих прокариот. Это фототрофы, осуществляющие бескислородный фотосинтез, некоторые типичные гетеротрофные бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и др. В эту группу входят и хемолитотрофные бактерии такие как тионовые бактерии и бесцветные серобактерии.

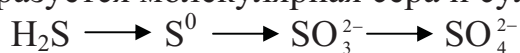
Тионовые бактерии квалифицированы в четыре рода: *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thiodendron* и *Sulfolobus*. Это одноклеточные организмы разной морфологии (палочковидные, близкие к сферическим, вибриоидные, спиралевидные) и размеров (от 0,2–0,3 до 3–4 мкм), неподвижные или подвижные (жгутикование полярное), бесспоровые. Размножаются бинарным делением или почкованием. Все известные тионовые бактерии, за исключением представителей рода *Sulfolobus*, имеют клеточную стенку грамотрицательного типа. Клеточная стенка бактерий рода *Sulfolobus* не содержит муреина, а построена из белково-липидного комплекса и поэтому их в настоящее время относят к архебактериям.

Тионовые бактерии способны окислять с получением энергии, помимо молекулярной серы, многие ее восстановленные соединения: сероводород (H_2S), тиосульфат ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), сульфит (SO_3^{2-}), тритионат ($\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$), тетратионат ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$), тиоцианат (CNS^-), диметилсульфид (CH_3SCH_3), диметилдисульфид (CH_3SSCH_3), а также сульфиды тяжелых металлов. Там, где в качестве промежуточного продукта образуется S^0 , она всегда откладывается вне клетки.

Полное ферментативное окисление тионовыми бактериями молекулярной серы и различных ее восстановительных соединений приводит к образованию сульфата (SO_4^{2-}).

Рассмотрим как происходит окисление сероводорода и молекулярной серы.

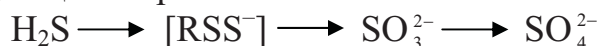
Окисление H_2S до сульфата сопровождается потерей восьми электронов, поступающих в дыхательную цепь, при этом в качестве промежуточных продуктов образуется молекулярная сера и сульфит:



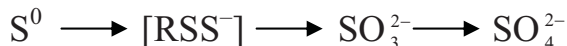
Перенос электронов сопровождается переносом протонов. Возникает электрохимический градиент, разрядка которого с помощью АТФ-синтазы приводит к синтезу АТФ.

Согласно другой точке зрения, в качестве первого продукта ферментативного окисления H_2S образуется связанный с мембраной сульфид-сульфгидрильный комплекс $[\text{RSS}^-]$, окисляющийся далее через сульфит до сульфата. Молекулярная сера в этом случае не является прямым про-

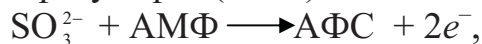
дуктом окисления H_2S . В этом случае окисление H_2S до SO_4^{2-} может быть представлено следующим образом:



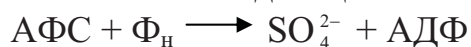
Если же происходит *окисление молекулярной серы*, то предполагают такие превращения:



На этапе окисления сульфита до сульфата образуется промежуточное соединение аденозинфосфосульфат (АФС):



которое в результате субстратного фосфорилирования превращается в сульфат. При этом также образуется молекула аденозиндифосфата (АДФ), в которой запасается высвобождающаяся энергия:



Далее с помощью аденилаткиназы из АДФ синтезируется АТФ.

Основное же количество энергии тионовые бактерии получают в результате переноса образующихся при окислении восстановленной серы электронов, поступающих в дыхательную цепь, вероятнее всего, на уровне цитохрома *c*.

В большинстве случаев конечным акцептором электронов служит молекулярный кислород, т. е. они являются аэробами и энергия у них образуется в процессе аэробного дыхания. Некоторые тионовые бактерии являются факультативными анаэробами; они могут использовать в качестве конечного акцептора электронов не только O_2 , но и нитраты, восстанавливая их до N_2 . Описаны тиобациллы, которые способны расти в анаэробных условиях на средах, содержащих органические соединения, но на минеральных средах их рост возможен только в аэробных условиях.

Большинство тионовых бактерий относится к облигатным хемолитоавтотрофам. Все компоненты клетки они способны строить из CO_2 , ассимилируя его в цикле Кальвина. Для таких тионовых бактерий CO_2 служит основным источником углерода, а окисление неорганических восстановленных соединений серы – единственным источником энергии.

Некоторые тионовые бактерии могут расти как в хемолитоавтотрофных, так и в хемоорганогетеротрофных условиях, используя в последнем случае в качестве источника углерода и энергии ряд органических соединений (углеводы, кислоты, спирты, аминокислоты). Описаны тионовые бактерии, которые могут расти, используя в качестве источника углерода только органические вещества, а энергию получать за счет окисления восстановленных соединений серы, т. е. являются хемолитогетеротрофами.

У тионовых бактерий функционирует система обратного переноса электронов для синтеза НАД · Н₂ (так же, как и у нитрифицирующих бактерий).

Тионовые бактерии широко распространены в природе благодаря своей приспособленности к условиям обитания. Среди них встречаются выраженные, или облигатные, ацидофилы. Например, бактерии *Thiobacillus thiooxidans* способны расти в кислой среде с рН приблизительно 0,6; оптимальным рН для их развития является область 2–4, при рН 7,0 этот организм расти не может. Бактерии *Thiobacillus denitrificans*, наоборот, развиваются в нейтральной и щелочной среде. Большинство тиобацилл относится к мезофилам с оптимальной температурой роста около 30 °С. В последнее время описаны термофильные штаммы, растущие при 60–70 °С.

Бесцветные серобактерии на основании морфологических признаков делятся на две группы, включающие одноклеточные или многоклеточные формы.

Одноклеточные бесцветные серобактерии в свою очередь можно разделить на две подгруппы:

- бактерии с крупными клетками (роды *Achromatium*, *Thiovulum* и др.);
- бактерии с мелкими клетками (роды *Thiospira*, *Thiobacterium* и др.).

Среди представителей этих бактерий можно обнаружить виды со сферическими, овальными, спиралевидными или слегка изогнутыми клетками, как подвижными, так и неподвижными.

Нитчатые организмы представлены неподвижными (*Thiothrix*) или способными к скользящему движению (*Beggiatoa*) формами.

Единственным общим признаком бесцветных серобактерий является способность откладывать серу внутри клеток.

Вопрос о способности бесцветных серобактерий существовать автотрофно еще не решен. Показано, что чистые культуры *Thiospira* могут расти только в присутствии органических соединений. У *Beggiatoa* также не обнаружено типичных для прокариот механизмов автотрофной ассимиляции СО₂. Все это заставляет склоняться в пользу того, что бесцветные серобактерии могут существовать только хемолитогетеротрофно.

Бактерии, окисляющие серу, участвуют в круговороте серы в природе. В отличие от фототрофных прокариот, окисляющих серу в анаэробных условиях, у данной группы бактерий окисление происходит в аэробных условиях. Хемолитотрофы, окисляющие серу, обитают в морских и пресных водоемах, содержащих О₂, в аэробных слоях почв разного типа. Представителей этой группы можно встретить в кислых горячих серных

источниках, кислых шахтных водах, в водоемах со щелочной средой и высокой концентрацией хлорида натрия.

Окисление восстановленных соединений серы до сульфатов, осуществляемое этими бактериями, приводит к подкислению окружающей среды, что может иметь положительные и отрицательные последствия. Положительные – переводит некоторые соединения в растворимую форму, что делает их доступными для растений; а отрицательные – накопление серной кислоты приводит к порче и разрушению различных сооружений.

9.2.3. Железобактерии

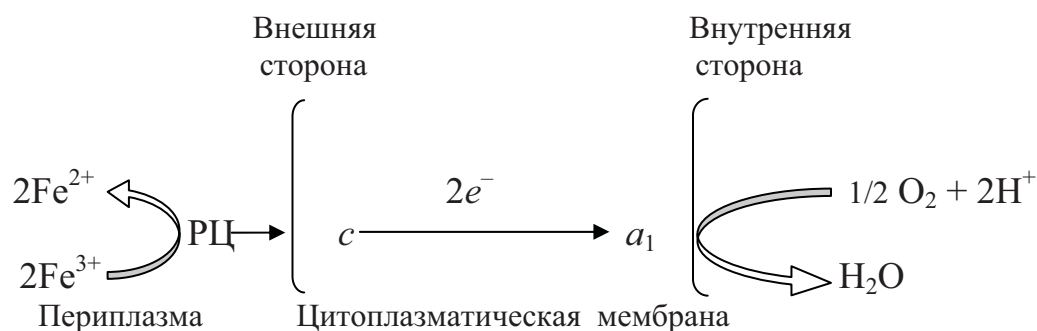
Железобактерии – это одноклеточные микроорганизмы, размножающиеся поперечным делением. Клетки разной формы и размеров, одиночные или формирующие скопления, окруженные чехлами, в которых откладываются оксиды железа. Они являются аэробными ацидофильными бактериями с оптимальным значением рН для роста ниже 4,5, что связывают с большей устойчивостью железа к окислению воздухом именно при низкой кислотности.

Наиболее изученным представителем данных бактерий является *Thiobacillus ferrooxidans*. Большинство штаммов этого вида принадлежит к облигатным хемолитоавтотрофам, использующим энергию окисления железа для ассимиляции CO₂, служащей основным или единственным источником углерода.

Окисление железа, приводящее к получению энергии, происходит в соответствии с уравнением



Бактерии вида *Thiobacillus ferrooxidans* способны окислять не только Fe²⁺, но и восстановленные соединения серы. Дыхательная цепь этих бактерий содержит все типы переносчиков, но участок, связанный с получением энергии, очень короткий. Окисление Fe²⁺ происходит на внешней стороне цитоплазматической мембраны; в цитоплазму через мембрану железо не проникает. Электроны с Fe²⁺ акцептируются особым медь-содержащим растворимым белком – **рустицианином** (РЦ), локализованным в периплазматическом пространстве. Затем с рустицианина они передаются на цитохром *c*, локализованный на внешней стороне цитоплазматической мембраны, а с него на цитохром *a*₁, расположенный на внутренней стороне мембраны. Перенос электронов с цитохрома *a*₁ на 1/2 O₂, сопровождающийся поглощением из цитоплазмы двух протонов, приводит к восстановлению молекулярного кислорода до H₂O:



Особенностью дыхательной цепи бактерий *Thiobacillus ferrooxidans* является отсутствие переноса через мембрану протонов, происходит перенос только электронов. Градиент H^+ по обе стороны цитоплазматической мембраны у *Thiobacillus ferrooxidans* поддерживается как за счет поглощения протонов из цитоплазмы, так и в результате низкого рН внешней среды, в которой обитают эти бактерии. Синтез АТФ происходит за счет движения H^+ из внешней среды в цитоплазму с помощью АТФ-синтазы. Движущей силой служит в основном разность рН снаружи и внутри клетки. Для синтеза одной молекулы АТФ необходимо окислить как минимум две молекулы Fe^{2+} . Образование восстановителя происходит в результате энергозависимого обратного переноса электронов. В целом для фиксации одной молекулы CO_2 в цикле Кальвина необходимо окислить более 22 молекул Fe^{2+} .

Грамотрицательные бактерии *Gallionella ferruginea* имеют бобовидную почковидную форму и относятся к собственно железобактериям. На вогнутой стороне клеток они образуют коллоидный гидроксид железа (ферригидрит), из которого формируют стебельки разной формы. На концах стебельков располагаются клетки. Донором электронов у этих бактерий служит только Fe^{2+} . Это типичные хемолитоавтотрофы, источником углерода для которых является CO_2 . Обитают в бикарбонатной среде, чаще в холодных водах, предпочитают нейтральные значения рН и микроаэрофильные условия. В системах водоснабжения образуют отложения, служащие причиной загрязнения питьевой воды и засорения коммуникаций.

Кроме охарактеризованных хемолитотрофов, окислять железо и (или) марганец способны и другие железобактерии, принадлежащие к разным таксономическим группам. Большинство железобактерий откладывают оксиды металлов во внеклеточных структурах (капсулах, стебельках, чехлах). Среди них встречаются как факультативные хемолитотрофы, так и хемоорганотрофы.

Автотрофные железобактерии и некоторые гетеротрофные бактерии принимают активное участие в образовании железистых отложений, из

которых формируются осадочные железные руды в водоемах. Большое значение имеет также способность хемолитотрофных железобактерий, в частности *Thiobacillus ferrooxidans*, окислять разнообразные нерастворимые в воде сульфидные минералы: сурьмы, меди, цинка, ртути, свинца, никеля, молибдена, кобальта. При этом образуются растворимые сульфаты, что имеет значение для плодородия почв, а также используется на практике при выщелачивании металлов из бедных руд. Суть технологии выщелачивания состоит в том, что через измельченную руду пропускают воду, содержащую железобактерии, собирают содержащий сульфаты раствор, концентрируют его и осаждают металлы.

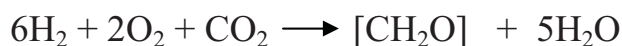
Железобактерии широко распространены в природе и могут существовать в различных условиях: в подземных водах сульфидных месторождений, кислых водах железистых источников, кислых озерах с высоким содержанием закисного железа и др.

9.2.4. Водородные бактерии

К водородным бактериям относятся прокариоты, способные получать энергию путем окисления молекулярного водорода с участием O_2 , а все вещества клетки строить из углерода CO_2 . Это хемолитоавтотрофы, растущие при окислении H_2 в аэробных условиях:



Помимо окисления, для получения энергии молекулярный водород используется в конструктивном метаболизме. Соотношение между потреблением растущей культурой водородных бактерий H_2 , O_2 и CO_2 и синтезом вещества клеток $[CH_2O]$ соответствует следующему уравнению:



Из уравнения видно, что на пять молекул H_2 , окисленного в процессе дыхания, приходится одна молекула H_2 , затрачиваемого на синтез биомассы.

Водородные бактерии, окисляющие H_2 в присутствии O_2 , весьма гетерогенная с таксономической точки зрения группа. Она включает преимущественно грамотрицательные бактерии, среди которых наиболее распространены представители рода *Alcaligenes* (*A. eutrophus*, *A. paradoxus*) и *Pseudomonas* (*P. facilis*, *P. saccharophila*, *P. carboxidovorans*, *P. carboxidoflava* и др.). Эти бактерии имеют сходную морфологию и являются неспорообразующими палочками размером $0,3\text{--}0,7 \times 0,8\text{--}2,9$ мкм. Среди грамотрицательных бактерий окислять водород в аэробных условиях способны также представители родов *Aquaspirillum*, *Xanthobacter*, *Para-*

coccus, *Rhizobium*, среди грамположительных – *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Bacillus*.

Водородные бактерии – факультативные хемолитоавтотрофы, использующие в качестве источника углерода и энергии также разнообразные органические соединения. Ассимиляция CO_2 происходит в цикле Кальвина. Водородные бактерии, растущие на органических соединениях, имеют тот же метаболический аппарат, что и хемоорганогетеротрофные прокариоты. Метаболизм органических соединений у разных представителей этой группы осуществляется с помощью гликолитического, окислительного пентозофосфатного и Энтнера – Дудорова путей, а также цикла Кребса и глиоксилатного шунта.

Все водородные бактерии способны потреблять аммиак, многие представители – мочевины, нитраты, нитриты, разные аминокислоты и азотистые основания. Некоторые штаммы способны к фиксации молекулярного азота.

Большинство водородных бактерий относится к облигатным аэробам. Однако среди них преобладают виды, тяготеющие к низким концентрациям O_2 в среде. Особенно чувствительны к O_2 водородные бактерии, растущие хемолитоавтотрофно, а также в условиях фиксации молекулярного азота. Это объясняется инактивирующим действием молекулярного кислорода на гидрогеназу и нитрогеназу – ключевые ферменты метаболизма H_2 и фиксации N_2 .

Водородные бактерии, как правило, мезофилы с температурным оптимумом для роста 30 – 35 °С. Некоторые виды – термофилы, растущие при температуре 50 °С и даже 70 °С. Нейтрофилы с оптимальным pH для роста 6,5–7,5.

Окисление водорода связано с наличием гидрогеназ, которые в клетке могут находиться в растворимом или связанном с мембранами состоянии. Большинство водородных бактерий содержит только одну форму фермента – связанную с мембранами. Однако есть виды, имеющие обе формы или только растворимую (цитоплазматическую) гидрогеназу.

Гидрогеназы с различной локализацией выполняют в клетке разные функции. Связанный с мембранами фермент, катализирующий реакцию поглощения H_2 , передает электроны в дыхательную цепь и, таким образом, имеет непосредственное отношение к энергетическим процессам. Растворимая гидрогеназа, катализирующая аналогичную реакцию, переносит электроны на молекулы НАД^+ , которые участвуют далее в различных биосинтетических реакциях. Если же водородные бактерии содержат только одну растворимую гидрогеназу, то она выполняет обе функции.

Если у водородных бактерий нет растворимой или НАД-зависимой гидрогеназы, то восстановитель НАД · Н₂ при хемолитотрофном способе существования этих микроорганизмов образуется с помощью механизма обратного переноса электронов.

Таким образом, из всех хемолитоавтотрофных прокариот только водородные бактерии с помощью растворимой гидрогеназы могут осуществлять непосредственное восстановление НАД⁺ окислением неорганического субстрата. У всех остальных групп НАД · Н₂ образуется с использованием механизма обратного транспорта электронов.

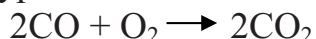
Водородные бактерии играют незаменимую роль в природе, участвуя в круговороте водорода. Они также рассматриваются как перспективные объекты биотехнологии, поскольку способны на дешевых минеральных субстратах с высокой эффективностью образовывать биомассу. Белки водородных бактерий полноценны по аминокислотному составу и легко усваиваются животными. Представители рода *Alcaligenes*, кроме того, способны синтезировать из СО₂ и накапливать в клетках большие количества поли-β-гидроксibuтирата – пластичного природного полимера.

9.2.5. Карбоксидобактерии

Это аэробные прокариоты, способные расти, используя оксид углерода в качестве единственного источника углерода и энергии. Таким свойством обладают некоторые представители родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Comamonas* и др. Это грамотрицательные прямые или слегка изогнутые палочки, подвижные.

Карбоксидобактерии могут расти автотрофно, ассимилируя СО₂ в цикле Кальвина, а также использовать в качестве единственного источника углерода и энергии различные органические соединения и некоторые одноуглеродные субстраты, такие как метанол и формиат. При выращивании на среде с СО₂ в качестве единственного источника углерода все карбоксидобактерии энергию могут получать за счет окисления молекулярного водорода. В большинстве случаев рост этих бактерий на среде с СО₂ + Н₂ происходит активнее, чем на среде с СО. Это дало основание рассматривать карбоксидобактерии как особую физиологическую подгруппу водородных бактерий.

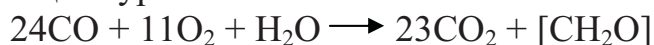
Использование СО карбоксидобактериями происходит путем его окисления в соответствии с уравнением



Далее продукт реакции используется по каналам автотрофного метаболизма. Таким образом, при выращивании карбоксидобактерий на среде с

СО в качестве единственного источника углерода и энергии источником углерода служит не СО, а СО₂.

Общее уравнение обмена карбоксидобактерий может быть представлено в виде следующего уравнения:



Окисление СО карбоксидобактериями осуществляется с участием СО-дегидрогеназы. Электроны, освобождающиеся при этом, поступают в электронтранспортную цепь, состав которой аналогичен таковому водородных бактерий.

Карбоксидобактерии приносят существенную пользу, улучшая экологическую ситуацию благодаря своей способности очищать атмосферу от токсичного оксида углерода, который в больших количествах присутствует в выхлопных газах, выбросах многих промышленных предприятий.

9.3. Семейство *Pseudomonadaceae*

Семейство *Pseudomonadaceae* состоит из четырех основных родов: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Zoogloea*, *Frateriella*, в состав которых входят как сапрофитные, так и патогенные штаммы. Сапрофиты могут быть почвенными и обитающими в пресной или морской воде. Патогенные штаммы включают как фитопатогенных (вызывающих заболевания растений), так и патогенных для человека и животных представителей.

Общие признаки представителей семейства *Pseudomonadaceae* – это грамотрицательные, аэробные, не образующие спор, в большинстве своем хемоорганотрофные бактерии. Метаболизм дыхательный, никогда не бродильный. Растут при температуре от 4 до 43 °С. По морфологии это прямые или изогнутые палочки, передвигающиеся с помощью полярно расположенных жгутиков.

Важным систематическим признаком является то, что представители семейства *Pseudomonadaceae* катаболизируют углеводы по пути Энтнера – Дудорова с образованием пировиноградной кислоты. Гликолиза и окислительного пентозофосфатного пути у них не обнаружено. Содержание ГЦ-пар в ДНК находится в пределах 58–71 %.

Краткая характеристика родов, входящих в семейство *Pseudomonadaceae*, представлена в табл. 12.

Таблица 12

Дифференциальные характеристики родов сем. *Pseudomonadaceae*

| Характеристики | <i>Pseudomonas</i> | <i>Xanthomonas</i> | <i>Frateriuria</i> | <i>Zoogloea</i> |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| Зависимость в факторах роста | — | + | — | + |
| Рост при pH 3,6 | — | — | + | — |
| Продукция ксантомонадинов | — | + | — | — |
| Патогенность для растений | ± | + | — | — |
| Образование хлопьев с древовидными выростами | — | — | — | + |

Род *Pseudomonas*. Впервые псевдомонады были описаны К. Флюгге в 1886 г. и названы им *Bacillus fluorescens*. В 1894 г. был создан род *Pseudomonas*. Размеры клеток бактерий 0,5–1 × 1,5–4 мкм. Все представители подвижны. Жгутикование полярное (моноплярное, амфитрихальное, лофотрихальное).

В большинстве случаев хемоорганотрофы, но встречаются и хемоли-тоавтотрофы. Метаболизм строго дыхательный. Оксидазная реакция положительная. Отдельные представители способны к денитрификации.

Типовой вид – *Pseudomonas aeruginosa*.

Род *Xanthomonas*. Отличительными признаками от представителей рода *Pseudomonas* являются некоторые особенности метаболизма, к числу которых относится способность продуцировать экстрацеллюлярные полисахариды ксантаны, а также желтые внутриклеточные не растворимые в воде пигменты ксантомонадины, которые представляют собой бромированные или метилированные арилполиены.

Оксидазная реакция отрицательная. Нитраты не восстанавливают. Пищевые потребности для роста сложны, бактерии зависят от наличия в среде метионина, глутаминовой и никотиновой кислот.

Все представители рода *Xanthomonas* патогенны для растений.

Типовой вид – *Xanthomonas campestris*.

Род *Frateriuria*. Представители, относящиеся к этому роду, имеют вид палочек, встречающихся парами и поодиночке. Выделяют подвижные с полярным жгутикованием и неподвижные формы.

Облигатные аэробы. Оптимальная температура роста 25–30 °С. Растут при pH 3,6. На среде с глюкозой образуют типичный водораствори-

мый коричневый пигмент. На среде с дрожжевым экстрактом или пептоном формируют желтые, либо оранжевые колонии.

Хемоорганотрофы. Образуют органические кислоты из этанола и большинства других источников углерода. Не нуждаются в факторах роста. Нитраты не восстанавливают.

Представители рода *Frateuria* выделены из растений рода *Lilium* (лилия) и рода *Rubus* (малина, ежевика) в Японии.

Типовой (и единственный) вид – *Frateuria aurantia*.

Род *Zoogloea*. Бактерии, относящиеся к этому роду, являются массовыми обитателями активного ила очистных сооружений. Молодые клетки быстро передвигаются при помощи одиночных полярных жгутиков, со временем клетки агрегируют в хлопья, которые свободно плавают или прикрепляются к какой-нибудь поверхности, а также образуют пленки. Клетки погружены в гелеобразный матрикс и образуют зооглеи – структуры с характерной «древовидной» или «пальцевидной» морфологией.

Хемоорганотрофы, окисляют многие углеводы, аминокислоты. Восстанавливают нитраты. Не пигментированы. Для роста нуждаются в витамине В₁₂. Мезофилы с оптимальной для роста температурой 28–37 °С.

Встречаются как свободноживущие в загрязненных органическими веществами пресных водах и в сточных водах на всех стадиях очистки.

Типовой вид – *Zoogloea ramigera*.

Типовым родом семейства *Pseudomonadaceae* является род *Pseudomonas* как самый многочисленный и уникальный. Интерес исследователей во всем мире к этим бактериям постоянно растет. Бактерии рода *Pseudomonas* – это и сапрофиты, и патогены. Способны утилизировать в качестве источника углерода и энергии разнообразные природные и неприродные соединения. Они являются продуцентами большого числа биологически активных соединений, таких как пигменты, антибиотики, аминокислоты, полисахариды, токсины, витамины, а также другие органические вещества, используемые в иммунологии, медицине и сельском хозяйстве. Наибольший интерес с практической точки зрения представляют пигменты и антибиотики, синтезируемые этими бактериями.

Пигменты бактерий рода *Pseudomonas* относятся к различным химическим группам соединений. Способность к синтезу пигментов в значительной степени зависит от условий культивирования клеток-продуцентов: состав среды, степень аэрации, температура влияют на этот процесс.

У бактерий рода *Pseudomonas* наиболее разнообразно представлена группа **феназиновых пигментов**. Эти пигменты синтезируются по метаболическому пути биосинтеза ароматических аминокислот. Производными феназина являются следующие пигменты: пиоцианин, йодинин,

хлорорафин, оксихлорорафин, аэругинозин А, аэругинозин В, феназин-1-карбоновая кислота. Феназиновые пигменты синтезируются многими флуоресцирующими псевдомонадами. Например, разные штаммы бактерий *P. aeruginosa* продуцируют аэругинозин А, аэругинозин В, оксихлорорафин, хлорорафин и синий пигмент – пиоцианин; *P. aureofaciens* – феназин-1-карбоновую кислоту; *P. iodinium* – пурпурный пигмент йодинин.

В определенных условиях некоторые представители рода *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* и др.) синтезируют водорастворимые флуоресцирующие желто-зеленые пигменты, названные **пиовердинами**. Молекула пиовердина состоит из хиолинового хромофора, связанного с циклическим пептидом, и короткой алифатической цепи. Пиовердины являются железохелатами (сидерофорами) и выполняют специфическую роль в транспорте Fe^{3+} . Синтез пиовердинов происходит при недостатке железа в среде. Появились сообщения, что эти пигменты имеют полезные свойства, так как при обработке семян растений культуральной жидкостью, содержащей флуоресцирующие пигменты, или после поливки ею вегетирующих растений наблюдается существенная прибавка урожая. Стимулирующий и защитный эффект флуоресцирующих пигментов можно объяснить следующим: пигменты связывают железо почвы, в результате чего находящиеся в ризосфере растения фитопатогенные микроорганизмы не размножаются, так как их рост ограничивается недостатком железа. В следствие этого растение развивается более здоровым и лучше плодоносит.

Третья группа пигментов, продуцируемых бактериями рода *Pseudomonas*, – каротиноидные пигменты **меланины**. Эти пигменты не растворимы в воде и остаются связанными с клетками, придавая колониям желтый или оранжевый цвет. Каротиноидные пигменты продуцируют представители видов *P. mendocina*, *P. flava*, *P. palleronii*, *P. radiora*, *P. aeruginosa*, *P. rodos* и др.

Большинство бактерий рода *Pseudomonas* синтезируют вещества **антибиотической природы**. Эти вещества составляют обширную группу различных соединений, объединяемых общей функцией. Количество антибиотиков, синтезируемых бактериями рода *Pseudomonas*, достигло более 50. По этому свойству псевдомонады почти достигли уровня бацилл и уступают лишь актиномицетам. По химической природе антибиотики псевдомонад принадлежат к феназинам, пирролам, производным индола и являются промежуточными или конечными продуктами метаболизма ароматических соединений.

Антибиотики, образуемые бактериями *Pseudomonas*, делятся на следующие группы.

1. Антибиотики ациклического строения, например:

- псевдомоновая кислота (мупироцин) – действует на грамположительные и грамотрицательные бактерии, дрожжи. Обладает гемолитическими свойствами. Продуцент – *P. fluorescens*;

- тиоформин – высокоактивен против грамположительных и грамотрицательных бактерий, клеток раковых опухолей, однако *in vivo* токсичен. Продуцент – *P. fluorescens*.

2. Антибиотики циклического строения, например:

- салициловая кислота. Продуценты – *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. denitrificans*;

- флюорооглюцины – высокоактивны против грамположительных бактерий. Продуцент – *P. aurantiaca*.

3. Антибиотики гетероциклического строения, например:

- феназиновые антибиотики – действуют на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Продуценты – *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*.

4. Антибиотики-производные пиррола, например:

- пирролнитрин – активен против большинства плесневых грибов и дрожжей. На его основе приготовлен медицинский препарат, используемый в медицине для лечения различных дерматомикозов. Продуценты – *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *P. azotoformans* и др.

5. Антибиотики-аминогликозиды, например:

- сорбистины – угнетают рост грамположительных и грамотрицательных бактерий. Продуценты – *P. fluorescens*, *P. sorbistini*.

6. Антибиотики-пептиды, например:

- синрингомицин. Продуцент – *P. syringae*;

- микроцины. Продуцент – *P. aeruginosa*.

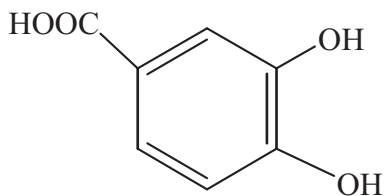
7. β -Лактамные антибиотики, например:

- табтоксины – высокотоксичны для бактерий, водорослей, высших растений и млекопитающих. Продуцент – *P. tabaci*;

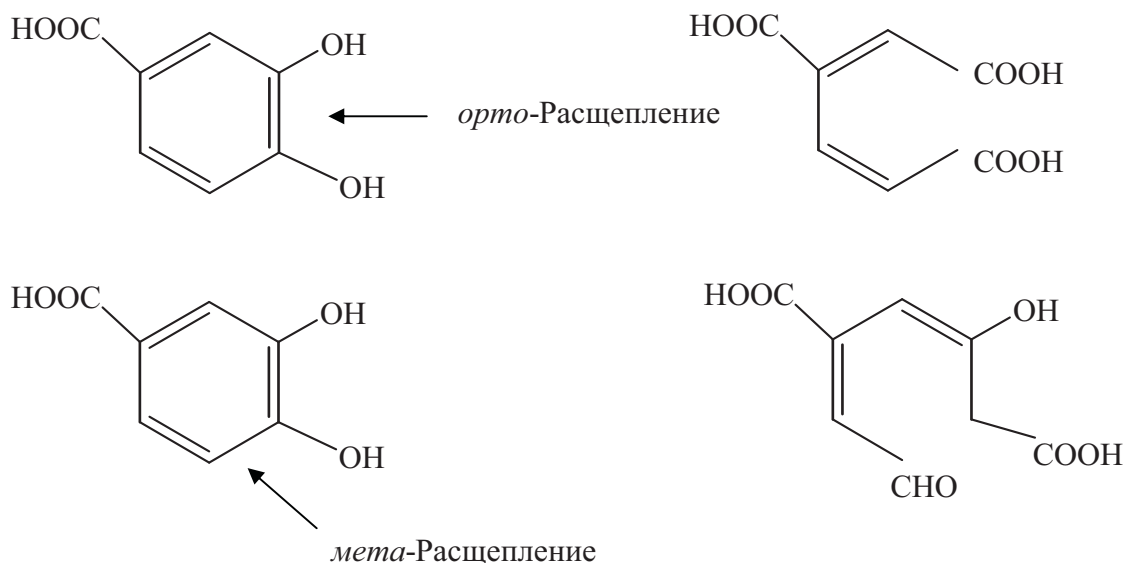
- сульфазецин – высокоактивен в отношении грамотрицательных бактерий, на грамположительные бактерии действует слабо. Продуцент – *P. acidophila*.

Бактерии рода *Pseudomonas* обладают редкой способностью использовать широкий круг источников питания – до 150 наименований природных и синтетических соединений. Уникальной особенностью псевдомонад является способность использовать в качестве источника углерода и энергии ароматические соединения, такие, как фенол, камфора,

салицилат, нафталин, толуол и другие, не утилизируемые большинством микроорганизмов. Первым этапом катаболизма ароматических соединений является образование катехола:



Затем происходит разрыв ароматического кольца в *орто*- или *мета*-положении:



Показано, что бактерии *P. putida* расщепляют ароматические соединения по *орто*-пути. Некоторые другие бактерии рода *Pseudomonas*, такие, как *P. testosteroni*, *P. fluorescens* и *P. acidovorans*, расщепляют ароматические соединения по *мета*-пути.

Бактерии рода *Pseudomonas* могут деградировать большую группу токсических соединений (гербициды, инсектициды, пестициды), содержащих в своем составе атомы хлора, фтора, ртути, брома. Некоторые представители псевдомонад способны расщеплять поверхностно-активные вещества (сульфанол, алкилсульфонат, додецилсульфат натрия и др.), синтетические полимеры (капролактамы, тринитротолуол, *n*-нитроанилин и др.). Установлено, что генетические детерминанты утилизации неприродных углеродсодержащих соединений находятся в плазмидах, которые относятся к плазмидам биodeградации, или D-плазмидам.

Таким образом, можно сделать вывод, что большинство бактерий рода *Pseudomonas* – типичные хемогетеротрофы. Вместе с тем в составе рода *Pseudomonas* имеются виды, способные к хемолитотрофному росту за счет окисления молекулярного водорода. Это бактерии видов *P. facilis*, *P. saccharophila*, *P. flava*, *P. palleronii* и др.

Некоторые виды бактерий рода *Pseudomonas* способны к денитрификации, к их числу относятся *P. aeruginosa*, *P. denitrificans*, *P. fluorescens*, *P. mendocina* и др. В процессе денитрификации нитраты и нитриты восстанавливаются до N_2O , NO или N_2 .

В последние годы получены данные о том, что некоторые бактерии рода *Pseudomonas*, обитающие в ризосфере различных растений, способны фиксировать молекулярный азот. Азотфиксирующие свойства выявлены у штаммов *P. saccharophila*, *P. delafieldii*, *P. aurantiaca* и др. Имеются также данные, свидетельствующие в пользу того, что бактерии одних и тех же видов микроорганизмов могут осуществлять два диаметрально противоположных процесса – азотфиксацию и денитрификацию.

Бактерии рода *Pseudomonas* широко распространены в природе: почве; морских и пресноводных водоемах; илах; сточных водах; пластовых водах нефтяных месторождений; почвах, загрязненных нефтью; почве около горячих источников; филосфере и ризосфере растений; в рудных месторождениях и т. д. Широкая распространенность псевдомонад обеспечивается их способностью развиваться в самых разных условиях в природе, используя различные соединения углерода и азота в энергетическом и конструктивном обмене.

Среди псевдомонад много сапрофитов (*P. fluorescens*, *P. putida* и др.), но есть виды, патогенные для человека и животных (*P. aeruginosa*) и для растений (*P. syringae*, *P. cichorii*, *P. glycinea* и др.).

Метаболическое разнообразие бактерий рода *Pseudomonas* позволяет широко использовать их в народном хозяйстве:

- для борьбы с загрязнением окружающей среды, утилизацией ксенобиотиков (выступают как детоксиканты);
- производства микробного белка при выращивании бактерий на дешевых субстратах (спирты, ароматические соединения, углеводороды и др.);
- производства уникальных антибиотиков и изыскания новых антимикробных, противоопухолевых и противовирусных соединений;
- извлечения остаточной нефти из скважин и месторождений;
- производства аминокислот и витаминов на дешевых субстратах;
- защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенов. Бактерии-антагонисты из рода *Pseudomonas* используются в качестве средства

биологической борьбы с заболеваниями растений бактериальной и грибной этиологии.

9.4. Семейство *Enterobacteriaceae*

Семейство *Enterobacteriaceae* объединяет бактерии, которым присущи следующие признаки:

- отрицательная окраска по Граму;
- прямые палочки (0,3–1,8 мкм), подвижные за счет перитрихальных жгутиков или неподвижные, не образующие спор;
- оксидазоотрицательные и каталазоположительные (за исключением *Shigella dysenteriae*);
- катаболизм углеводов с образованием кислоты и газа или только кислоты;
- факультативные анаэробы, обладающие метаболизмом дыхательного и бродильного типа;
- восстанавливают нитраты в нитриты (кроме ряда видов родов *Erwinia*, *Yersinia* и *Pantoea*);
- хемоорганогетеротрофы, хорошо растущие на обычных питательных средах;
- не содержат цитохромоксидазу;
- некислотоустойчивые;
- большинство видов хорошо растет при температуре 37 °С, однако представители некоторых видов лучше осуществляют жизнедеятельность при 25–30 °С.

Семейство получило свое название *Enterobacteriaceae*, так как некоторые типичные его представители являются постоянными обитателями толстого кишечника млекопитающих и человека (от греч. *entero* – кишечник).

Семейство *Enterobacteriaceae* насчитывает более 30 родов и более 100 видов. Наибольший интерес для человека представляют роды *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Serratia*, *Hafnia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Providencia*, *Morganella*.

Энтеробактерии распространены повсеместно: их можно обнаружить в почве, воде, на фруктах, овощах, зерне, цветковых растениях и деревьях, в организмах животных (от червей и насекомых до млекопитающих) и человека. Входящие в это семейство микроорганизмы весьма разнообразны по особенностям экологии, кругу хозяев, а также патогенности для человека, животных, насекомых и растений.

Энтеробактерии с их типичным представителем *E. coli*, часто рассматривающимся как прототип бактерий вообще, являются объектами интенсивного исследования по следующим причинам.

1. Имеют медицинское и экономическое значение.

Ряд видов энтеробактерий вызывают желудочно-кишечные заболевания, включая брюшной тиф и бактериальную дизентерию. Кроме того, большинство видов энтеробактерий могут быть возбудителями разнообразных внекишечных инфекций, таких как бактериемия, менингит, инфекции мочевыводящих и дыхательных путей, а также раневые инфекции. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* являются причиной 50 % случаев внутрибольничных инфекций; наиболее часто их вызывает *E. coli*, представители родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* и вида *Serratia marcescens*.

Фитопатогенные виды бактерий рода *Erwinia* наносят значительный ущерб продукции сельского хозяйства, вызывая заболевания картофеля, капусты, огурцов, арбузов и др. Установлено, что в отдельных случаях при хранении картофеля 20–50 % урожая гибнет от поражения «мягкими» гнилями, возбудителями которых являются данные микроорганизмы. Они также вызывают заболевания вегетирующих растений, снижая урожайность сельскохозяйственных культур. Однако помимо вреда, который наносят бактерии рода *Erwinia*, они могут выступать в качестве продуцентов пектолитических ферментов, которые могут найти широкое применение в пищевой промышленности для осветления фруктовых и овощных соков, в промышленной мочке льна и др.

2. Быстро растут и размножаются. Например, время генерации бактерий *E. coli* в оптимальных условиях составляет 20 мин.

3. Не требуют для роста сложных сред.

4. Удобны для проведения генетических манипуляций, для них разработаны и осуществлены все способы генетического обмена.

Род *Escherichia* получил свое название в честь немецкого ученого Т. Эшериха, который в 1885 г. выделил из кишечника детей бактерии *E. coli*. Это типовой род семейства *Enterobacteriaceae*. Основные признаки рода: прямые палочки (1,1–1,5 × 2,0–6,0 мкм), перитрихи (или неподвижные), для многих представителей характерно образование капсул или микрокапсул, оптимальная температура для роста 37 °С, ферментируют лактозу с образованием кислоты и газа (или не сбраживают лактозу), цитратотрицательные, реакция Фогеса – Проскауэра (определяется продукция ацетона – промежуточного соединения при синтезе 2,3-бутан-диола) отрицательная, проба с метиловым красным (определяется количество кислоты, образуемой из углевода) положительная, не обра-

зуют H_2S , не гидролизуют мочевины, не обладают липазной активностью.

Бактерии рода *Escherichia* входят в состав нормальной микрофлоры толстого кишечника теплокровных животных, рыб и пресмыкающихся, а представители вида *E. blattae* обитают в кишечнике тараканов. Вместе с содержимым кишечника они могут попадать во внешнюю среду.

Род *Escherichia* представлен семью видами. Типовой вид – *Escherichia coli* (кишечная палочка).

Бактерии *E. coli* – факультативные анаэробы, хорошо растут на обычных питательных средах. Температурный оптимум для роста 37 °С, но способны к росту в диапазоне температур от 10 до 45 °С, с оптимальным значением pH 7,2–7,5. Используют ацетат в качестве единственного источника углерода. Образуют индол из триптофана. Ферментируют лактозу с образованием кислоты и газа. На дифференциально-диагностических средах, содержащих лактозу, формируют окрашенные колонии (на среде Эндо – темно-малиновые с металлическим блеском; на среде Левина – темно-синие с металлическим блеском; на среде ЕМВ – фиолетовые с металлическим блеском) (рис. 95). Не нуждаются в дополнительных факторах роста.



Рис. 95 . Рост бактерий *E. coli* на среде ЕМВ

Бактерии *E. coli* используются в международных стандартах как санитарный показатель фекального загрязнения питьевой воды и пищевых продуктов. Основанием для этого послужил тот факт, что в фекалиях вместе с кишечной палочкой могут присутствовать и патогенные микроорганизмы, поэтому чтобы не применять специальных трудоемких методов для их выявления, пользуются показателем общего загрязнения. Таким индикатором и являются бактерии *E. coli* – постоянные обитатели толстого кишечника, обнаружение которых указывает на то, что среда загрязнена содержимым кишечника и кишечными бактериями, среди которых могут быть и патогенные формы. Санитарными показателями питьевой воды и пищевых продуктов служат коли-титр и коли-индекс.

Коли-титром называется наименьший объем воды в миллилитрах, содержащий одну клетку кишечной палочки. Для водопроводной воды коли-титр должен быть не менее 333 мл. **Коли-индекс** – количество клеток бактерий *E. coli* в 1 л. Для водопроводной воды коли-индекс составляет не более 2–3 кл/л.

Бактерии *E. coli*, являясь условно-патогенными микроорганизмами, в определенных условиях могут вызывать различные заболевания: кишечные инфекции (диареи), поражения мочевыводящих путей, бактериемии, менингиты, гнойные воспаления и др. Факторами вирулентности патогенных бактерий *E. coli* являются ворсинки, или фимбриальные факторы, которые облегчают адгезию к эпителию и способствуют колонизации нижних отделов тонкого кишечника, термолабильный и термостабильный энтеротоксины (стимулируют гиперсекрецию клетками кишечника жидкости, содержащей ионы Na^+ , K^+ , Cl^- , бикарбонаты, что приводит к нарушению водно-солевого обмена и развитию диареи), эндотоксины (являются причиной эндотоксикоза).

Pod Shigella назван в честь К. Шига, впервые описавшего его типовой вид *Shigella dysenteriae*, который является возбудителем дизентерии. Позже были обнаружены и другие возбудители дизентерии: *Shigella flexneri* (выделены С. Флекснером), *Shigella sonnei* (выделены К. Зонне), *Shigella boydii* (выделены Дж. Бойдом).

Бактерии рода *Shigella* представляют собой короткие неподвижные палочки, не образующие спор и капсул. Шигеллы не образуют H_2S ; глюкозу и другие углеводы ферментируют с образованием кислоты без газа; как правило, не ферментируют лактозу (за исключением шигелл Зонне), реакция Фогеса – Проскауэра отрицательная. Температурный оптимум для роста шигелл 37 °С, выше 45 °С они не растут. Оптимальное значение pH для роста 6,7–7,2.

Международная классификация шигелл построена с учетом биохимических признаков и особенностей антигенной структуры. Чтобы отличить от других шигелл бактерии вида *S. sonnei*, часто достаточно провести следующие биохимические тесты (табл. 13).

Однако различить виды *S. dysenteriae*, *S. flexneri* и *S. boydii* только по биохимическим признакам невозможно. Для надежной идентификации видов шигелл необходимо типирование по соматическим антигенам. У шигелл обнаружены различные по специфичности соматические антигены (О-антигены): общие для семейства *Enterobacteriaceae*, родовые, видовые, групповые и типоспецифические. В классификации шигелл учитываются в основном групповые и типоспецифические О-антигены. В соответствии с этими признаками род *Shigella* включает 44 серотипа.

Таблица 13

Биохимические отличия *Shigella sonnei* от других шигелл

| Тест | <i>S. sonnei</i> | Другие шигеллы |
|-----------------------------------|------------------|----------------|
| Образование индола | — | <i>d</i> |
| Орнитиндекарбоксилаза | + | — |
| Образование кислоты из раффинозы | — | <i>d</i> |
| Образование кислоты из L-рамнозы | + | — |
| o-Нитрофенил-β-D-галактопиранозид | + | — |

Примечание: *d* – 25–75 % штаммов положительные.

Большинство штаммов рода *Shigella* продуцирует специфические бактериоцины, что наряду с чувствительностью к известным бактериоцинам учитывается при идентификации до вида. Для этого имеются наборы типовых и индикаторных штаммов шигелл, а также набор эталонных бактериоциногенных штаммов.

Бактериальная дизентерия распространена повсеместно. Единственным природным резервуаром шигелл является человек. Источник инфекции – больные люди и бактерионосители. Никакие животные в природе дизентерией не болеют. Основные способы передачи шигелл – фекально-оральный и контактно-бытовой (через воду, пищевые продукты). Определенную роль играют насекомые (мухи, тараканы и др.), переносящие возбудителей на пищевые продукты.

Факторами вирулентности бактерий рода *Shigella* можно считать наличие ворсинок; специфические свойства белков и липополисахаридов наружной мембраны; образование ферментов, разрушающих слизь, – нейраминидазы, гиалуронидазы; синтез муциназы (обеспечивает адгезию и колонизацию на клетках слизистой оболочки толстого кишечника – фактор инвазивности); продукцию экзотоксинов (цитотоксинов Шига), вызывающих гибель клеток и приток жидкости в очаг поражения; образование эндотоксинов, обеспечивающих интоксикацию организма.

Pod Salmonella назван в честь ученого Д. Сальмона, который выделил одного из возбудителей пищевой токсикоинфекции, известного в настоящее время как *Salmonella choleraesuis*.

Ключевые признаки рода *Salmonella* следующие: короткие прямые палочки с закругленными концами (0,7–1,5 × 2–5 мкм), в большинстве случаев подвижны (перитрихи), спор и капсул не имеют, образуют при ферментации глюкозы (и ряда других углеводов) кислоту и газ (за исключением *S. typhi* и некоторых других серотипов), в основном образуют

H₂S, дают отрицательную реакцию Фогеса – Проскауэра, не ферментируют лактозу (кроме *S. arizonae* и *S. diarizonae*).

Род *Salmonella* состоит из двух видов – *S. bongori* и *S. choleraesuis*. Типовой вид *S. choleraesuis* объединяет бактерии подвидов: *choleraesuis*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* и *indica*.

Сальмонеллы различаются по антигенной структуре. Они имеют различные соматические и жгутиковые антигены. В настоящее время количество серотипов сальмонелл достигло более 2500. Большая часть известных серотипов включает в себя подвид *choleraesuis*. Для удобства дальнейшего изложения материала будем пользоваться исторически сложившейся таксономией бактерий, которая рассматривает серотипы (серовары) как виды (например, *S. typhi* вместо *S. choleraesuis* подвид *choleraesuis* серовар *typhi*).

Сальмонеллы обладают достаточно высокой устойчивостью к факторам внешней среды и поэтому могут длительно сохраняться в природе. В воде открытых водоемов и питьевой воде они могут выживать 11–120 суток, в морской воде – 15–30, на овощах и фруктах – 5–10 суток, в масле, сыре – до 3 месяцев, в яйцах и замороженном мясе – до 13, в почве – до 9 месяцев, в комнатной пыли – 80–540 суток. Нагревание при температуре 70 °С сальмонеллы выдерживают в течение 30 мин.

Основные заболевания, вызываемые сальмонеллами (сальмонеллезы), можно условно разделить на три группы: брюшной тиф и паратифы, гастроэнтериты (пищевые токсикоинфекции) и септицемии. Брюшной тиф (возбудитель – *S. typhi*) и паратиф А (возбудитель – *S. paratyphi A*) – типичные антропонозные инфекции (заболевания, характерные только для человека). Остальные заболевания, вызываемые сальмонеллами, характерны как для человека, так и для животных. Возбудителями паратифа В являются бактерии *S. schotmuleri*; паратифа С – *S. hirschfeldii*; гастроэнтеритов – *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* и др.

Источником брюшного тифа и паратифа А является только человек, больной или бактерионоситель. Источником паратифа В и С, кроме человека, могут быть и животные, в том числе птицы. Механизм заражения – фекально-оральный. Наиболее опасными источниками пищевых токсикоинфекций являются животные, страдающие сальмонеллезом. Вспышки токсикоинфекций чаще всего связаны с употреблением мяса, инфицированного сальмонеллами (до 70–75 %). У ослабленных животных сальмонеллы легко проникают из кишечника в кровь, а через нее – в мышцы, обуславливая прижизненное инфицирование мяса. Большую роль в эпидемиологии сальмонеллезом играют водоплавающие птицы и их яйца, а также куры, их яйца и другие птицепродукты. Сальмонеллы

могут попасть в яйцо непосредственно во время его развития, но могут легко проникать и через неповрежденную скорлупу. На долю яиц и птицепродуктов приходится более 10 %, молока и молочных продуктов – около 10 % и на долю рыбопродуктов – около 3–5 % вспышек сальмонеллезов.

В настоящее время наблюдается рост заболеваемости людей и животных сальмонеллезами. Одной из основных причин этого – инфицирование пищевых продуктов при производстве в результате широкого распространения сальмонелл на объектах внешней среды и на обрабатывающих предприятиях, куда поступают животные, у которых сальмонеллез протекает в скрытой форме. Одной из главных причин широкой циркуляции сальмонелл среди животных является корм, содержащий переработанные побочные продукты животного происхождения и очень часто зараженный сальмонеллами.

Как факторы вирулентности возбудителей брюшного тифа и паратифов рассматриваются их способность противостоять фагоцитозу и размножаться в клетках лимфоидной системы, наличие антигена вирулентности (Vi-антиген, состоящий из трех фракций, основная из которых – N-ацетилгалактозаминоуроновая кислота с молекулярной массой 10 МД), образование эндотоксина.

Факторами вирулентности сальмонелл – возбудителей пищевых токсикоинфекций являются факторы адгезии и колонизации на клетках слизистой оболочки кишечника, эндотоксин, термолабильные и термостабильные энтеротоксины, шигаподобные цитотоксины.

Название *poda Klebsiella* дано в честь немецкого бактериолога Э. Клебса, впервые обнаружившего эти бактерии в тканях больных, погибших от пневмонии. Бактерии рода *Klebsiella*, в отличие от представителей подавляющего большинства родов энтеробактерий, обладают способностью образовывать макрокапсулу. Клетки клебсиелл имеют форму толстых коротких палочек с закругленными концами, размером 0,3–1,0 × 0,6–6,0 мкм и расположены одиночно, в парах или коротких цепочках. Жгутики отсутствуют, спор не образуют.

Клебсиеллы ферментируют углеводы с образованием кислоты или кислоты и газа, восстанавливают нитраты до нитритов. По образованию индола, пробе с метиловым красным, реакции Фогеса – Проскауэра, а также по способности расти на среде Симмонса с цитратом виды клебсиелл варьируют. Некоторые штаммы бактерий вида *K. pneumoniae* способны фиксировать молекулярный азот.

Бактерии рода *Klebsiella* широко распространены в природе: почве, воде, на овощах, фруктах, в фекалиях человека и клиническом материа-

ле. Их постоянно обнаруживают на коже и слизистых оболочках человека и животных. Клебсиеллы находят в почвах пустынь, воде антарктических озер, древесине деревьев, стоках текстильной промышленности, сахарном тростнике и др. Такое широкое распространение бактерий рода *Klebsiella* связывают с наличием полисахаридной капсулы.

В настоящее время род *Klebsiella* включает четыре вида – *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. oxytoca* и типовой вид *K. pneumoniae*, который подразделяется на три подвида: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* и *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Основную роль в патологии человека играет вид *Klebsiella pneumoniae*, остальные виды мало изучены и роль их в патологии человека уточняется. Штаммы вида *K. pneumoniae* известны как возбудители заболеваний дыхательных путей: пневмонии, озы (поражение и атрофия слизистой оболочки носа и его придаточных пазух, сопровождающиеся выделением вязкого зловонного секрета), риносклеромы (поражение не только слизистой оболочки носа, но и трахеи, бронхов, глотки, гортани, при этом в пораженной ткани развиваются специфические гранулемы с последующим склерозированием и развитием хрящевых инфильтратов). Кроме того, клебсиеллы вызывают заболевания суставов, мозговых оболочек, позвоночника, глаз, мочеполовых органов, а также желудочно-кишечные заболевания, сепсис и гнойные послеоперационные осложнения. Клебсиеллы – возбудители внутрибольничных инфекций, заболеваний новорожденных. Они также вызывают маститы, сестимии и пневмонии у крупного рогатого скота, свиней, лошадей и обезьян.

Заражение клебсиеллами возможно как экзогенным, так и эндогенным путем. Наиболее частые пути передачи – пищевой, воздушно-капельный и контактно-бытовой. Факторами передачи чаще всего являются пищевые продукты (особенно мясные и молочные), вода, воздух. В последние годы частота клебсиеллезов возросла, одна из причин этого – повышение патогенности возбудителя в связи со снижением резистентности организма человека. Этому способствует также широкое использование антибиотиков, изменяющих нормальное соотношение микроорганизмов в естественном биоценозе, иммунодепрессантов и т. д.

Основными факторами вирулентности клебсиелл являются К-антиген (капсульный антиген), подавляющий фагоцитоз, и эндотоксин. Помимо них, бактерии *K. pneumoniae* могут продуцировать термолабильный энтеротоксин – белок, по механизму действия подобный токсину энтеротоксигенной кишечной палочки. Определенный вклад в патогенность клебсиелл вносит их сидерофорная активность, в результате чего связываются ионы Fe^{2+} и снижается их содержание в тканях. У клебсиелл

выявлены хелаторы железа энтеробактин (энтерохелин) и аэробактин. Факторами адгезии клебсиелл к эпителиальным клеткам являются фимбрии и поверхностные белки, синтез которых детерминируется плазмидными генами.

Род Yersinia назван в честь французского ученого А. Иерсена, который открыл возбудителя чумы в 1894 г. Бактерии рода *Yersinia* – прямые палочки, иногда приобретающие сферическую форму, диаметром 0,5–0,8 и длиной 1–3 мкм. Неподвижные при 37 °С, но при температуре ниже 30 °С подвижные за счет перитрихальных жгутиков; исключение составляют некоторые штаммы бактерий вида *Y. ruckeri* и вид *Y. pestis*, представители которого всегда неподвижны. У бактерий рода *Yersinia* проба с метиловым красным обычно положительная, реакция Фогеса – Проскауэра отрицательная; H₂S не образуют. Восстанавливают нитраты.

Иерсинии широко распространены в природе; некоторые из них – паразиты различных животных (особенно грызунов и птиц) и человека; их также выделяют из почвы, воды, молочных и других пищевых продуктов.

Род *Yersinia* включает 11 видов, три из них патогенны для человека: *Y. pestis* (типовой вид), *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*; патогенность остальных видов бактерий пока еще не ясна.

Бактерии *Y. pestis* – возбудители чумы, болезни, главным образом, диких грызунов. Переносчиками бактерий *Y. pestis*, распространяющими возбудителей среди диких грызунов, служат блохи, в которых бактерии размножаются, закупоривая пищевод и глотку. При очередном кровососании блохи отгрызают бактерии и при этом могут передавать возбудителей, если не находят других хозяев, человеку. В результате укуса инфекционных блох у человека развивается типичная бубонная форма чумы и может возникнуть вторичная пневмония. При воздушно-капельной передаче инфекции возможно появление первичной легочной чумы.

Бактерии *Y. pestis* обладают высокой инвазивностью, агрессивностью и токсигенностью, поэтому вызывают тяжелое заболевание. Факторами вирулентности являются ворсинки адгезии, капсула (угнетает активность макрофагов), «мышинный» токсин (блокирует процесс переноса электронов в митохондриях сердца и печени, поражает тромбоциты и сосуды и нарушает их функции), эндотоксин и другие компоненты клеточной стенки (обладают токсическим и аллергическим действием), фибринолизин, плазмокоагулаза, нейраминидаза, аденилатциклаза, аминоксипептидазы, термоиндуцибельные белки наружной мембраны (Yop-белки – подавляют активность фагоцитов) и др. Значительная часть факто-

ров вирулентности бактерий *Y. pestis* контролируется генами локализованными в рУР-плазмидах.

Бактерии *Y. pseudotuberculosis* патогенны для многих видов животных (грызуны, олени, домашние животные и птицы). Заболевания человека наблюдаются сравнительно редко. Большая часть случаев зарегистрирована в Европе у подростков; пик заболеваемости – зимние месяцы. Бактерии *Y. pseudotuberculosis* вызывают лимфаденит, хроническое желудочно-кишечное расстройство и тяжелую септицемию.

Основное поражение, вызываемое бактериями *Y. enterocolitica* – иерсиниоз, – инфекция, сопровождающаяся диареей, энтеритом, псевдоаппендицитом и (иногда) септициемией или острым артритом. Возбудитель широко распространен в природе, его выделяют от насекомых, моллюсков, ракообразных, птиц, грызунов, собак, кошек, домашних сельскохозяйственных животных (основные хозяева). Бактерии *Y. enterocolitica* можно также обнаружить в воде многих рек и озер. Инфицирование человека происходит фекально-оральным путем. Подъем заболеваемости отмечают в осенне-зимний сезон. В Европе основной резервуар – свиньи, большинство достоверных случаев заражения связаны с употреблением недостаточно термически обработанной свинины. Большинство случаев, зарегистрированных в Японии, связано с употреблением в пищу рыбы и ракообразных.

Бактерии *Y. ruckeri* вызывают «болезнь красного рта» у рыб (основной хозяин – радужная форель).

Род *Enterobacter* объединяет прямые подвижные (за счет перитрихальных жгутиков) палочки размерами 1,2–3,0 × 0,6–1,0 мкм. Бактерии вида *E. asburiae* неподвижны. Клетки бактерий рода *Enterobacter* имеют полисахаридную капсулу.

Бактерии рода *Enterobacter* ферментируют глюкозу и некоторые другие углеводы с образованием кислоты и газа. Индол, H₂S не образуют. У большинства штаммов реакция Фогеса – Проскауэра положительная. Проба с метиловым красным варьирует. Утилизируют цитрат.

Род насчитывает 13 видов. Типовой вид – *E. cloacae*. Бактерии рода *Enterobacter* широко распространены в природе: встречаются в пресной воде, почве, сточных водах, на растениях, овощах, а также в фекалиях человека и животных. Доказана патогенность энтеробактеров для некоторых насекомых (например, саранчи). Вопрос о патогенности энтеробактеров для человека длительное время оставался открытым. Однако в 1970–1980-е годы, установлено, что они редко вызывают самостоятельные инфекции, но часто поражают пациентов, особенно получающих антибиотики широкого спектра, в стационарах. Показано, что энтеробакте-

ры вызывают до 10–15 % госпитальных бактериемий. Несколько реже они инфицируют ожоговые и хирургические раны, а также вызывают поражения мочеполовой и дыхательной систем. Установлено, что из шести видов энтеробактеров, выделяемых из организма человека (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. sakazakii*, *E. gergoviae*, *E. amnigenus*, *E. tayloraе*), поражения наиболее часто вызывают первые два вида. Основные факторы патогенности – наличие микроворсинок, облегчающих колонизацию, и эндотоксина.

Бактерии *рода Citrobacter* прямые подвижные (перитрихи) палочки размером 2–6 × 1,0 мкм. Род объединяет группу родственных бактерий, названных так благодаря их способности утилизировать цитрат натрия в качестве единственного источника углерода и образовывать триметиленгликоль из глицерина. Цитробактеры катаболизируют глюкозу и другие углеводы с образованием кислоты и газа. Дают положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную реакцию Фогеса – Проскауэра. Восстанавливают нитраты. Утилизируют соли органических кислот – мукаты и тартраты.

Род *Citrobacter* включает три вида: *C. amolonaticus*, *C. diversus* и *C. freundii* (типовой вид).

Цитробактеры выделяют из воды, почвы, фекалий животных и человека. Некоторые виды входят в состав нормальной кишечной микрофлоры. Большинство представителей цитробактеров не патогенны для человека, но некоторые способны вызывать вспышки гастроэнтеритов и пищевых токсикоинфекций. У людей чаще обнаруживают бактерии вида *C. freundii*. Механизмы передачи возбудителя – фекально-оральный и контактный. Тем не менее, наибольшую значимость приобрели госпитальные поражения желче- и мочевыводящих путей, отиты и остеомиелиты, особенно у ослабленных пациентов и новорожденных, обусловленные горизонтальной передачей через руки медперсонала. Часто наблюдают бактериемии, эндокардиты и поражения дыхательных путей. Кроме того, бактерии вида *C. diversus* являются частыми возбудителями менингитов и абсцессов центральной нервной системы. Основные факторы патогенности цитробактеров – микроворсинки, поверхностный белок адгезии (факторы инвазивности) и эндотоксин.

Бактерии *рода Proteus* впервые выделены в 1885 г. из гниющего мяса. В основу названия рода легла способность его представителей менять внешнее проявление роста на плотных средах (в честь сына Посейдона – водяного божества Протея, способного менять свой облик).

Бактерии рода *Proteus* – прямые подвижные (перитрихи) палочки размерами 1–3 × 0,4–0,8 мкм, капсул не имеют (рис. 96).

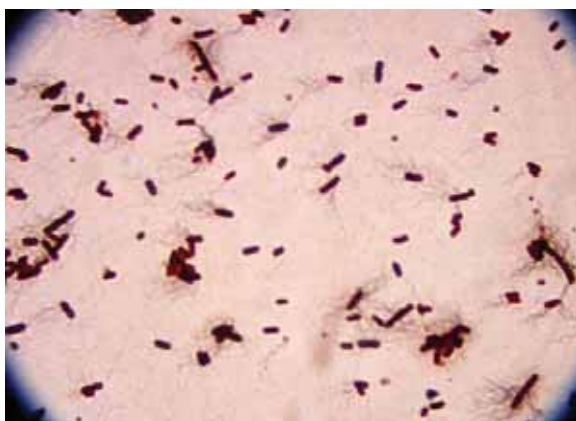


Рис. 96. Микрофотография бактерий *Proteus vulgaris*
(http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Microbiology/Prepared_Slides/)

Протеям в наибольшей степени (по сравнению с другими энтеробактериями) свойственен полиморфизм с образованием нитевидных и кокковидных форм. Подвижность более выражена при температуре 20–22 °С. Для большинства штаммов рода *Proteus* характерен «феномен роения» на плотных питательных средах (образование концентрических колец роста по периферии центральной колонии или однородной пленки на влажной поверхности питательной среды) (рис. 97). «Феномен роения» можно подавить добавлением в питательную среду NaCl, мочевины, карболовой кислоты, солей желчных кислот и др.



Рис. 97. Рост бактерий *Proteus mirabilis* на питательной среде

Протеи катаболизируют глюкозу и немногие другие углеводы с образованием кислоты и обычно газа. Восстанавливают нитраты, гидролизуют мочевины, расщепляют тирозин, растут на средах с KCN, дезаминируют фенилаланин и триптофан. По образованию индола, реакции Фоге-

са – Проскауэра виды различаются. Обычно образуют H_2S . Малонат не используют.

Род *Proteus* включает четыре вида: *P. mirabilis*, *P. mxyofaciens*, *P. penneri*, *P. vulgaris* (типовой вид).

Бактерии рода *Proteus* обитают в кишечнике многих видов позвоночных и беспозвоночных животных (например, *P. mxyofaciens* в кишечнике гусениц шелкопряда непарного), в почве, сточных водах и разлагающихся органических остатках. Патогенны для человека и вызывают инфекции мочевыводящих путей, а также вторичные септические поражения у пациентов с ожогами и после хирургических вмешательств. Факторы патогенности многочисленны, важнейшие из них – способность к «роеванию», ворсинки, гемолизины, гемагглютинины, ферменты протеазы и уреазы.

Бактерии *рода Providencia* ранее относили к роду *Proteus*, но выявленные биохимические отличия (неспособность образовывать H_2S , ферментировать глюкозу с образованием газа, инертность к различным углеводам – мальтозе, трегалозе, сахарозе, ксилозе и др.), а также исследования ДНК послужили основанием для выделения бактерий в отдельный род.

Бактерии рода *Providencia* – прямые подвижные (перитрихи) палочки размерами $0,6\text{--}0,8 \times 1,5\text{--}2,5$ мкм.

Температурный оптимум для роста бактерий рода *Providencia* – 37°C . Глюкозу и другие углеводы катаболизируют с образованием кислоты. Образуют индол (за исключением *P. heimbachae*), обычно дают положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную Фогеса – Проскауэра. Малонат не используют. Не образуют лизин- и орнитиндекарбоксилазу, а также аргининдегидролазу. Осуществляют окислительное дезаминирование триптофана. Разлагают тирозин, вызывая просветление агаризованной среды, содержащей эту нерастворимую аминокислоту.

Род *Providencia* состоит из пяти видов: *P. alcalifaciens* (типовой вид), *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii*, *P. stuartii*.

До 25 % изолятов бактерий вида *P. stuartii* и до 40 % штаммов вида *P. rettgeri* могут давать «феномен роения». Установлено, что значительно большее число штаммов способно к роению после инкубирования при температуре 30°C или при снижении плотности агара (1,3 %). Для роения провиденций характерно образование полиморфных структур (в виде деревьев, протуберанцев), но не классических концентрических кругов.

Природный резервуар провиденций – человек (основной) и пингвины. Все виды выделяют из фекалий при диарее, из мочи при инфекциях

мочевыводящих путей, из гнойного отделяемого ран, ожоговых поражений, а также из крови. Полагают, что практически все Providencia проявляют патогенность, хотя ее степень достаточно низка.

Бактерии *rod* ***Morganella*** открыл Х. Морган, ранее они входили в род *Proteus*, однако некоторые биохимические свойства и особенности гомологии ДНК послужили основанием для выделения их в отдельный род. Признаки, отличающие бактерии рода *Morganella* от родов *Proteus* и *Providencia*, приведены в табл. 14. Род *Morganella* образуют прямые подвижные (перитрихи) палочки размерами 1,0–1,7 × 0,6–0,7 мкм, «феномен роения» не дают.

Таблица 14

**Отличительные признаки бактерий группы
*Proteus – Providencia – Morganella***

| Тест | <i>Proteus</i> | <i>Providencia</i> | <i>Morganella</i> |
|---|-----------------------------|--------------------------|-------------------|
| Образование H ₂ S | + | – | – |
| | Кроме <i>P. myxofaciens</i> | | |
| Образование индола | – | + | + |
| | Кроме <i>P. vulgaris</i> | | |
| Феномен истинного роения | + | – | – |
| Гидролиз желатины | + | – | – |
| Гидролиз мочевины | + | + | + |
| | | Кроме <i>P. stuartii</i> | |
| Липазная активность | + | – | – |
| Образование кислоты из: маннозы и ксилозы | ± | ± | ± |

Температурный оптимум для роста бактерий рода *Morganella* – 37 °С. Глюкозу и другие углеводы катаболизируют с образованием кислоты и обычно газа. Реакция Фогеса – Проскауэра отрицательная. Образуют индол, не образуют лизиндекарбоксилазу и аргининдегидролазу, но синтезируют орнитидекарбоксилазу. Дезаминируют фенилаланин и триптофан (что сближает их с бактериями родов *Proteus* и *Providencia*), синтезируют уреазу, H₂S не образуют, восстанавливают нитраты, растут на средах с KCN.

Род *Morganella* состоит из одного вида – *M. morganii* с подвидами *morganii* и *sibonii*.

Бактерии вида *M. morganii* выделяют из фекалий различных млекопитающих (включая человека) и рептилий, а также из воды. Ассоциированы с желудочно-кишечными заболеваниями у человека, но как возбудители не определены.

Род *Hafnia* включает один вид – *Hafnia alvei*. Это прямые подвижные (перитрихи) палочки размерами $2\text{--}5 \times 0,5\text{--}1$ мкм (также существуют и неподвижные штаммы).

Температурный оптимум для роста бактерий рода *Hafnia* составляет $30\text{--}37$ °С. Глюкозу и некоторые углеводы сбраживают с образованием кислоты и газа. Индол, H_2S и уреазу не образуют. Большое число изолятов дают положительные реакции с метиловым красным и Фогеса – Проскауэра при температуре 22 °С. Растут на средах с KCN, гидролизуют эскулин. По лизин- и орнитиндекарбоксилазе положительные; по аргининдегидролазе отрицательные. Восстанавливают нитраты. Некоторые изоляты (до 30 %) продуцируют бактериоцины.

Бактерии рода *Hafnia* обнаруживают в сточных водах, почве, воде и пищевых продуктах, фекалиях человека, различных животных и птиц. У ослабленных пациентов могут вызывать спорадические оппортунистические инфекции, локализованные обычно в крови, мочевых путях или ранах.

Название **рода *Serratia*** связывают с именем лодмана Серафино Соррати. Род образуют прямые подвижные (перитрихи) палочки размерами $0,9\text{--}2,0 \times 0,5\text{--}0,8$ мкм, отдельные штаммы имеют капсулу.

Температурный оптимум для роста серраций составляет $25\text{--}30$ °С. Глюкозу и другие углеводы ферментируют с образованием кислоты и часто газа. Образуют индол из триптофана (исключая некоторые штаммы вида *S. adorifera*), дают положительную реакцию Фогеса – Проскауэра (исключая представителей вида *S. fonticola*). Образуют лизин- и орнитиндекарбоксилазу, но не синтезируют аргининдегидролазу. Не выделяют H_2S , не утилизируют малонат. Восстанавливают нитраты.

Род *Serratia* состоит из 11 видов. Типовой вид – *Serratia marcescens*. Бактерии этого вида называют «чудесной палочкой» или «палочкой чудесной крови» из-за ярко-красного пигмента продигиозина, который они синтезируют (рис. 98).



Рис. 98. Рост бактерий *Serratia marcescens* на питательной среде

Бактерии рода *Serratia* распространены повсеместно в окружающей среде, их выделяют из почвы, воды, воздуха, с растений, а также из испражнений насекомых и грызунов. Серрации, особенно *S. marcescens*, ранее считали непатогенными. Однако в 1960-е годы была установлена их способность вызывать бактериемии у пациентов стационаров и наркоманов. Позднее выяснилось, что у взрослых людей бактерии чаще колонизируют мочевыводящие и воздухоносные пути, а у детей – желудочно-кишечный тракт. Бактерии вида *S. marcescens* вызывают до 10 % случаев госпитальных бактериемий и пневмоний, 5 % инфекций мочевыводящих путей, хирургических ран и гнойничковых поражений кожи. Важный момент – способность данных бактерий к горизонтальной передаче через руки медицинского персонала. Наиболее часто серрации проникают в организм через постоянные катетеры, а также через препараты и растворы для внутривенных вливаний. У наркоманов, вводящих препараты внутривенно, часто наблюдают септические артриты, эндокардиты и остеомиелиты. Серрации также вызывают мастит у коров и другие инфекции у животных.

Факторы патогенности бактерий рода *Serratia* изучены плохо. Ими являются фимбрии, гемолизины (присутствуют у штаммов, колонизирующих почечную ткань), внеклеточные протеазы (вызывают появление кровоизлияний на коже и слизистых оболочках, поражения глаз), термолабильный цитотоксин. Определенный вклад в патогенез вносит сидерофорная система (представлена энтеробактином и реже – аэробактином), обуславливающая поглощение ионов Fe^{2+} из крови и тканей.

Род *Edwardsiella* объединяет мелкие подвижные (перитрихи) палочки размерами $1 \times 2-3$ мкм. Температурный оптимум – $37^\circ C$, исключая бактерии вида *E. ictaluri*, теряющие подвижность при $37^\circ C$ (подвижны при $25^\circ C$). По сравнению с другими энтеробактериями, эдвардсиеллы проявляют большую инертность к углеводам, но ферментируют глюкозу, арабинозу, маннит, трегалозу, мальтозу и маннозу с образованием кислоты и газа. Реакция Фогеса – Проскауэра отрицательная. Восстанавливают нитраты, проявляют лизин- и орнитиндекарбоксилирующую активность.

Род *Edwardsiella* включает три вида: *E. hoshinae*, *E. ictaluri*, *E. tarda*. Типовой вид – *E. tarda*.

Эдвардсиеллы имеют ограниченное распространение в природе и сравнительно небольшую группу хозяев. Чаще они встречаются в кишечнике у пойкилотермных животных и в их среде обитания, особенно в пресной воде, но обнаружены также и у гомойотермных животных и человека. Патогенны для угрей, зубаток и других животных. Большая часть поражений у человека обусловлена контактами с пресной и соленой во-

дой, а также с животными, обитающими в этих водоемах либо использующими их в качестве водопоя. Патогенными для человека являются лишь бактерии вида *E. tarda*. Их естественным резервуаром могут быть различные моллюски, морские ежи, рыбы, рептилии, птицы и млекопитающие (включая коров, свиней, собак, обезьян, леопардов и т. д.). У человека бактерии *E. tarda* способны вызывать гастроэнтериты, бактериемии, раневые инфекции и реже – перитониты, поражения желче- и мочевыводящих путей.

Основными факторами патогенности бактерий *E. tarda* являются инвазивные свойства, β -гемолизин и термостабильный энтеротоксин (продуцируется только некоторыми штаммами и обуславливает развитие диарейных синдромов).

Род *Erwinia* назван в честь американского фитопатолога Эрвина Смита, сыгравшего выдающуюся роль в создании учения о бактериозах.

Бактерии рода *Erwinia* – прямые палочки размерами 0,5–1,0 × 1–3 мкм, одиночные, в парах и иногда в коротких цепочках. Подвижные за счет перитрихальных жгутиков (за исключением *E. stewartii*).

Оптимальная температура для роста бактерии рода *Erwinia* составляет 27–30 °С. Катаболизируют глюкозу и другие углеводы с образованием кислоты; газ большинство видов не образуют. Реакция Фогеса – Проскауэра положительная. По лизин- и орнитиндекарбоксилазе, а также аргининдегидролазе отрицательные. Нитраты большинство видов не восстанавливают. Как источники углерода и энергии используют ацетат, глюконат, малат, сукцинат и фумарат, но не бензоат, оксалат или пропионат.

Род *Erwinia* состоит из 17 видов. Типовой вид – *Erwinia amylovora* (возбудитель бактериального ожога плодовых). Бактерии этого вида нуждаются для роста в никотиновой кислоте.

Представители рода *Erwinia* являются паразитами, сапрофитами или составной частью эпифитной микрофлоры растений. Фитопатогенные бактерии этого рода могут вызывать некрозы, ожоги и увядания, а также типичные «мокрые» или «мягкие» гнили, которые относятся к паренхиматозным, сосудистым и гиперпластическим заболеваниям. Например, бактерии вида *E. ananas* вызывают гниль плодов ананасов; *E. carotovora* – «мягкую» и «мокрую» гниль запасных тканей у большого числа растений, а также «черную ножку» у вегетирующих растений картофеля; *E. chrysanthemi* – сосудистый вилт и некрозы различных растений, в том числе хризантем; *E. cypripedii* – коричневую гниль орхидей; *E. rhapontici* – гниль ревеня и гиацинтов, порчу зерна пшеницы; *E. nigrifluens* – некрозы грецкого ореха; *E. salicis* – сосудистый вилт ив; *E. quercina* – ожог

листьев дубовых; *E. maelotivora* – опадание листьев малотуса японского (сем. Молочайные); *E. tracheiphila* – сосудистое увядание тыквенных; *E. stewartii* – сосудистый вилт кукурузы; *E. rubrifaciens* – некрозы флоры грецкого ореха; *E. uredovora* – уничтожает плодовые тела ржавчинных грибов.

Факторами патогенности фитопатогенных бактерий рода *Erwinia* являются пектолитические, целлюлолитические ферменты, экзотоксины и слизистые вещества полисахаридной природы.

Род *Pantoea* – самый новый род семейства *Enterobacteriaceae*. Его образуют бактерии, ранее относящиеся к видам *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*.

Бактерии рода *Pantoea* – прямые палочки размерами 0,5–1,0 × 1–3 мкм. Подвижные за счет перитрихальных жгутиков. Большинство образуют желтый внутриклеточный нерастворимый в воде пигмент.

Оптимальная температура для роста бактерий рода *Pantoea* – 30 °С. Катаболизируют глюкозу и другие углеводы с образованием кислоты, но не газа. Реакция Фогеса – Проскауэра положительная. H₂S не образуют. Не синтезируют лизиндекарбоксилазу. Восстанавливают нитраты.

Род *Pantoea* состоит из двух видов: *P. agglomerans* (типовой вид; ранее – *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*) и *P. dispersa*.

Бактерии рода *Pantoea* выделены с поверхности растений, семян, из почвы и воды, а также из отделяемого ран, конъюнктивы, абсцессов, крови и дыхательных путей человека и животных. Патогенные свойства изучены плохо.

В заключение следует отметить, что энтеробактерии, наряду с псевдомонадами, рассматриваются как наиболее типичные представители протеобактерий.

9.5. Спирохеты

Спирохеты – это грамотрицательные спирально завитые одноклеточные бактерии с одним или большим числом полных витков спирали (рис. 99).

Могут встречаться в цепочках, объединенных внешней оболочкой. Клеточная стенка спирохет не ригидная, а чрезвычайно гибкая. В сравнении с длиной толщина клетки мала и поэтому спирохеты проходят через мелкопористые фильтры (диаметр пор 0,2–0,45 мкм), задерживающие большинство бактерий. Используя фильтрацию, можно получать накопительные культуры спирохет.



Рис. 99. Микрофотография бактерий *Borrelia burgdorferi*
(из <http://dwb.unl.edu/.../Bact303/MajorGroupsOfProkaryotes>)

Клетки спирохет состоят из спирально извитого протоплазматического цилиндра, обвитого нитями, которые по отдельности называются **аксиальными** или **осевыми фибриллами**, а в совокупности – **аксостилем**. Протоплазматический цилиндр благодаря пептидогликану имеет постоянную спиралевидную форму, образуя первичные завитки. Их число, тип, шаг, высота, угол наклона варьируют у разных видов и играют важную систематическую роль. Вторичные завитки у спирохет образуются в результате изгиба всего тела. Каждая аксиальная фибрилла одним концом прикреплена к протоплазматическому цилиндру, другой ее конец свободен. Протоплазматический цилиндр и аксостиль снаружи окружены клеточной стенкой. Аксиальные фибриллы тянутся до полюса клетки, противоположного тому, к которому они прикреплены, и перекрывают друг друга. Неприкрепленные концы аксиальных фибрилл могут выходить за пределы клетки, создавая впечатление наружных полярных жгутиков. С помощью фибрилл спирохеты передвигаются.

Размножаются спирохеты поперечным делением. Эндоспор не образуют; аэробы, факультативные анаэробы или анаэробы; хемоорганогетеротрофы.

Среди спирохет встречаются свободноживущие аэробные водные виды, анаэробные виды, представители нормальной микрофлоры животных и паразитические виды. Их обнаруживают в кишечнике млекопитающих, на поверхности жгутиковых животных, в рубце жвачных животных, в кристаллическом стебельке моллюсков, в кишечнике термитов, переваривающих древесину, тараканов и др.

Порядок *Spirochaetales* включает два семейства: *Spirochaetaceae* и *Leptospiraceae*. Семейство *Spirochaetaceae* содержит семь родов: *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema*, *Borrelia*, *Brachyspira*, *Leptonema*, *Serpulina*. Для человека патогенны только боррелии и трепонемы.

Представители **рода *Spirochaeta*** – непаразитические, свободноживущие бактерии. Встречаются в иле, содержащем сероводород, в сточных и загрязненных водах.

Бактерии *рода Cristispira* широко распространены у морских и пресноводных видов двустворчатых и других моллюсков, обычно находятся в кристаллическом стебельке или в жидкости пищеварительного тракта.

Бактерии *рода Treponema* встречаются в полости рта, пищеварительном тракте и половых органах человека и животных. Некоторые виды патогенны, в частности *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* – возбудитель сифилиса, *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* – возбудитель тропической болезни фрамбезии (тропическая гранулема, невенерический сифилис).

К *роду Borrelia* относятся анаэробные спирохеты, паразиты различных членистоногих, а также возбудители болезней человека и других позвоночных. Например, *Borrelia recurrentis* – возбудитель возвратного тифа или возвратной лихорадки у человека. Переносчиками этих бактерий являются вши и клещи.

В семейство *Leptospiraceae* включен один *род Leptospira*. К нему относятся самые мелкие аэробные спирохеты. Некоторые штаммы паразитируют у позвоночных животных и могут быть патогенными для них, другие – свободноживущие. К свободноживущим относится *Leptospira biflexa* – обитает в пресной воде, растет на обычных питательных средах. Из патогенных *Leptospira canicola* – возбудитель инфекционной желтухи. Эти бактерии попадают в организм с водой и пищей, проникают в кровь, почки и печень и нарушают функцию этих органов, что приводит к кровоизлияниям и желтухе.

9.6. Риккетсии и хламидии

Риккетсии получили свое название в честь американского исследователя Х. Риккетса, впервые описавшего возбудителя болезни *Rickettsia rickettsii*, известной как пятнистая лихорадка Скалистых гор, и погибшего при его исследовании. Риккетсии относятся к семейству *Rickettsiaceae*. По своим размерам риккетсии сравнимы с некоторыми вирусами, но от них отличаются тем, что содержат в клетке как ДНК, так и РНК. В клетке риккетсий имеются рибосомы и ферменты, принимающие участие в метаболизме. Кроме того, она окружена клеточной стенкой, в состав которой входит муреин. Глюкозу риккетсии не используют, способны усваивать некоторые соединения, главным из которых является глутамат, который окисляется через образование дикарбоновых кислот. Способны синтезировать АТФ, их дыхательная цепь во многих отношениях сходна с дыхательной цепью других прокариот. Риккетсии не могут синтезиро-

вать НАД и в этом отношении зависимы от хозяина, обеспечивающего их им.

Большинство видов риккетсий – палочковидные, кокковидные и часто плеоморфные микроорганизмы с типичными грамотрицательными бактериальными клеточными стенками. Эндоспор не образуют. Размножаются бинарным делением только внутри живых клеток хозяина. Их можно культивировать в куриных эмбрионах или культурах клеток позвоночных животных. Некоторые представители могут быть выращены на умеренно сложных бактериологических средах, содержащих кровь.

Все виды риккетсий – облигатные паразиты. Природными носителями риккетсий являются членистоногие (клещи, блохи, вши), в которых эти микроорганизмы обитают, по-видимому, как безвредные паразиты. Попадая в организм других хозяев-животных или человека (при укусе насекомого, расчесывании кожи или с вдыхаемым воздухом), риккетсии могут вызывать тяжелые патологические явления.

Заболевания, вызываемые риккетсиями, носят названия **риккетсиозами**. Важное значение в проявлении патогенных свойств риккетсий имеет способность образовывать токсин, который тесно связан с их клеткой, и в чистом виде его трудно получить. От экзотоксинов он отличается неотделимостью от микробных клеток и чрезвычайной неустойчивостью. В то же время он не похож на эндотоксины, так как термолабилен и инактивируется формалином.

Самые известные возбудители риккетсиозов принадлежат к бактериям группы сыпного тифа. В нее входят представители двух основных видов риккетсий: *Rickettsia prowazekii* (риккетсии Провачека) – возбудитель эпидемического сыпного тифа, и *Rickettsia typhi* – возбудитель эндемического, или крысиного, тифа.

Источником эпидемического сыпного тифа является больной человек, переносчиком возбудителя – платяная вошь. Насосавшись крови сыпнотифозного больного, платяная вошь на третьи–десятые, чаще четвертые–пятые сутки становится заразной. Риккетсии развиваются при температуре 30 °С в кишечнике вшей. Вместе с испражнениями попадают на кожу, белье и т. д. Заражение сыпным тифом происходит не через укус вшей, а при втирании риккетсий, которые выделяются с испражнениями или раздавливанием вшей и проникают в ссадины, царапины кожи и повреждения слизистых оболочек.

Сыпной тиф относится к кровяным инфекциям. Возбудитель болезни в период заболевания находится в крови, в лейкоцитах, в эндотелии сосудов кожи, мозга и других органов.

Основным источником возбудителя крысиного сыпного тифа в природе являются крысы и мыши, которые инфицируются друг от друга посредством укусов блох и вшей, люди же заражаются крысиным тифом от грызунов, т. е. это зоонозная инфекция.

Заболеваемость крысиным тифом среди людей обычно носит эндемический и спорадический характер. Болезнь характеризуется сезонностью, наибольшее количество заболеваний приходится на август–ноябрь.

Вторая группа возбудителей риккетсиозов – возбудители клещевой пятнистой лихорадки. В эту группу входят следующие виды: *Rickettsia rickettsii* (возбудитель пятнистой лихорадки Скалистых гор), *Rickettsia conorii* (возбудитель марсельской, или средиземноморской, лихорадки), *Rickettsia sibirica* (возбудитель клещевого сыпного тифа Северной Азии), *Rickettsia australis* (североавстралийский клещевой сыпной тиф), *Rickettsia acari* (возбудитель осповидного, или везикулезного, риккетсиоза), *Rickettsia tsutsugamushi* (возбудитель японской речной лихорадки цуцугамуши) и другие. Природными носителями этих возбудителей являются клещи.

Хламидии относятся к семейству *Chlamydiaceae*, которое включает один род *Chlamydia*. Это неподвижные кокковидные грамотрицательные бактерии. Размножаются только внутри связанных с мембраной вакуолей в цитоплазме клеток человека, млекопитающих и птиц.

Клеточные стенки хламидий сходны по строению со стенками грамотрицательных бактерий, но не содержат мурамовую кислоту или содержат ее в следовых количествах. Хламидии не имеют цитохромов, не способны окислять глюкозу и синтезировать свои собственные высокоэнергетические соединения, такие как АТФ. Поэтому они являются «энергетическими паразитами» и не способны размножаться вне живой клетки.

Жизненный цикл хламидий внутри эукариотических клеток сложен, включает образование трех основных форм и обычно завершается в течение 40–72 ч. Основные его стадии следующие:

1) образование элементарных телец – мелких (0,2–0,5 мкм) электронно-плотных шаровидных структур, имеющих компактный нуклеоид и ригидную клеточную стенку;

2) образование инициальных, или ретикулярных, телец – больших (в диаметре 0,8–1,5 мкм) сферических образований, имеющих сетчатую структуру с тонкой клеточной стенкой и фибриллярным нуклеоидом;

3) формирование промежуточных телец – стадии между элементарными и ретикулярными тельцами.

Элементарные тельца являются инфекционной формой хламидий, т. е. обеспечивают передачу заболевания от человека (животного) к человеку (животному). **Ретикулярные тельца** – вегетативная форма хламидий. Вегетативные формы размножаются путем бинарного деления внутриклеточно, но они не инфекционны, когда выделяются из клетки-хозяина. Жизненный цикл хламидий начинается с того, что элементарные тельца адсорбируются на чувствительных эпителиальных клетках и проникают в них посредством эндоцитоза. В течение последующих нескольких часов элементарные тельца реорганизуются, увеличиваются в размерах и превращаются в ретикулярные формы, которые размножаются путем бинарного деления. Образующиеся дочерние формы также размножаются путем бинарного деления. Жизненный цикл заканчивается, когда возникающие промежуточные формы реорганизуются (уплотняются), уменьшаются в размерах и превращаются в элементарные тельца. Размножаясь внутри цитоплазматических везикул, хламидии формируют микроколонии, окруженные мембраной, образующейся из впячивания мембраны клетки при фагоцитозе элементарного тельца. В составе микроколоний обнаруживаются все три стадии развития хламидий. В одной клетке может быть несколько микроколоний, образующихся в случае фагоцитоза нескольких элементарных телец. После разрыва стенки везикулы и мембраны клетки-хозяина вновь появившиеся хламидии высвобождаются, и элементарные тельца, инфицируя другие клетки, повторяют цикл развития.

В настоящее время род *Chlamydia* включает три патогенных вида: *C. trachomatis* (типовой вид рода), *C. psittaci* и *C. pneumoniae*. Установлено, что многие штаммы патогенных хламидий вызывают генерализованные инфекции у различных хозяев, некоторые – резко выраженные воспаления в одной или нескольких тканях или органах только определенных видов позвоночных. Штаммы хламидий обнаружены у птиц, млекопитающих (включая приматов) и людей. У людей они вызывают заболевания глаз, мочеполовой и дыхательной систем; у птиц – респираторные болезни и генерализованную инфекцию; у млекопитающих – заболевания дыхательных путей, суставов, плаценты и кишечные болезни. Некоторые штаммы хламидий патогенны и для человека, и для птиц (табл. 15).

Заболевания, вызываемые патогенными хламидиями

| Виды | Вызываемые заболевания | Способы передачи |
|-----------------------|--|---|
| <i>C. trachomatis</i> | Трахома (кератоконъюнктивит) – хроническое заболевание глаз Конъюнктивит новорожденных Урогенитальный хламидиоз, венерическая лимфогранулема | Прямой контакт: с больных глаз на здоровые (занос грязными руками) или через загрязненные предметы Во время родов от матерей, у которых хламидии имеются в эпителиальных клетках слизистой оболочки мочеполовой системы Половой |
| <i>C. psittaci</i> | Орнитозы | При уходе за птицами (больными и носителями), при употреблении в пищу без достаточной термической обработки мяса и яиц инфицированных птиц |
| <i>C. pneumoniae</i> | Пневмония, бронхиальная астма, катар верхних дыхательных путей | Контактный (от больного человека). Механизм заражения – воздушно-капельный |

9.7. Миксобактерии и цитофаги

Миксобактерии и цитофаги – это грамотрицательные скользящие бактерии, относящиеся соответственно к порядкам *Mycobacteriales* и *Cytophagales*.

Миксобактерии имеют относительно крупные клетки ($0,6\text{--}1,2 \times 2\text{--}10$ мкм) двух морфологических типов: тонкие гибкие палочки с более или менее суженными концами и относительно толстые палочки цилиндрической формы с закругленными концами. Клетки миксобактерий обычно окрашены в желтый, оранжевый или красный цвет за счет каротиноидных пигментов.

Миксобактерии передвигаются путем скольжения по твердой поверхности и способны также проникать в субстрат, продвигаясь внутри, например 1,2–1,5 % агаровых гелей. Скользящие клетки всегда оставляют за собой слизистые треки. В результате скользящего движения клеток колонии миксобактерий распространяются по поверхности субстрата и поэтому называются **швармами**. Внутри шварма клетки обычно распределены неравномерно, концентрируясь в радиальных тяжах, а иногда в

массивных складках по периферии шварма. В условиях голодания клетки скапливаются и агрегируют в определенных участках шварма, образуя крупные глобулярные или гребневидные массы, которые затем дифференцируются в структуры, называемые *плодовыми телами* (рис. 100).



Рис. 100. Микрофотография плодовых тел у бактерий *Stigmatella aurantiaca*
(Photo by David White colorized by Yves Brun using NIH Image)

Плодовые тела варьируют в размерах от 100 до 600 мкм и хорошо заметны благодаря яркой окраске и блестящей поверхности. Плодовые тела имеют разную форму: от микроскопического бугорка до сложных древоподобных структур, они могут располагаться концентрическими кругами или радиальными тяжами. Внутри созревающего плодового тела вегетативные клетки превращаются в покоящиеся *миксоспоры*. Они устойчивы к высушиванию и довольно устойчивы к нагреванию: выживают при температуре 58–60 °C в течение 10–60 мин. Миксоспоры могут иметь сферическую или овальную (например, у представителей родов *Мухосoccus*, *Nannocystis* и др.) и палочковидную (например, у представителей родов *Cystobacter*, *Polyangium*, *Stigmatella* и др.) форму. Миксобактерии – облигатные аэробы. Большинство из них мезофиллы; оптимальная температура для роста 30–35 °C. Все представители – хемоорганотрофы, способные использовать самые разнообразные органические вещества в качестве источников энергии и углерода. В зависимости от источников питания различают бактериолитические и целлюлозолитические виды. К *бактериолитическим* относятся миксобактерии, входящие в род *Мухосoccus*. Представители этого рода за счет синтеза различных экзоферментов могут разрушать клетки бактерий, дрожжей и других микроорганизмов и использовать полученные вещества в качестве источников энергии и уг-

лерода. Такой тип взаимоотношений между микроорганизмами относится к хищничеству. *Целлюлозолитические* виды содержит род *Polyangium*, так как его представители способны гидролизовать целлюлозу. Следует отметить, что некоторые миксобактерии способны синтезировать в значительных количествах стеролы (например, рода *Nannocystis*).

Миксобактерии присутствуют повсеместно. Особенно обильно встречаются, по-видимому, в теплых, полусухих и сухих местообитаниях, таких как степи и полупустыни субтропического и умеренного поясов. Типичные местообитания миксобактерий – почвы с нейтральным pH и нормальным содержанием солей, разлагающийся органический материал, включая помет травоядных животных и гниющую древесину, кора живых и отмерших деревьев, а также пресная вода.

В отличие от миксобактерий, *цитофаги* не образуют плодовых тел и имеют другой нуклеотидный состав ДНК. Содержание ГЦ у цитофаг 30–50 %, у миксобактерий значительно выше – 67–71 %. Группа цитофаг включает восемь родов, представители которых могут обитать в почве, пресноводных и морских водоемах (например, роды *Cytophaga*, *Flexibacter*), полости рта (например, род *Capnocytophaga*), горячих источниках (например, род *Thermonema*).

Цитофаги – облигатные аэробы или факультативные анаэробы; хемоорганотрофы; метаболизм дыхательного, или бродильного, типа. Глюкозу сбраживают с образованием ацетата, пропионата, сукцината и некоторых других органических кислот. Отдельные представители могут осуществлять нитратное дыхание, используя в качестве конечного акцептора электронов NO_3^- . Для бактерий рода *Cytophaga* характерна способность разлагать целлюлозу, агар, хитин, пектин и крахмал; рода *Flexibacter* – хитин и крахмал; рода *Sporocytophaga* – целлюлозу и целлобиозу; рода *Microscilla* – карбоксиметилцеллюлозу.

Веретенообразные вегетативные клетки бактерий родов *Sporocytophaga* и *Chitinophaga* могут превращаться в длительно сохраняющиеся круглые клетки, окруженные капсулой – микроцисты (стадия покоя). Бактерии рода *Flexithrix* могут образовывать чехлы, которые окружают длинные многоклеточные нити с однорядным расположением клеток.

Среди цитофаг встречаются патогенные представители. Например, бактерии рода *Capnocytophaga* выделяют из полости рта, очагов поражения в легких, крови и абсцессов. Бактерии вида *Flexibacter columnaris* – возбудитель заболеваний у рыб и часто является причиной их массовой гибели в рыборазводных прудах.

9.8. Молочнокислые бактерии

Молочнокислые бактерии относятся к семействам *Lactobacillaceae* и *Streptococcaceae*. Это морфологически гетерогенная группа бактерий – включает палочковидные и сферические организмы. Все молочнокислые бактерии грамположительны, не образуют эндоспор (за исключением *Sporolactobacillus inulinus*) и в подавляющем большинстве неподвижны. Это факультативные анаэробы, использующие в качестве источника энергии углеводы и образующие молочную кислоту. Однако они не способны синтезировать АТФ за счет дыхания, так как не содержат цитохромы и другие ферменты, имеющие гем. Таким образом, молочнокислые бактерии способны только к брожению, дыхание у них отсутствует.

У всех молочнокислых бактерий обнаруживаются сложные потребности в факторах роста: витаминах группы В, аминокислотах, а также в пуринах и пиримидинах. Следовательно, молочнокислые бактерии – это своего рода «метаболические инвалиды», которые, вероятно, в результате специализации (рост в молоке и других средах, богатых питательными и ростовыми веществами) утратили способность к синтезу многих метаболитов.

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

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

Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют практически только одну молочную кислоту. К ним относятся бактерии видов *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* и др.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии образуют смесь молочной кислоты, этанола и CO_2 , а иногда и уксусной кислоты. К ним относятся *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Bifidobacterium bifidum* и др.

Распространение в природе молочнокислых бактерий определяется их сложными потребностями в питательных веществах и способом полу-

чения энергии. Они почти никогда не обнаруживаются в почве или водоемах. В естественных условиях они встречаются:

- в молоке, молочных продуктах, в местах переработки молока (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* и другие лактобациллы; *Streptococcus lactis*);
- на поверхности растений как эпифитная микрофлора и на разлагающихся растительных остатках (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*);
- в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных как представители нормальной микрофлоры (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis* и др.).

В связи с тем что молочнокислые бактерии используются для приготовления пищевых продуктов и выступают как возбудители болезней человека и животных, они представляют собой группу большого экономического значения.

Молочнокислые бактерии используются для приготовления:

- 1) силоса;
- 2) квашеной капусты, огурцов и др. (*Leuconostoc mesenteroides* и *Lactobacillus plantarum*);
- 3) молочнокислых продуктов. Стерилизованное или пастеризованное молоко либо сливки сбраживают, прибавляя в качестве закваски чистые культуры молочнокислых бактерий. Для приготовления различных молочнокислых продуктов берут соответствующие микробные закваски. Например, для приготовления йогурта используют пастеризованное молоко, сквашенное с помощью бактерий *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*. Для приготовления кефира – *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefirianofaciens*; сметаны – *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis* и *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (но сквашиваются пастеризованные сливки);
- 4) сырокопченых колбас. Образующаяся при брожении молочная кислота придает определенный вкус, а также снижает pH, что предохраняет от порчи те виды колбас, которые не подвергаются варке;
- 5) кислого теста в хлебопечении. Образующаяся молочная кислота используется для подъема теста, а также придает хлебу специфический кислый вкус;
- 6) получения чистой молочной кислоты, которая применяется в кожевенной, текстильной, фармацевтической, пищевой промышленности и для получения биodeградируемых полилактидов, используемых для упаковки пищевых продуктов.

Молочнокислые бактерии могут играть и отрицательную роль, вызывая порчу пива, фруктовых соков, мяса и других продуктов. В эту группу входят и патогенные для человека и животных бактерии. Они растут на средах сложного состава с сывороткой или эритроцитами или на сывороточном либо кровяном агаре.

В практике широко распространена классификация, основанная на отношении стрептококков к эритроцитам, согласно которой они делятся на три группы:

- гемолитические стрептококки, образующие β -гемолизин и дающие на кровяном агаре зону гемолиза вокруг колоний;
- зеленыящие стрептококки, синтезирующие α -гемолизин и дающие на кровяном агаре вокруг колоний позеленение среды и частичный гемолиз (позеленение обусловлено превращением оксигемоглобина в метгемоглобин);
- стрептококки, не изменяющие кровяного агара.

Патогенные стрептококки образуют различные по своему действию экзотоксины:

1) β -гемолизин (гемотоксин, О-стрептолизин и S-стрептолизин), инактивирующийся при температуре 55 °С в течение 30 мин. Обуславливает разрушение эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, макрофагов;

2) лейкоцидин, разрушающий лейкоциты;

3) летальный (диализабельный) токсин, обладающий некротическим действием;

4) эритрогенный термостабильный токсин, обладающий способностью вызывать воспалительную реакцию кожи у животных и у людей, в крови которых отсутствуют антитоксины;

5) α -гемолизин, секретируемый в питательную среду. Действует как β -гемолизин.

Болезнетворные свойства стрептококков обусловлены, помимо продукции экзотоксинов, и образованием термостабильных эндотоксинов.

Кроме того, патогенные стрептококки образуют ферменты вирулентности: гиалуронидазу, дезоксирибонуклеазу, рибонуклеазу, нейраминидазу, протеиназу, стрептокиназу, амилазу, липазу и др.

Возможно экзогенное и эндогенное заражение стрептококками.

Экзогенное заражение стрептококками (от больных людей, животных, инфицированных продуктов и предметов) происходит через наружные кожные покровы и слизистые оболочки, а также при проникновении вместе с пищей стрептококков в кишечник. Основной путь заражения стрептококками – воздушно-капельный.

Эндогенная инфекция оппортунистическими (условно-патогенными) стрептококками – обитателями человеческого тела – возможна в результате ослабления естественной сопротивляемости организма (иммунитета).

Стрептококковые инфекции подразделяют на **нагноительные** и **ненагноительные**. К нагноительным заболеваниям, вызываемым стрептококками, относятся острые инфекции верхних дыхательных путей (в частности, пневмонии), рожистое воспаление, или рожа (воспаление слизистых путей), ангина (воспаление слизистых оболочек зева и миндалин). При проникновении в кровяное русло стрептококки обуславливают тяжело протекающий септический процесс. В группу ненагноительных болезней входят скарлатина, ревматизм и др.

К патогенным относятся зеленеющие стрептококки вида *Streptococcus pneumoniae*. Они чаще вызывают пневмонию, а также септицемию, ангину, гайморит, острые катары верхних дыхательных путей и другие заболевания.

Бактерии вида *Streptococcus pyogenes* вызывают рожу, абсцессы при раневых инфекциях. Относятся к гемолитическим стрептококкам.

Бактерии вида *Streptococcus viridans* – постоянные обитатели полости рта и глотки здоровых людей. Относятся к зеленеющим стрептококкам. Обладают слабой вирулентностью для человека и животных. Они обнаруживаются при гнойных и воспалительных поражениях зубов и десен, вызывают подострый эндокардит.

Бактерии вида *Streptococcus faecalis* (энтерококки) обитают в кишечнике человека и теплокровных животных. Обнаружение их служит также одним из критериев фекального загрязнения воды, сточных вод, пищевых продуктов.

9.9. Спорообразующие бактерии

В эту группу входят бактерии разной морфологии (клетки в форме палочек, кокков и иногда нитей), большинство из них окрашивается по Граму положительно. Клетки обычно подвижные за счет перитрихальных жгутиков, образуют устойчивые к нагреванию, сильно преломляющие свет эндоспоры. В группу входят пять основных родов: *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium* и *Desulfotomaculum*.

Первичное таксономическое деление на роды основано на отношении бактерий к молекулярному кислороду. Роды *Bacillus* и *Sporosarcina* включают облигатные аэробы и факультативные анаэробы. Представи-

тели рода *Bacillus* – грамположительные палочковидные бактерии, рода *Sporosarcina* – грамположительные кокковидные бактерии.

Представители родов *Clostridium* и *Desulfotomaculum* являются облигатными анаэробами. Однако они отличаются друг от друга по характеру энергетического метаболизма и грампринадлежности. Бактерии рода *Clostridium* окрашиваются по Граму положительно и синтезируют энергию в основном за счет брожения. Бактерии рода *Desulfotomaculum* по Граму окрашиваются отрицательно, хотя имеют клеточную стенку грамположительного типа, энергию получают путем анаэробного сульфатного дыхания, используя в качестве конечных акцепторов электронов сульфаты.

Бактерии рода *Sporolactobacillus* – микроаэрофилы. Клетки палочковидные, подвижные (жгутикование перитрихиальное), грамположительные. Метаболизм бродильный, осуществляют гомоферментативное молочнокислое сбраживание гексоз с образованием молочной кислоты. Клетки не содержат каталазы и цитохромов. Типовой (и единственный) вид *Sporolactobacillus inulinus*.

К числу наиболее широко распространенных и имеющих значительный практический интерес относятся бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*.

К роду *Bacillus* относятся аэробные или факультативно-анаэробные палочковидные бактерии, большинство из них подвижны. Хемоорганотрофы. Метаболизм строго дыхательный, строго бродильный или дыхательный и бродильный одновременно, с использованием различных субстратов. Некоторые представители способны получать энергию за счет нитратного дыхания. Для большинства представителей рода *Bacillus* характерно брожение с образованием 2,3-бутандиола, глицерина и CO₂, а также небольших количеств молочной кислоты и этанола. Бутандиоловое брожение, осуществляемое бактериями рода *Bacillus*, можно представить следующим образом:



Бактерии рода *Bacillus* можно разделить на три группы, различающиеся по структуре и внутриклеточной локализации эндоспор:

1. Споры овальные, расположение их в материнской клетке центральное, растяжение клетки спорой не происходит. Таковы споры у большинства бацилл (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*).

2. Споры овальные, имеющие толстую оболочку с выростами, расположение их в материнской клетке центральное. Они «растягивают» клетки изнутри в ходе споруляции (*B. polymyxa*, *B. stearothermophilus*).

3. Споры сферические, расположение их в материнской клетке полярное. Эндоспоры «растягивают» клетку в ходе споруляции (*B. pasteurii*).

Большинство представителей рода *Bacillus* являются сапрофитами, широко распространены в природе, особенно в почвах, богатых органическими веществами (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*). *B. megaterium* считаются «гигантами» среди эубактерий, так как их клетки имеют размеры 2×5 мкм. Вид *B. subtilis* является типовым для рода *Bacillus*, называется «сенной палочкой» (так как накопительные культуры данных бактерий получают из настоя сена). Бактерии *B. polymyxa* получили название из-за того, что они образуют большое количество слизи. *B. stearothermophilus* – выраженный термофил (температурный оптимум для роста 50–65 °C).

Представителями патогенных бацилл являются *B. anthracis* и *B. thuringiensis*. *B. anthracis* – возбудитель сибирской язвы. Это нуждающиеся в факторах роста неподвижные бактерии с пептидной капсулой, содержащей в большом количестве D- и L-формы глутаминовой кислоты.

B. thuringiensis – возбудитель паралитического заболевания у гусениц многих чешуекрылых насекомых. Клетки этих бактерий подвижны, зависят от наличия факторов роста. Каждая спорулирующая клетка бактерий *B. thuringiensis* образует примыкающий к споре кристалл, состоящий из Cry-белков (молекулярная масса 60–140 кД) или из Cyt-белков (молекулярная масса 28 кД). Кристаллы высвобождаются вместе со спорами при аутолизе материнских клеток и попадают в почву, на растения. Личинки насекомых, питающиеся растениями, заглатывают кристаллы вместе со спорами. Кристаллики растворяются в кишечнике только чувствительных личинок, и Cry-белки разрушают клетки их средней кишки, что приводит к выходу содержимого кишечника в гемолимфу и гибели насекомых. Споры при этом прорастают и дают начало новой популяции бактерий, развивающейся в организме погибшего насекомого. Специфичность действия Cry-белков очень высока. В настоящее время известно более 30 классов таких белков, они токсичны для большого числа чешуекрылых насекомых, но не для позвоночных животных. В связи с этим препараты спорообразующих клеток бактерий *B. thuringiensis* нашли широкое применение в сельском хозяйстве в качестве инсектицида. Включения токсичных для насекомых белков известны и у других бацилл, например у *B. laterosporus*, *B. sphaericus*, *B. popilliae*.

Бактерии рода *Bacillus* являются активными продуцентами различных антибиотических веществ. В настоящее время известно около 200 антибиотиков, синтезируемых этими бактериями. Наиболее продуктивными являются бактерии вида *B. subtilis* – для них описано более 70 различных

антибиотиков. Около 30 антибиотиков продуцируют культуры *B. brevis*. Различные антибиотики синтезируют также бактерии видов *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* и др. Большинство антибиотиков бактерий рода *Bacillus* – полипептиды, активные против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжей и микроскопических грибов. Однако антибиотики бактерий рода *Bacillus* могут относиться и к другим классам химических соединений. Так, антибиотик бутирозин, продуцируемый бактериями *B. circulans*, является аминогликозидом, а антибиотик протидин бактерий *B. licheniformis* – фосфосодержащим триеном. Некоторые антибиотики бактерий рода *Bacillus* широко используются в медицине, сельском хозяйстве и пищевой промышленности. К ним относятся полимиксины, колистин, бацитрацин, грамицидин С, субтилиин, эдеин, бутирозин и др.

Анаэробные спорообразующие бактерии рода *Clostridium* – палочки с закругленными или иногда заостренными концами, часто расположенные в парах или коротких цепочках. Большинство из них подвижны за счет перитрихальных жгутиков. Образуют овальные или сферические эндоспоры, располагающиеся субтерминально, центрально или терминально. Как правило, диаметр спор больше диаметра вегетативной клетки, поэтому палочка со спорой приобретает сходство с веретеном, отсюда и произошло название рода. Большинство штаммов рода *Clostridium* – облигатные анаэробы, хотя некоторые могут расти в присутствии воздуха. Хемоорганотрофы, энергию получают в основном за счет маслянокислого брожения. Возбудителями классического маслянокислого брожения являются *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. rubrum* и др. В качестве основных продуктов они образуют масляную и уксусную кислоты, углекислый газ и молекулярный водород. Другие представители (*C. acetobutyricum*, *C. felsineum*, *C. sporogenes* и др.) осуществляют ацетобутиловое брожение, при котором кроме масляной кислоты образуются нейтральные продукты: ацетон, бутиловый, этиловый, изопропиловый спирты.

Клостридии сбраживают большое число субстратов, включая полисахариды, белки, аминокислоты и пурины. В зависимости от вида сбраживаемого субстрата выделяют несколько физиологических групп клостридий:

- сахаролитические, использующие в качестве субстратов моносахара, крахмал, пектин, целлюлозу и другие вещества углеводной природы (*C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. felsineum*);
- протеолитические, сбраживающие белки, пептиды, аминокислоты (*C. botulinum*, *C. tetani*, *C. putrificum*, *C. sporogenes*, *C. histolyticum* и др.);

- пуринолитические, сбраживающие гетероциклические азотсодержащие соединения – пурины и пиримидины (*C. acidurici*, *C. cylindrosporum*).

Потребности клостридий в питательных веществах весьма разнообразны. Как правило, они могут расти только на сложных, богатых органическими соединениями средах. Для них выявлена потребность в определенных витаминах и наборе аминокислот.

Для многих сахаролитических клостридий характерна способность фиксировать атмосферный азот. Первый анаэробный азотфиксатор был выделен из почвы русским микробиологом С. Н. Виноградским и назван им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*.

Клостридии широко распространены в природе. Естественной средой их обитания является почва, особенно ее глубокие слои, ил различных водоемов, сточные воды, кишечный тракт травоядных животных и человека. Среди клостридий выделяют как сапрофитные, так и патогенные формы. К сапрофитным относятся *C. pasteurianum*, *C. acetobutyricum*, *C. butyricum* (типовой вид). Патогенные клостридии: *C. tetani* – возбудитель столбняка; *C. botulinum* – возбудитель ботулизма; *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. sordelli* – возбудители газовой гангрены. Патогенные клостридии, как правило, относятся к протеолитическим.

Бактерии рода *Clostridium* играют важную роль в круговороте веществ в природе, особенно азота и углерода, осуществляя процессы гниения, брожения и фиксации молекулярного азота. Некоторые представители клостридий используются для промышленного получения масляной кислоты, бутанола, ацетона (*C. butyricum*, *C. acetobutyricum*). Анаэробные клостридии применяются также при мочке льна, конопли и других прядильных культур.

9.10. Стафилококки

Стафилококки относятся к семейству *Micrococcaceae*. Клетки стафилококков имеют форму правильных шаров диаметром 0,5–1,5 мкм. Они располагаются поодиночке, парами, но чаще в результате характерного деления более чем в одной плоскости образуют группы клеток, напоминающие гроздь винограда. Неподвижны, спор не образуют, грамположительны, хемоорганотрофы, факультативные анаэробы.

При выращивании в аэробных условиях стафилококки нуждаются в аминокислотах и витаминах, а в анаэробных условиях, кроме того, им необходим урацил. Хорошо растут на мясопептонных средах, образуя

круглые, с ровными краями, возвышающиеся над поверхностью агаризованной среды пигментированные (белые, золотистые, лимонно-желтые) колонии. Цвет пигмента колоний может быть различен у разных штаммов одного и того же вида, в связи с чем не является дифференцирующим признаком. Пигменты стафилококков – каротиноидные пигменты, не растворяющиеся в воде, но растворяющиеся в эфире, бензине, ацетоне, этаноле.

Характерное свойство стафилококков – способность большинства штаммов расти на питательных средах, содержащих 15 % NaCl или 40 % желчи. Если патогенные стафилококки выращивать на кровяном агаре, то вокруг колоний образуются зоны гемолиза.

Энергетический метаболизм у стафилококков может быть двух типов: аэробное дыхание и брожение. Углеводы сбраживают с образованием органических кислот (главным образом, молочной), ацетона и небольшого количества CO₂. Диагностическое значение имеет способность сбраживать глюкозу и маннит в анаэробных условиях. Этой способностью обладают патогенные стафилококки.

Род *Staphylococcus* включает в себя более 20 видов, которые подразделяются на две группы – коагулазоположительные и коагулазоотрицательные стафилококки. К коагулазоположительным относятся *S. aureus* (золотистый стафилококк), *S. intermedius*, *S. hyicus*. Коагулазоотрицательными стафилококками являются *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus* (строгие анаэробы), *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. simulans* и др. Среди патогенных видов коагулазоположителен лишь *S. aureus*, остальные патогенные виды относятся к коагулазоотрицательным. Основные поражения человека вызывают *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. saprophyticus* (табл. 16).

Таблица 16

Основные инфекции человека, вызываемые патогенными стафилококками

| Вид | Заболевания |
|-------------------------|--|
| <i>S. aureus</i> | Кожные гнойничковые инфекции, раневые инфекции, бактериемия, эндокардиты, пневмонии, артриты суставов, остеомиелиты, перитониты, инфекции мочевыводящей системы, синдром «ошпаренной кожи», синдром токсического шока, пищевые токсикоинфекции |
| <i>S. epidermidis</i> | Бактериемия, эндокардиты, глазные инфекции, инфекции мочевыводящей системы, артриты суставов |
| <i>S. saprophyticus</i> | Инфекции мочевыводящей системы |

Стафилококки – уникальные микроорганизмы. Они могут вызывать более 100 различных заболеваний, относящихся к 11 классам по Между-

народной классификации, и поражать любую ткань, любой орган. Это свойство стафилококков обусловлено наличием у них большого комплекса факторов вирулентности.

1. Факторы адгезии – прикрепление стафилококков к клеткам тканей обусловлено их гидрофобностью (чем она выше, тем сильнее проявляются адгезивные свойства), а также адгезивными свойствами полисахаридов микрокапсулы и способностью связывать фибронектин (рецептор некоторых клеток).

2. Разнообразные ферменты, способствующие проникновению и распространению стафилококков в организме: плазмокоагулаза (главный фактор вирулентности), гиалуронидаза, фибринолизин, ДНКаза, лизоцимоподобный фермент, лецитиназа, фосфатаза, протеиназа и т. д.

3. Комплекс секретируемых эндотоксинов:

- мембраноповреждающие токсины – α , β , δ и γ . Повреждая мембраны каждый из этих токсинов разрушает эритроциты, лейкоциты, макрофаги, тромбоциты, клетки культур тканей, протопласты и сферопласты бактерий. Мембраноповреждающие токсины отличаются по антигенным свойствам, спектру лизируемых эритроцитов, скорости наступления летального исхода и некоторым другим признакам;

- эксфолиативные токсины А и В различают по антигенным свойствам, отношению к температуре (А – термостабилен, В – термолабилен), локализации генов, контролирующих их синтез (А контролируется хромосомным геном, В – плазмидным). С этими токсинами связана способность стафилококков вызывать пузырчатку у новорожденных и скарлатиноподобную сыпь;

- истинный лейкоцидин – избирательно действует на лейкоциты, разрушая их.

4. Экзотоксин, вызывающий синдром токсического шока. Для синдрома характерны повышение температуры, снижение артериального давления, кожные высыпания с последующими шелушениями на кистях и стопах, иногда диарея, поражение почек и др.

5. Сильные аллергизирующие свойства, которыми обладают как компоненты структуры клеток, так и экзотоксины и другие секретируемые бактериями продукты жизнедеятельности. Стафилококки являются главными виновниками кожных и респираторных аллергий (дерматиты, бронхиальная астма и др.).

6. Факторы, угнетающие фагоцитоз. Фагоцитоз угнетают микрокапсула, белок А, пептидогликан, тейхоевые кислоты, токсины. Кроме того, стафилококки индуцируют синтез некоторыми клетками организма супрессоров фагоцитарной активности.

7. Энтеротоксины А, В, С1, С2, С3, Д, Е. Они характеризуются антигенной специфичностью, термостабильностью, устойчивостью к действию формалина и пищеварительных ферментов (трипсина и пепсина), устойчивы в диапазоне рН 4,5 – 10,0. Энтеротоксины являются низкомолекулярными белками с молекулярной массой 26 – 34 кД. С синтезом энтеротоксинов связана способность стафилококков вызывать пищевые отравления типа интоксикации. Все типы стафилококковых энтеротоксинов вызывают сходную картину отравления: тошнота, рвота, диарея, головная боль, повышение температуры, мышечный спазм. Отравление чаще связано с употреблением инфицированных стафилококками продуктов (мороженого, пирожных, тортов, сыра, творога, сметаны и т. п.) и консервов с маслом.

Стафилококки обладают повышенной устойчивостью к факторам внешней среды. Они хорошо переносят высыхание и остаются жизнеспособными и вирулентными неделями и месяцами в сухой мельчайшей пыли, являясь источником пылевой инфекции. Стафилококки устойчивы к высокой температуре – нагревание до 80 °С выдерживают до 30 мин, сухой жар (110 °С) убивает их в течение 2 ч; низкие температуры они переносят также хорошо. Прямой солнечный свет убивает их лишь в течение многих часов, а рассеянный действует очень слабо.

Стафилококки являются постоянными обитателями кожи и слизистых оболочек человека и теплокровных животных, встречаются в воздухе и почве. Поэтому заболевания, вызываемые ими, могут иметь характер либо аутоинфекции (при различных повреждениях кожи и слизистых оболочек, в том числе и при микротравмах), либо экзогенной инфекции, обусловленной контактно-бытовым, воздушно-капельным, воздушно-пылевым, либо алиментарным (при пищевых отравлениях), способом заражения.

Стафилококки играют большую роль при смешанных инфекциях: их обнаруживают вместе со стрептококками при раневых инфекциях, дифтерии, туберкулезе, ангинах, гриппе и других острых респираторных заболеваниях.

В связи с широким использованием антибактериальных препаратов и особенно антибиотиков, обуславливающих селекцию резистентных штаммов, произошли значительные изменения тяжести и степени распространенности стафилококковых поражений. Во всех странах мира отмечается рост внутрибольничных заболеваний в акушерских, хирургических и детских стационарах, а также среди медицинского персонала и населения.

Распространение стафилококковых инфекций связано с тем, что многие люди (в хирургических и родильных отделениях, в закрытых коллективах и т. п.) являются носителями патогенных стафилококков. Носительство может иметь временный характер, но особую опасность для окружающих представляют лица, у которых оно бывает постоянным (резидентные носители). У таких людей стафилококки длительное время и в большом количестве персистируют на слизистых оболочках носа и зева.

9.11. Грамотрицательные кокки

Семейство *Neisseriaceae* названо в честь А. Нейссера, впервые обнаружившего в 1879 г. возбудителя гонореи. К семейству *Neisseriaceae* в настоящее время отнесены четыре рода: *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter* и *Kingella*.

Род *Neisseria* включает 14 видов, в том числе два патогенных: *N. meningitidis* (менингококк) – возбудитель менингококковых инфекций и *N. gonorrhoeae* (гонококк) – возбудитель гонореи (табл. 17). Остальные представители этого рода (*N. sicca*, *N. flavescens*, *N. mucosa*, *N. lactamica* и др.) являются сапрофитами и обитают на слизистой оболочке верхних дыхательных путей человека. Типовой вид рода – *N. gonorrhoeae*.

Таблица 17

Патогенные бактерии рода *Neisseria* и их свойства

| Вид | Источник заболевания | Основные заболевания | Основной способ заражения |
|------------------------|----------------------|---|---|
| <i>N. meningitidis</i> | Человек | Менингококкцемия (менингококковый сепсис), менингококковый менингит (гнойное воспаление мозговых оболочек спинного и головного мозга) | Воздушно-капельный |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | Человек | Гонорея (инфекционное венерическое заболевание с воспалительными проявлениями в мочеполовых органах) | Половой, возможно инфицирование плода при прохождении через родовые пути матери; отмечены случаи заражения через предметы обихода |

Представители рода *Neisseria* являются сферическими, формирующими пары или скопления бактериями, размером 0,6–1,0 мкм. Благодаря делению в двух плоскостях бактерии некоторых видов образуют тетра-

ды. Неподвижны, некоторые виды имеют капсулу и фимбрии (ворсинки). Эндоспоры не образуются. Представители некоторых видов рода *Neisseria* синтезируют зеленовато-желтые каротиноидные пигменты.

Нейссерии – хемоорганотрофы, каталазоположительные (за исключением *N. elongata*) и оксидазоположительные. Патогенные нейссерии не растут на обычных питательных средах, но хорошо культивируются на средах, содержащих цельную кровь, сыворотку, асцитическую жидкость. Непатогенные виды менее прихотливы. Каждый вид нейссерий избирательно ферментирует углеводы с образованием уксусной кислоты. Установлено, что представители видов *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis* способны расщеплять глюкозу по пентозофосфатному пути и пути Энтнера – Дудорова. Большинство представителей рода *Neisseria* (кроме видов *N. gonorrhoeae* и *N. canis*) восстанавливают нитраты. Оптимальная температура для роста 35–37 °С. Величины оптимума pH у различных штаммов варьируют, но для большинства находятся в пределах 6,0–8,0.

Основными факторами вирулентности патогенных бактерий *N. gonorrhoeae* является продукция эндотоксинов, а также наличие ворсинок, с помощью которых осуществляются адгезия и колонизация эпителиальных клеток слизистой оболочки мочеполовых путей. Экзотоксины у гонококков не обнаружены.

Основным фактором вирулентности патогенных менингококков можно считать образование полисахаридной капсулы, защищающей их от различных воздействий, в первую очередь от поглощения фагоцитами. Факторами, способствующими адгезии и колонизации, являются ворсинки и белки наружной мембраны, факторами инвазивности – гиалуронидаза и другие ферменты, деполимеризующие субстраты ткани хозяина. Токсичность менингококков обусловлена наличием у них липополисахаридов, которые обладают пирогенным, некротическим и летальным действием. В качестве факторов вирулентности можно рассматривать и наличие у них таких ферментов, как нейраминидаза, плазмокоагулаза, некоторых протеаз, фибринолизина, а также проявление гемолитической и антилизоцимной активности.

К роду *Moraxella* относятся грамотрицательные бактерии, обычно имеют форму очень коротких и толстых округлых палочек (1,0–1,5 × 1,5–2,5 мкм), часто приобретают форму кокков, располагающихся преимущественно парами или короткими цепочками. В культурах может наблюдаться изменчивость по признакам размеров и форм клеток; плеоморфизм усиливается при отсутствии кислорода и при температуре выше оптимальной. Спор не образуют, жгутиков не имеют. Клетки могут быть окружены капсулой. Строгие аэробы. Моракселлы – хемоорганотрофы с

окислительным метаболизмом. Для большинства видов характерны сложные потребности в питательных веществах, но конкретные ростовые потребности неизвестны. Моракселлы являются паразитами слизистых оболочек людей и теплокровных животных; возможно, существуют и сапрофиты. Некоторые моракселлы являются патогенными. Например, бактерии вида *M. catarrhalis* нередко обнаруживаются на слизистой оболочке шейки матки и уретры у здоровых людей и могут вызывать воспаление слизистых оболочек самостоятельно или в ассоциации с другими бактериями. Имеется сообщение о том, что они могут быть причиной менингита. Бактерии видов *M. lacunata* и *M. bovis* нередко вызывают у людей, живущих в плохих санитарно-гигиенических условиях, конъюнктивит. Некоторые виды (например, *M. osloensis* и *M. phenylpyruvica*) являются потенциальными возбудителями септицемий, менингита или гноеродных заболеваний.

Род *Acinetobacter* включает в себя грамотрицательные палочки, обычно очень короткие и округлые, размеры их в логарифмической фазе роста составляют $1,0\text{--}1,5 \times 1,5\text{--}2,5$ мкм. В стационарной фазе роста они приобретают преимущественно форму кокков, располагающихся парами или в виде коротких цепочек. Спор не образуют, жгутиков не имеют. Аэробы; метаболизм чисто дыхательного типа с использованием молекулярного кислорода в качестве конечного акцептора электронов. Оптимальная температура для роста $30\text{--}32$ °C, pH около 7,0. Акинетобактерии являются свободно живущими сапрофитами, распространены повсеместно, их часто выделяют из почвы, воды, сточных вод, загрязненных пищевых продуктов, со слизистых оболочек животных (включая рыб) и людей. Они могут быть причиной многих инфекционных процессов, включая менингиты и септицемии у людей и септицемии и аборт у животных.

Род *Acinetobacter* включает шесть видов, типовой вид – *A. calcoaceticus*.

Род *Kingella* включает три вида, типовой вид – *K. kingae*. Клетки кокковидные или короткие палочки с закругленными или квадратно очерченными концами, в парах и иногда коротких цепочках. Жгутиков не имеют. Аэробы или факультативные анаэробы. Оптимальная температура для роста $33\text{--}37$ °C. Хемоорганотрофы. Сбраживают глюкозу и ограниченное число углеводов с образованием кислоты, но не газа. Кингеллы наиболее часто выделяют из глоточной слизи, а также со слизистых оболочек мочеполовых путей, носа, из абсцессов при повреждении костей, заболевании суставов и т. п. Основным местом обитания кингелл является слизистая оболочка глотки. Патогенность для человека выясняется.

9.12. Микобактерии

Семейство *Mycobacteriaceae* содержит один род – *Mycobacterium*. Микобактерии – это кислото- и спиртоустойчивые, аэробные, хемоорганотрофные, неподвижные, неспорообразующие, грамположительные прямые или изогнутые палочковидные бактерии. Иногда они образуют (особенно в старых культурах) нитевидные или мицелиальные структуры, фрагментирующиеся при легком механическом воздействии на палочки или кокковидные элементы. Кислотоустойчивость микобактерий объясняется высоким содержанием в клеточных стенках особых липидов – миколовых кислот, связанных с пептидогликано-арабиногалактановым комплексом. Миколовые кислоты – это разветвленные 3-гидроксикислоты, которые в положениях 2 и 3 замещены алифатическими цепями. В миколовых кислотах микобактерий 78–95 атомов углерода и установлено, что только кислоты с очень длинными цепями придают клеткам кислотоустойчивость. Содержание липидов и восков в микобактериях может составлять до 60 % сухого остатка клеток. Некоторые виды микобактерий синтезируют каротиноидные недиффундирующие в среду пигменты. Микобактерии растут на питательных средах медленно или очень медленно; видимые колонии появляются через 14–40 суток при оптимальной температуре. Колонии часто розовые, оранжевые или желтые, особенно при росте на свету; поверхность колоний обычно матовая или шероховатая. Представители некоторых видов микобактерий требовательны к составу среды, нуждаются в специальных добавках к среде (например, *M. paratuberculosis*) или не поддаются культивированию (*M. leprae*). Многие из них могут хорошо расти на средах с парафинами, ароматическими и гидроароматическими углеводородами. Каталазоположительные, арилсульфатазоположительные, устойчивые к лизоциму.

Микобактерии широко распространены в природе: они встречаются в почве, воде, в организме теплокровных и холоднокровных животных. Род *Mycobacterium* включает более 40 видов. Среди микобактерий есть сапрофитные, условно-патогенные (потенциально патогенные) и патогенные виды. Патогенные микобактерии вызывают заболевания, получившие общее название **микобактериозов**. К патогенным или потенциально патогенным относятся 24 вида микобактерий, но основные патогены человека – *M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. leprae* (табл. 18).

Таблица 18

Основные патогенные для человека микобактерии и их свойства

| Вид | Резервуар | Основные заболевания | Возможность передачи от человека человеку | Основной способ заражения |
|------------------------|-----------|----------------------|---|--|
| <i>M. tuberculosis</i> | Человек | Туберкулез | Да | Воздушно-капельный и воздушно-пылевой, реже через кожу и слизистые оболочки, иногда возможно трансплацентарное инфицирование плода |
| <i>M. bovis</i> | Животные | Туберкулез | Редко | При контакте с больными животными, при употреблении сырого молока или плохо обработанного мяса |
| <i>M. leprae</i> | Человек | Проказа | Да | При непосредственном контакте с больным человеком, а также воздушно-капельным путем |

Патогенность туберкулезных микобактерий определяется не синтезом экзотоксинов, а связана с высоким содержанием липидов в их клетках. Входящие в состав липидов фтиоидная, миколовая и другие жирные кислоты оказывают своеобразное токсическое действие на клетки ткани макроорганизма. Например, фосфатидная фракция, наиболее активная из всех липидов, обладает способностью вызывать в нормальном организме специфическую тканевую реакцию с образованием эпителиоидных клеток, жировая фракция – туберкулоидной ткани. Эти свойства указанных липидных фракций связаны с наличием в их составе фтиоидной кислоты. Восковая фракция, содержащая миколовую кислоту, вызывает реакции с образованием многочисленных гигантских клеток. Таким образом, с липидами, состоящими из нейтральных жиров, восков, стеринов, фосфатидов, сульфатидов и содержащими такие жирные кислоты, как фтиоидная, миколовая, туберкулостеариновая, пальмитиновая и другие, связаны патогенные свойства туберкулезных палочек. Однако главным фактором вирулентности является токсический гликолипид (корд-фактор), который располагается на поверхности и в толще клеточной стенки. По химической природе он представляет собой полимер, состоящий из одной молекулы дисахарида трегалозы и связанных с ней в эквимольных соотношениях высокомолекулярных жирных кислот ($C_{186}H_{366}O_{117}$). Корд-фактор не только оказывает токсическое действие на ткани, но и защищает туберкулезные палочки от фагоцитоза, блокируя окислительное фосфорилирование в митохондриях макрофагов и вызывая их гибель.

Факторы патогенности бактерий, вызывающих проказу (*M. leprae*), определяются также химическим составом их клеток; продукции экзотоксинов не установлено.

9.13. Пропионовокислые бактерии

Пропионовокислые бактерии объединены в род *Propionibacterium*, который входит в состав семейства *Propionibacteriaceae*.

В целом пропионовокислые бактерии характеризуются как грамположительные, каталазоположительные, неспорообразующие, неподвижные, факультативные анаэробы или аэротолератные. Клетки часто булавовидной формы с одним концом закругленным и другим суженным; некоторые клетки могут быть кокковидными, раздвоенными или разветвленными, но нитчатые формы отсутствуют. Расположение клеток одиночное, в парах, коротких цепочках, V- или Y-конфигурациях, а также группами в виде «китайских иероглифов».

Бактерии содержат менахины, C₁₅-насыщенную жирную кислоту мембранных липидов и образуют пропионовую кислоту при брожении, откуда и получили свое название. В слабоаэрируемых условиях пропионовокислые бактерии могут осуществлять аэробное дыхание. Содержание ГЦ-пар в ДНК 53–67 %. Оптимум температуры для роста 30–37 °C. Формируют колонии кремового, желтого, оранжевого, красного, коричневого цвета.

На основании высокой степени гомологии нуклеотидных последовательностей 16S-рРНК в род *Propionibacterium* включены три подгруппы пропионовых бактерий: классические, кожные и *Propionibacterium propionicus*.

Классические бактерии обитают главным образом в молоке, сырах (отсюда и другое название – молочные пропионовые). Кожные бактерии обитают на коже людей, в рубце жвачных животных. Их рассматривают как биологическую защиту человека и полезную естественную микрофлору рубца животных. Они усиливают иммуностимулирующие реакции у людей, благотворно влияют на сельскохозяйственных животных и птиц, и поэтому нашли применение как компоненты лечебных и профилактических препаратов. Кожные пропионовые бактерии живут не только на поверхности нормальной кожи людей, их выделяют также из угрей, реже из содержимого желудка, ран, крови, гнойных и мягких тканевых абсцессов, хотя вопрос о причастности этих бактерий к возникновению заболеваний утвердительного ответа не имеет. Таким образом, классические и кожные пропионовые бактерии различаются, прежде всего, по ха-

бактерным местам их обитания в природе. Кроме того, классические пропионовые бактерии, в отличие от кожных, не образуют индола и не способны к гидролизу желатины.

Третья подгруппа пропионовокислых бактерий включает только один вид – *Propionibacterium propionicus*. Бактерии этого вида обитают в почве.

К **классическим пропионовокислым бактериям** относятся четыре вида: *P. freudenreichii*, *P. thoenii*, *P. jensenii*, *P. acidipropionici*.

К **кожным пропионовокислым бактериям** относятся три вида: *P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum*.

Типовой вид – *Propionibacterium freudenreichii*.

Синтетические способности пропионовокислых бактерий хорошо развиты, хотя и различаются у разных видов и штаммов. Установлено, что некоторые пропионовокислые бактерии способны фиксировать молекулярный азот, использовать углеводороды, самостоятельно синтезировать витамины. Все пропионовокислые бактерии синтезируют витамин В₁₂, принимающий участие в брожении, синтезе белка, ДНК, в регуляции синтеза ДНК и некоторых других реакциях.

Продукты, выделяемые бактериями при брожении: пропионовую и уксусную кислоты, а также биомассу бактерий, широко применяют на практике. В зависимости от целей производства используют энзиматически неактивную или энзиматически активную биомассу.

Энзиматически неактивная биомасса применяется в животноводстве как белок одноклеточных организмов, богатый у пропионовокислых бактерий серосодержащими аминокислотами, особенно метионином, а также треонином и лизином, витаминами группы В. В корм животных рекомендуют добавлять биомассу бактерий *P. freudenreichii*, положительный эффект которой обусловлен обогащением корма микроэлементами, находящимися в биологически активной форме, витаминами и белком. Биомасса неживых (термически обработанных) бактерий служит источником витамина В₁₂, поскольку он выдерживает нагревание. Убитые нагреванием кожные бактерии (*P. acnes* и *P. granulosum*) рекомендованы для производства иммуностимулирующего препарата. Показано, что эти бактерии стимулируют образование антител, обладают антивирусными и антибактериальными свойствами. Кроме того, в ряде лабораторий установлено, что бактерии *P. acnes* способны замедлять рост различных (включая злокачественные) опухолей, а также инвазию опухолей за счет усиления защитных реакций организма. Еще более поразительный факт заключается в том, что *P. acnes* ингибирует распространение метастазов в организме. Иммуноterapia рака наиболее эффективна по-

сле операций, поскольку при этом удаляются источники диссимиляции опухолевых клеток, а также при химиотерапевтической ремиссии лейкемии. Наблюдения проводились не только на животных, но и на людях: они подтвердили безопасность убитых *P. acnes* для клинического применения.

Убитые бактерии *P. granulosum* являются источником порфиринов. Порфирины и металлокомплексы используют как красители и пигменты, включая красители для пищевых целей, как катализаторы реакций окисления-восстановления; катализаторы реакций окисления углеводов, меркаптанов в нефти, нефтепродуктах и т. д. Они могут применяться как диагностические и лечебные препараты.

Вторая категория производств основана на выращивании и получении **энзиматически активной биомассы**. Это производство:

- заквасок для сыроделия. Твердые сычужные сыры, в изготовлении которых обязательно принимают участие пропионовокислые бактерии, производят повсеместно;

- витамина В₁₂. Витамин В₁₂ с использованием ферментации пропионовокислых бактерий выпускают в России, Великобритании, Венгрии и других странах мира. Производство витамина В₁₂ методом химического синтеза практически невозможно;

- заквасок для хлебопечения. Пропионовокислые бактерии, наряду с дрожжами и молочнокислыми бактериями, вводят в некоторые закваски для теста с целью образования в процессе ферментации, помимо молочной и уксусной кислот, еще и пропионовой. Такой хлеб содержит до 0,28 % пропионовой кислоты, срок его хранения увеличивается в связи с ингибирующим действием пропионовой кислоты на рост плесневых грибов. Кроме того, такой хлеб обогащен витамином В₁₂; это особенно важно для вегетарианцев и лиц, страдающих различными заболеваниями, причиной которых служит дефицит витамина В₁₂ в организме;

- заквасок для силосования кормов;

- пропионовой кислоты как фунгицида. Известно, что вредители уничтожают 15 % мирового урожая во время хранения. При влажности более 14 % зерно начинает нагреваться и плесневеть. Такие способы сохранения зерна, как его сушка, хранение при низкой температуре или в герметических условиях, в реальной жизни трудно достигаемы. Но существует еще один способ, который уже применяется в некоторых странах, предусматривающий обработку (опрыскивание) зерна слабым раствором (0,5–1,0 %) пропионовой кислоты. Пропионовая кислота останавливает рост семян, убивает микроорганизмы, и прежде всего плесневые

грибы. Питательные качества такого корма повышаются, а вероятность заболевания животных микозом и микотоксикозом снижается.

Кроме того, энзиматически активную биомассу пропионовокислых бактерий можно использовать для обессахаривания белка куриных яиц. Эта проблема возникла в связи с хранением сухого яичного белка. В свежем белке имеется активный лизоцим, обладающий бактерицидным действием, однако в процессе хранения активность его снижается и белок становится уязвимым для многих, прежде всего гнилостных бактерий, вызывающих порчу. Вследствие накопления продуктов разложения и окислительных процессов белок оказывается непригодным для употребления в пищу. Предложен способ консервации белка с использованием пропионовокислых бактерий. Он основан на их способности расти в жидком курином белке, сбраживая за 24 ч углеводы с образованием консервантов пропионовой и уксусной кислот.

9.14. Коринеформные бактерии

Коринеформные бактерии – сводная группа грамположительных неспорообразующих палочковидных бактерий неправильной формы. В состав группы входят следующие роды: *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomas*, *Clavibacter*, *Microbacterium* и др.

К *роду Corynebacterium* относятся бактерии с булавовидной формой клеток (от греч. *coryne* – булава). В развивающейся культуре одновременно могут находиться клетки палочковидной, конусообразной и булавовидной формы. Размеры клеток 0,3–0,8 × 1,5–8,0 мкм. Неподвижны. Помимо плеоморфизма, для представителей этого рода характерно «защелкивание» клеток при их делении. Оно происходит из-за того, что соединяющая дочерние клетки перегородка расслаивается на разных сторонах с разной скоростью, так что клетки оказываются под углом друг к другу (V-сочетания клеток). Неислотоустойчивые. Внутри клеток, как правило, образуются метакроминовые гранулы полиметафосфата. В клеточной стенке имеются арабиногалактановый полимер и мезо-диаминопимелиновая кислота, а также специфические липиды – эфиры коринномиколовой и коринномиколеновой кислот, димиколат трегалозы, фосфаты маннозы и инозита.

Коринебактерии – аэробы и факультативные анаэробы, хемоорганотрофы. Метаболизм смешанный – бродильный и дыхательный. Основным продуктом при сбраживании углеводов является пропионовая кислота. Большинство представителей коринебактерий имеют сложные пищевые потребности и нуждаются в витаминах группы В и биотине. На

питательных средах формируют в основном пигментированные колонии (желтые, розовые, коричневые и др.).

Среди коринебактерий имеются паразиты человека и животных и патогенные для них, а также сапрофитные виды. Типовым видом сапрофитных коринебактерий является *C. glutamicum* – продуцент глутаминовой кислоты. Бактерии сапрофитного вида *C. mediolaneum* способны осуществлять биологическую трансформацию стероидов. Сапрофитные коринебактерии широко распространены в почвах, пресных водоемах, на овощах и фруктах. Многие патогенные виды являются нормальными обитателями кожи, слизистых оболочек зева, носоглотки, глаз, дыхательных путей, уретры и половых органов. Основными патогенами человека из рода *Corynebacterium* являются бактерии вида *C. diphtheriae* (типовой вид), которые вызывают дифтерию. Большинство штаммов *C. diphtheriae* неvirulentны, являются нормальными обитателями дыхательных путей. Способность вызывать дифтерию они приобретают после заражения их бактериофагом β . После того как клетки становятся лизогенными, они начинают синтезировать дифтерийный токсин (главный фактор вирулентности). Основным путем передачи инфекции – воздушно-капельный; возможно также заражение через предметы, используемые больным, и инфицированные пищевые продукты (особенно молоко).

Род *Arthrobacter* представлен палочковидными бактериями неправильной формы варьирующих размеров (0,8–1,2 × 1,0–8,0 мкм), образующими клетки различных сочетаний (V-, Y- и др.) и с булавовидными концами, но нити отсутствуют. Для артробактерий характерен цикл развития: кокк – палочка – кокк. Старые культуры полностью или главным образом состоят из кокковидных клеток (диаметр 0,6–1,0 мкм), которые образуются при распаде палочковидных бактерий. При посеве культуры в свежую питательную среду происходит прорастание кокковидных клеток. Прорастание осуществляется путем образования ростков, которых может быть от одного до четырех на клетку. У большинства артробактерий полный цикл развития (кокк – палочка – кокк) завершается в течение 1–2 суток.

Артробактерии – грамположительные, но легко обесцвечиваются. Не кислотоустойчивые, не спорообразующие. Представители некоторых видов подвижны благодаря наличию жгутиков. По составу клеточной стенки отличаются от коринебактерий. Они не имеют арабиногалактана и миколовых кислот. Характерными аминокислотами клеточной стенки являются лизин или L,L-диаминопимелиновая кислота.

Аэробы. Хемоорганотрофы. Метаболизм дыхательный, никогда не бывает броидильным. Многие виды нуждаются в факторах роста: биоти-

не, тиамине, пантотеновой кислоте. Целлюлозу не гидролизуют, каталазоположительные. Температурный оптимум для роста 25–30 °С. Оптимум pH для роста 7,0–8,0.

Бактерии рода *Arthrobacter* являются одной из основных групп микроорганизмов, обитающих в различных почвах земного шара, а также в ризосфере растений. Их находят в воде и горных породах, торфе, кишечном тракте животных, в производственных и пищевых субстратах.

Обладая значительным набором ферментов, артробактерии активно участвуют в круговороте веществ в природе, осуществляя процессы аммонификации и нитрификации, фиксации атмосферного азота и превращения труднодоступных для других микроорганизмов веществ: пластмасс, углеводов, пестицидов, алкалоидов, лигнина и т. д.

Многообразна биосинтетическая деятельность артробактерий. Они активно продуцируют аминокислоты, витамины, ауксины, внеклеточные полисахариды и пигменты; широко используются в микробиологической промышленности как продуценты органических кислот (лимонной и пантотеновой), производных и предшественников нуклеиновых кислот (5-пуридиннуклеотида, 6-азаурацилрибонуклеотида, НАД, гуанин-5-монофосфата, оротидиловой кислоты, ксантина), свободных аминокислот (гистидина, изолейцина, серина, триптофана, треонина, фенилаланина), протеолитических ферментов.

Описано 30 видов бактерий рода *Arthrobacter*. Типовой вид – *Arthrobacter globiformis*.

Бактерии *рода Brevibacterium* в молодых культурах представлены палочками неправильной формы (0,6–1,2 × 1,5–6 мкм), одиночными или в парах и часто расположенными V-образно. Может встречаться ветвление, но мицелий не образуется. В старых культурах палочки распадаются на мелкие кокки.

Бревибактерии – грамположительные, но легко обесцвечиваются, неподвижные, неспорообразующие, некислотоустойчивые. В их клеточной стенке имеется DL-диаминопимелиновая кислота, но отсутствуют арабиногалактановый полимер и миколовые кислоты.

Это облигатные аэробы, хемоорганотрофы, каталазоположительные. Метаболизм дыхательного типа. На агаризованных питательных средах формируют желто-оранжевые, серые или пурпурные колонии. Оптимальная температура для роста 20–35 °С. Многие представители бревибактерий являются продуцентами биологически активных веществ (аминокислот, внеклеточных белков).

Бревибактерии экологически связаны со специфическими органическими субстратами – молочными продуктами, кожей рыб, пометом

домашних птиц и т. д. Кроме того, они обнаруживаются на коже человека.

Род *Brevibacterium* включает четыре вида: *B. casei*, *B. epidermidis*, *B. iodinum*, *B. linens*. Типовой вид – *B. linens*. Это соленоустойчивые микроорганизмы. Наиболее часто их можно обнаружить на поверхности мягких сыров, на коже морских рыб, на помете домашних птиц и в морской воде. Бактерии данного вида зависимы в витаминах группы В, колонии имеют желто-оранжевую пигментацию.

Род *Cellulomas* – гетерогенная группа бактерий, утилизирующих целлюлозу. В молодых культурах бактерии этого рода представляют собой палочки неправильной формы ($0,5\text{--}0,6 \times 2,0\text{--}0,5$ мкм). Они могут быть прямыми, угловатыми, слегка изогнутыми, а иногда булабовидными или располагаться в форме буквы V. В экспоненциальной фазе роста могут быть нитеобразными и могут давать первичные ответвления, но мицелий не образуют. В более старых культурах часть клеток может быть кокковидной. Однако для бактерий рода *Cellulomas* не характерен цикл кокков. Клетки некоторых представителей передвигаются с помощью одного полярного или нескольких латеральных жгутиков. Обнаружены и неподвижные представители. Эндоспор не образуют. Грамположительные; клетки легко обесцвечиваются, и часто в культуре наблюдается смесь грамположительных и грамотрицательных палочек. Некислоустойчивые. Клеточные стенки не содержат мезо-диаминопимелиновой кислоты, арабиногалактанового полимера и миколовых кислот.

Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладающие и дыхательным, и бродильным типом метаболизма с образованием кислоты из глюкозы и различных других углеводов в аэробных и в анаэробных условиях. Каталазоположительные. Восстанавливают нитраты до нитритов. При росте на агаризованной среде с пептоном и дрожжевым экстрактом образуют выпуклые желтые колонии. Оптимальная температура для роста 30 °С. Хорошо растут при нейтральных значениях pH. Для роста нуждаются в биотине и тиамине.

Бактерии рода *Cellulomas* широко распространены в почвах, отходах бумажной промышленности, гниющем растительном материале.

Род *Cellulomas* представлен восемью видами. Типовой вид – *Cellulomas fla-vigena*.

Бактерии **рода *Clavibacter*** выделены из рода *Corynebacterium*. Этот род объединяет виды аэробных фитопатогенных бактерий, клеточная стенка которых содержит 2,4-диаминомасляную кислоту, а не мезо-диаминопимелиновую, как у бактерий других видов рода *Corynebacterium*.

Кроме того, в клеточной стенке бактерий *Clavibacter* не содержатся миколовые кислоты и арабиногалактановый полимер.

Бактерии рода *Clavibacter* представлены прямыми или слегка изогнутыми тонкими палочками (0,4–0,75 × 0,8–2,5 мкм) неправильной формы и часто клино- или булабовидной формы, преимущественно одиночными или в парах V-образной конфигурации. В старых культурах обнаруживаются кокковидные клетки, но цикл «палочки – кокки» не характерен.

Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, некислоустойчивые.

Бактерии рода *Clavibacter* относятся к облигатным аэробам и хемоорганотрофам. Метаболизм дыхательного типа с образованием небольшого количества кислоты из глюкозы и некоторых других углеводов. Кatalазоположительные, оксидазоотрицательные, индол не образуют, нитраты не восстанавливают. Оптимальная температура для роста 20–29 °С; в редких случаях растут при температуре выше 35 °С. Нуждаются в богатых питательных средах, растут медленно. Некоторые штаммы синтезируют желтый или голубой пигмент.

Бактерии рода *Clavibacter* являются облигатными паразитами, вызывающими заболевания различных цветущих растений.

Род *Clavibacter* представлен пятью видами: *C. iranicus*, *C. michiganensis*, *C. rathayi*, *C. tritici*, *C. xyli*. Типовой вид – *C. michiganensis* (возбудитель бактериального рака томатов).

К роду *Microbacterium* относятся тонкие палочковидные бактерии неправильной формы (0,4–0,8 × 1,0–4,0 мкм), одиночные или в парах V-образной конфигурации. Первичное ветвление нетипично, и мицелий не образуется. В старых культурах палочки короче, но четкий цикл «палочка – кокки» отсутствует. Грамположительные, некислоустойчивые, неспорообразующие. В клеточной стенке имеется лизин, но отсутствуют миколовые кислоты и арабиногалактановый полимер. Неподвижные или подвижные за счет одного-трех жгутиков.

Бактерии рода *Microbacterium* – аэробы, хемоорганотрофы. Метаболизм в основном дыхательного типа, но может быть и слабо выраженный бродильного типа. Кatalазоположительные. Требуют для роста витамины группы В и некоторые аминокислоты. На агаризованной среде с дрожжевым экстрактом, пептоном и глюкозой формируют непросвечивающие, блестящие, часто с желтоватой пигментацией колонии. Оптимальная температура для роста около 30 °С. Не растут при 18 и 40 °С. Выдерживают нагревание при 72 °С в течение 15 мин в обезжиренном молоке.

Обнаружены в молоке, молочных продуктах, на оборудовании молочных предприятий, в сточных водах и у насекомых.

Род *Microbacterium* включает четыре вида: *M. arborescens*, *M. imperiale*, *M. lacticum*, *M. laevaniformans*. Типовой вид – *M. lacticum*.

9.15. Актиномицеты

Актиномицеты относятся к порядку *Actinomycetales*, в который входят бактерии, имеющие тенденцию к образованию ветвящихся гиф, способных развиваться в мицелий. Гифы могут быть очень короткими или хорошо развитыми и в связи с этим мицелий может быть плотным, субстратным, врастающим в питательную среду или же рыхлым, воздушным на поверхности колонии. Различают мицелий стабильный и распадающийся на палочковидные или кокковидные элементы, некоторые из них обладают подвижностью за счет жгутиков. Мицелий может нести интеркалярные везикулы, не содержащие спор либо содержащие многочисленные споры. Кроме того, для актиномицетов характерно образование конидий (бесполох спор), которые похожи на бактериальные эндоспоры и служат для перенесения неблагоприятных условий внешней среды. Характер расположения конидий у разных групп актиномицетов отличается. Это могут быть одиночные конидии, пары конидий, короткие или длинные цепочки конидий, конидиенесущие гифы, соединенные в пучки гиф, из которых высвобождаются подвижные споры.

Еще одним морфологическим критерием, который используется для идентификации актиномицетов, является образование спорангиев – мешков, содержащих споры. Они могут образовываться на хорошо развитых воздушных гифах или на поверхности конидий со слабо развитым воздушным мицелием либо без него, либо главным образом в толще агара (рис. 101).



Рис. 101. Схематическое изображение мицелиального роста и спорообразования у актиномицетов различных родов
(из «Todar's Online Textbook of Bacteriology»; www.textbookofbacteriology.net)

Кроме морфологических критериев, для идентификации актиномицетов используются данные о химической структуре некоторых соединений:

- типе двухосновной аминокислоты, присутствующей в составе клеточной стенки (мезо- или L-диаминопимелиновая кислота);
- типе диагностических сахаров, содержащихся в гидролизате целых клеток.

Культуры актиномицетов по окраске делятся на две группы: бесцветные и пигментированные. Первые при росте на питательных средах не образуют никаких пигментов, колонии их бесцветные, беловатые. Актиномицеты второй группы образуют пигменты, поэтому формируют окрашенные колонии: синие, фиолетовые, красные, розовые, желтые, оранжевые, зеленые, коричневые, черные (рис. 102, 103).

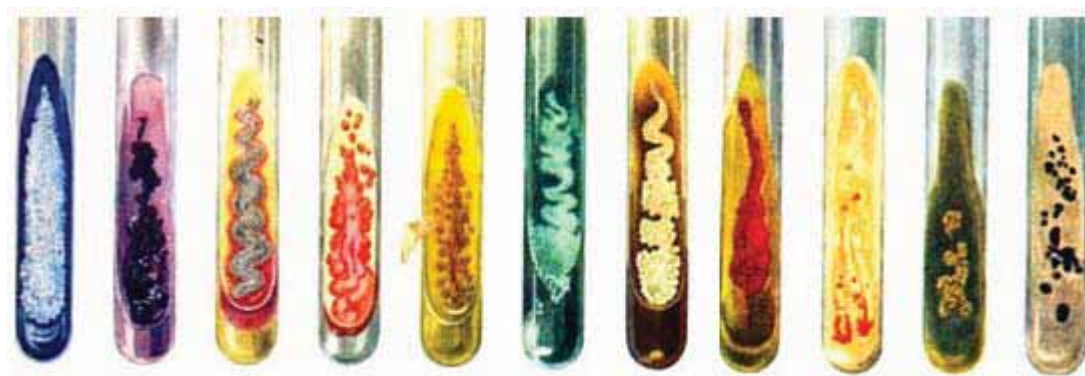


Рис. 102. Пигментация у различных видов актиномицетов

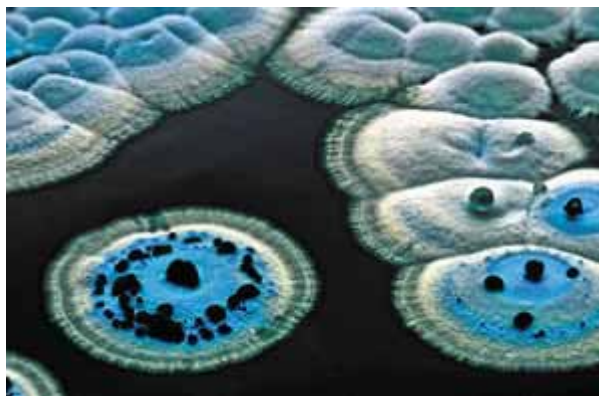


Рис.103. Колонии бактерий *Streptomyces coelicolor*
(из «Hinger Education and Research Opportunitie, the John Innes Centre»;
<http://www.hero.ac.uk/sites/hero/uk/research/archives/2002/>)

Многие актиномицеты могут синтезировать одновременно несколько пигментов, причем на разных средах в различных количественных соот-

ношениях. Пигменты актиномицетов разнообразны по своим химическим и физическим свойствам. Одни из них хорошо растворяются в воде и этиловом спирте, другие не растворяются в воде, но растворяются в спирте, эфире и других органических растворителях. Третьи не растворяются ни в воде, ни в органических растворителях.

Актиномицеты – грамположительные организмы, хотя реакция по Граму может изменяться с возрастом культуры. Большинство аэробы, но некоторые роды представлены факультативными или облигатными анаэробами. Хемоорганогетеротрофы, использующие разнообразные источники энергии: углеводы, органические кислоты, спирты, крахмал, декстрин, клетчатку, различные углеводородные соединения (парафин и другие продукты переработки нефти), жиры, воски, лигнин, хитин и др. В большинстве случаев встречаются как свободноживущие в разнообразных местообитаниях. Однако есть актиномицеты, которые образуют симбиотические азотфиксирующие ассоциации с растениями (род *Frankia*).

Встречаются чаще в почве и реже – в пресной воде. Есть патогенные для человека, животных и растений виды. Споры могут быть аллергенными для человека.

По морфологическим и химическим критериям актиномицеты в девятом издании «Определителя бактерий Берджи» разделены на восемь групп родов.

1. Нокардиоформные актиномицеты.
2. Роды с многогнездными спорангиями.
3. Актинопланы.
4. Стрептомицеты и близкие роды.
5. Мадуромицеты.
6. *Thermomonospora* и близкие виды.
7. *Thermoactinomyces*.
8. Другие роды.

Нокардиоформные актиномицеты. Это гетерогенная группа, многие представители которой образуют нити мицелия, распадающиеся на более короткие элементы. Для некоторых родов характерно образование воздушного мицелия с цепочками спор. Подразделение на роды основано в первую очередь на хемотипе клеточной стенки, присутствии или отсутствии миколовых кислот и других химических признаках. Эта группа актиномицетов разделена на четыре погруппы:

- бактерии, содержащие миколовые кислоты;
- *Pseudonocardia* и близкие роды;
- *Nocardioides* и *Terrabacter*;

- *Promicromonospora* и близкие роды.

Бактерии, содержащие миколовые кислоты, широко распространены в природе, особенно в почве, однако некоторые виды ассоциированы с животными. В эту подгруппу входят четыре рода: *Gordona* (выделяются из почвы, мокроты больных легочным туберкулезом); *Nocardia* (широко распространены и обильно представлены в почве. Некоторые являются возбудителями актиномицетной мицетомы и нокардиоза); *Rhodococcus* (широко распространены; особенно обильно представлены в почве и помете травоядных животных. Некоторые представители патогенны для человека и животных); *Tsukamurella* (выделены из почвы, мокроты человека, а также из мицетом и яичников постельных клонов. Некоторые представители известны как возбудители легочной инфекции, менингита с летальным исходом и некротирующего тендовагинита).

Подгруппа Pseudonocardia и близкие роды выделяются из разнообразных местообитаний, чаще всего из почвы и растительного материала; некоторые виды вызывают аллергические заболевания. Подгруппа включает 10 родов бактерий.

Подгруппа Nocardioides и Terrabacter состоит из двух родов бактерий: *Nocardioides* и *Terrabacter*. Встречаются в почве.

Подгруппа Promicromonospora и близкие роды выделяются из почвы и растительного материала. Включает три рода: *Jonesia*, *Oerskovia* и *Promicromonospora*.

Роды с многогнездными спорангиями. Для актиномицетов этой группы типично образование нитей мицелия, делящихся в продольном и поперечном направлениях, и большого числа кокковидных элементов, которые могут быть подвижными или неподвижными. В эту группу входят три рода:

- *Dermatophilus* – паразиты млекопитающих, в частности сельскохозяйственных животных; обычно вызывают только экссудативный дерматит (например, *Dermatophilus congolensis*), который может быть очень тяжелым и угрожающим жизни; в редких случаях вызывают подкожные абсцессы и лимфогранулематоз;
- *Frankia* – большинство штаммов – симбионты ряда покрытосеменных растений, индуцирующие образование клубеньков на корнях соответствующих хозяев. Встречаются и как свободноживущие в почве;
- *Geodermatophilus* – местообитание почва.

Актинопланы. Представлены бактериями, нити мицелия которых не распадаются на фрагменты; воздушный мицелий развит слабо или отсутствует. Они образуют подвижные или неподвижные споры в спорангиях, одиночные либо в цепочках. Клеточные стенки содержат мезо-диамино-

пимелиновую кислоту и глицин, в гидролизатах целых клеток присутствуют арабиноза и ксилоза. Местообитание – почва, разлагающийся растительный материал, пресная и морская вода, ил. Группа включает шесть родов: *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Catellaspore*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Pilimelia*.

Стрептомицеты и близкие роды. Это гетерогенная группа, для всех таксонов которой характерны клеточные стенки, содержащие L-диаминопиколоновую кислоту и глицин. Нити мицелия не распадаются на фрагменты и могут образовывать обильный воздушный мицелий с длинными цепочками спор (роды *Streptomyces* и *Streptoverticillium*) (рис. 104). Для других родов (*Intrasporangium*, *Kineospora*, *Sporichthya*) характерно слабое развитие воздушного мицелия либо полное его отсутствие и разнообразные по форме споры.

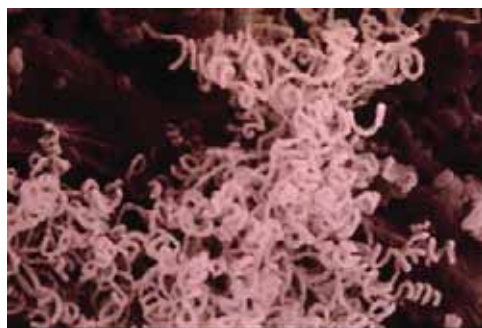


Рис. 104. Филаменты мицелия бактерий рода *Streptomyces*
(из «Natural Resources Conservation Service»; http://soils.usda.gov/.../soil_biology/)

В группу входит пять родов: *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Intrasporangium*, *Kineospora*, *Sporichthya*. Основное местообитание представителей этих родов – почва, но есть патогенные для человека и животных или растений виды. Типовой род – *Streptomyces*. Все стрептомицеты – облигатные аэробы. Они нетребовательны к питательным субстратам, не нуждаются в факторах роста, преимущественно сапрофиты. Стрептомицеты широко распространены в почвах разных типов и играют большую роль в минерализационных процессах. Их наличие обуславливает специфический запах свежеспаханной почвы. Из стрептомицетов *Str. griseus* было выделено масло, названное геосмином, обладающее таким запахом. Стрептомицеты хорошо развиваются при низкой влажности почвы, поэтому в почвах засушливых климатических зон они численно преобладают над всеми микроорганизмами.

Повсеместное распространение актиномицетов рода *Streptomyces* связано с наличием у них активных ферментных систем, позволяющих разрушать и использовать самые разнообразные соединения. Так, у актино-

мицетов выявлена способность продуцировать такие гидролитические ферменты, как протеазы, амилазы, кератиназы, хитиназы, активные окислительно-восстановительные ферменты группы полифенолоксидаз, обес-печивающие расщепление устойчивых фенольных соединений, входящих в состав гумуса. Некоторые актиномицеты осуществляют трансформацию полициклических соединений – стероидов – в биологически активные соединения – стероидные гормоны (преднизолон, кортизон). Среди актиномицетов особенно много продуцентов антибиотиков. Например, *Str. aureofaciens* – продуцент тетрациклина, *Str. griseus* – продуцент стрептомицина, *Str. venezuelae* – продуцент хлорамфеникола и др. Одновременно с образованием тетрациклина бактерии вида *Str. aureofaciens* синтезируют также витамин В₁₂ и его аналоги. Витамины группы В способны продуцировать почти все стрептомицеты. Многие из них образуют каротиноидные пигменты, черно-коричневые меланины и сине-фиолетовые антоцианы.

Среди фитопатогенных представителей рода *Streptomyces* следует отметить бактерии вида *Str. scabies*, которые являются возбудителями парши картофеля. Парша картофеля проявляется в образовании уплотненных слоев на поверхности клубней, ухудшении свойств, связанных с пищевой ценностью (рис. 105). Возбудитель поражает только клубни и неактивен в отношении зеленых частей растения. Вирулентность этих бактерий связана с наличием кутиназы, которая гидролизует полимер защитного кутикулярного слоя. Показано, что стрептомицеты, вызывающие паршу картофеля, могут подавлять образование фитоалексинов в клубнях. Фильтраты культуральной жидкости бактерий *Str. scabies* ингибируют дыхание клубней картофеля.



Рис. 105. Клубни картофеля, пораженные бактериями *Streptomyces scabies* (из «Vegetable MD Online»; <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/>)

Мадуромицеты. Это бактерии, нити мицелия которых не распадаются на фрагменты и образуют развитый в большей или меньшей степени

воздушный мицелий, несущий споры. Клеточные стенки содержат мезо-диаминопимелиновую кислоту, а гидролизаты целых клеток мадурузу. Эта группа разделена на две подгруппы:

- *Streptosporangium* и родственные таксоны;
- *Actinomadura*.

Мадуромицеты – в основном почвенные микроорганизмы, но среди них встречаются патогенные для человека и животных виды.

***Thermomonospora* и близкие виды.** Представлены бактериями, нити мицелия которых не распадаются на фрагменты и образуют воздушный мицелий со спорами, расположенными одиночно (род *Thermomonospora*), в цепочках (роды *Actinosynnema*, *Nocardiopsis*) или в спорангиеподобных структурах (род *Streptoalloteichys*). Клеточные стенки содержат мезо-диаминопимелиновую кислоту; в гидролизатах целых клеток характерные аминокислоты и сахара отсутствуют. Миколовые кислоты также отсутствуют. Основное местообитание – почва.

***Thermoactinomyces*.** Это группа бактерий, нити мицелия которых не распадаются на фрагменты и образуют воздушный мицелий. Одиночные споры (представляющие собой эндоспоры) имеются как на воздушном, так и на субстратном мицелии. Все виды термофильные. Клеточные стенки содержат мезо-диаминопимелиновую кислоту; характерные аминокислоты и сахара отсутствуют. Аэробы; сапрофитные хемоорганотрофы. Группа представлена только одним родом – *Thermoactinomyces*.

Другие роды. Эта группа включает три рода: *Glycomyces*, *Kitasatospora*, *Saccharothrix*. Они не могут быть в настоящее время отнесены ни к одной из вышеперечисленных групп. Все представители этих родов образуют воздушный мицелий с цепочками спор. В составе клеточной стенки отсутствуют миколовые кислоты. Аэробы, хемоорганотрофы. Выделены из почвы.

9.16. Микоплазмы

Микоплазмы – это очень мелкие прокариотические организмы, полностью лишенные клеточных стенок. Клетки ограничены только цитоплазматической мембраной и не способны к синтезу пептидогликана и его предшественников. В связи с этим для них характерен ярко выраженный плеоморфизм. В культуре одного вида можно одновременно обнаружить кокковидные, эллипсовидные, дискообразные, палочковидные, грушевидные клетки, а также нитевидные формы. Нити могут ветвиться, образуя структуры, подобные мицелиальным. Диаметр клеток составляет 0,1–10 мкм. Размножаются различными способами: бинарным делением;

фрагментацией крупных тел и нитей, сопровождающейся освобождением большого числа кокковидных форм; почкованием. Репликация генома предшествует, но не обязательно синхронизована с клеточным делением.

Микоплазмы, как правило, неподвижны, однако некоторые виды обладают способностью к скользящему движению по поверхностям, покрытым жидкостью. Клетки других видов, имеющие форму спиральных нитей, обнаруживают подвижность вращательного, изгибательного и поступательного типов.

Покоящиеся стадии неизвестны.

Отсутствие клеточной стенки обуславливает еще одну отличительную особенность микоплазм – их нечувствительность к антибиотикам, специфически действующим на бактериальную стенку (пенициллину, ампициллину, цефалоспорины и др.).

Микоплазмы представляют собой группу, чрезвычайно разнообразную с точки зрения физиолого-биохимических особенностей. Они могут расти:

- на искусственных бесклеточных средах разной степени сложности (от простых минеральных до сложных органических). Большинство видов нуждается для роста в стеринах и жирных кислотах;
- только внутри организма-хозяина, откуда их можно выделить с использованием культуры клеток.

Разнообразны также способы получения энергии у микоплазм. Среди них описаны виды, получающие энергию за счет окисления или сбраживания органических соединений, а также за счет окисления неорганических соединений (железа, марганца). Описаны микоплазмы, являющиеся строгими аэробами, хотя большинство из них – факультативные анаэробы. Некоторые микоплазмы – облигатные анаэробы, погибающие в присутствии минимального количества минерального кислорода.

Микоплазмы могут быть сапрофитными, паразитическими и патогенными. Патогенные вызывают заболевания человека, животных (в том числе насекомых) и растений.

Факторы вирулентности микоплазм, патогенных для человека и животных, разнообразны. Они продуцируют как экзо-, так и эндотоксины; пероксид водорода, нейраминидазу, кислые фосфатазы, уреазу, аргининдегидролазу. Ферменты действуют на соответствующие субстраты и обуславливают в силу этого патогенный эффект. Например, аргининдегидролаза разрушает необходимую для нормальной жизнедеятельности клеток аминокислоту аргинин. Нейраминидаза вызывает изменения рецепторного аппарата клеточных мембран эритроцитов, респираторного

эпителия и т. д. Пероксид водорода вызывает повреждения мерцательного эпителия трахеи и бронхов человека и животных.

Первая фаза микоплазменной инфекции основана на способности микоплазм адсорбироваться на клетках хозяина. Это обусловлено общностью рецепторных участков на мембранах разных видов микоплазм и разных типов клеток макроорганизмов. Разные виды микоплазм адсорбируются на эритроцитах, макрофагах, мембранных структурах реснитчатого эпителия трахеи и бронхов человека, крупного рогатого скота, птиц и других организмов. Проникновение микоплазм в клетки происходит редко, т. е. они действуют с поверхности клетки. Конечный эффект взаимодействия микоплазм и клеток организма может выражаться в развитии либо острой инфекции, сопровождающейся видимым изменением, разрушением поражаемых клеток, либо скрытой ее форме – изменяются метаболизм и функции поражаемых клеток, нарушается нормальное клеточное деление, вызываются хромосомные изменения.

Основными факторами патогенности фитопатогенных микоплазм являются токсины, пероксид водорода, аммиак, ферменты (нуклеазы, протеазы, уреазы и т. д.). Также одним из факторов патогенности принято считать их конкуренцию с клеткой-хозяином за отдельные субстраты энергетического и белкового обменов (углеводы, аминокислоты и т. д.). Так, для большинства аргининусваивающих микоплазм в качестве основного фактора патогенности является их способность усваивать аргинин.

Микоплазмы вызывают такие заболевания, как столбуры (недоразвитость верхушки, усиление ветвления, курчавость листьев, разрастание чашелистиков, позеленение лепестков, увядание и т. п.); желтухи (удлинение междоузлий и пожелтение листьев); «ведьмины метлы» (чрезмерное разрастание пазушных и дополнительных побегов, недоразвитость верхушек); вырождения и др.

Основными заболеваниями, наносящими значительный экономический ущерб, являются микоплазмозы пшеницы, пасленовых, винограда и некоторых древесных культур (яблони, шелковицы и др.). К наиболее распространенным микоплазмозам относятся бледно-зеленая карликовость пшеницы, «ведьмины метлы» картофеля, столбур томатов и др.

По вредоносности микоплазмозы, за небольшим исключением, относятся к катастрофическим заболеваниям. Урожай пшеницы может снизиться на 80–90 %. Большой вред они наносят овощеводству, вызывая потери на 25–38 % урожая плодов томатов и других пасленовых, недобору 18–20 % урожая картофеля.

Микоплазмы широко распространены в основных районах хлебопашества и овощеводства.

Характер взаимодействия микоплазм с мембранами клеток специфических растений-хозяев очень сходен с таковым микоплазм, патогенных или потенциально патогенных для человека и животных. В основе взаимодействия лежит родство рецепторного аппарата микоплазм и клеток. Адсорбировавшиеся на мембранных элементах клеток-хозяев микоплазмы получают возможность извлекать из них необходимые питательные субстраты, а также непосредственно влиять на генетический аппарат клеток хозяина.

Интересен также способ распространения микоплазмозов растений. Если микоплазмы, поражающие человека и животных, распространяются от особи к особи посредством прямых контактов, а у птиц, кроме того, и через яйца, то фитопатогенные микоплазмы являются типичными трансмиссивными патогенами. Для их распространения обязательно нужен переносчик. Основную роль в распространении микоплазмозов растений играют насекомые, главным образом цикадки. Насчитывается свыше 60 видов цикадок-переносчиков микоплазмозов растений. Кроме того, микоплазмы могут передаваться механически – при использовании больного прививочного материала.

Порядок *Mycoplasmatales* по своим свойствам является гетерогенной группой бактерий, включающей три семейства: *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae* и *Spiroplasmataceae*.

Семейство *Mycoplasmataceae* представлено двумя родами: *Mycoplasma* и *Ureaplasma*. Различия между ними состоят в том, что бактерии рода *Ureaplasma* обладают уреазной активностью. Все представители данного семейства являются хемоорганогетеротрофами, характеризующимися высокими потребностями в питательных веществах (особенно в холестерине или близких стеринах). Энергетический метаболизм ферментативного или окислительного типа. Использование глюкозы происходит по гликолитическому пути. Некоторые из представителей семейства способны передвигаться путем скольжения.

Большинство представителей данного семейства является высокоспециализированными паразитами человека, животных, насекомых и растений. Многие паразитические формы бактерий этого семейства патогенны, например *Mycoplasma pneumoniae* – возбудитель острых респираторных заболеваний и пневмоний у человека. Бактерии видов *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* – возбудители воспалительных заболеваний мочеполовой системы, таких как уретриты, циститы, пиелонефриты, простатиты, вагиниты и др. Этими видами микоплазм инфицировано

не менее 50 % здоровых мужчин и женщин в возрасте 30–50 лет, причем до 30 % женщин – носители одновременно обоих видов микоплазм.

В состав семейства *Acholeplasmataceae* входит один род – *Acholeplasma*. Ахолеплазмы менее требовательны к составу питательных сред и не нуждаются для роста в холестерине и сыворотке. Не гидролизуют аргинин и мочевины. К ахолеплазмам относятся свободноживущие сапрофитные бактерии и паразиты млекопитающих и птиц; некоторые из них, возможно, патогенны. Наиболее хорошо изучены бактерии вида *Acholeplasma laidlawii*, относящиеся к сапрофитным микоплазмам.

В третье семейство *Spiroplasmataceae* включены бактерии рода *Spiroplasma*. Отличительным признаком спироплазм является их своеобразная морфология: в стадии роста среди разнообразных форм преобладают спиралевидные нити. На первых этапах развития спироплазмы нуждаются в холестерине. На более поздних этапах развития у них индуцируется синтез каротиноидов, которые в мембранах спироплазм выполняют те же функции, что и холестерин. Спироплазмы являются внутриклеточными паразитами. Выделены из клещей, гемолимфы и кишечника насекомых, из сосудистой жидкости растений, с поверхности цветковых растений и т. д. Типовой вид данного рода – *Spiroplasma citri* – патоген цитрусовых растений, хрена, редьки.

9.17. Метилотрофные бактерии

Метилотрофы – микроорганизмы, способные использовать в качестве источника углерода и энергии одноуглеродные, или C_1 -соединения. К таким веществам относятся метан (CH_4), метанол (CH_3OH), формальдегид ($HCHO$), формиат ($HCOOH$), метиламин (CH_3NH_2), хлорметан (CH_3Cl), цианид калия (KCN) и др. В большинстве этих соединений углерод представлен в виде метильной группы, поэтому микроорганизмы, использующие их, и получили название метилотрофов.

Метилотрофные микроорганизмы распространены повсеместно, это связано с тем, что практически везде в природе имеются C_1 -соединения. Например, ежегодно в атмосферу поступает 10^{15} г метана (из болот, прудов, органического ила, промышленных отходов, недр земли, из желудков жвачных животных и др.). Однако в атмосфере он не накапливается, его используют метаноокисляющие бактерии. Метан, кроме того, подвергается фотоокислению с образованием метанола. В природе обнаруживаются также формальдегид, формиат, формамид, цианиды и их соли, CO , метиламины, что также определяет места распространения метилотрофов (табл. 19).

**Источники образования и распространение в природе
одноуглеродных соединений**

| С ₁ -соединения | Нахождение в природе | Источник |
|---|---|---|
| CH ₄ (метан) | Заливные луга, озера, болота, сточные воды, шахты, рубец жвачных животных | Метаногенные бактерии, попутный газ |
| CH ₃ OH (метанол) | Атмосфера, гниющие растительные остатки, разложение лигнина и пектина | Фотоокисление метана, химическое разложение лигнина и гемицеллюлозы |
| HCONH (формальдегид) | Промышленные сбросы | Отходы лакокрасочной и химической промышленности |
| HCOOH (формиат) | Промышленные сбросы | Химическая промышленность, бродильное производство |
| HCONH ₂ (формамид) | Промышленные сбросы | Химическая промышленность |
| KCN и другие цианиды | Промышленные сбросы, разложение растительного материала | Гальванопластика, продукты метаболизма микроорганизмов |
| CO (оксид углерода) | Города, свалки, пожарища | Разложение порфиринов |
| CH ₃ NH ₂ (метиламин) (CH ₃) ₂ NH (диметиламин) (CH ₃) ₃ N (триметиламин) | Промышленные сбросы, водоемы | Разложение отходов рыбной промышленности, белков, аминокислот |

Метилотрофные микроорганизмы составляют таксономически неоднородную, не связанную родством группу и включают грамположительные, грамотрицательные бактерии и дрожжи.

По способности использовать С₁ и другие углеродные соединения метилотрофные бактерии делятся на две основные группы: облигатные и факультативные. Облигатные метилотрофы способны расти только на одноуглеродных субстратах. Группа факультативных метилотрофов включает бактерии, которые наряду с одноуглеродными могут использовать и некоторые полиуглеродные соединения.

Облигатные метилотрофные бактерии входят в состав родов: *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Methylophaga*, *Methylovorus* и *Methylobacterium*. Это в основном грамотрицательные эубактерии с разной морфологией и размерами клеток, подвижные и неподвижные. Облигатные аэробы. Тип метаболизма – дыхательный. Каталазо- и оксидазоположительные. При росте на метаноле имеют сложную систему внутрицитоплазматических мембран двух типов: мембраны первого типа представлены стопками плотно упакованных везикулярных дисков, распределенных во всей цитоплазме;

мембраны второго типа имеют вид ламелл, расположенных по периферии клетки. Отличительные признаки родов облигатных метилотрофных бактерий приведены в табл. 20.

Таблица 20

Отличительные признаки облигатных метилотрофных бактерий

| Признаки | Роды | | |
|---|--|---|---|
| | <i>Methylococcus</i> <i>Methylomonas</i> | <i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i> | <i>Methylovorus</i> <i>Methylobacillus</i> <i>Methylophilus</i> <i>Methylophaga</i> <i>Methylobacterium</i> |
| Упаковка внутрицито-плазматических мембран | Первый тип | Второй тип | Первый тип |
| Цикл трикарбоновых кислот | Неполный (не содержат α -кетоглутаратдегидрогеназы) | Полный | Неполный (не содержат α -кетоглутаратдегидрогеназы) |
| Покоящиеся формы | Цисты | Экзоспоры | Не имеют |
| Основной путь ассимиляции C_1 -соединений | Рибулозомонофосфатный путь | Сериновый путь | Восстановительный пентозофосфатный путь (цикл Кальвина) |
| Длина углеродной цепи жирных кислот | 16 углеродных остатков | 18 углеродных остатков | 16 углеродных остатков |

К факультативным метилотрофам относятся некоторые представители родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Nocardia*, *Hyphomicrobium*, *Brevibacterium* и др. Это различные по морфологии, окраске по Граму, подвижные или неподвижные бактерии, единственным общим признаком которых является способность расти на C_1 -соединениях.

Использование метилотрофами C_1 -соединений в конструктивном и энергетическом метаболизме привело к формированию у них специфических путей их ассимиляции и окисления.

Процесс полного окисления метана может быть представлен в виде следующей схемы (рис. 106).

Формальдегид у метилотрофных бактерий является ключевым метаболитом, на уровне которого расходятся конструктивные и энергетические пути. Часть формальдегида превращается в вещества клетки по специфическим для метилотрофов ассимиляционным циклическим путям (рибулозомонофосфатному, сериновому и восстановительному пентозофосфатному), большая часть окисляется через формиат до CO_2 , что приводит к образованию АТФ.

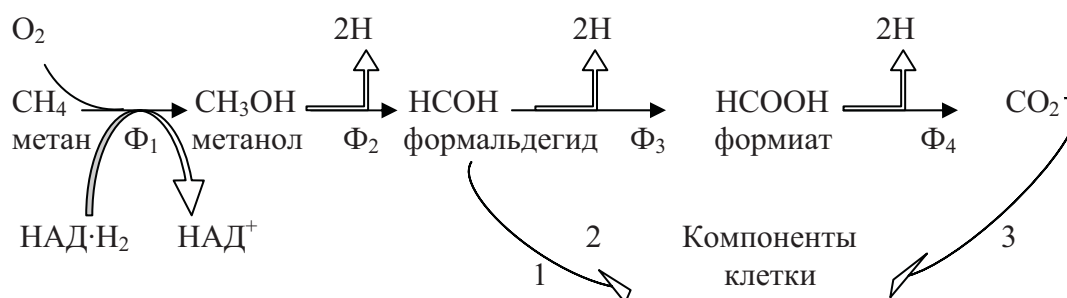


Рис. 106. Окисление метана и связь энергетического и конструктивного метаболизма у метилотрофов:

Φ_1 – метанмонооксигеназа; Φ_2 – метанолдегидрогеназа; Φ_3 – формальдегиддегидрогеназа; Φ_4 – формиатдегидрогеназа. Ассимиляционные циклы: 1 – рибулозомонофосфатный, 2 – сериновый, 3 – восстановительный пентозофосфатный

В окислительном метаболизме C_1 -соединений у метилотрофов участвуют следующие переносчики дыхательной цепи: флавопротеины, хиноны, цитохромы типа *a*, *b*, *c*, *o*. Количество энергии, выделяющейся при окислении C_1 -соединений соответствующими дегидрогеназами, определяется местом поступления электронов в дыхательную цепь. При окислении метанола в формальдегид метанолдегидрогеназой электроны поступают в дыхательную цепь на уровне цитохрома *c*. Это приводит к синтезу одной молекулы АТФ. На какие переносчики дыхательной цепи передаются электроны от формальдегида и формиата пока неизвестно.

Метилотрофные бактерии находят широкое практическое применение и являются перспективными объектами биотехнологии. Биомасса метилотрофов характеризуется достаточно высоким содержанием белка и незаменимых аминокислот, например содержание лизина достигает 5,8 % сухой массы. Перевариваемость бактериальной биомассы составляет 85–98 %, поэтому ее можно использовать в качестве кормовой добавки.

Промышленное значение имеет также биотрансформация метилотрофами органических веществ. Имобилизованные бактерии, клеточные экстракты или очищенные ферменты окисления C_1 -соединений катализируют неспецифическое окисление ряда соединений: ароматических, алициклических и гетероциклических углеводородов, фенолов, спиртов с длинной углеродной цепью. При биотрансформации получают продукты, имеющие потенциальное промышленное значение, например из пропилена пропиленоксид, который является субстратом для синтетических полимеров.

Метилотрофы являются продуцентами аминокислоты серина, витамина В₁₂, убихинонов Q₈, Q₉, Q₁₀, метаксина, поли-β-гидроксibuтирата и внеклеточных полисахаридов. Например, выход полисахаридов составляет более 30 % по отношению к массе субстрата. При определенных условиях выращивания до 66 % биомассы метилотрофных бактерий составляет поли-β-гидроксibuтират – полимер, имеющий промышленное значение как заменитель пластмасс, но подверженный биодegradации.

Перспективно также использование метилотрофных бактерий в качестве биокатализаторов для обнаружения выбросов метана в угольных шахтах, для очистки сточных вод от метилсодержащих соединений. Наконец, метилотрофы могут служить хорошей основой для создания генно-инженерных штаммов – продуцентов эукариотических белков медицинского и ветеринарного назначения. Показано, что уровень экспрессии некоторых генов (например, интерферонов) в метилотрофных бактериях выше, чем в бактериях *E. coli*.

9.18. Археобактерии

Впервые археобактерии стали известны в 1977 г. благодаря работам американских ученых К. Везе и Г. Фокса по изучению молекулярно-биохимических свойств биополимеров клеток разных видов бактерий. Ведущую роль в их открытии сыграл анализ состава и определение последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК. Было показано, что метанобразующие бактерии резко отличаются по этому признаку от других обследованных организмов.

Впоследствии было установлено, что археобактерии, кроме этого, обладают рядом уникальных общих свойств, благодаря которым их выделили в отдельный класс.

1. Их клеточная стенка не имеет пептидогликана муреина, вместо которого в состав клеточной стенки входят кислые полисахариды, белки или псевдомуреин, не содержащий в отличие от муреина мурамовой кислоты, а в пептидных мостиках – D-аминокислот. Вместо ацетилмурамовой кислоты в состав муреина входит ацетилталозаминуриновая кислота, что определило устойчивость археобактерий к антибиотикам, нарушающим синтез клеточных стенок у эубактерий, – пенициллину, ампициллину, D-циклосерину и т. п.

2. Мембраны археобактерий не содержат в составе липидов сложных эфиров глицерина и жирных кислот, а представлены особыми бифитанильными глицериновыми эфирами, образованными путем конденсации глицерина с терпеноидными спиртами.

3. В тРНК архебактерий изменена общая для всех других организмов петля тимин–псевдоуридин–цитидин, в которой вместо тимина присутствуют другие основания.

4. Наличие в генах, кодирующих тРНК, интронов, которые имеются только в эукариотических геномах, но отсутствуют у большинства эубактерий.

5. Наличие в геноме архебактерий многократно повторяющихся последовательностей, что характерно для хромосомной ДНК эукариот. В области нуклеоида у архебактерий содержатся белки гистоны.

6. Архебактерии имеют более сложную структуру аппаратов трансляции и транскрипции. ДНК-зависимая РНК-полимераза, осуществляющая процесс транскрипции у архебактерий, состоит из 9–12 субъединиц, у эубактерий – из 4–8 субъединиц. РНК-полимераза архебактерий, подобно таковой у эукариот, не ингибируется рифампицином, их активность стимулируется силибином.

7. Рибосомы архебактерий содержат относительно больше белков, чем рибосомы эубактерий, причем они представлены более кислыми формами по сравнению с белками рибосом эубактерий. Кроме того, процесс биосинтеза белков у архебактерий не ингибируется такими антибиотиками, как хлорамфеникол и стрептомицин.

8. Особенностью конструктивного метаболизма архебактерий является отсутствие фиксации CO_2 в цикле Кальвина. Основным путем автотрофной его фиксации является восстановительный путь карбоновых кислот в различных его модификациях, присущий и некоторым эубактериям.

9. Архебактерии неспособны использовать сложные высокомолекулярные соединения. Среди них не обнаружено активных продуцентов гидролитических ферментов, что, возможно, является одной из причин отсутствия патогенных и паразитических форм.

10. Некоторые архебактерии, в частности метаногенные, синтезируют уникальный набор коферментов, не встречающийся у других организмов, например кофермент М, никельтетрапиррольный фактор F_{430} , фактор F_{420} (производное 5-деазафлавина), тетрагидрометанооптерин, метанофуран и др.

11. Архебактерии занимают необычные, часто экстремальные по условиям окружающей среды высокоспециализированные экологические ниши.

12. Морфология клеток архебактерий беднее, чем эубактерий. Среди них нет мицелиальных, стебельковых и трихомных форм, преобладают сферические и цилиндрические клетки, а также необычные плоские

клетки, имеющие вид пластинок и коробочек разнообразной геометрической формы, сходные с кусочками битого стекла, что присуще только архебактериям.

В настоящее время к архебактериям отнесены метаногенные, анаэробные серовосстанавливающие бактерии, экстремальные термофилы, метаболизирующие молекулярную серу, термоацидофильные микоплазмы и экстремально галофильные бактерии.

Метаногенные бактерии – самая многочисленная группа архебактерий, являющаяся облигатными анаэробами. Большинство представителей неподвижны, подвижные имеют полярные жгутики. Метаногенные архебактерии – высокоспециализированная физиологическая группа, которая не использует углеводы, белки и другие сложные органические вещества. Источниками энергии служат процессы окисления молекулярного водорода, оксида углерода, метанола, муравьиной и уксусной кислот, акцептором электронов является углекислый газ, которая восстанавливается до метана. В природных средах метаногенные бактерии развиваются в ассоциации с другими микроорганизмами, выполняя функцию конечного звена в трофической цепи – превращают продукты брожения этих микроорганизмов в метан. Основные места обитания: торфяные болота, ил на дне водоемов, очистные сооружения сточных вод, пищеварительный тракт животных. Представители метаногенных бактерий входят в роды *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum* и др.

Анаэробные серовосстанавливающие бактерии представлены одним родом *Archaeoglobus*, который состоит из двух видов: *A. fulgidus* (типовой вид) и *A. profundus*. Это облигатные анаэробы и экстремальные термофилы. Диапазон температуры для роста 60–95 °С с оптимумом около 83 °С; диапазон pH 4,5–7,5 с оптимумом около 6. Диапазон солености (NaCl) 0,9–3,6 %.

Бактерии рода *Archaeoglobus* – грамотрицательные кокковидные клетки неправильной формы, часто треугольные, одиночные или в парах, со жгутиками (монопольные политрихи) или без них. При освещении светом с длиной волны 420 нм обнаруживают голубовато-зеленую флуоресценцию. На агаризованной среде формируют зеленовато-черные гладкие колонии диаметром 1–2 мм. Способны к хемолитотрофному или хемоорганотрофному росту. Основная форма энергетического метаболизма – анаэробное дыхание (диссимиляционная сульфатредукция). Донорами электронов являются формиат, лактат, глюкоза, крахмал, белки и молекулярный водород; конечными акцепторами электронов – сульфат, сульфит и тиосульфат (но не молекулярная сера), которые восстанавливаются до сероводорода. Особенностью бактерий рода *Archaeoglobus* яв-

ляется способность в небольшом количестве образовывать метан. Подобно типичным метаногенным бактериям, в клетках бактерий рода *Archaeoglobus* содержится фактор F_{420} и тетрагидрометаноптерин, но не обнаружены кофермент М и фактор F_{430} .

Основное местообитание серовосстанавливающих археобактерий – мелководные и глубоководные морские гидротермальные источники, в которых они вызывают активное восстановление соединений серы.

Экстремальные термофилы, метаболизирующие молекулярную серу – граммотрицательные бактерии разной морфологии: кокки, палочки, диски, нити или клетки неправильной дольчатой формы. Клеточные стенки у этих бактерий состоят из гликопротеиновых или белковых субъединиц. Цитоплазматические мембраны многослойные, содержат липиды, построенные на основе тетраэфиров глицерина. Молекула тетраэфира состоит из двух остатков глицерина, соединенных двумя одинаковыми парами C_{40} -бифитанильных цепей, которые содержат от 1 до 4 пятичленных циклических группировок.

Экстремальные термофилы, метаболизирующие молекулярную серу, подразделяются на три порядка, четыре семейства и включают девять родов. Все представители объединены в одну группу благодаря тому, что их энергетический метаболизм связан с метаболизмом молекулярной серы. Облигатно аэробные бактерии (например, бактерии рода *Sulfolobus*) осуществляют окисление S^0 ; строгие анаэробы (например, бактерии родов *Thermococcales* и *Thermoproteales*) – только восстановление S^0 до H_2S ; факультативные анаэробы (например, бактерии рода *Acidianus*) – в зависимости от условий могут окислять или восстанавливать S^0 .

Второй признак, объединяющий всех представителей группы, – экстремальная термофилия: нижний температурный предел роста – 60–82 °С, верхняя граница – 95–110 °С. Оптимальная температура для роста 80–105 °С. Наиболее высокотемпературными представителями серозависимых археобактерий являются бактерии вида *Pyrodictium occultum*. Они способны расти при 110 °С, с оптимумом при 105 °С.

Экстремально термофильные археобактерии, метаболизирующие молекулярную серу, являются аборигенами высокотермальных кислых источников и грунтов в зонах вулканического происхождения. Кроме того, бактерии рода *Pyrodictium* выделяют из подводных морских горячих источников, богатых серой и сульфидами, где они проявляют активную геохимическую деятельность.

В практическом плане привлекают внимание бактерии вида *Sulfolobus brierleyi*, способные выщелачивать металлы при высоких температурах из трудноокисляемых сульфидов, таких как пирит (FeS_2), халько-

пирит (CuFeS_2) и молибденит (MoS_2). Эти бактерии можно использовать также для удаления серных компонентов из некондиционного каменного угля. Отрицательным моментом в деятельности этих археобактерий является их способность вызывать биокоррозию стали.

Термоацидофильные микоплазмы представлены единственным видом *Thermoplasma acidophilum*. В отличие от других археобактерий, эти бактерии не имеют клеточной стенки. Клетки окружены трехслойной мембраной, толщиной около 7 нм, могут быть подвижными и обладать жгутиками.

Термоплазмы – гетеротрофы со сложными пищевыми потребностями. Хемоорганотрофы, факультативные анаэробы. Энергию получают как за счет аэробного дыхания, так и за счет брожения. Облигатные термофилы и облигатные ацидофилы. Температурный оптимум культивирования соответствует 60 °С, а оптимум pH лежит в пределах 1,0–2,0. При нейтральном pH происходит лизис клеток. Естественным местообитанием их служат саморазогревающиеся отходы каменного угля и кислые термальные источники.

В группу **экстремально галофильных бактерий** входят бактерии с разной морфологией клеток. Например, к роду *Halococcus* относятся грамвариабельные неподвижные кокки, к роду *Halobacterium* – грамположительные подвижные палочки с полярно расположенными жгутиками. Грамположительные бактерии рода *Haloarcula* имеют форму плоских квадратных пластинок и коробочковидных клеток.

Галобактерии распространены там, где есть подходящие для этого условия: высокое содержание NaCl и других необходимых ионов, т. е. в природных соленых водоемах, в бассейнах для выпаривания соли, в белковых материалах, консервируемых с помощью соли (рыба, мясо, шкуры). Они могут расти в насыщенном растворе NaCl (около 30 %). Нижний предел концентрации соли для роста большинства видов составляет 12–15 %; оптимальное содержание – между 20 и 26 %. Высоки потребности галобактерий и в других ионах – ионах Mg^{2+} и K^+ . Установлено, что ионы Na^+ необходимы для поддержания клеточной стабильности. Они взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами клеточной стенки галобактерий и придают ей необходимую жесткость. Ионы K^+ (наряду с другими ионами) необходимы для поддержания ионного равновесия внутри и снаружи клетки, стабилизации ферментов, мембран и других клеточных структур.

Необычное строение имеют клеточные стенки галобактерий. У представителей рода *Halobacterium* клеточная стенка построена из регулярно расположенных гексагональных субъединиц, состоящих в основном из

Цитоплазматическая мембрана галобактерий содержит липиды, в молекулах которых глицерин связан не с остатками жирных кислот, а с C_{20} -терпеноидным спиртом – фитанолом. Помимо уникальных липидов, клеточные мембраны экстремальных галофилов включают много каротиноидных пигментов (основной – бактериоруберин), которые обуславливают окраску колоний от розового до красного цвета. Это имеет для галофилов немаловажное значение как средство защиты против избыточной радиации, поскольку для их мест обитания характерна интенсивная освещенность.

CC(C)=CC(=C)C(=C)C(=C)C1=CC=CC=C1C

Экстремальные галофилы имеют сложные пищевые потребности. Для роста большинства видов в состав сред должны входить дрожжевой экстракт, пептон, гидролизат казеина, набор витаминов. Основным источником энергии и углерода служат аминокислоты и углеводы. Метаболизм глюкозы осуществляется по модифицированному пути Энтнера – Дудорова (рис. 107). Этот путь отличается у галобактерий тем, что глюкоза без фосфорилирования окисляется в глюконовую кислоту. Последняя превращается в 2-кето-3-дезоксиглюконовую кислоту, которая расщепляется на два C_3 -фрагмента: пировиноградную кислоту и глицериновый альдегид. Из глицеринового альдегида в результате нескольких ферментативных реакций также образуется пировиноградная кислота. Дальнейшее ее окисление происходит в замкнутом цикле Кребса.

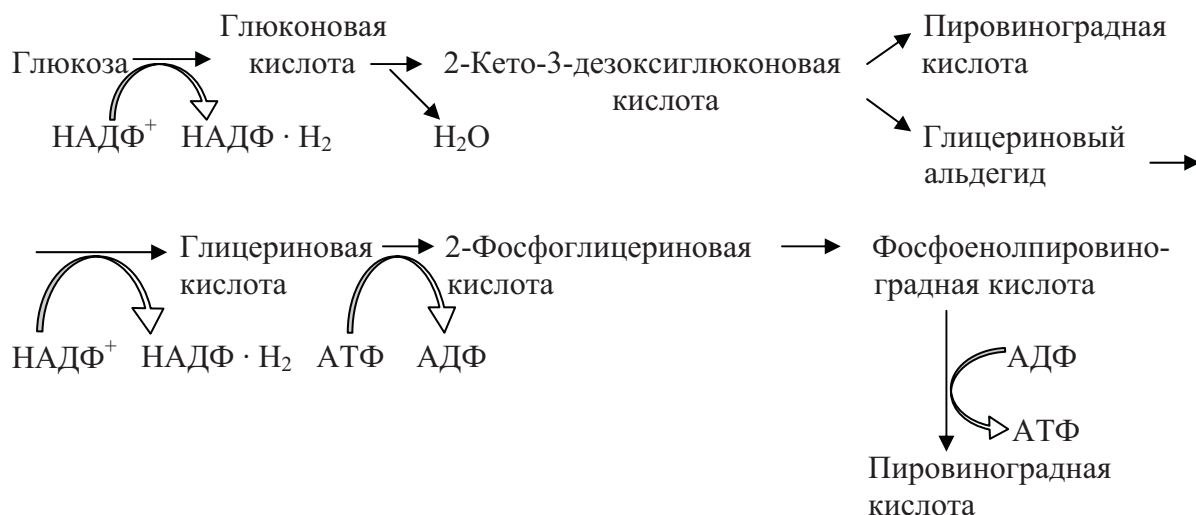
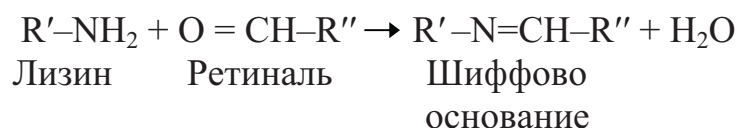


Рис. 107. Схема модифицированного пути Энтнера – Дудорова

Основной способ получения энергии экстремальными галофилами – аэробное дыхание. В цитоплазматической мембране обнаружены цитохромы *b* и *c*, а также цитохромоксидаза *o*. В анаэробных условиях в темноте источником энергии может служить анаэробное дыхание с использованием NO_3^- в качестве конечного акцептора электронов, а также процесс сбраживания аргинина и цитруллина. Свет служит дополнительным источником энергии, аппарат для использования которого подключается при недостатке O_2 . Использование световой энергии для создания трансмембранного градиента протонов происходит с участием бактериородопсина и не связано с переносом электронов по цепи переносчиков. Этот хромопротеин имеет молекулярную массу 26 кД и содержит полипептидную цепь, построенную из 248 аминокислотных остатков и на 75 % состоящую из α -спиральных участков. Последние образуют семь тяжей, ориентированных перпендикулярно плоскости мембраны. Ретиналь расположен параллельно плоскости мембраны и, следовательно, перпендикулярно белковым тяжам (рис. 108).

Связь между ретиналем и полипептидной цепью осуществляется через Шиффово основание, образованное в результате взаимодействия альдегидной группы ретиналя с ϵ -аминогруппой 216 остатка лизина:



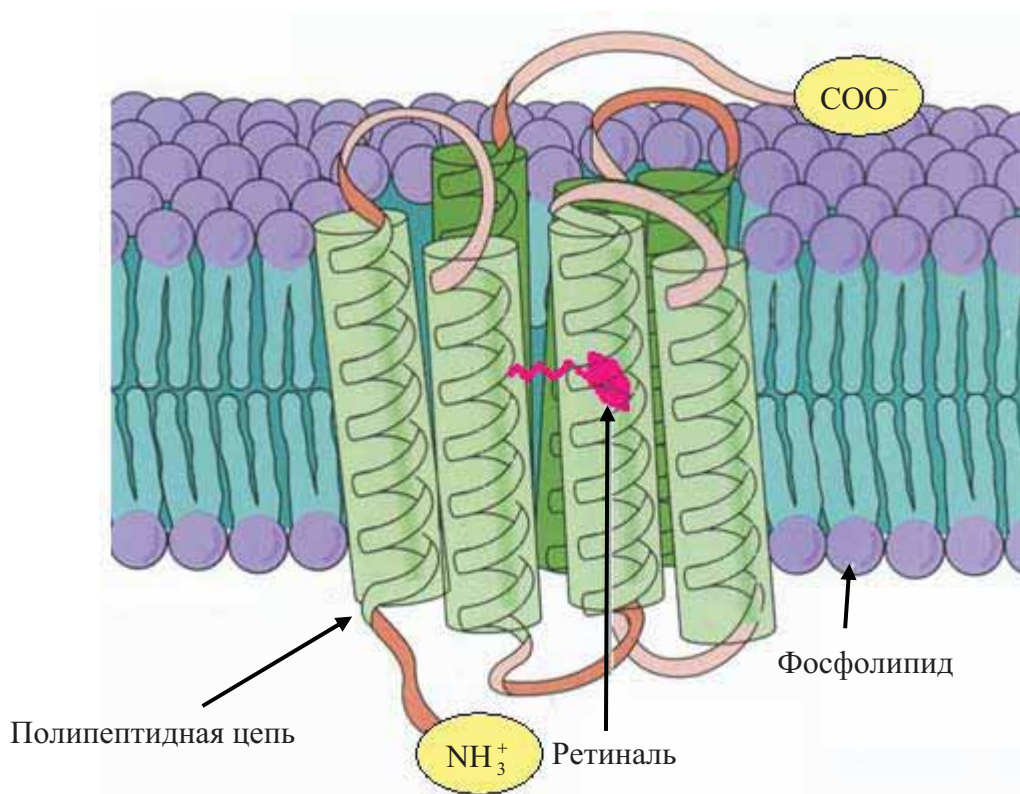
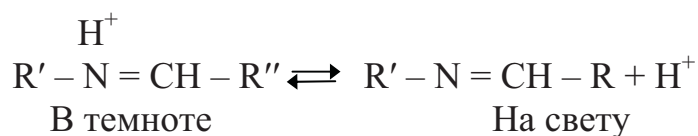


Рис. 108. Организация бактериородопсина в пурпурной мембране
(из <http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-2.htm>)

Шиффово основание в темноте находится в протонированной форме. Поглощение кванта света бактериородопсином вызывает изменение конформации ретиналя и приводит к отщеплению H^+ от Шиффова основания:



Протон, отделившийся на свету от Шиффова основания, переходит во внеклеточное пространство, а H^+ , протонирующий Шиффово основание, поглощается из цитоплазмы. Таким образом, под действием света бактериородопсин «перебрасывает» протоны с одной стороны мембраны на другую.

В результате работы циклического механизма, получившего название **бактериородопсиновой протонной помпы**, при освещении по разные стороны мембраны возникает градиент концентрации H^+ , достигающий 200 мВ (рис. 109). Разрядка протонного градиента с помощью H^+ -АТФ-синтазы приводит к синтезу АТФ. Таким образом, бактериородопсин – простейший из известных генераторов протонного градиента.

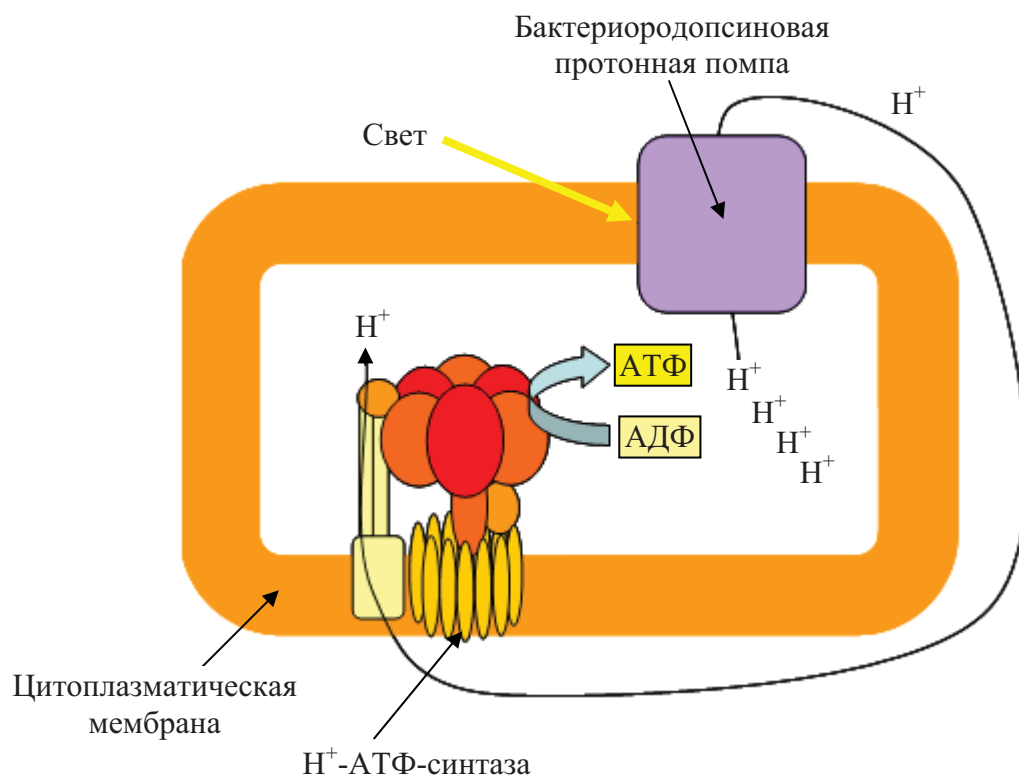


Рис. 109. Схема работы бактериородопсиновой протонной помпы:
(из <http://www.steve.gb.com/science/membranes.html>)

Вопрос о происхождении бесхлорофилльного фотосинтеза, обнаруженного у экстремально галофильных археобактерий, неясен. Большинство исследователей считают, что этот тип фотосинтеза – сформированное в «кислородную эпоху» приспособление к существованию в условиях недостатка O_2 . В то же время нельзя полностью исключить возможность сохранения древней формы фотосинтеза, основанного на светозависимых превращениях каротиноидных пигментов.

Глава 10. БИОГЕОХИМИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмам принадлежит важная роль в круговороте веществ в природе, образовании и разрушении месторождений полезных ископаемых, минералов и горных пород.

Основы понимания биогеохимической деятельности микроорганизмов заложены исследованиями русских микробиологов С. Н. Виноградского, Г. А. Надсона, В. Л. Омелянского, а также В. И. Вернадского, который указал на большую роль микроорганизмов в перемещении, концентрации и рассеивании химических элементов в биосфере.

Будучи широко распространенными в природе и обладая активным ферментным аппаратом, микроорганизмы осуществляют процессы расщепления и синтеза самых сложных органических веществ. Благодаря минерализующей деятельности микроорганизмов происходит постоянное очищение поверхности земли от трупов животных и остатков растений. Органические вещества растений и животных под действием микроорганизмов разлагаются на простые минеральные элементы, которые растворяются в воде и используются растениями в качестве источника питания, вовлекаясь таким образом в малый биологический круговорот.

Помимо биологического круговорота элементов, в природе функционирует и большой геологический круговорот. Он осуществляется под действием физико-химических факторов и включает процессы выветривания горных пород, растворения минеральных продуктов выветривания и вынос их в моря и океаны. Преобладающая часть вынесенных минеральных элементов используется водными организмами и после их отмирания частично переходит в состав осадочных пород, выключаясь тем самым из биологического круговорота. Если бы этот процесс проходил постоянно, то жизнь на земной поверхности не могла бы развиваться. Однако этого не происходит, так как биологически важные элементы непрерывно закрепляются в почве благодаря деятельности зеленых растений и автотрофных микроорганизмов. После отмирания организмы растений и животных минерализуются микроорганизмами и в зависимости от условий включаются в биологический или геологический круговорот.

10.1. Участие микроорганизмов в биологическом круговороте углерода в природе

Углеродные ресурсы на Земле представлены следующими формами: углерод в органических соединениях (ископаемые остатки, почвенный гумус, живая и отмершая биомасса) и неорганических веществах (карбонаты, углекислый газ), которые присутствуют во всех частях (лито-, гидро- и атмосфера) биосферы.

К особенностям цикла углерода можно отнести ведущую сопряженную роль живых организмов в его реакциях, в первую очередь фотосинтезирующих организмов (растений и микроорганизмов), образующих органическое вещество (продукция), и микроорганизмов, разлагающих его и возвращающих CO_2 в круговорот углерода (деструкция). Процессы минерализации органического вещества происходят как в аэробных, так и в анаэробных (метаногенез) условиях.

Круговорот углерода начинается с фиксации CO_2 зелеными растениями и автотрофными микроорганизмами (рис. 110).

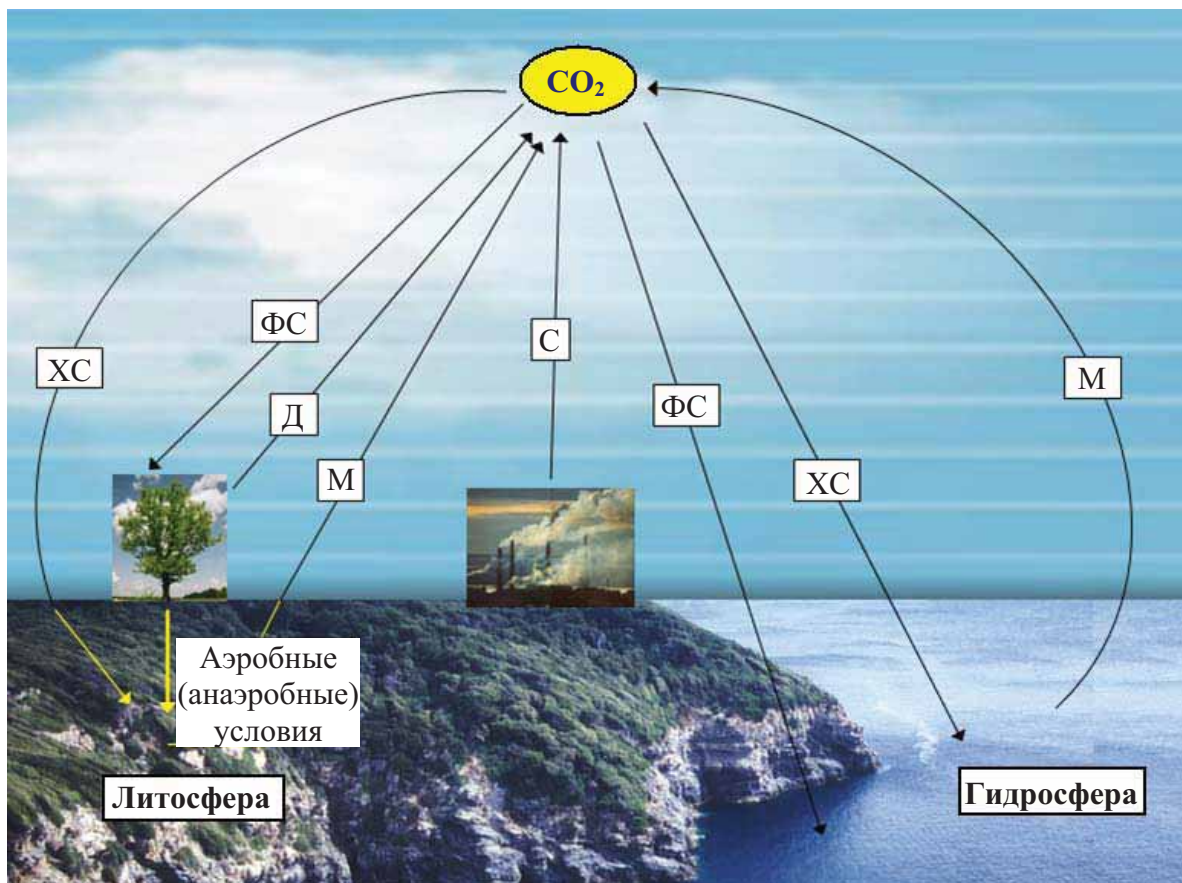


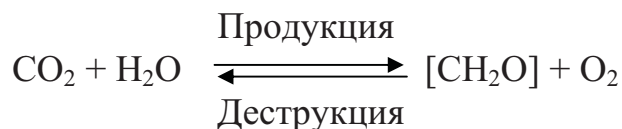
Рис. 110. Схема круговорота углерода:

ФС – фотосинтез; ХС – хемосинтез; Д – дыхание; М – минерализация; С – сжигание

Образовавшиеся в процессе фото- и хемосинтеза углеводы или другие углеродсодержащие органические соединения частично используются этими же организмами для получения энергии, при этом CO_2 (продукт реакций окисления) выделяется в среду. Часть фиксированного растениями углерода потребляется человеком и животными, которые выделяют его в форме CO_2 в процессе дыхания. Углерод, образующийся в результате разложения отмерших растений и животных, окисляется до CO_2 и тоже возвращается в атмосферу.

Ведущая роль в возвращении углерода в атмосферу принадлежит микроорганизмам. В процессе дыхания и брожения они разлагают самые разнообразные органические вещества. Более доступными являются углеродсодержащие соединения, растворимые в воде (углеводы, спирты и др.). Но в естественных условиях – в почве и воде – в гораздо большем количестве встречаются труднорастворимые соединения углерода, такие как крахмал, пектиновые вещества, целлюлоза, лигнин. В них сосредоточена основная масса углерода. Разложение их начинается с гидролиза, в результате чего образуются более простые соединения типа углеводов. Дальнейшее превращение данных соединений осуществляется в реакциях дыхания или брожения.

В аэробных условиях очевидна связь между процессами образования органического углерода, выделения O_2 и потребления CO_2 , что следует из уравнения:



Необходимо обратить внимание и на то, что примерно 1 % минерализованного углерода поступает в биосферу в виде метана биогенного происхождения. Это количество постоянно возрастает, что сказывается и на увеличении в атмосфере содержания так называемых парниковых газов. Прирост метана ежегодно в 3 раза превышает прирост в атмосфере CO_2 , а его парниковый эффект в 23 раза выше такого же количества CO_2 . Приведенные данные об образовании метана следует рассматривать как минимальные, так как основная часть (до 50 %) его окисляется на границе аэробно-анаэробной зоны метанотрофными микроорганизмами.

10.2. Участие микроорганизмов в круговороте азота в природе

Азот является вторым наиболее важным биогенным элементом. В результате биохимической деятельности микроорганизмов могут образо-

ываться его соединения с валентностью от -3 до $+5$ (в зависимости от окислительно-восстановительных условий).

Круговорот азота состоит из четырех этапов (рис. 111):

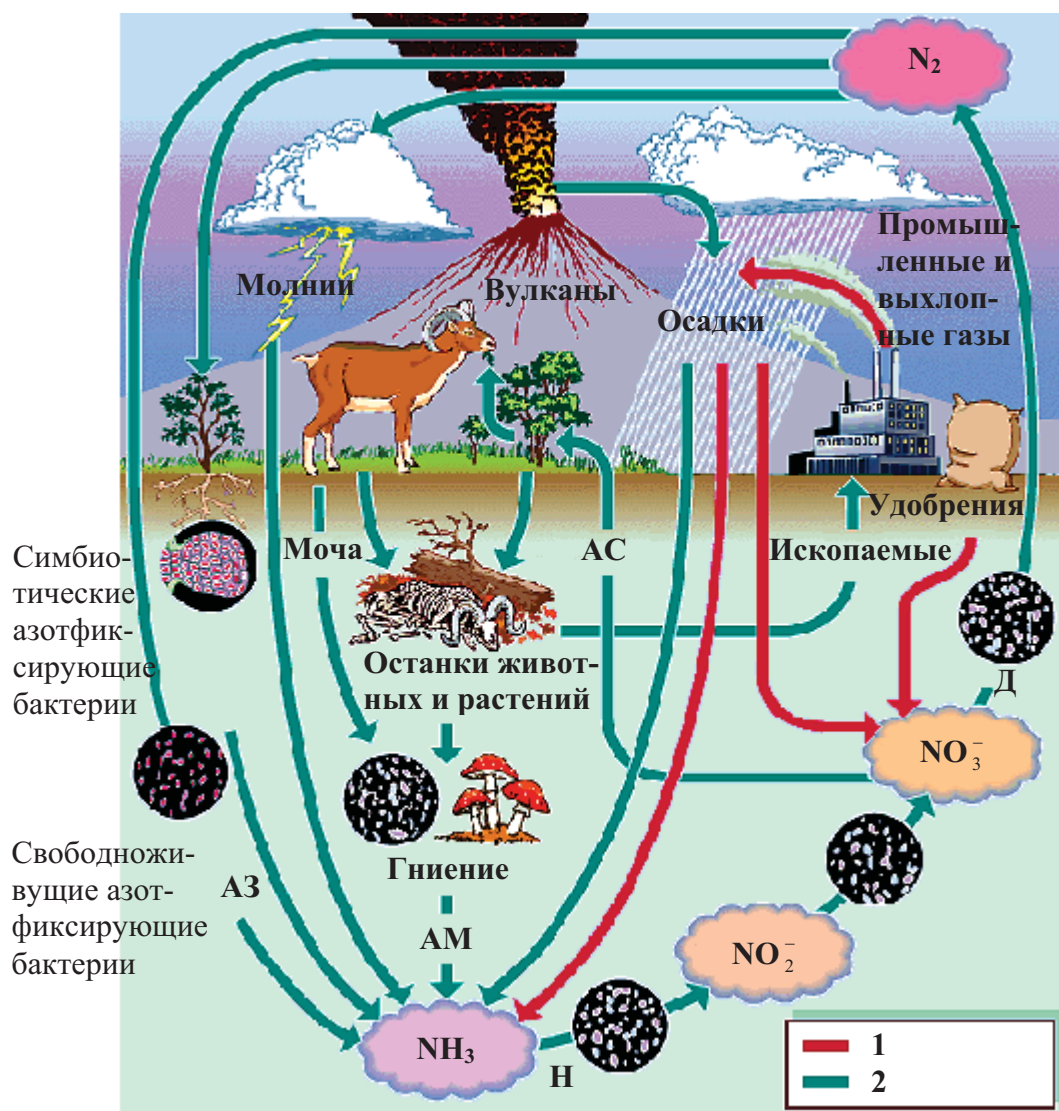


Рис. 111. Схема круговорота азота:

1 – деятельность человека; 2 – природная активность;

АМ – аммонификация; АС – ассимиляция растениями и микроорганизмами;

АЗ – азотфиксация; Д – денитрификация; Н – нитрификация

Первый этап – **фиксация молекулярного азота**. Он осуществляется аэробными и анаэробными азотфиксирующими микроорганизмами, которые могут быть свободноживущими и симбиотическими. Конечным продуктом азотфиксации является ион аммония NH_4^+ , который ассимилируют микроорганизмы и растения и включают в азотсодержащие органические вещества.

Второй этап круговорота азота, получивший название **аммонификации**, приводит к высвобождению аммиака, но уже в результате процессов минерализации органического вещества.

Аммонификации подвергаются вещества самой разнообразной структуры – белковые соединения, аминосахара, нуклеиновые кислоты, алкалоиды, мочевины и другие, причем освобождающийся аммиак расходуется по-разному. Часть его адсорбируется в обменных реакциях почвы, часть используется гетеротрофными микроорганизмами и превращается в белки их клеток; некоторое количество аммиака окисляется хемолитотрофами до нитритов и нитратов. Он также может остаться в свободном состоянии и выделяться в атмосферу.

В аммонификации принимают участие многие микроорганизмы, включая неспорообразующие и спорообразующие бактерии, актиномицеты, микроскопические грибы. В зависимости от стадии минерализации органического вещества доминируют те или другие представители. Активными возбудителями аммонификации являются бактерии рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus* и др.

Расщепление белков начинается с гидролиза, осуществляемого внеклеточными гидролитическими ферментами, выделяемыми аммонификаторами. В результате образуются более простые продукты: белок → пептоны → пептиды → аминокислоты. Аминокислоты ассимилируются бактериями как источники питания, и под действием внутриклеточных ферментов дезаминаз от них отщепляется аммиак – конечный продукт аммонификации. Чаще всего наблюдается гидролитическое и окислительное дезаминирование, реже – дезаминирование, приводящее к образованию ненасыщенных соединений; для анаэробных условий характерно восстановительное дезаминирование.

Наряду с дезаминированием может происходить и декарбоксилирование аминокислот. Обычно в кислой среде наблюдается декарбоксилирование, в щелочной – дезаминирование. Обе ферментные системы – дезаминазы и декарбоксилазы – действуют как механизмы нейтрализации среды, в результате чего pH поддерживается на уровне, обеспечивающем нормальную жизнедеятельность клетки. При декарбоксилировании аминокислот образуются первичные амины, такие как кадаверин, путресцин (трупные яды), и выделяется углекислый газ.

Дезаминированию подвергаются вещества и небелковой природы, например мочевины. Большое число бактерий способно использовать мочевины в качестве источника азота. Мочевина расщепляется гидролитическим ферментом уреазой:



У большинства бактерий синтез уреазы подавляется ионами аммония. Благодаря этому количество образующегося и выделяющегося аммиака не превышает того, что требуется для синтеза белков. Лишь у немногих бактерий, известных своей способностью разлагать мочевины (*Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina urea*, *Proteus vulgaris* и др.), уреазы представляют собой конститутивный фермент; для ее образования не требуется индукции мочевиной и аммиак не подавляет ее синтез. Поэтому эти бактерии могут расщеплять всю имеющуюся мочевину (например, в конюшнях) до аммиака. В результате pH среды сдвигается до значений 9–10, к которым эти бактерии приспособлены.

На третьем этапе круговорота азота происходит **нитрификация**: образовавшийся при аммонификации аммиак окисляется до нитритов и нитратов.

Типичные нитрификаторы относятся к хемолитоавтотрофам. Процесс нитрификации является двухфазным, причем каждая фаза осуществляется различными видами бактерий.

Кроме типичных нитрификаторов, многие гетеротрофные бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Xanthomonas* способны окислять аммиак и другие восстановленные соединения азота до нитритов и нитратов. Этот тип нитрификации получил название гетеротрофной. В отличие от нитрификации, осуществляемой хемолитотрофными бактериями, гетеротрофная нитрификация не является источником энергии для бактерий.

Гетеротрофная нитрификация широко распространена в природе, особенно там, где аммиак образуется в условиях высокого содержания органического вещества, например в компостах, сточных водах.

Нитраты, образующиеся в процессе нитрификации, потребляются определенными растениями и микроорганизмами, имеющими ассимиляционную нитратредуктазную активность. Если нитраты служат не только источниками азота, но и акцепторами электронов в бескислородных условиях, говорят о **денитрификации**. В результате ее образуется либо NH_4^+ , либо N_2 , который выделяется в атмосферу и возвращаются в цикл. Этот процесс протекает с высвобождением NO и NO_2 в качестве побочных продуктов, которые также поступают в атмосферу, где действуют как газы, создающие парниковый эффект.

10.3. Участие микроорганизмов в биологическом круговороте серы в природе

В природе постоянно происходят многообразные превращения серы, где основную роль играют микроорганизмы, и только один из этапов серного цикла (ассимиляционная сульфатредукция) может происходить без участия прокариот (рис. 112).

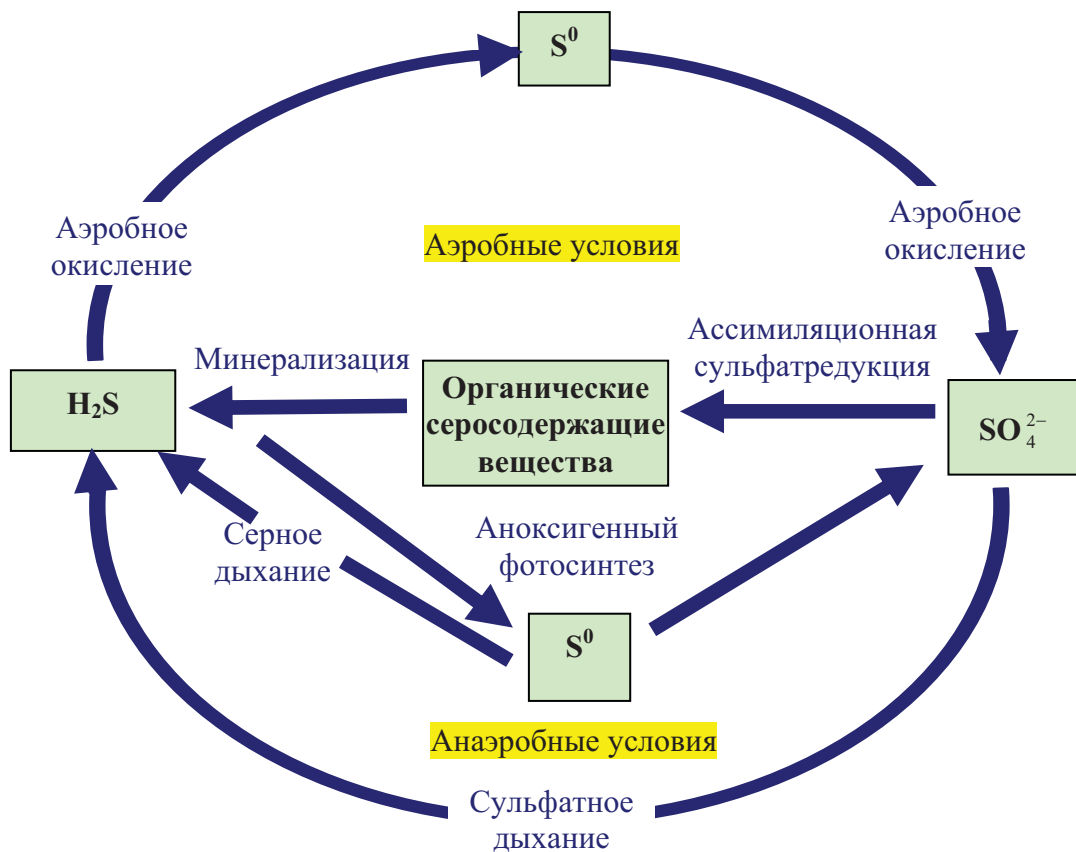


Рис. 112. Схема круговорота серы

Микроорганизмы осуществляют три важнейших этапа в превращении серы: минерализацию органической серы, окисление и восстановление минеральной серы. Эти этапы определяют три основные формы природной серы: органическую серу (белки, аминокислоты); сульфаты и сульфиты; сероводород и сульфиды.

В процессе минерализации органической серы участвуют многочисленные неспециализированные гетеротрофные микроорганизмы (аэробные и анаэробные бактерии, грибы и некоторые актиномицеты). В настоящее время установлено, что в процессе минерализации серосодер-

жащих соединений образуется не только сероводород, но и другие соединения: меркаптаны, минеральная сера и сульфаты.

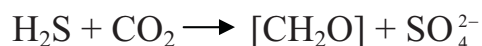
Окисление минеральной серы, получившее название **сульфофикации**, включает процессы окисления сероводорода, элементарной серы, тио- и тетрасоединений до серной кислоты. Эти процессы вызываются особыми группами бактерий – бесцветными серобактериями, зелеными и пурпурными серными бактериями, тионовыми бактериями и некоторыми железобактериями, широко распространенными как в почвах, так и в водоемах. В анаэробных условиях H_2S могут окислять и денитрифицирующие бактерии.

Восстановление сульфатов как наиболее распространенной в биосфере формы серы до сероводорода осуществляется облигатными сульфатредуцирующими анаэробами в процессе диссимиляционной сульфатредукции (сульфатное дыхание). В качестве конечного акцептора электронов они используют сульфаты, донором электронов могут служить различные органические соединения и молекулярный водород.

Восстановление сульфатов до сульфидов с последующим включением их в состав органических веществ (цистина, цистеина, метионина, кофермента А, биотина, тиамина, липоевой кислоты) происходит в процессе ассимиляционной сульфатредукции, в которой могут принимать участие растения или микроорганизмы.

Следует отметить, что в природе может происходить восстановление и элементарной серы в процессе **серного дыхания**, которое осуществляют анаэробные бактерии *Desulfuromonas acetoxidans*, использующие ее в качестве конечного акцептора электронов. Сера восстанавливается при этом также до сероводорода.

В общем глобальном цикле серы можно выделить отдельные круговороты меньшего масштаба, функционирующие в определенных экологических условиях. Например, фототрофные пурпурные серные бактерии окисляют H_2S с образованием



Условием для продолжения деятельности пурпурных серных бактерий является удаление сульфат-иона, что обеспечивается метаболизмом анаэробных сульфатредуцирующих бактерий, образующих H_2S .

На примере бактерий серного цикла можно проиллюстрировать и одно из интересных открытий, связанных с биогеохимической деятельностью живых организмов: установление эффекта фракционирования ими изотопов. Суть данного явления заключается в том, что компоненты живой клетки и ее метаболиты, как правило, обогащены легкими изотопами

элементов. В результате микробиологической сульфатредукции в биосфере произошло разделение серы на две части: серу биогенных сернистых газов и сульфидов (^{32}S) и серу сульфатов, обогащенных изотопом ^{34}S . В воде морей и океанов преобладает изотоп ^{34}S , а в донных отложениях и осадочных породах присутствует значительное количество сульфида железа биогенного происхождения.

Следует отметить, что для двух известных и наиболее широко распространенных изотопов углерода ^{12}C и ^{13}C также показано, что рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза более интенсивно поглощает $^{12}\text{CO}_2$ и включает его в органическое вещество. Карбонаты, как вторая форма нахождения углерода в биосфере, обогащены тяжелым изотопом.

10.4. Участие микроорганизмов в биологическом круговороте фосфора в природе

Фосфор, относящийся к группе биогенов, представляет собой химический элемент, без которого невозможны основные биосинтетические реакции в клетке. Более того, считается, что рост, накопление биомассы и продуктивность живых организмов определяются соотношением N : P, которое может варьировать от 10–15 до 2. Однако почти во всех экологических системах фосфора меньше, чем азота, и именно он лимитирует массу живого вещества. Кроме того, содержание фосфора в реакциях анаболизма тесно сопряжено с содержанием органического углерода и выражается как 100 : 1.

В живых организмах фосфор присутствует только в пятивалентном состоянии в виде свободных фосфатных ионов (PO_4^{3-}) или органических фосфатных компонентов клетки. Живые клетки не способны поглощать большинство органических соединений, они предпочтительно используют соединения неорганического ортофосфата, из которых внутри них синтезируются органические фосфорсодержащие соединения. После отмирания организмов происходит минерализация этих соединений с помощью микроорганизмов и фосфатный ион снова освобождается.

Однако несмотря на быстрое функционирование круговорота фосфора и относительное обилие фосфатов в почвах и горных породах, вследствие малой растворимости фосфорных минералов (апатитов, варисцитов, фосфатов железа и кальция) содержание неорганического фосфата во многих природных местообитаниях ограничено. Доступность фосфатов лимитируется также их способностью адсорбироваться на органических и неорганических полимерах. Все это приводит к тому, что фосфат служит фактором, ограничивающим рост многих организмов.

Микроорганизмы осуществляют следующие преобразования соединений фосфора: перевод в растворимую форму фосфатных минералов, включение неорганического фосфата в органические соединения клеток и минерализацию органических соединений фосфора.

Растворение минеральных фосфатов осуществляется с помощью кислот (органических или неорганических), которые являются продуктами метаболизма микроорганизмов. Органические кислоты (щавелевая, гликолевая, уксусная, молочная, лимонная и др.), синтезируемые многими гетеротрофными бактериями и грибами, лучше растворяют апатиты, так как кроме снижения рН они образуют хелаты с кальцием. Гуминовые кислоты, освобождаемые из разлагающихся органических веществ, могут образовывать хелаты с кальцием, железом или алюминием, освобождая ортофосфат. Продукты метаболизма хемолитотрофных бактерий – азотная и серная кислота приводят к высвобождению ортофосфата из фосфоритов. Кроме того, H_2S , выделяемый в процессе жизнедеятельности многими микроорганизмами, приводит к растворению фосфатов железа.

Включение (иммобилизация) растворимых фосфатов в растущие клетки микроорганизмов наблюдаются во всех экосистемах, но количество вовлекаемого фосфора невелико. В водной экосистеме основную массу фосфора накапливает фитопланктон. Известно лишь, что бактериальные клетки содержат значительно большее количество фосфора (1,5–25 % сухого вещества), чем грибы (0,5–1,0 %) или растения (0,005–0,5 %). В последние годы отмечается роль в иммобилизации фосфора и грибов-эндомикоризообразователей. За счет наличия кислых фосфатаз они улучшают снабжение фосфором растений при внедрении гиф и образовании везикулярно-арбускулярной микоризы.

Минерализацию фосфорсодержащих органических веществ осуществляют почти все гетеротрофные микроорганизмы, синтезирующие различные ферменты, такие как нуклеазы, фосфолипазы, фитазы и др.

Круговорот фосфора в основном является однонаправленным, так как растворимые фосфаты постоянно переносятся из почвенной среды в моря и океаны и вследствие выщелачивания осаждаются в них. Единственный источник поступления (возвращения) фосфатов на сушу – процессы выветривания. Кроме того, отличительной особенностью круговорота фосфора от других биогенных элементов является отсутствие его в виде газообразных соединений.

При техногенных загрязнениях водоемов сточными водами богатыми фосфатами, содержащимися в детергентах, инсектицидах и т. п., наблюдается чрезмерное размножение в них водорослей и резкое увеличение их продуктивности. Это приводит к серьезным экологическим пробле-

мам современности — переходу водоемов от олиготрофного состояния к *эвтрофному*. Повышение уровня первичной продукции при эвтрофикации связано с накоплением в водоемах органического вещества при разложении водорослей, которое не успевает минерализоваться. Кроме того, в процессе разложения органического вещества водорослей происходит интенсивное поглощение кислорода гетеротрофами, что может привести к истощению в водоеме запаса растворенного кислорода и последующей гибели его животного мира (в первую очередь рыбы). Такая постепенная биологическая деградация пресноводных водоемов в настоящее время приобрела широкие масштабы. Решение этой проблемы возможно только при прекращении сбросов в водоемы сточных вод и их очистке.

ЛИТЕРАТУРА

- Альберт, С. Б.* Молекулярная биология клетки: в 3 т. / С. Б. Альберт, [и др.]. М.: Мир, 1994. Т. 1–3.
- Брода, П.* Плазмиды / П. Брода. М.: Мир, 1982.
- Воробьева, Л. И.* Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. М.: Высш. шк., 1989.
- Воробьева, Л. И.* Пропионовокислые бактерии / Л. И. Воробьева. М.: Изд-во МГУ, 1995.
- Глик, Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М.: Мир, 2002.
- Готтшалк, Г.* Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк. М.: Мир, 1982.
- Громов, Б. В.* Строение бактерий / Б. В. Громов. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1985.
- Гусев, М. В.* Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. М.: Издательский центр «Академия», 2003.
- Дебабов, В. Г.* Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. М.: Высш. шк., 1988.
- Заварзин, Г. А.* Лекции по природоведческой микробиологии / Г. А. Заварзин. М.: Наука, 2004.
- Заварзин, Г. А.* Введение в природоведческую микробиологию / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. М.: Книжный дом «Университет», 2001.
- Елинов, Н. П.* Химическая микробиология / Н. П. Елинов. М.: Высш. шк., 1989.
- Емцев, В. Т.* Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. М.: Дрофа, 2005.
- Кондратьева, Е. Н.* Хемолитотрофы и метилотрофы / Е. Н. Кондратьева. М.: Изд-во МГУ, 1983.
- Кондратьева, Е. Н.* Фототрофные микроорганизмы / Е. Н. Кондратьева, И. В. Максимова, В. Д. Самуйлов. М.: Изд-во МГУ, 1989.
- Коничев, А. С.* Молекулярная биология / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. М.: Издательский центр «Академия», 2003.
- Коротяев, А. И.* Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. СПб.: СпецЛит, 2002..
- Ланчини, Д.* Антибиотики / Д. Ланчини, Ф. Паренти. М.: Мир, 1985.
- Льюин, Б.* Гены / Б. Льюин. М.: Мир, 1987.
- Медицинская микробиология* / под ред. В. И. Покровского, О. К. Поздеева. М.: Гэотар Медицина, 1999.
- Методы общей бактериологии: в 3 т.* / под ред. Ф. Герфардта [и др.]. М.: Мир, 1983–1984. Т. 1–3.
- Нетрусов, А. И.* Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов [и др.]. М.: Издательский центр «Академия», 2005.

Нетрусов, А. И. Экология микроорганизмов / А. И. Нетрусов [и др.]. М.: Издательский центр «Академия», 2004.

Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта [и др.]. М.: Мир, 1997. Т. 1–2.

Пехов, А. П. Основы плазмидологии / А. П. Пехов. М.: Изд-во Рос. ун-та дружбы народов, 1996.

Прозоров, А. А. Трансформация у бактерий / А. А. Прозоров. М.: Наука, 1988.

Современная микробиология: в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. Т. 1–2.

Стейниер, Р. Мир микробов: в 3 т. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. М.: Мир, 1979. Т. 1–3.

Стэнт, Г. Молекулярная генетика / Г. Стэнт, Р. Кэлиндар. М.: Мир, 1981.

Шлегель, Г. История микробиологии / Г. Шлегель. М.: Едиториал УРСС, 2002.

Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. М.: Мир, 1987.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Editor-in-Chief G. M. Garrity. N.Y.: Springer, 2001–2003, Vol. 1–5.

Интернет источники

<http://www.cme.msu.edu/Bergeys/> – Bergey's Manual Trust. Headquarters at Michigan State University.

<http://www.microbeworld.org/home.htm> – © 2002 American Society for Microbiology.

<http://www.bact.wisc.edu/Bact303mainpage> – © 2003, Dr. Kenneth T. (University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology).

http://www.hero.c.uk/sites/hero/uk/research/r.../genome_keys_unlock_nature1588.cf – Higher Education and Research Opportunities in the United Kingdom.

<http://www.textbookofbacteriology.net> – Todar's Online Textbook of Bacteriology.

<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Prokaryotes/Chroococcaceae/> – Japanese Fresh-water Algae, 1977.

<http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Microbiology/> – David B. Fankhauser, Ph. D. Professor of Biology and Chemistry University of Cincinnati Clermont College.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Адансон М. (M. Adanson) 20
Адельберг Е. (E. Adelberg) 221
Аллоуэй Дж. (J. Alloway) 204
Арбер В. (W. Arber) 238
- Барт П. (P. Barth) 75
Бейеринк М. (M. Beijerinck) 17, 167, 262
Берджи Д. (D. Bergey) 20, 28, 31
Бидл Дж. (G. Beadle) 18
Бойд Дж. (J. Boyd) 328
Бредли Д. (D. Bradley) 193
Бреннер С. (S. Brenner) 75
- Варбург О. (O. Warburg) 124
Ватанабе Т. (T. Watanabe) 195
Везе К. (C. Woese) 389
Вернадский В. И. 6, 398
Вилсон Х. (H. Wilson) 68
Виноградский С. Н. 16, 17, 255, 306, 358, 398
Вольман Е. (E. Wollman) 217–219
- Гамалея Н. Ф. 15, 16
Гиббонс Н. (N. Gibbons) 298
Говард-Фландерс П. (P. Howard-Flan-
ders) 236
Горленко В. М. 293, 295, 296
Грам Х. (Ch. Gram) 41
Грация А. (A. Gratia) 192
Гриффит Ф. (F. Griffith) 202–204
Гусев М. В. 60, 286, 287, 302, 304
- Даусон М. (M. Dawson) 204
Дельбрюк М. (M. Delbruck) 167
Де Фриз Г. (H. de Vries) 167
Диккенс Ф. (F. Dickens) 124
Дубинина Г. А. 293, 295, 296
Дубнау Д. (D. Dubnau) 210
- Дудоров М. (M. Doudoroff) 124, 127, 128
Дэвис Б. (B. Davis) 187, 215, 226
- Ермольева З. В. 96
- Жакоб Ф. (F. Jacob) 75, 217–219, 221, 249, 250
- Зонне К. (C. Sonne) 328
- Ивановский Д. И. 16, 76
Иерсен А. (A. Yersin) 333
- Кавалли Л. (L. Cavalli) 218
Карстрем Х. (X. Karstrem) 245
Кемпбелл А. (A. Campbell) 82, 219
Клебс Э. (E. Klebs) 332
Клюйвер А. (A. Kluyver) 17
Коллинз Дж. (J. Collins) 75
Кон Ф. (F. Cohn) 297
Кох Р. (R. Koch) 13, 14
Крик Фр. (F. Crick) 18
Кузнецов С. И. 293, 295, 296
Кьюзен Ф. (F. Cuzin) 75
Кейрнс Ж. (J. Cairns) 68
- Левенгук А. ван (A. van Leeuwenhoek) 11, 12
Ледерберг Дж. (J. Lederberg) 18, 167, 169, 170, 187, 213–216, 225, 226, 228, 230
Ледерберг Е. (E. Lederberg) 167, 169, 170, 230
Лекс С. (S. Lacks) 211
Лурия С. (S. Luria) 167
Львов А. (A. Lwoff) 218
- Мак-Карти М. (M. McCarty) 18, 204

- Мак-Леод К. (K. MacLeod) 18, 204
Мейергоф О. (O. Meyerhof) 124
Меррей Р. (R. Murray) 298
Меселсон М. (M. Meselson) 71, 72
Мечников И. И. 15
Минеева Л. А. 60, 286, 287, 290–292, 302, 304
Моно Ж. (J. Monod) 246, 249, 250
Морган Х. (H. Morgan) 338
Морзе М. (M. Morse) 230
- Надсон Г. А. 17, 398
Нейссер А. (A. Neisser) 362
Ниль К. ван (C. van Niel) 17
Ньюкомб Г. (H. Newcombe) 167–169
- Омелянский В. Л. 17, 398
- Пакула Р. (R. Pakula) 206
Парнас Я. О. 124
Пастер Л. (L. Pasteur) 12, 13, 358
Паустиан Т. (T. Paustian) 58
Петри Р. (R. Petri) 14
Притчард Р. (R. Pritchard) 75
Прозоров А. А. 207
- Риккетс Х. (H. Ricketts) 345
Роуз Э. (E. Rose) 42
- Сальмон Д. (D. Salmon) 330
Сиа Р. (R. Sia) 204
Смит Е. (E. Smith) 341
Солтон М. (M. Salton) 42
Сталь Ф. (F. Stahl) 71, 72
- Старр М. (M. Starr) 259
Стейниер Р. (R. Stanier) 298
Столып Г. (H. Stolp) 259
- Татум Э. (E. Tatum) 17, 213–216
Тихонов А. Н. 59
Томас Р. (R. Thomas) 206
- Уотсон Дж. (J. Watson) 18
- Флекснер С. (S. Flexner) 328
Флеминг А. (A. Fleming) 95, 96
Флори Х. (H. Florey) 96
Флюгге К. (C. Flügge) 320
Фокс Г. (H. Fox) 389
Фомичев Ю. К. 4
Фрир Дж. (F. Freer) 42
- Халворсен Г. (H. Halvorsen) 65
Хейс У. (W. Hayes) 216–217
Халей С. (S. Haley) 68
Хореккер Г. (G. Horecker) 124
Хочкисс Р. (R. Hotchkiss) 206
- Ценковский Л. С. 14, 15
Циндер Н. (N. Zinder) 18, 225, 226, 228
- Чейн Э. (E. Chain) 96
- Шига К. (K. Shiga) 328
- Эвери О. (O. Avery) 18, 204
Эмбден Х. (H. Embden) 124
Энтнер Н. (N. Entner) 124, 127, 128
Эшерих Т. (T. Escherich) 327

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Acetobacter* 30, 87, 387
– *pasteurianus* 55
Acholeplasma 385
– *laidlawii* 385
Acholeplasmataceae 384, 385
Achromobacter 318, 387
Achromatium 313, 316
– *oxaliferum* 5
Acidianus 392
Acinetobacter 30, 362, 364, 365
– *calcoaceticus* 365
Actinobacteria 29
Actinomadura 381
Actinomyces 29
Actinomycetales 375–382
Actinoplanes 29, 379
Actinosynnema 381
Aeromonas 30
Agrobacterium 30, 189
– *tumefaciens* 70, 197, 278
Alcaligenes 30, 316, 318
– *eutrophus* 316
– *paradoxus* 316
Alnus 265
Ampullariella 379
Anabaena azollae 266
Ancalochloris perfilievii 295
Ancylobacter 30
Anoxyphotobacteria 31, 293, 295
Aquaspirillum 30, 316
Archaeobacteria 32
Archaeoglobus 391, 392
– *fulgidus* 391
– *profundus* 391
Arthrobacter 29, 91, 370–373, 387, 403
– *globiformis* 373
Aspergillus flavus 96
– *nidulans* 96
– *niger* 206
Azolla 266
Azomonas 30, 106
Azorhizobium 106
Azospirillum 106
Azotobacter 30, 68, 106, 189
– *chroococcum* 17, 69
Bacillus 30, 64, 92, 110, 140, 310, 316, 355–357, 387, 402, 403
– *anthracis* 13, 63, 273, 356
– *brevis* 98, 357
– *cereus* 356, 357
– *circulans* 357
– *laterosporus* 357
– *licheniformis* 356, 357
– *megaterium* 67, 87, 356, 357
– *pasteurii* 87, 356, 402
– *polymyxa* 98, 356, 357
– *popilliae* 357
– *psychrophilus* 90
– *sphaericus* 357
– *stearothermophilus* 91, 356
– *submarinus* 94
– *subtilis* 42, 65, 70, 98, 205–207, 210, 211, 228, 229, 240, 249, 356, 357
– *thuringiensis* 356, 357
Bacteroidaceae 270
Bacteroides 147
– *ruminicola* 152
Bdellovibrio 30, 260
– *bacteriovorus* 259
Beggiatoa 30, 313
– *alba* 5

Beijerinckia 30, 106
Bifidobacterium 29, 270
 – *bifidum* 151, 270, 352
Borrelia 344
 – *burgdorferi* 70, 349
 – *recurrentis* 344
Brachyspira 344
Bradyrhizobium 30, 106, 265
 – *japonicum* 265
Brevibacterium 370, 373, 387
 – *casei* 373
 – *epidermidis* 373
 – *iodinum* 373
 – *linens* 373
Burkholderia cepacia 70

Campylobacter 30
Candida 269, 270, 271
Capnocytophaga 350, 351
Caryophanon 30
Casuarina 265
Catellaspera 379
Caulobacter 30, 56
Cellulomonas 370, 373, 374
 – *flavigena* 374
Chitinophaga 350
Chlamydia 346–348
 – *pneumoniae* 347, 348
 – *psittaci* 347, 348
 – *trachomatis* 347, 348
Chlamydiaceae 346–348
Chlorobiaceae 295
Chlorobium limicola 295
 – *vibrioforme* 295
Chloroflexaceae 295, 296
Chloroflexus aurantiacus 296, 297
Chloronema giganteum 296
Chromatiaceae 294
Chromatium 30, 56, 106, 266, 293
Chroococcales 299
Citrobacter 155, 182, 326, 335, 336
 – *amolonaticus* 336
 – *diversus* 336
 – *freundii* 336
Clathrochloris sulfurica 295
Clavibacter 370, 374
 – *iranicus* 374
 – *michiganensis* 278, 374
 – *rathayi* 374
 – *tritici* 374
 – *xyli* 374
Clostridium 30, 55, 64, 106, 149, 270, 355, 357, 358
 – *acetobutyricum* 357, 358
 – *acidiurici* 358
 – *botulinum* 19, 67, 84, 89, 93, 271, 358
 – *butyricum* 357, 358
 – *cylindrosporum* 358
 – *felsineum* 357, 358
 – *histolyticum* 358
 – *novyi* 358
 – *pasteurianum* 16, 357, 358
 – *perfringens* 42, 276, 358
 – *propionicum* 152
 – *putribicum* 358
 – *rubrum* 357
 – *septicum* 358
 – *sordelli* 358
 – *sporogenes* 149, 357, 358
 – *tetani* 19, 42, 67, 272, 275, 358
 – *thermocellum* 149
 – *thermohydrosulfuricum* 149
Comamonas 318
Corynebacterium 29, 63, 370, 371, 374
 – *diphtheriae* 84, 136, 273, 275, 276, 371
 – *glutamicum* 371
 – *mediolaneum* 371
Crenarchaeota 30
Crenothrix 30
Cristispira 344
Cystobacter 349
Cytophaga 350
Cytophagales 348, 350, 351

Dactylosporangium 379
Dermatophilus 378
 – *congolensis* 378
Derxia 106
Desulfococcus 30
Desulfotomaculum 30, 140, 355
Desulfonema 141
 – *limicola* 141
Desulfosarcina 30, 140

- *variabilis* 141
- Desulfovibrio* 30, 140
 - *gigas* 69
- Desulfuromonas* 30
 - *acetoxidans* 405
- Dryas* 265
- Ectothiorhodospira* 293
- Edwardsiella* 326, 341
 - *ictaluri* 341
 - *hoshinae* 341
 - *tarda* 341
- Enterobacter* 156, 270, 326, 335
 - *aerogenes* 335
 - *agglomerans* 342, 343
 - *amnigenus* 335
 - *asburiae* 335
 - *cloacae* 155, 335
 - *gergoviae* 335
 - *sakazakii* 335
 - *taylorae* 335
- Enterobacteriaceae* 126, 154, 270, 325–343
- Enterococcus* 30
- Erwinia* 56, 156, 189, 202, 208, 325, 326, 341–343
 - *amylovora* 149, 155, 342
 - *ananas* 342
 - *carotovora* 44, 278, 342
 - *chrysanthemi* 194, 342
 - *cypripedii* 342
 - *maelotivora* 342
 - *nigrifluens* 342
 - *quercina* 342
 - *rhapontici* 342
 - *rubrifaciens* 342
 - *salicis* 342
 - *stewartii* 341, 342
 - *tracheiphila* 342
 - *uredovora* 342
- Escherichia* 110, 147, 155, 189, 326–328
 - *blattae* 327
 - *coli* 6, 38, 44, 45, 47, 49, 53, 55, 56, 68, 70–74, 78, 80, 87, 90, 93, 109, 110, 132, 133, 135, 154, 157, 165, 167, 168, 170–172, 182, 188, 191–195, 198, 200, 205, 208, 213, 216, 219–221, 223–225, 228, 231, 233, 235–237, 239, 240, 245, 246, 249, 250, 252–254, 259, 276, 326–328, 389
- Euryarchaeota* 30, 31
- Fibrobacter* 147
- Firmibacteria* 32
- Firmicutes* 29, 31–33
- Flexibacter* 350
 - *columnaris* 351
- Flexithrix* 351
- Frankia* 29, 106, 265, 266, 377, 379
- Frateuria* 319–321
 - *aurantia* 321
- Gallionella* 30, 90
 - *ferruginea* 315
- Geodermatophilus* 29, 379
- Geotrichum* 271
- Glycomyces* 381
- Gluconobacter* 30
- Gordona* 378
- Gracilicutes* 31, 32
- Haemophilus influenzae* 205, 211
 - *parainfluenzae* 205, 211
- Hafnia* 326, 339
 - *alvei* 339
- Haloarcula* 393
- Halobacterium* 94, 393, 394
- Halococcus* 94, 393, 394
- Helicobacter* 30
 - *pylori* 270
- Heliobacterium* 30, 393
 - *chlorum* 282, 297
- Heliobacillus mobilis* 282, 297
- Hippophae* 265
- Hyphomicrobium* 30, 387
- Intrasporangium* 379
- Jonesia* 378
- Kineosporia* 379
- Kingella* 362, 365
 - *kingae* 365
- Kitasatosporia* 381

Klebsiella 63, 106, 147, 182, 189, 266, 326, 332
 – *oxytoca* 332
 – *planticola* 332
 – *pneumoniae* 332, 333
 subsp. *ozaenae* 332
 subsp. *pneumoniae* 332
 subsp. *rhinoscleromatis* 332
 – *terrigena* 332
Korarchaeota 30, 31

Lactobacillaceae 351
Lactobacillus 91, 110, 270
 – *acidophilus* 270, 352
 – *brevis* 151, 352
 – *bulgaricus* 151, 352
 – *kefir* 352
 – *kefiranoformans* 352
 – *lactis* 151, 352
 – *plantarum* 352
Lactococcus 30
 – *cremoris* 352
 – *lactis* 149, 352, 363
Legionella 30
Leptonema 344
Leptospira 344
 – *biflexa* 344
 – *canicola* 344
 – *interrogans* 70
Leptospiraceae 344
Leptothrix 30
Leuconostoc 30
 – *lactis* 352
 – *mesenteroides* 63, 149, 151, 352
Listeria 30

Magnetospirillum 30
Megasphaera elsdenii 152
Mendosicutes 31–33
Methanobacterium 391
Methanosarcina 391
Methanospirillum 391
Methylobacillus 387
Methylobacter 30
Methylobacterium 387
Methylococcus 30, 387
 – *capsulatus* 91

Methylocystis 30, 387
Methylomonas 30, 387
Methylophaga 387
Methylophilus 387
Methylosinus 387
Methylovorus 387
Micavibrio 260
Microbacterium 370, 375
 – *arborescens* 375
 – *imperiale* 375
 – *lacticum* 375
 – *laevaniformans* 375
Micrococcaceae 359
Micrococcus 29
 – *radiodurans* 93
Micromonospora 379
Microscilla 360
Mollicutes 32
Moraxella 362, 364
 – *bovis* 364
 – *catarrhalis* 364
 – *lacunata* 364
 – *osloensis* 364
 – *phenylpyruvica* 364
Morganella 326, 338, 339
 – *morganii* 338
 subsp. *morganii* 338
 subsp. *sibonii* 338
Mycobacteriaceae 365–367
Mycobacterium 29, 316, 365–367, 387
 – *bovis* 366
 – *leprae* 365–367
 – *paratuberculosis* 365
 – *phlei* 136
 – *smegmatis* 271
 – *tuberculosis* 13, 366
Mycoplasma 30, 384
 – *genitalium* 69
 – *hominis* 385
 – *pneumoniae* 385
 – *urealyticum* 385
Mycoplasmataceae 384
Mycoplasmatales 384
Myxobacteriales 348–350
Myxococcus 30, 68, 349

Nannocystis 349

- Neisseria* 30, 55, 362–364
 – *canis* 363
 – *elongate* 363
 – *flavescens* 362
 – *gonorrhoeae* 362, 363
 – *lactamica* 362
 – *meningitidis* 362, 363
 – *mucosa* 362
 – *sicca* 362
Neisseriaceae 362–365
Neurospora 18
Nitrobacter 30, 109, 307, 308
Nitrococcus 30, 307
Nitrosococcus 30, 307
Nitrosolobus 307
Nitrosomonas 30, 109, 307
Nitrospira 30, 307
Nitrosovibrio 307
Nitrospina 307
Nocardia 29, 316, 378, 387
Nocardioides 378
Nocardiopsis 381
Nostocales 299, 300

Oerskovia 378
Oscillatoriales 299, 300
Oscillochloris chrysea 296
Oxyphotobacteria 31, 32

Pantoea 156, 325, 326, 342, 343
 – *agglomerans* 268, 343
 – *dispersa* 343
Paracoccus 30, 316
Pediococcus 30
Pelodictyon clathratiforme 295
 – *lutecium* 295
Penicillium chrysogenum 96
 – *nigricans* 96
 – *notatum* 95, 96
Peretta 266
Photobacterium 30
Pilimelia 379
Pleurocapsales 299
Polyangium 30, 349
Prochlorales 304
Prochloron 304, 305
 – *didemni* 305

Prochlorothrix 304, 305
 – *hollandica* 305
Promicromonospora 378
Propionibacteriaceae 367–370
Propionibacterium 29, 147, 367–370
 – *acidipropionici* 368
 – *acnes* 368, 369
 – *avidum* 368
 – *freudenreichii* 368
 – *granulosum* 368, 369
 – *jensenii* 368
 – *propionicus* 367, 368
 – *thoenii* 368
Prosthecochloris aestuarii 295
Proteobacteria 29, 30
Proteus 147, 270, 326, 336–339, 402
 – *mirabilis* 337
 – *myxofaciens* 337, 339
 – *penneri* 337
 – *vulgaris* 44, 154, 336, 337, 339, 402
Providencia 326, 337–339
 – *alcalifaciens* 337, 338
 – *heimbachae* 337, 338
 – *rettgeri* 338
 – *rustigianii* 338
 – *stuartii* 338, 339
Pseudomonadaceae 319–325
Pseudomonas 21, 30, 55, 56, 91, 106, 140, 182, 202, 270, 311, 316, 318–325, 387, 402, 403
 – *acidophila* 323
 – *acidovorans* 324
 – *aeruginosa* 44, 194, 320–325
 – *aurantiaca* 322, 324
 – *aureofaciens* 321, 323
 – *azotoformans* 323
 – *carboxidoflava* 316
 – *carboxidovorans* 316
 – *chlororaphis* 321, 323
 – *cihorii* 325
 – *delafeldii* 324
 – *denitrificans* 322, 324
 – *facilis* 316, 324
 – *flava* 322, 324
 – *fluorescens* 192, 321–325
 – *glycinea* 325
 – *iodinium* 321

- *mendocina* 322, 324
- *palleronii* 322, 324
- *putida* 321, 324, 325
- *radiora* 322
- *rodos* 322
- *saccharophila* 316, 324
- *sorbistini* 323
- *syringae* 278, 323, 325
- *tabaci* 323
- *testosteroni* 324
- Pseudonocardia* 378
- Psichoteria* 266
- Pyrodictium* 393
- *occultum* 393
- Rickettsia* 30, 345, 346
 - *acari* 346
 - *australis* 346
 - *conorii* 346
 - *prowazekii* 345
 - *rickettsii* 345, 346
 - *sibirica* 346
 - *tsutsugamushi* 346
 - *typhi* 346
- Rickettsiaceae* 345
- Rhizobium* 30, 106, 189, 262, 263, 316
 - *japonicum* 206
 - *leguminosarum* 263
 - *phaseoli* 263
 - *trifolii* 263
- Rhodobacter* 30, 294
 - *sphaeroides* 70, 293
- Rhodococcus* 29, 378
 - *fascians* 71
- Rhodocyclus* 30, 293
- Rhodomicrobium* 293
- Rhodopseudomonas* 30
 - *palustris* 293
- Rhodospirillaceae* 294
- Rhodospirillum* 30, 293
- Saccharomyces cerevisiae* 149
 - *uvarum* 149
- Saccharothrix* 381
- Salmonella* 55, 147, 155, 182, 189, 270, 326, 330–332
 - *bongori* 330
 - *choleraesuis* 330
 - subsp. *arizonae* 330
 - subsp. *choleraesuis* 330
 - subsp. *diarizonae* 330
 - subsp. *houtenae* 330
 - subsp. *indica* 330
 - subsp. *salamae* 330
 - *enteritidis* 331
 - *gallinarum* 331
 - *hirschfeldii* 331
 - *paratyphi A* 331
 - *pullorum* 331
 - *typhi* 155, 330, 331
 - *schotmuleri* 331
 - *typhimurium* 70, 80, 225, 226, 228, 233, 331
- Sarcina* 30
 - *ventriculi* 42, 63, 149
- Schizosaccharomyces pombe* 149
- Schyzophyta* 297
- Scotobacteria* 31
- Serpulina* 344
- Serratia* 156, 326, 339–341
 - *adorifera* 340
 - *fonticola* 340
 - *marcescens* 155, 192, 326, 340
- Shigella* 155, 182, 189, 194, 270, 326, 328–330
 - *boydii* 328, 329
 - *dysenteriae* 155, 325, 328, 329
 - *flexneri* 328, 329
 - *sonnei* 328, 329
- Sphaerotilus* 30
 - *natans* 64
- Spirillum* 30, 56
- Spirochaeta* 344
 - *aurantia* 149
- Spirochaetaceae* 344
- Spirochaetales* 344
- Spiroplasma* 385
 - *citri* 385
- Spiroplasmataceae* 384, 385
- Sporichthya* 379
- Sporocytophaga* 350
- Sporolactobacillus* 355
 - *inulinus* 351, 355
- Sporosarcina* 30, 355

- urea 402
- Staphylococcus* 30, 270, 359–362
 - aureus 42, 359, 360
 - capitis 359
 - chromogenes 359
- epidermidis 192, 269, 271, 359, 360
- hominis 359
- hyicus 359
- intermedius 359
- saccharolyticus 359
- saprophyticus 269, 359, 360
- simulans 359
- Stigmatella* 355
 - aurantiaca 355
- Stigonematales* 299, 300
- Streptoalloteichys* 381
- Streptococcaceae* 351–354
- Streptococcus* 30
 - bovis 352
 - cremoris 151, 352
 - faecalis 87, 352, 354
 - lactis 42, 151, 352
 - moniliformis 46
 - mutans 63
 - pneumoniae 63, 202, 206–207, 352, 354
 - pyogenes 352, 354
 - thermophilus 352
 - viridans 354
- Streptomyces* 29, 98, 379–381
 - aureofaciens 380
 - griseus 380
 - scabies 380, 381
 - venezuelae 380
- Streptosporangium* 381
- Streptoverticillium* 379
- Stigmatella* 349
 - aurantiaca 350
- Stigonematales* 299, 300
- Sulfolobus* 87, 311, 392
 - brierley 393
- Tenericutes* 31–33
- Terrabacter* 378
- Thallobacteria* 32
- Thermoactinomyces* 377, 381
- Thermoanaerobacter ethanolicus* 149

- Thermococcales* 392
- Thermomicrobium* 92
- Thermomonospora* 377, 381
- Thermonema* 350
- Thermoplasma* 92
 - acidophilum 393
- Thermoproteales* 392
- Thermothrix* 30
- Thermus* 92
- Thiobacillus* 30, 87, 311
 - denitrificans 313
 - ferrooxidans 314, 315
 - thiooxidans 312
- Thiobacterium* 313
- Thiocapsa* 30, 293
- Thiocystis* 293
- Thiodendron* 311
- Thiodictyon* 293
- Thiomicrospira* 30, 311
- Thiospira* 313
- Thiospirillum* 30, 293
- Thiothrix* 30, 313
- Thiovulum* 313
- Torulopsis* 271
- Treponema* 344
 - pallidum subsp. pallidum 344
 - pallidum subsp. pertenue 344
- Tsukamurella* 378
- Ureaplasma* 30, 384
 - urealyticum 385
- Vampirovibrio* 260
- Vibrio* 30, 56
 - comma 192
- Wolinella* 147
- Xanthobacter* 316
- Xanthomonas* 63, 319, 320, 403
 - campestris 63, 320
- Yersinia* 155, 325, 326, 333–335
 - enterocolitica 334
 - pestis 44, 155, 333, 334
 - pseudotuberculosis 334
 - ruckeri 333, 335

Zoogloea 30, 319, 320
– *ramigera* 320

Zymomonas 30
– *mobilis* 149