

Министерство образования Республики Беларусь
Белорусский государственный университет
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

СОГЛАСОВАНО
Заведующий кафедрой

_____ С.Л. Василенко

«03» января 2024 г.

СОГЛАСОВАНО
Декан факультета

_____ В.В. Демидчик

«15» января 2024 г.

Микробиология

Электронный учебно-методический комплекс
для специальностей:
6-05-0511-06 «Биотехнология»,
1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика»

Регистрационный № 2.4.2-24/395

Авторы:

Лысак В.В., профессор кафедры микробиологии, кандидат биологических наук, доцент;

Мямин В.Е., доцент кафедры микробиологии, кандидат биологических наук, доцент;

Василенко С.Л., заведующий кафедрой микробиологии, кандидат биологических наук.

Рассмотрено и утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ
18.01.2024 г., протокол № 5.

Минск 2024

УДК579(075.8)
Л 886

Утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ
Протокол № 5 от 18.01.2024 г.

Решение о депонировании вынес:
Совет биологического факультета
Протокол № 5 от 15.01.2024 г.

А т о р ы:

Лысак Владимир Васильевич, профессор кафедры микробиологии биологического факультета, кандидат биологических наук доцент, БГУ;

Мямин Владислав Евгеньевич, доцент кафедры микробиологии биологического факультета, кандидат биологических наук, доцент, БГУ;

Василенко Светлана Леонидовна, заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета, кандидат биологических наук, БГУ.

Рецензенты:

кафедра биотехнологии учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет» (заведующий кафедрой Леонтьев В.Н., кандидат химических наук, доцент);

Алещенкова З.М., доктор биологических наук, профессор, ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларусь».

Лысак, В. В. Микробиология : электронный учебно-методический комплекс для специальностей: 6-05-0511-06 «Биотехнология», 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика» / В. В. Лысак, В. Е. Мямин, С. Л. Василенко ; БГУ, Биологический фак., Каф. микробиологии. – Минск : БГУ, 2024. – 301 с. : ил. – Библиогр.: с. 300–301.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов I ступени высшего образования специальностей 6-05-0511-06 «Биотехнология», 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика». Содержание ЭУМК посвящено изучению структурной организации клеток прокариот; питания микроорганизмов; особенностей энергетического и конструктивного метаболизма микроорганизмов; генетики прокариот; систематики прокариот; взаимоотношений между микро- и макроорганизмами. Кратко описаны методы культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях. Уделено внимание значению микроорганизмов в природе и применению их в различных областях биологии, медицины, сельского хозяйства и промышленности.

СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА.....	6
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....	8
1.1. ВВЕДЕНИЕ.....	8
1.1.1. Предмет и задачи микробиологии.....	8
1.1.2. Значение микроорганизмов в природе и жизни человека	11
1.1.3. История развития микробиологии	14
1.2. СИСТЕМАТИКА ПРОКАРИОТ	20
1.2.1. Принципы систематики	20
1.2.2. Генетические критерии систематики	22
1.2.3. Фенотипические критерии систематики	27
1.2.4. Серологические критерии систематики.....	28
1.2.5. Современная классификация прокариот	28
1.3. МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТОК ПРОКАРИОТ	33
1.3.1. Морфология прокариот	33
1.3.2. Структурная организация бактериальной клетки.....	35
1.3.2.1. Клеточная стенка.....	36
1.3.2.2. Цитоплазматическая мембрана и ее производные	45
1.3.2.3. Транспорт веществ в клетку прокариот.....	48
1.3.2.4. Секреция продуктов жизнедеятельности клеток прокариот	49
1.3.2.5. Цитоплазма и внутрицитоплазматические включения	50
1.3.2.6. Жгутики и движение прокариот	53
1.3.2.7. Ворсинки (или фимбрии)	57
1.3.2.8. Капсулы, слизи, чехлы, гликокаликс и S-слои	58
1.3.2.9. Эндоспоры и другие покоящиеся формы бактерий	60
1.3.2.10. Нуклеоид и репликация ДНК у прокариот	64
1.4. ВИРУСЫ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА	70
1.4.1. Строение и химический состав вирусных частиц	71
1.4.2. Строение бактериофагов. Взаимодействие бактериофагов с чувствительными клетками бактерий	73
1.5. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ	78
1.5.1. Действие факторов химической природы	78
1.5.2. Действие факторов физической природы	82
1.5.3. Антимикробное действие антибиотиков	87
1.6. ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБНОГО РОСТА. СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	92
1.6.1. Питание микроорганизмов	92
1.6.2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов	98
1.6.3. Закономерности микробного роста	102
1.6.4. Способы культивирования микроорганизмов	104
1.7. МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	110
1.7.1. Общая характеристика энергетического метаболизма	112

1.7.1.1. Аэробное дыхание.....	119
1.7.1.2. Получение энергии в результате анаэробного дыхания	126
1.7.1.3. Получение энергии в результате брожения	140
1.7.2. Общая характеристика конструктивного метаболизма	155
1.7.2.1. Биосинтез аминокислот	156
1.7.2.2. Биосинтез нуклеотидов	162
1.7.2.3. Биосинтез липидов	164
1.7.2.4. Биосинтез углеводов	165
1.7.2.5. Биосинтез пептидогликана муреина	169
1.8. ГЕНЕТИКА ПРОКАРИОТ	172
1.8.1. Мутации у прокариот. Доказательства природы возникновения мутаций у прокариот.....	173
1.8.2. Классификация мутаций у прокариот. Молекулярные механизмы мутационного процесса. Мутагенные факторы	178
1.8.3. Методы выделения мутантов бактерий	189
1.8.4. Плазмиды прокариот	193
1.8.4.1. F-плазмида	196
1.8.4.2. Плазмиды бактериоциногенности.....	197
1.8.4.3. R-плазмиды, или факторы резистентности	199
1.8.4.4. Ti-плазмиды	201
1.8.5. Способы генетического обмена у прокариот	202
1.8.5.1. Трансформация.....	206
1.8.5.2. Конъюгация	216
1.8.5.3. Трансдукция.....	227
1.8.6. Репарация повреждений днк у прокариот	235
1.8.7. Система рестрикции-модификации клеток микроорганизмов	239
1.8.8. Генетическая инженерия. Клонирование генов в клетках микроорганизмов.....	243
1.8.9. Регуляция метаболизма у прокариот	245
1.8.9.1. Регуляция активности ферментов	246
1.8.9.2. Регуляция на уровне генов, или регуляция синтеза ферментов ...	250
1.9. ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ДРУГ С ДРУГОМ И С МАКРООРГАНИЗМАМИ	258
1.9.1. Взаимоотношения между микроорганизмами	258
1.9.2. Взаимоотношения микроорганизмов с макроорганизмами	262
1.9.2.1. Мутуалистические взаимоотношения между микроорганизмами и макроорганизмами	263
1.9.2.2. Паразитические взаимоотношения между микро- и макроорганизмами	274
1.10. БИОГЕОХИМИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ	280
1.10.1. Участие микроорганизмов в биологическом круговороте углерода в природе	281
1.10.2. Участие микроорганизмов в круговороте азота в природе	283

10.3. Участие микроорганизмов в биологическом круговороте серы в природе	286
10.4. Участие микроорганизмов в биологическом круговороте фосфора в природе	288
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	290
Программа лабораторных занятий	290
3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ	291
3.1. Перечень рекомендуемых средств диагностики.....	291
3.2. Примерный перечень заданий для управляемой самостоятельной работы студентов.....	291
3.3. Темы реферативных работ	294
3.4. Примерный перечень вопросов к экзамену.....	294
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ.....	300
4.1. Рекомендуемая литература	300
4.2. Электронные ресурсы	301

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Микробиология» создан в соответствии с экспериментальными учебными планами: № 6-05-05-001/эксп., утвержденным 23.05.2022, № 6-05-05-002/эксп., утвержденным 14.06.2022 (специальность 6-05-0511-06 Биотехнология) и ОСВО 1-31 01 04-2021, утвержденным Постановлением Министерства образования Республики Беларусь № 98 от 25.04.2022, типовым учебным планом № G 31-1-020/пр-тип., утвержденным 21.04.2022, учебным планом УВО № G 31-1-206/уч., утвержденным 22.03.2022 (специальность 1-31 01 04 Биоинженерия и биоинформатика).

Содержание разделов ЭУМК соответствует образовательным стандартам высшего образования по данным специальностям. Учебная дисциплина относится к государственному компоненту и входит в модуль «Микробиология и вирусология» (специальность 6-05-0511-06 Биотехнология) и в модуль «Микробиология и вирусология» компонента учреждения высшего образования (специальность 1-31 01 04 Биоинженерия и биоинформатика).

Цель учебной дисциплины – сформировать у студентов целостную систему знаний о многообразии, важнейших свойствах микроорганизмов, их значении в природных процессах, народном хозяйстве и здравоохранении

Задачи учебной дисциплины:

- рассмотреть принципы систематики прокариот и современную филогенетическую и фенетическую классификацию прокариот;
- изучить морфологию, структурную организацию, метаболизм и генетику бактерий;
- изучить действие химических, физических и биологических факторов на жизнедеятельность микроорганизмов;
- изучить взаимоотношения микроорганизмов с микро- и макроорганизмами;
- изучить физиолого-биохимические, экологические особенности, роль в природе и практическое значение представителей различных групп прокариот;
- ознакомить с современными методическими приемами работы с микроорганизмами.

Требования к компетенциям:

Освоение учебной дисциплины «Микробиология» должно обеспечить формирование следующей компетенции:

СК-6. Характеризовать основные группы микроорганизмов и вирусов, особенности их жизнедеятельности, взаимодействия с другими организмами, роль в природе и практической деятельности человека, осуществлять подбор микробиологических объектов для биотехнологических производств, применять методические подходы по улучшению производственных и экономических характеристик продуцентов методами *in vivo* и *in vitro* (специальность 6-05-0511-06 Биотехнология).

СК-6. Характеризовать основные группы микроорганизмов и вирусов, особенности их жизнедеятельности и взаимодействия с другими организмами с целью биотехнологического использования (специальность 1-31 01 04 Биоинженерия и биоинформатика).

В ЭУМК существенное место отводится изучению структурной организации клеток прокариот; питания микроорганизмов; особенностей энергетического и конструктивного метаболизма микроорганизмов; генетики прокариот; систематики прокариот; взаимоотношений между микро- и макроорганизмами. Кратко описаны методы культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях. Уделено внимание значению микроорганизмов в природе и применению их в различных областях биологии, медицины, сельского хозяйства и промышленности.

Цель ЭУМК – оказание методической помощи студентам в получении современных знаний по учебной дисциплине «Микробиология», систематизации учебного материала в процессе подготовки к итоговой аттестации.

В структуру ЭУМК входит:

1. Теоретический раздел (включает конспект лекций по учебной дисциплине).
2. Практический раздел.
3. Контроль самостоятельной работы студентов (содержит перечень контрольных мероприятий управляемой самостоятельной работы студентов; темы реферативных заданий и примерный перечень вопросов для подготовки к экзамену).
4. Вспомогательный раздел (включает список рекомендуемой литературы).

Работа студента с ЭУМК должна включать ознакомление с тематическим планом учебной дисциплины, представленным в учебной программе учреждения высшего образования, в которой можно получить информацию о тематике лекций, лабораторных занятий и рекомендуемой литературе. Для подготовки к лабораторным занятиям рекомендуется использовать материалы, представленные в теоретическом и практическом разделах ЭУМК, а также материалы для контроля самостоятельной работы студентов. В ходе подготовки к экзамену целесообразно ознакомиться с требованиями к компетенциям по учебной дисциплине, изложенными в учебной программе учреждения высшего образования, а также перечнем вопросов к экзамену.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1.1. ВВЕДЕНИЕ

1.1.1. Предмет и задачи микробиологии

Микробиология (от греч. *mikros* – 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, археи, микроскопические грибы и водоросли, простейшие, а также организмы с неклеточной организацией – 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 крупные на сегодняшний день прокариотические микроорганизмы – это *Epulopiscium fishelsoni*, *Tiomargarita namibiensis* и *Tiomargarita magnifica*. Клетки прокариот *Epulopiscium fishelsoni* имеют форму толстой палочки с заостренными концами и обитают в кишечнике глубоководной рыбы-хирурга. Их размеры достигают 600 мкм в длину и 100 мкм в диаметре. Клетки прокариот *Tiomargarita namibiensis*, обнаруженные в прибрежных водах Намибии и Чили, кокковидные, до 750 мкм в диаметре. Нитевидные бактерии вида *Tiomargarita magnifica* обнаружены в мангровых зарослях Карибского моря. Они являются самыми крупными представителями из известных бактерий. Их средняя длина составляет 10 мм, а некоторые особи достигают 20 мм, что делает бактерии вида *Tiomargarita magnifica* видимыми невооруженным глазом. Самые мелкие из известных прокариот – микоплазмы, наноархеи и трепонемы, диаметр клеток которых составляет 0,05 – 0,1 мкм. Следовательно, размеры известных в настоящее время прокариот колеблются от 0,05 мкм до 20 мм.

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 *индукцильными*, 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 и антарктических 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) (таблица 1). К эукариотическим микроорганизмам относятся водоросли, грибы и простейшие, к прокариотическим – бактерии и археи.

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 инtronов (за исключением архей). Гены организованы в опероны. Митоз и мейоз отсутствуют	Ядро, содержащее обычно более одной хромосомы. Есть белки гистоны. Гены имеют экзонноинтронную организацию. Опероны отсутствуют. Митоз и мейоз осуществляются
Локализация ДНК	В нуклеоиде и плазмидах	В ядре и некоторых органеллах. У некоторых дрожжей в

Признак	Прокариотическая клетка	Эукариотическая клетка
		плазмидах
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	Состоит из микротрубочек, собранных в группы
Комpartmentализация клеток	Слабо выражена	Клетка разделена мембранами на отдельные отсеки
Клеточная стенка (там, где она имеется)	Содержит пептидогликан муреин (за исключением архей)	Пептидогликан муреин отсутствует

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

Деление клеток прокариот 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 мембранны и пептидогликанового слоя. Расхождение образовавшихся дочерних клеток происходит в результате лизиса срединного слоя поперечной перегородки с помощью ферментов автолизинов. Клетки большинства грамотрицательных бактерий делятся путем перетяжки, которая формируется при сужении в центральной части клетки цитоплазматической мембранны 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 почкоющихся 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 и для эукариотических микроорганизмов, однако отличаются от них тем, что у последних этим процессам предшествует митотическое деление ядра, а у бактерий и архей митоз отсутствует.

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

Микроорганизмы первыми поселяются на материнской горной породе и обусловливают 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 азотфикссирующие 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, биофильры 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, стрепто-киназы, 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, стериоиды, 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 небиологические производства, как получение энергетического сырья (биогаз метан), добыча нефти, что вносит существенный вклад в решение топливно-энергетической проблемы. Микроорганизмы способны 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, синдроме приобретенного иммунодефицита и многих вирусных инфекций. 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 и лекарственными средствами, возобновление энергетических ресурсов, охрана окружающей среды, так или иначе будет связано с использованием микроорганизмов.

1.1.3. История развития микробиологии

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

Позднее он достиг большого совершенства при изготовлении линз и назвал их «микроскопиями» (рисунок 1).

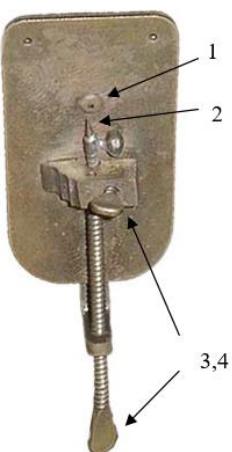
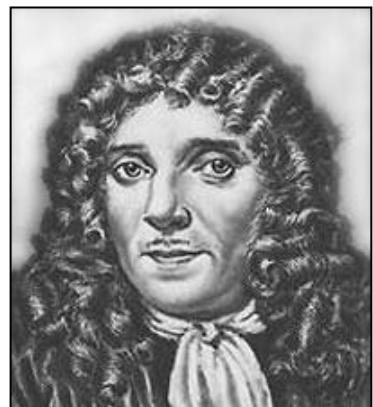


Рисунок 1 – Устройство одного из микроскопов А.ван Левенгука:
1 – линза; 2 – булавка, к которой прикрепляется объект; 3, 4 – фокусирующие винты.

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 малоплодотворным, 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 процессы брожения и гниения обусловливаются жизнедеятельностьюю 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 – анаэробиоз. 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 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.

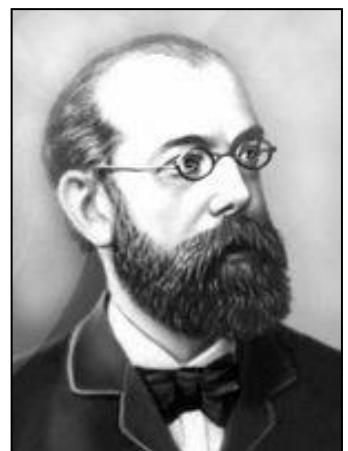
Неоценимый вклад внес Пастер в медицинскую микробиологию. В процессе исследований он установил, что не только брожение, болезни пива и вина, шелковичных червей обусловлены жизнедеятельностью микроорганизмов, но и многие болезни человека и животных также вызываются микроорганизмами. Они, подобно возбудителям 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, гонореи.

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;

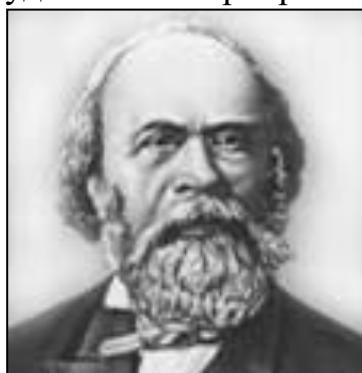
- усовершенствовали технику микроскопирования – конденсор Аббе и иммерсионные объективы, что дало возможность выявлять плохо различимые бактериальные формы;

- 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. Л. С. 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 имmunологии.

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 продления 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 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 микробиоты 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 осеннюю вакцины, впервые описал явление лизиса бактерий под



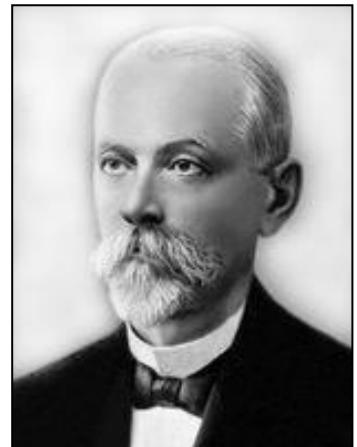
действием агентов, которые впоследствии были названы бактериофагами.

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.



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 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 бактерии, 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.



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 микроорганизмов. Они обнаружили, что закономерности процессов энергетического и конструктивного метаболизма для всех микроорганизмов едины. На основании этого А. Клюйвер 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, Н. Циндера и У. Хейса** 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.

1.2. СИСТЕМАТИКА ПРОКАРИОТ

1.2.1. Принципы систематики

Систематика (таксономия) прокариот 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 прокариот, так же как и в ботанике, зоологии, принята бинарная номенклатура, согласно которой прокариотам 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 прокариотам присваивают в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры прокариот.

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 прокариот 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, обусловливающих существование двух систем классификации: филогенетической (естественной) и фенетической (искусственной). В основу **филогенетической** классификации положена идея создания системы прокариот, объективно отражающей родственные отношения между разными группами бактерий и историю их эволюционного развития. **Фенетическая** 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.

При классификации прокариот учитывается большое количество различных свойств и признаков. Свойства и признаки, характерные для всех прокариот 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 равнозначны. Однако допущение о равнозначности всех признаков является и основным недостатком нумерической таксономии.

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

1.2.2. 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, молекулярная 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 прокариот и др.).

Относительное содержание ГЦ-пар в ДНК представляет собой стабильный признак прокариот, 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 пириимидиновых 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 непосредственное 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 (рисунок 2).

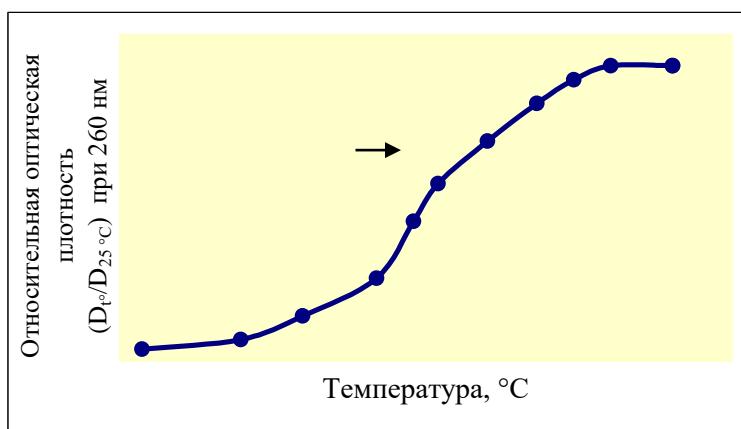


Рисунок 2 – Зависимость поглощения ДНК от температуры.

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

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

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 нукleinовых 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 двухцепочных 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 двухцепочных гибридных молекул ДНК. Оставшиеся после «отжига» одноцепочные ДНК удаляют обработкой ДНКазой. Гибридные молекулы можно обнаружить путем центрифугирования препарата в градиенте CsCl, где они образуют полосы, занимающие промежуточное положение между «легкими» и «меченными» 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 гидроксилапатит. Гидроксилапатит представляет собой гель фосфата кальция, который при определенных условиях специфически адсорбирует только двойные, но не одиночные цепи нуклеиновых кислот. Гибридизационную смесь пропускают через колонку, которую затем промывают для удаления из нее одноцепочных 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 прокариот. 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 генома прокариот, 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 высокую гомологию геномов двух прокариот, у которых реассоциация ДНК–ДНК не выявляет заметной гомологии.

Как уже отмечалось, сравнивать генотипы прокариот 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 прокариот, как *рестрикционное картирование*. Ферменты рестриктазы способны распознавать специфические нуклеотидные последовательности и в строго определенных участках (сайтах рестрикций) «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 прокариот 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 гена (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 прокариот 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.

1.2.3. Фенотипические критерии систематики

В классификации прокариот 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 прокариот 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 прокариоты многих видов.

При характеристике **культуральных признаков**, т. е. таких, которые проявляются при выращивании прокариот в различных условиях, отмечают особенности роста прокариот 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** прокариот, 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.

1.2.4. 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 происходит 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.

1.2.5. Современная классификация прокариот

В современной систематике прокариот 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 прокариот, следует отметить, что наиболее приемлемой филогенетической системой классификации прокариот является система, основанная на сопоставлении последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК.

На основании рассчитанных коэффициентов сходства 16S- и 18S-рРНК сравниваемых организмов в 80-е гг. XX в. К. Вёзе с сотрудниками предложили трехдоменную систему классификации живых организмов: *Eucarya*, *Bacteria*, *Archaea*.

К *домену Eucarya* отнесены все эукариоты. К *домену Bacteria* отнесено подавляющее большинство прокариот – бактерии. В *домен Archaea*, получивший название архей, вошли сравнительно малоизученные прокариоты, часто обитающие в экстремальных условиях.

Система классификации прокариот, основанная на сопоставлении последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК, положена в основу 2-го издания многотомной энциклопедии прокариот – *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Руководство по систематике бактерий Берджи), вышедшей в свет в 2001-2007 гг. В этом труде при классификации бактерий учитываются также и организация их геномов в сочетании с фенотипическими свойствами. Важно отметить, что и по фенотипическим свойствам представители трех доменов существенно различаются между собой (таблица 2).

Таблица 2 – Сопоставительный анализ фенотипических свойств представителей трех доменов

Свойство	Домены		
	Эукариоты	Археи	Бактерии
Организация клеток	Эукариоты	Прокариоты	Прокариоты
Муреин в клеточной стенке	Отсутствует	Отсутствует	Присутствует
Тип рибосом	80S	70S	70S
Наличие инtronов в генах	Да	Есть в генах, кодирующих тРНК, рРНК и некоторые белки	Нет
Наличие оперонов	Нет	Да	Да
Наличие плазмид	Редко	Да	Да
Жирные кислоты в липидах мембран	Присутствуют	Отсутствуют	Присутствуют

В настоящее время в составе *домена Bacteria* насчитывается более 80 филогенетических ветвей (групп, филумов). Следует подчеркнуть, что некоторые из этих ветвей содержат бактерии, которые не выделены в виде чистых культур и поэтому еще детально не изучены. Для представителей данных видов известны только последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК. Большинство филогенетических ветвей бактерий представлено грамотрицательными бактериями и только две филогенетические ветви – бактериями, имеющими клеточную стенку грамположительного типа.

Самой крупной и разнообразной по составу является ветвь грамотрицательных бактерий протеобактерий (*Proteobacteria*).

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 вибрионную 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-рРНК разделена на пять подгрупп: альфа, бета, гамма, дельта и эпсилон. Краткая характеристика Протеобактерий, к которым по составу 16S-рРНК наиболее близки митохондрии и хлоропласты большинства эукариот, приведена в таблице 3.

Таблица 3 – Грамотрицательные бактерии филогенетической группы *Proteobacteria* (Протеобактерии)

Основные фенотипические группы	Наиболее распространенные роды
Ферментирующие палочки вибрионы	Энтеробактерии, <i>Vibrio</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Zymomonas</i>
Палочки и кокки, обладающие аэробным дыханием	<i>Pseudomonas</i> , <i>Zoogloea</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Azomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Legionella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Rickettsia</i>
Бактерии, образующие чехлы	<i>Sphaerotilus</i> , <i>Leptothrix</i> , <i>Crenothrix</i>
Бактерии, образующие простеки	<i>Caulobacter</i> , <i>Hypomicrobium</i>
Паразиты бактерий	<i>Bdellovibrio</i>
СпирILLЫ И МАГНИТОСПИРИЛЛЫ	<i>Spirillum</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Magnetospirillum</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter</i>
Миксобактерии	<i>Polyangium</i> , <i>Myxococcus</i>
Бактерии, восстанавливающие сульфаты и серу	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfosarcina</i> , <i>Desulfuromonas</i>
Нитрификаторы	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosospira</i> , <i>Nitrosococcus</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrococcus</i>
Бактерии, окисляющие серу и железо	<i>Thiobacillus</i> , <i>Thiomicrospira</i> , <i>Thermothrix</i> , <i>Beggiatoa</i> , <i>Thiothrix</i> , <i>Gallionella</i>
Бактерии, окисляющие водород	<i>Alcaligenes</i> , <i>Ancylorhabdium</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Spirillum</i>
Метилотрофные бактерии	<i>Methylomonas</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylococcus</i>

Основные фенотипические группы	Наиболее распространенные роды
Фотосинтезирующие пурпурные бактерии	Серные: <i>Chromatium, Thiospirillum, Thiocapsa</i> ; несерные: <i>Rhodobacter, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Rhodococcus</i>

Кроме Протеобактерий к грамотрицательным относятся следующие основные группы бактерий: водородные термофилы, зеленые нитчатые бактерии, зеленые серные бактерии, цианобактерии, спирохеты, цитофаги, бактероиды, хламидии, планктомицеты, deinококки, хлорофлексусы, фузобактерии, фибробактерии, термодесульфобактерии, термотоги, лептоспириллы, ацидобактерии 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* и др. Группа *Firmicutes* («клостридиальная 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*,

В настоящее время в составе *домена Archaea* выделяют семь групп (филумов). Из них наиболее изучены *кренархеоты* (*Crenarchaeota*) и *эвриархеоты* (*Euryarchaeota*). Представители других филумов архей (*Korarchaeota, Thaumarchaeota, Nanoarchaeota, Aigarchaeota, Lokiarchaeota, Thorarchaeota*) содержат единичные штаммы, полученные в виде чистых культур, а основное их большинство не поддается культивированию в лабораторных условиях и идентифицировались только по анализу нуклеиновых кислот из проб, полученных из мест их обитания. Для них известны последовательности генов, кодирующих молекулы 16S-рРНК. Деление архей на филумы подтверждается результатами секвенирования целых геномов этих микроорганизмов.

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 прокариот только с учетом этого признака не представляется возможным.

Наиболее признанной и используемой фенетической (искусственной) классификацией прокариот является классификация, представленная в девятом издании Определителя бактерий Берджи. В этом издании прокариоты на основании строения пограничного слоя клетки разделены на четыре основные

категории (отдела): 1) *Gracilicutes* (от лат. *cutes* – кожа, *gracilis* – тонкий) – грамотрицательные прокариоты, имеющие клеточные стенки; 2) *Firmicutes* (от лат. *firmus* – прочный) – грамположительные прокариоты, имеющие клеточные стенки; 3) *Tenericutes* (от лат. *tener* – мягкий, нежный) – прокариоты, лишенные клеточных стенок; 4) *Mendosicutes* (от лат. *mendosus* – ошибочный) – археи, клеточные стенки которых отличаются от аналогичных структур других прокариот.

В отдел *Gracilicutes* входят прокариоты различной морфологии с грамотрицательной клеточной стенкой. Размножение происходит в основном бинарным делением, некоторые прокариоты размножаются почкованием. Эндоспор не образуют. Большинство подвижны: встречаются все типы передвижения – с помощью жгутиков, скольжением, изгибанием. Отдел включает аэробные, анаэробные и факультативные анаэробные прокариоты; фототрофные и хемотрофные прокариоты. Отдел подразделяют на три класса: *Scotobacteria*, *Oxyphtobacteria*, *Anoxyphtobacteria*. В класс *Scotobacteria* входят грамотрицательные прокариоты, 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 прокариот. В класс *Anoxyphtobacteria* входят пурпурные бактерии, зеленые бактерии и гелиобактерии, осуществляющие аноксигенный фотосинтез (без выделения молекулярного кислорода). Класс *Oxyphtobacteria* представлен цианобактериями, осуществляющими оксигенный фотосинтез (с выделением молекулярного кислорода). Этот тип фотосинтеза аналогичен фотосинтезу, протекающему в растениях.

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

Отдел *Tenericutes* представлен прокариотами, 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 прокариот, входящих в этот отдел, происходит бинарным делением, почкованием. Окрашивание по Граму отрицательное. Характерно образование мелких, врастающих в агар колоний. Могут быть сапротрофными, паразитами или патогенами. Отдел состоит из одного класса *Mollicutes* (микоплазмы).

Отдел *Mendosicutes* образован прокариотами 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.

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 удается, хотя уже в чистую культуру выделены и описаны около 5 тыс. видов прокариот.

1.3. МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТОК ПРОКАРИОТ

1.3.1. Морфология прокариот

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

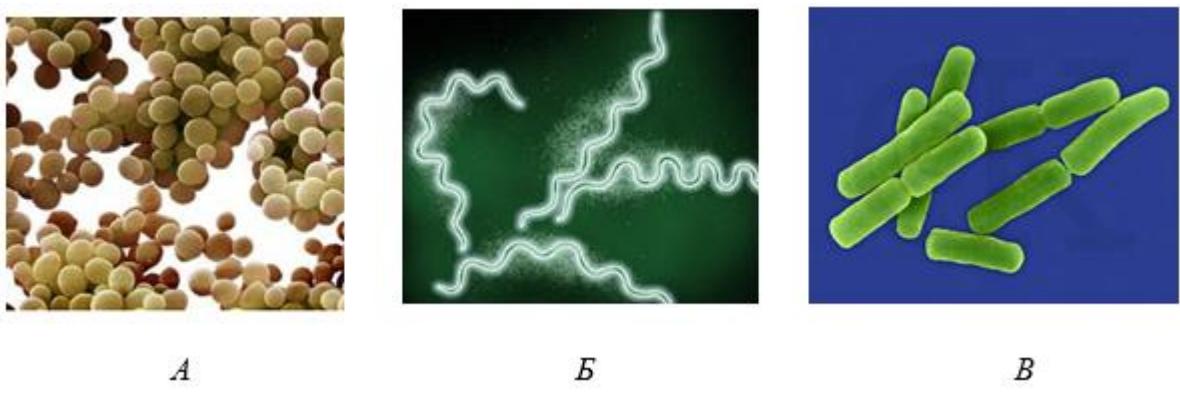


Рисунок 3 – Микрофотографии клеток прокариот:
A – сферических; B – извityх; C – палочковидных

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

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

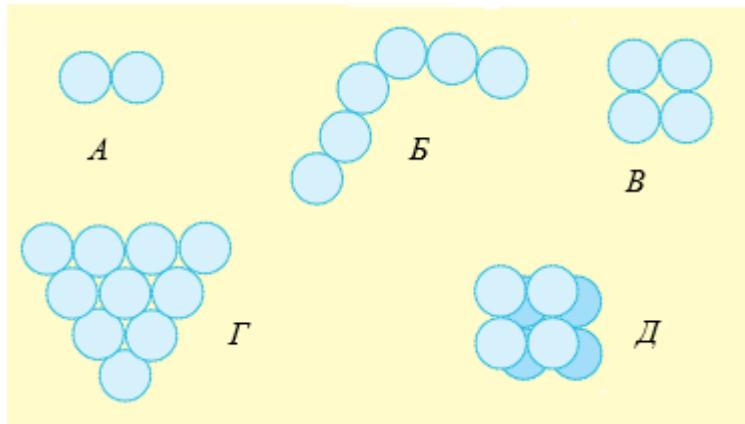


Рисунок 4 – Типы скоплений кокковидных клеток:
А – диплококки; Б – стрептококки; В – тетракокки; Г – стафилококки;
Д – сарцины

Палочковидные (цилиндрические) клетки сильно отличаются по отношению длины клетки к ее поперечнику. Они делятся только в одной плоскости – перпендикулярно оси цилиндра. Клетки при этом могут располагаться поодиночке (монопрокариоты), образовывать пары (диплопрокариоты) или цепочки (стрептопрокариоты) (рисунок 5).

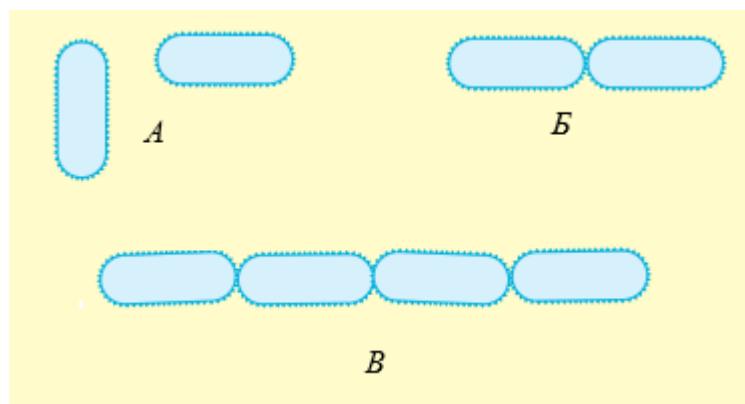


Рисунок 5 – Типы расположения палочковидных клеток:
А – монопрокариоты; Б – диплопрокариоты; В – стрептопрокариоты

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); *спирILLы* (от греч. *speira* – спираль) имеют 3 – 5 крупных завитков и *спирохеты* – большое количество мелких завитков (рисунок 6).

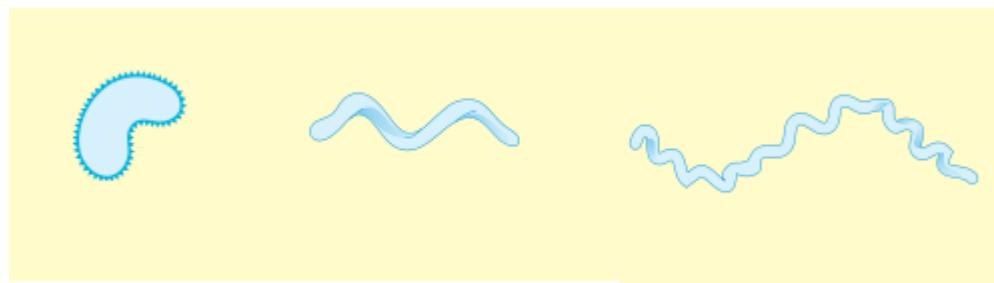


Рисунок 6 – Типы извитых клеток:
A – вибрионы; B – спириллы; C – спирохеты

Кроме описанных форм, которые преобладают среди прокариот, известны и клетки иных типов: клетки с выростами; булавовидной 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 прокариот является устойчивым видовым признаком. Однако существуют прокариоты, обладающие морфологической изменчивостью (плеоморфизмом), в зависимости от условий имеющие вид палочек, кокков или обнаруживающие слабое ветвление. У некоторых видов прокариот при прохождении цикла развития также наблюдается изменение формы клеток.

1.3.2. Структурная организация бактериальной клетки

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

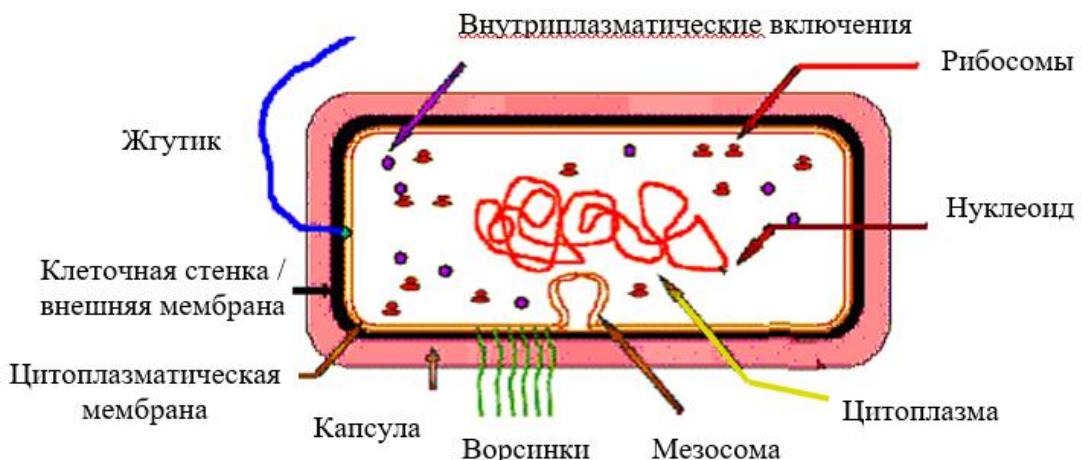


Рисунок 7 – Схематическое строение бактериальной клетки

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, гликокаликс, S-слои и т. д.

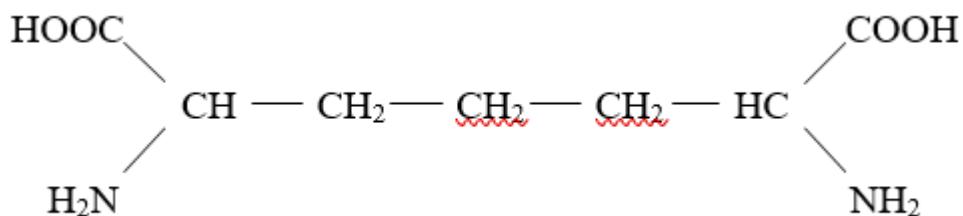
1.3.2.1. Клеточная стенка

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

По строению и химическому составу клеточная стенка прокариот отличается от таковой эукариотических организмов. Основным компонентом клеточной стенки большинства бактерий является муреин, относящийся к классу веществ пептидогликанов. **Муреин** – гетерополимер, построенный из цепочек, в которых чередуются остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенные между собой β -1,4-гликозидными связями (рисунок 8).

Такие неразветвленные гетерополимерные цепи (гликан) образуют основу муреина. Остатки N-ацетилмурамовой кислоты через карбоксильные группы лактата соединены амидной связью с аминокислотами. К типичным аминокислотам, обнаруженным в составе муреина, относятся L-аланин, D-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота и D-аланин.

Диаминопимелиновая кислота относится к диаминокислотам и находится в муреине в мезоформе:



У некоторых бактерий вместо мезо-диаминопимелиновой кислоты встречаются L-лизин, либо L- или D-орнитин, либо 2,4-диаминомасляная кислота, либо гомосерин, либо гидроксилизин.

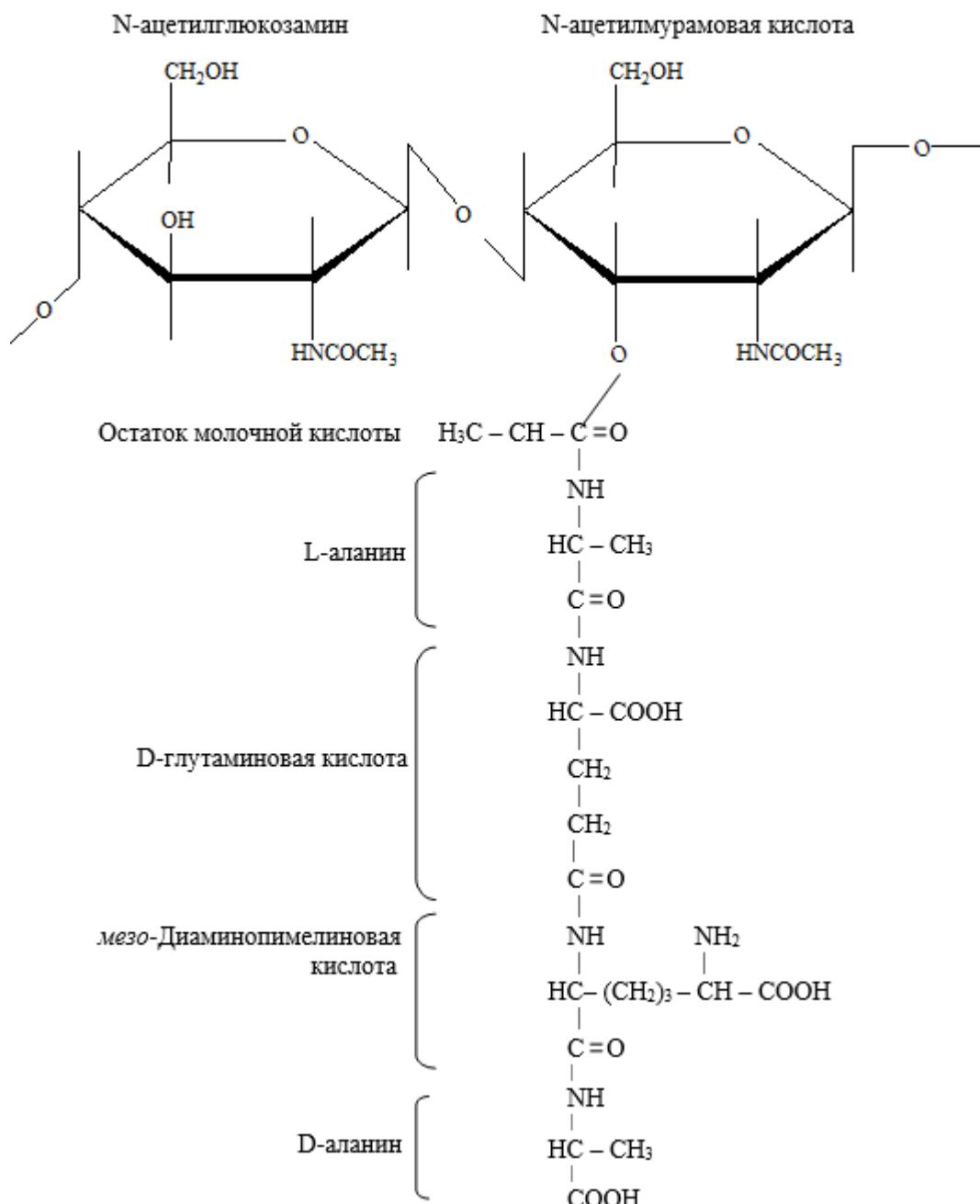


Рисунок 8 – Структура субъединицы муреина клеточной стенки бактерий *Escherichia coli*

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 аминогруппы, и таким образом между собой связываются две гетерополимерные цепи муреина (рисунок 9).

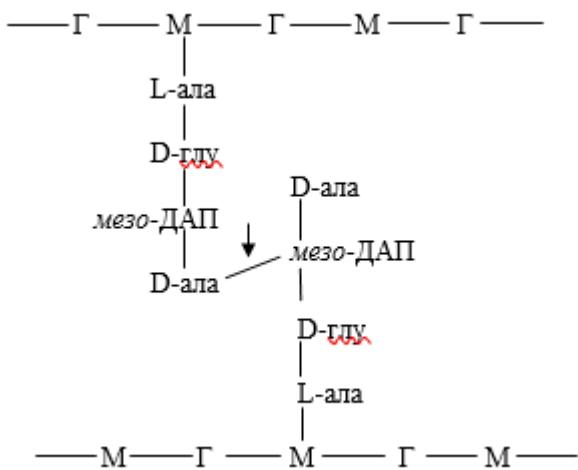


Рисунок 9 – Пептидные мостики между гетерополимерными цепочками муреина: Г – N-ацетилглюкозамин; М – N-ацетилмурамовая кислота; ала – аланин; глу – глутаминовая кислота; ДАП – диаминопимелиновая кислота. Стрелкой обозначена пептидная связь

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

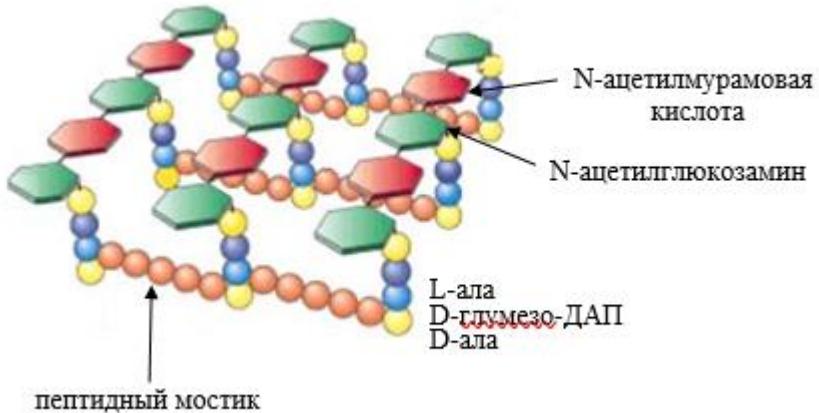


Рисунок 10 – Схематическое изображение структуры однослоиного поперечношитого муреинового мешка

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

- чередующихся последовательностей N-ацетилглюказамина 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 (рисунок 11). Муреин в клеточной стенке грамположительных бактерий составляет 50 – 90 % ее сухой массы. Пептидогликановый слой проходит в поперечном направлении еще одним полимером – тейхоевыми кислотами. Тейхоевые кислоты – это полиолфосфаты, состоящие из глицерола или рибитола с большим количеством разнообразных заместителей (D-аланин, L-серин, глицин, глюкоза и N-ацетилглюкозамин). Через фосфорный диэфир тейхоевые кислоты связаны с C_6 -атомом ацетилмурамовой кислоты в муреине. Тейхоевые кислоты придают муреиновому мешку определенную степень свободы при растяжении и сжатии и действуют на подобии пружин в матрасе. Тейхоевые кислоты благодаря своей анионной полиолфосфатной природеочно связывают ионы магния. Предполагают, что они могут в клетке выполнять роль своеобразного ионообменника. В условиях фосфатного голодаания синтез тейхоевых кислот прекращается, они заменяются на тейхуроновые кислоты.

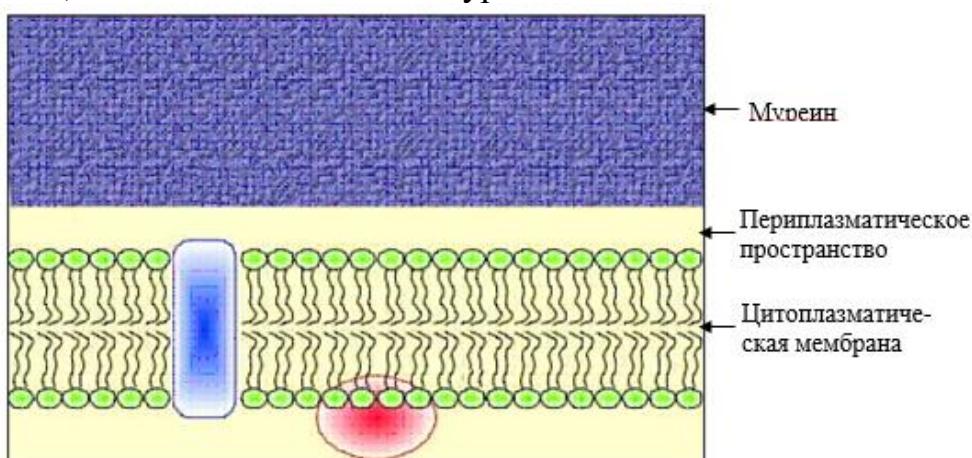


Рисунок 11 – Схематическое строение клеточной стенки грамположительных бактерий

Помимо муреина и тейховых кислот, в составе клеточной стенки грамположительных бактерий в небольшом количестве обнаружены полисахариды, белки и липиды (таблица 4).

Таблица 4 – Химический состав клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных прокариот

Компоненты клеточной стенки	Грамположительные бактерии	Грамотрицательные бактерии	
		Внутренний слой (пептидогликановый)	Внешний слой (наружная мембрана)
Пептидогликан	+	+	-
Тейховые кислоты	+	-	-
Полисахариды	+	-	+
Белки	±	-	+
Липиды	±	-	+
Липополисахариды	-	-	+
Липопротеины	-	±	+

К грамположительным бактериям относятся следующие виды: *Bacillus subtilis*, *Sarcina ventriculi*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* и др. (рисунок 12).

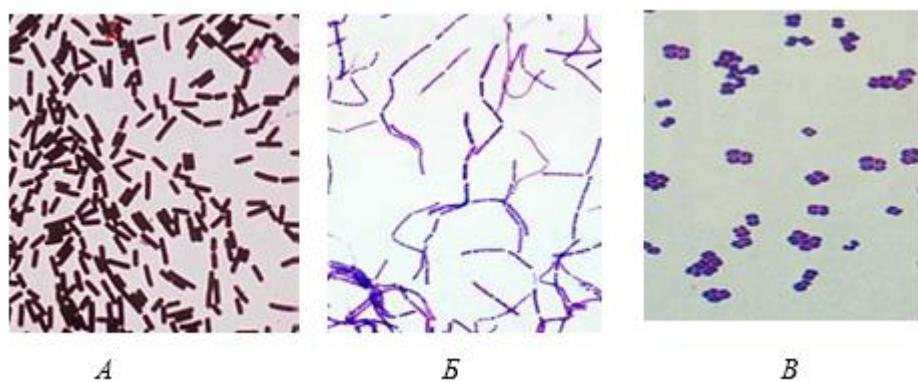


Рисунок 12 – Микрофотографии грамположительных бактерий:
A – *Clostridium perfringens*; B – *Bacillus subtilis*; C – *Sarcina ventriculi*

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее составляет 14 – 17 нм (рисунок 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.

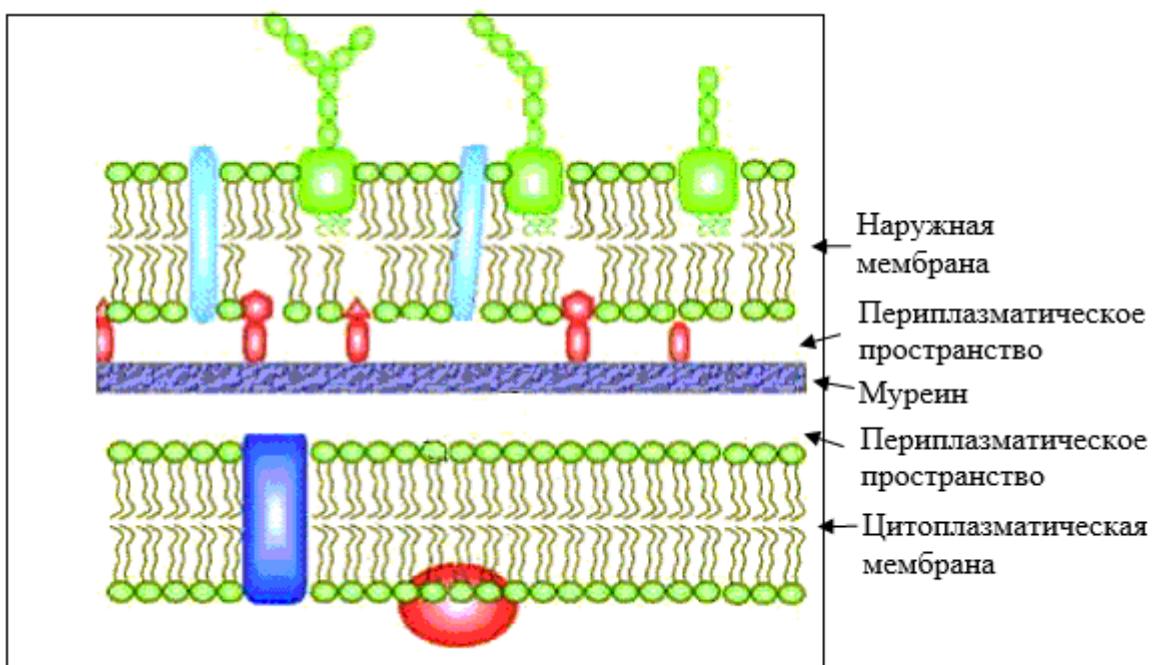


Рисунок 13 – Схематическое строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий

Внешний слой клеточной стенки – наружная или внешняя мембрана. По сравнению с цитоплазматической мембраной она является сильно асимметричным липидным бислоем, в котором внутренний слой состоит из фосфолипидов, представленных почти на 90 % фосфатидилэтаноламином. Внешний слой наружной мембранны состоит из липополисахаридов. Они имеют сложную химическую структуру, являются антигенами, обладают токсичностью и придают поверхности клетки отрицательный заряд.

Наружная мембрана является дополнительным барьером при поступлении веществ в клетку. Она непроницаема для гидрофильных веществ, таких как углеводы, аминокислоты, белки и др. Перенос таких веществ через нее происходит с помощью каналаобразующих белков, которые представляют собой наполненные водой гидрофильные поры в липофильной мембране и поэтому называются **поринами**. С помощью поринов осуществляется пассивный транспорт через мембрану растворенных гидрофильных веществ. Наружная мембрана осуществляет контакт клеток между собой, с поверхностью субстрата, а также клетками организма-хозяина при патогенезе.

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 мембранны, рестриктазы, пермеазы

и, так называемые, субстратсвязывающие белки, которые участвуют в переносе некоторых субстратов в цитоплазму.

К грамотрицательным бактериям относятся следующие виды: *Escherichia coli*, *Pectobacterium carotovorum*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* (рисунок 14) и др.

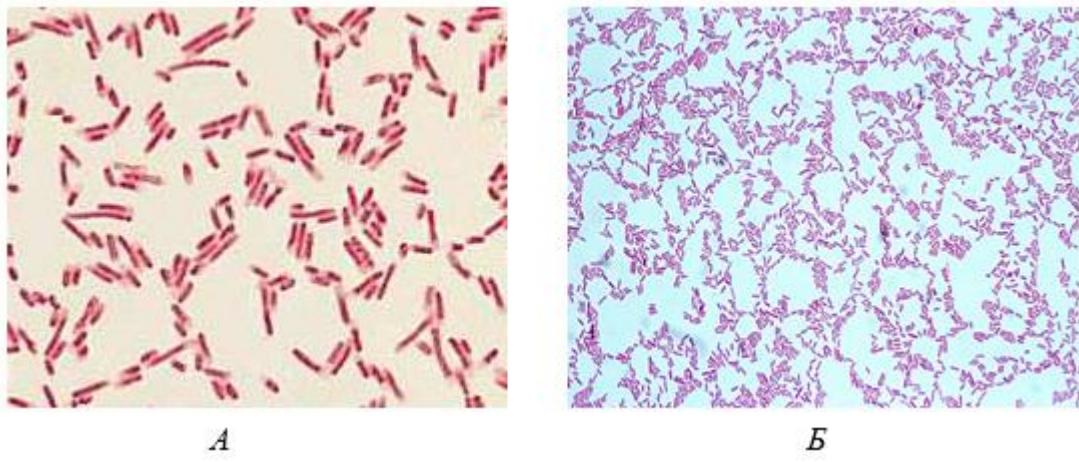


Рисунок 14 – Микрофотографии грамотрицательных бактерий:
A – Escherichia coli; Б - Pseudomonas aeruginosa

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 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 тетховые 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.

Протопласти и сферопласти можно получить в лабораторных условиях, обрабатывая клетки бактерий лизоцимом, 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.

Протопласти и сферопласти 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 мезодиаминопимелиновой кислотой.

Протопласти и сферопласти 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 протопласти и сферопласти лопаются и образуют «тени».

Протопласти и сферопласти 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.

При снятии действующего на образование муреина фактора (пенициллин, циклосерин, лизоцим и др.) протопласти, как правило, отмирают, реже регенерируют клеточную стенку и возвращаются в исходное состояние, но могут превращаться в L-формы. Сферопласти 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 обнаружаются 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 мембранные вакуоли.

Различают стабильные и нестабильные L-формы. Нестабильные L-формы обладают элементами клеточной стенки и поэтому способны revertirовать 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 revertируют 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 сапротрофы в естественных условиях, а также вызывать заболевания и у растений.

1.3.2.2. 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 вида *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 мембранные бактерий богаче белками, содержат необычные жирные кислоты и в основном не имеют стеринов.

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 (рисунок 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 НАДН-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.

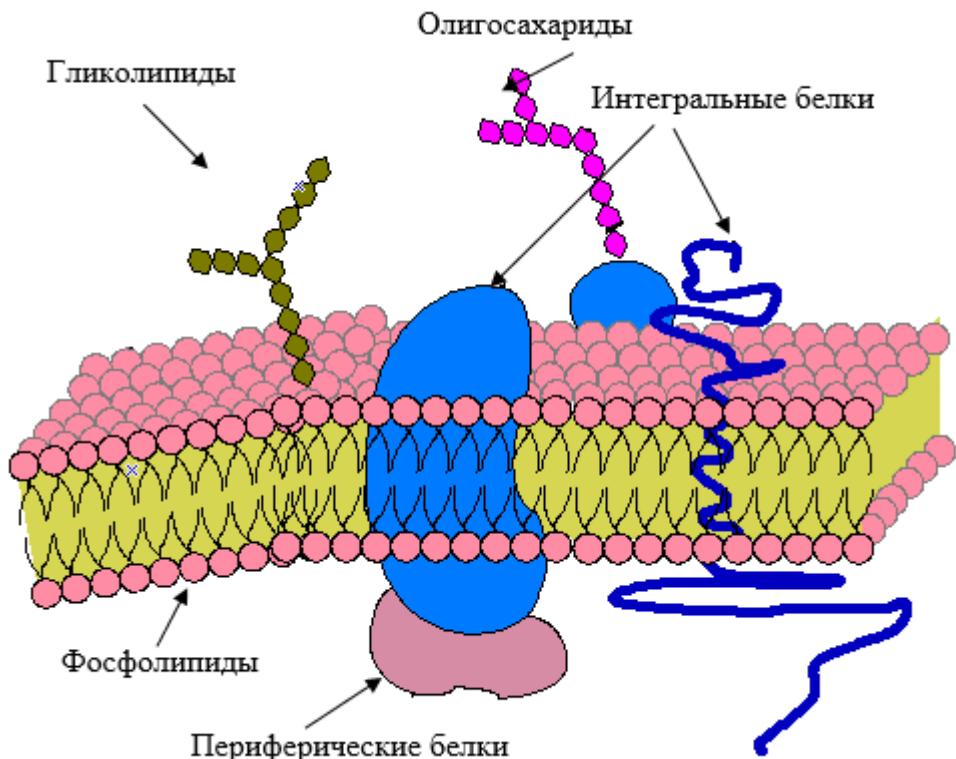


Рисунок 15 – Структура цитоплазматической мембраны

Цитоплазматическая мембрана выполняет ряд существенных для клетки функций:

- поддержание внутреннего постоянства цитоплазмы клетки. Это достигается за счет уникального свойства цитоплазматической мембраны – ее избирательной проницаемости. 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 локализуются в мембране. Такие транспортные системы функционируют за счет механизмов активного транспорта и системы специфических ферментов пермеаз;
- с вышеуказанной особенностью цитоплазматической мембраны связана и функция транспорта веществ в клетку и вывод их наружу;
- в цитоплазматической мембране локализуются 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 мембранны в цитоплазму (некоторые исследователи считают, что мезосома – это артефакт, возникающий при фиксации клеток для электронной микроскопии).

Мезосомы прокариот разнообразны по форме, размерам и локализации в клетке. Выделяют три основных типа мезосом: *ламеллярные* (пластиначатые), *везикулярные* (имеющие форму пузырьков) и *тубулярные* (трубчатые). В клетках некоторых прокариот 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 мембранны.

Существуют разные точки зрения относительно роли мезосом в клетках прокариот. Согласно одной из них, мезосомы служат для усиления мембранзависимых функциональных активностей клетки, так как в мембранах, образующих мезосомы, находятся ферменты, участвующие в энергетическом метаболизме прокариот. 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 название фотосинтетических мембран. Все фотосинтетические мембранны – производные цитоплазматической мембранны, возникшие в результате ее разрастания и глубокого впячивания (инвагинации) в цитоплазму. Фотосинтетические мембранны образуют у этих прокариот **тилакоиды**.

Для нитрифицирующих и метанокисляющих прокариот характерно образование **ламелл**.

Магнитосомы – внутриклеточные кристаллы магнетита, покрытые липопротeinовой мембраной. Они характерны для магнитоспироилл. Одним из свойств магнитоспироилл является способность ориентироваться относительно силовых линий магнитного поля земли. Эти бактерии могут усваивать железо, которое превращаются в кристаллы магнетита, обладающего сильными ферромагнитными свойствами.

1.3.2.3. Транспорт веществ в клетку прокариот

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

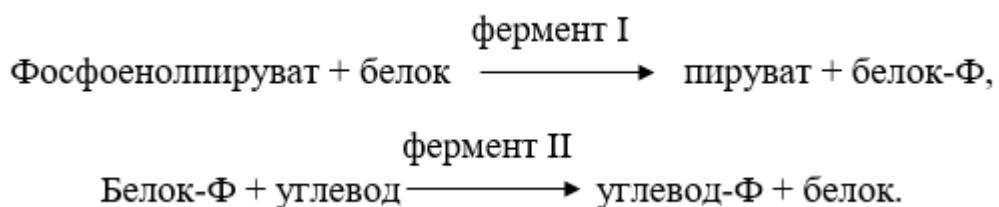
Простая, или пассивная, диффузия – неспецифическое поступление веществ в клетку за счет разницы концентраций, т. е. происходит передвижение молекул из более концентрированного раствора в менее концентрированный – по градиенту концентрации. Этот процесс не связан с затратой энергии. Таким путем осуществляется 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 мембранны. 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 **субстратсвязывающие белки**, не идентичные пермеазам и не входящие в структуру мембранны, а локализованные в периплазматическом пространстве. У субстратсвязывающих белков отсутствует каталитическая активность, но они обладают очень высоким сродством к определенным питательным веществам и различным аминокислотам, углеводам, неорганическим ионам. Выделено и изучено более 100 различных субстратсвязывающих белков, которые образуют прочные комплексы со своими субстратами и необходимы для их активного переноса через мембрану. Субстратсвязывающие 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 мембранны 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 неизмененном виде, то при ***транслокации группы*** происходит химическая модификация переносимых молекул. Так происходит поступление в клетку многих прокариот углеводов, в процессе которого они фосфорилируются. Источником фосфатной группы служат фосфоенолпириват и фосфорибозилпиофосфат, от которых 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 мемbrane и обнаруживающего высокое сродство к определенным углеводам, фосфатная группа переносится на углевод на наружной стороне цитоплазматической мембранны:



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 затраты богатой энергией фосфатной связи фосфоенолпиривата (фосфорибозилпиофосфата), 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 кatabолизма.

1.3.2.4. Секреция продуктов жизнедеятельности клеток прокариот

Прокариоты синтезируют и секретируют во внешнюю среду различные продукты своей жизнедеятельности. Секреция белков прокариотами 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 секреции осуществляется 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 мембрanoассоциированных 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. Например, бактериоцины, синтез которых кодируется генами различных плазмид, не содержат 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.

1.3.2.5. 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. Рибосомы на 60 % состоят из РНК и на 40 % из белка. 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. Субъединица 50S состоит из двух типов молекул рРНК (23S- и 5S-).

Бактериальная клетка содержит от 5 до 90 тыс. рибосом, число их тем больше, чем больше скорость роста клетки.

Рибосомы служат местом синтеза белка. Синтез белка осуществляется агрегатами, состоящими из рибосом, РНК – матричной (мРНК) 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 откладывющиеся 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 фотопротекционные химические центры, т. е. они принимают непосредственное участие в фотосинтезе. Это эллипсовидные 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 прокариот. Они имеют форму многогранника диаметром 90 – 100 нм, окруженного однослойной белковой оболочкой. В карбоксисомах содержится рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза – ключевой фермент, катализирующий фиксацию CO₂ в цикле Кальвина в процессе фото- и хемосинтеза.

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 вещества 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 вида *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 полимер, растворимый в хлороформе и состоящий примерно из 60 остатков β -оксибутиратов. Доля этого вещества в сухой биомассе клеток может достигать 80 %. Поли- β -гидроксимасляная 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, микробактерии могут содержать до 40 % восков.

Полифосфаты откладываются в гранулах, называемых **волютиновыми** или **метахроматиновыми зернами**. Название «метахроматиновые зерна» 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 накапляемой серы зависит от содержания H_2S в окружающей среде. В условиях отсутствия H_2S сера, находящаяся в клетке, окисляется до SO_4^{2-} . Серу служит источником энергии и донором электронов.

Специфическими запасными веществами цианобактерий являются **цианофитиновые гранулы**, состоящие из полипептида, в который входят аргинин и аспарагиновая кислота в эквимолярных 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.

Некоторые спорообразующие бактерии (например, *Bacillus thuringiensis*) содержат **параспоральные тельца** белковой природы, токсичные для отдельных видов насекомых.

1.3.2.6. Жгутики и движение прокариот

Большинство прокариот 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 прокариоты подразделяются:

- на **монахтрихи** – 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*) (рисунок 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 прокариот может варьировать.

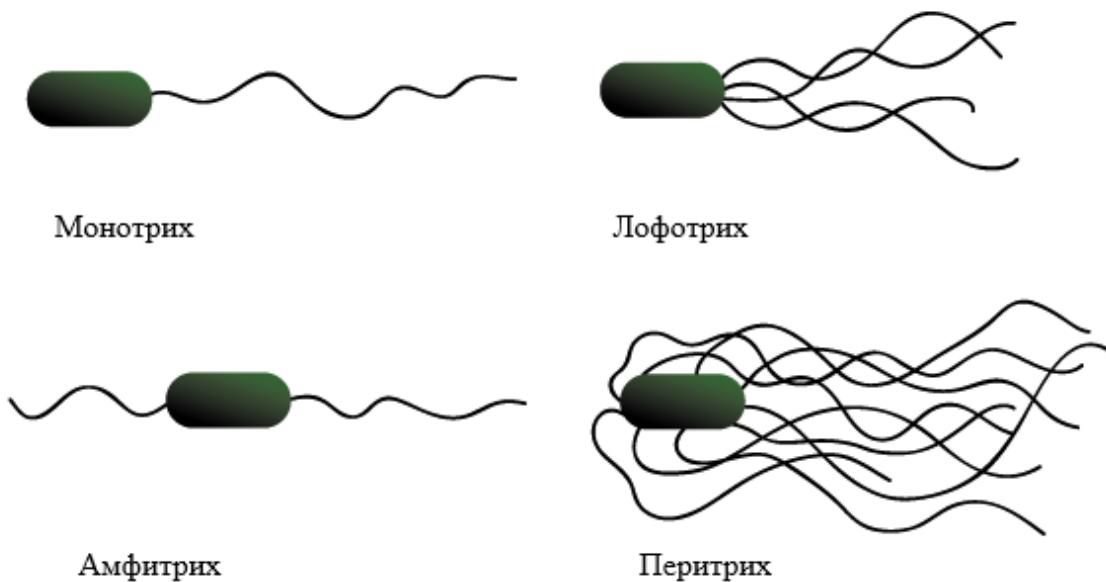


Рисунок 16 – Типы жгутикования у прокариот

Жгутик состоит из трех частей: нити, крюка и базального тельца (рисунок 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 и 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.

Жгутики прокариот 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 прокариоты 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 прокариот снова начнут синхронно вращаться против часовой стрелки, образовав пропеллер, толкающий клетку, направление ее поступательного движения будет отличаться от первоначального. Таким способом прокариоты могут изменять направление своего движения.

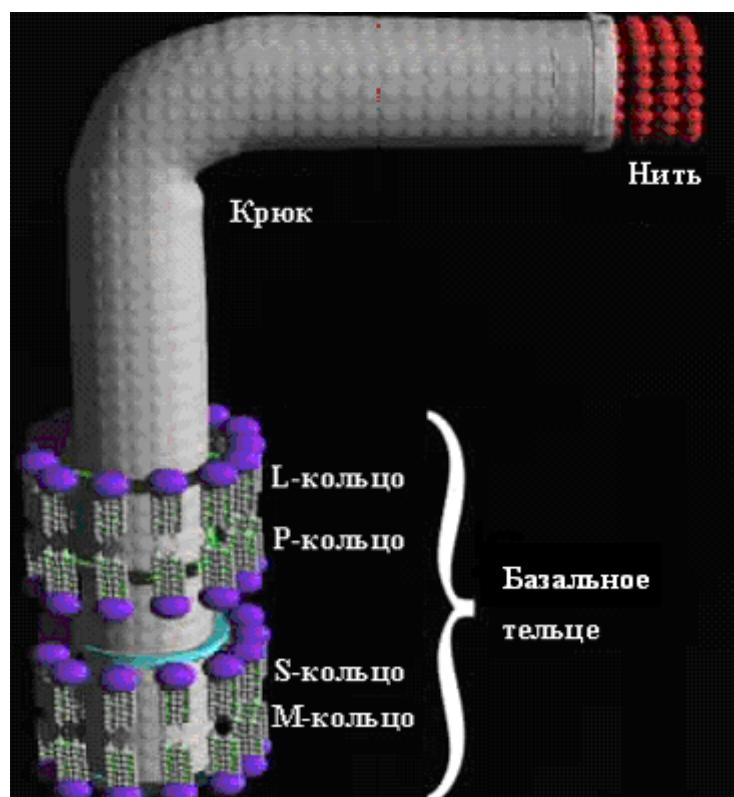


Рисунок 17 – Структура жгутика грамотрицательных бактерий

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 (рисунок 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 качестве источника энергии для вращения жгутиков используется протонодвижущая сила, возникающая в цитоплазматической мембране.

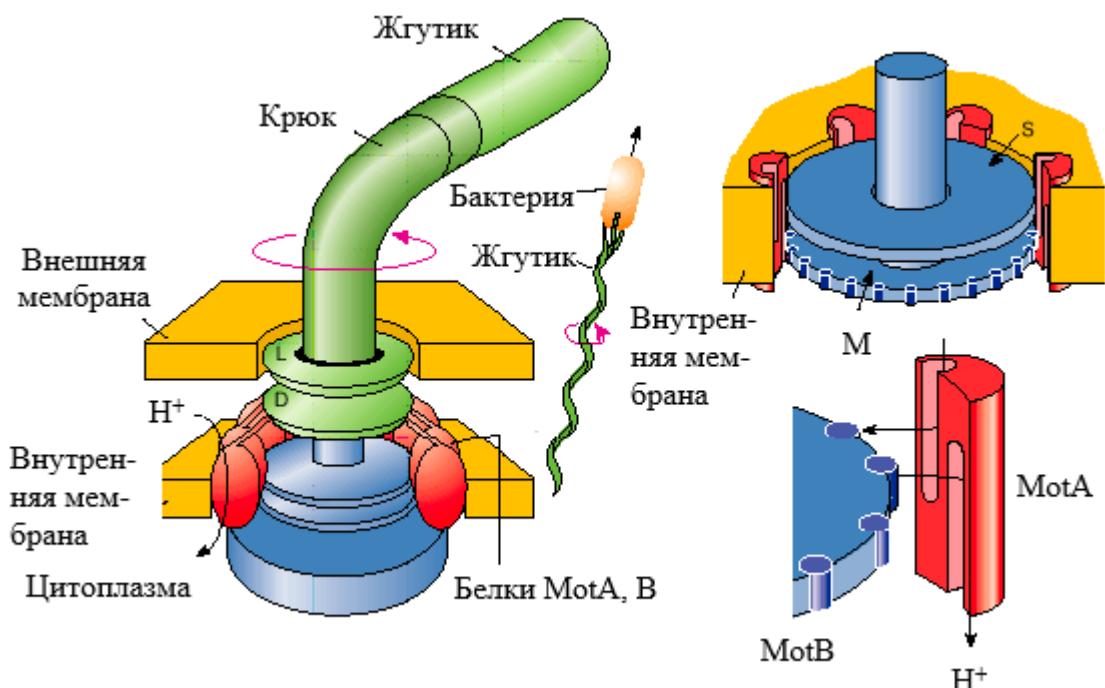


Рисунок 18 – Схематическое изображение электромотора, вращающего жгутики бактерий

Своебразный тип движения характерен для спирохет. Клетка спирохет состоит из протоплазматического цилиндра, представленного пептидогликановым 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 (рисунок. 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, обусловливают характерное для спирохет движение: путем изгибаия, вращения вокруг оси, волнообразно, винтообразно.

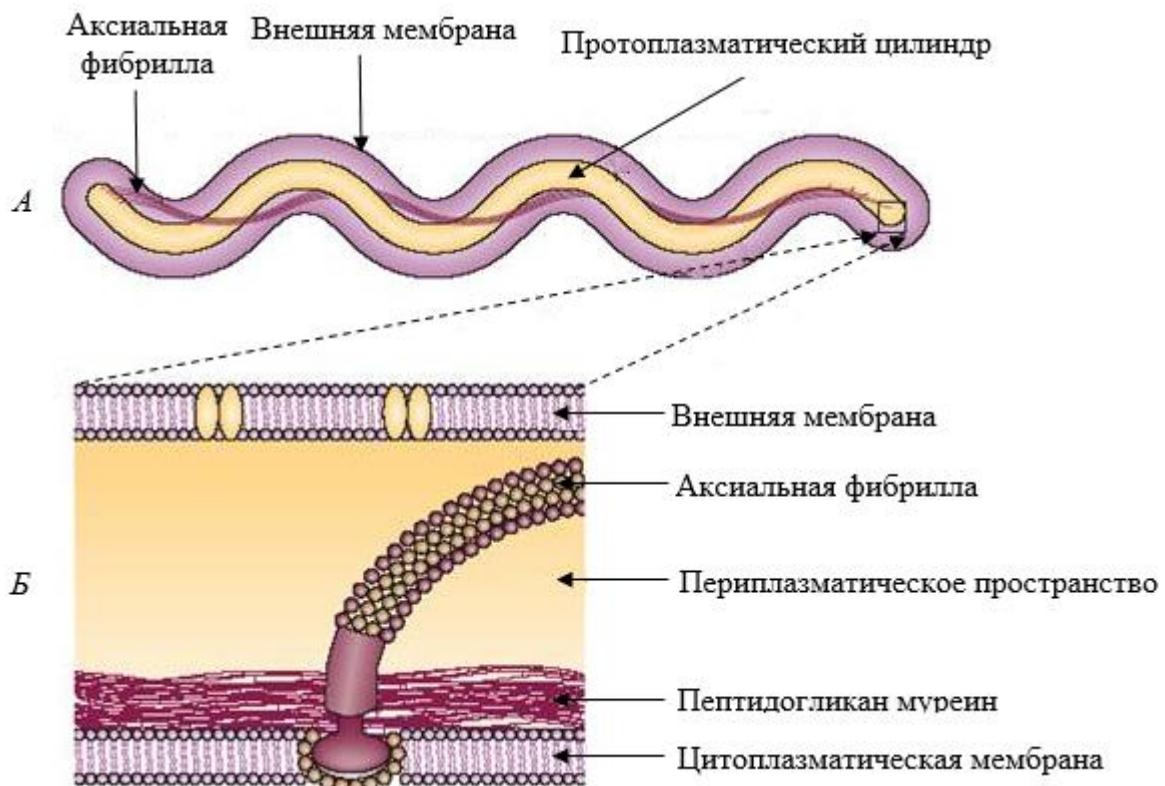


Рисунок 19 – Клетка спирохет в продольном разрезе (А) и увеличенное в размере место прикрепления аксиальной фибриллы у полюса протоплазматического цилиндра (Б)

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. Активно передвигающиеся клетки имеют преимущества перед неподвижными: они могут передвигаться по поверхности твердого субстрата, поэтому способны использовать такие сложные нерастворимые соединения, как хитин и целлюлозу. Способность к скользящему движению помогает перемещаться в толще гетерогенных субстратов, таких как почва, донные осадки и небольшие каналы в гниющей древесине, помогает выбирать оптимальное положение в отношении кислорода, солнечного света, температуры и других факторов внешней среды.

Общим для всех микроорганизмов, способных к скольжению, является выделение слизи. Механизмы скольжения могут быть разными. Например, флавобактерии вида *Flavobacterium johnsoniae* скользят при помощи белков

внешней мембранны, на которые передается усилие с белков цитоплазматической мембранны. Движение вперед по поверхности происходит за счет отталкивания. Многие миксобактерии (например, *Mucoxoccus xanthus*) выделяют поверхностно-активные вещества с одного конца клетки. На разных концах клетки возникают различия в величине поверхностного натяжения, которые и толкают ее вперед. У клеток некоторых цианобактерий скользящий тип движения связан с присутствием белкового слоя, который состоит из правильно расположенных фибрилл, аналогичных нитям жгутиков, но находящихся внутри клеточной стенки. В клеточной стенке этих бактерий также обнаружены структуры, очень схожие с базальными тельцами жгутиковых форм. Вращательное движение белковых 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.

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

Хемотаксис – движение прокариот 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: атTRACTАНты – вещества, которые притягивают бактерии; репелленты – вещества, которые отпугивают прокариоты.

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

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

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

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

1.3.2.7. 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.

Ворсинки общего типа выполняют функцию прикрепления клеток прокариот к поверхности субстрата (живого или мертвого) или к другой клетке.

Они являются адгезинами и обеспечивают микробные контакты с неживыми объектами, тканями и клетками в восприимчивых организмах человека и животных. С их помощью происходит колонизация тканей хозяина сапротрофными и патогенными микроорганизмами, а также формирование на тканях и органах микробных биопленак. Например, уропатогенные бактерии для заселения эпителия мочевого пузыря должны иметь специфические ворсинки, которыми они прикрепляются к рецепторам эпителия, содержащим маннозу, и в результате предотвращается вымывание бактерий с мочой. Специальные ворсинки осуществляют ту же функцию в почках, препятствуя удалению вызывающих пиелонефрит клеток бактерий из почек и мочевыводящих каналов. Таким образом, ворсинки выступают в роли одного из факторов вирулентности патогенных бактерий. Кроме того, с помощью ворсинок образуются биопленки нормальной микробиоты человека и других животных.

Специфические ворсинки – половые пили, обнаруженные у клеток-доноров, т. е. у клеток, содержащих половой фактор (F-плазмиду) или другие конъюгативные плазмиды. Если в клетке бактерий находится половой фактор, то на их поверхности синтезируются половые F-пили. На клетках, содержащих другие конъюгативные плазмиды (R-, Col-, Ti- и др.), синтезируются соответствующие половые пили. Количество половых пилей на поверхности клетки 1 – 2. Половые пили имеют вид полых белковых трубочек длиной от 0,5 до 10 мкм. Они играют определяющую роль в образовании конъюгационных пар при переносе генетического материала от клетки донора в клетку реципиента в процессе конъюгации.

1.3.2.8. Капсулы, слизи, чехлы, гликокаликс и S-слои

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 клетки прокариот, а по толщине часто превосходящее ее диаметр.

Капсулы и слизь не являются обязательными структурами клеток прокариот, так как прокариоты, 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 вида *Bacillus anthracis*. Для ряда бактерий

показана также способность синтезировать капсулу, состоящую из волокон целлюлозы. Так построена капсула у бактерий вида *Sarcina ventriculi*.

Слизи по химической природе являются полисахаридами. Особенно обильное их образование наблюдается у многих микроорганизмов при выращивании на среде с сахарозой. Например, бактерии вида *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 и бактериоцинов, препятствуя их адсорбции на клетках бактерий;
- являются источником запасных питательных веществ;
- объединяют клетки в цепочки, колонии;
- обеспечивают прикрепление клеток к поверхности субстрата.

Капсулные полисахариды, образуемые прокариотами, имеют большое практическое значение. Например, ксантан, внеклеточный полисахарид бактерий вида *Xanthomonas campestris*, добавляют в качестве стабилизатора и загустителя во многие пищевые продукты. Их также добавляют к буровому шламу при бурении нефтяных скважин, т. к. они устойчивы в растворах электролитов. В настоящее время производство микробных ксантанов достигает 30 000 т/год. Декстраны, синтезируемые бактериями вида *Leuconostoc mesenteroides* и некоторыми другими прокариотами, также находят применение в пищевой промышленности и медицине. Например, декстран с молекулярной массой 75 000 Да используют как заменитель плазмы крови, а с молекулярной массой 40 000 Да – в качестве антитромболитика при полостных операциях.

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 –гексозамина, 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.

У прокариот, способных формировать биопленки, может образовываться **гликокаликс**. Это сеть из полисахаридных тяжей для прикрепления к

поверхности неподвижных предметов в водных средах или к тканям растений и животных. Гликокаликс образован высокополимерными мукополисахаридами. Гликокаликс не имеет постоянной прочной связи с клеточной стенкой бактерий.

Некоторые прокариоты образуют на поверхности клетки *S-слои* – кристаллические белковые образования правильной формы, плотно прилегающие друг к другу. У грамотрицательных бактерий *S-слои* прилегают к внешней мембране, у грамположительных – к муреиновому мешку. *S-слои* защищают клетку прокариот от резких изменений концентраций различных ионов, действия ферментов, бактериофагов, бактериоцинов и бактериихищников, а также способствуют клеточной агрегации и помогают удерживать форму клетки.

1.3.2.9. 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 у большинства бактерий 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, например, 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 (рисунок 20):

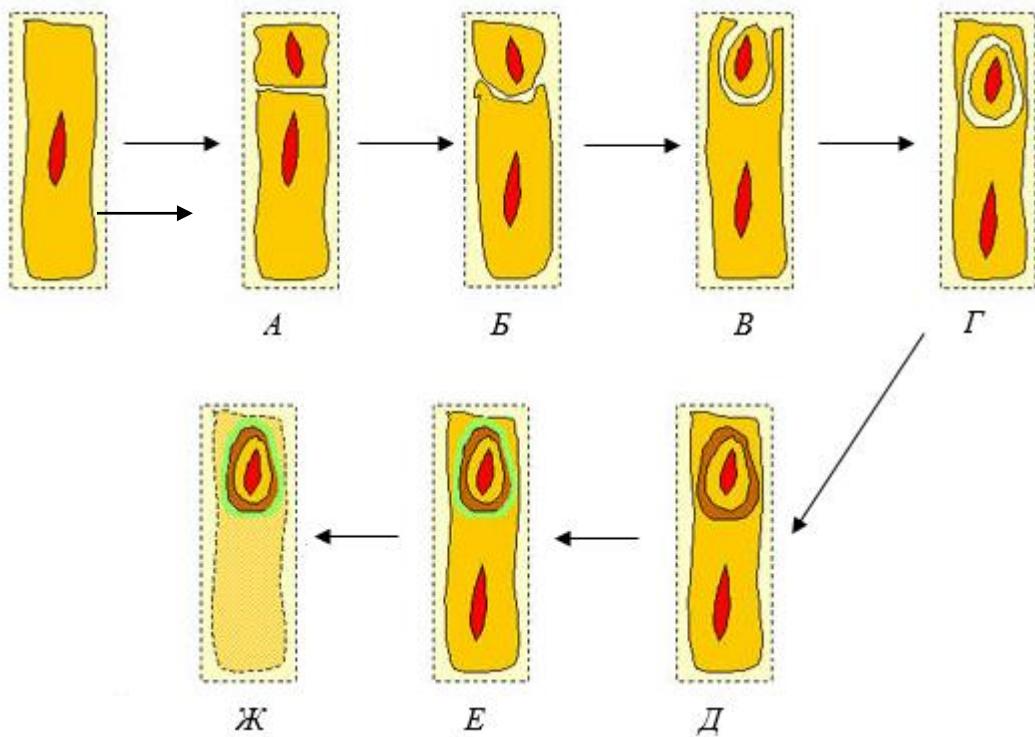
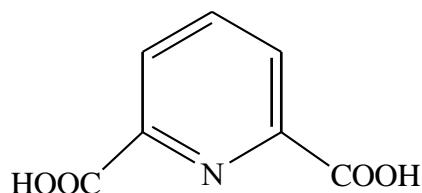


Рисунок 20 – Схема процесса спорообразования:
А – отделение протопласта споры; Б, В, Г – образование предспоры;
Д, Е, Ж – формирование споры

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. Образование клеточной стенки

между обоими протопластами (как при обычном делении) в данном случае не происходит. Вместо этого протопласт будущей споры обрастаёт цитоплазматическая мембрана материнской клетки, а образующаяся структура носит название **предспоры** или **проспоры**.

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

Кроме кортекса и стенки зародыша, синтезируется еще **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 (рисунок 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 мембранный, клеточной стенкой зародыша, кортексом, внутренней оболочкой, наружной оболочкой, экзоспориумом.



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

Третий этап – созревание споры. Спора приобретает характерную форму и занимает определенное положение в клетке (рисунок 22). Диаметр споры может превышать или не превышать ширину 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 (например, у *Clostridium botulinum*) или терминально (например, у *Clostridium tetani*).

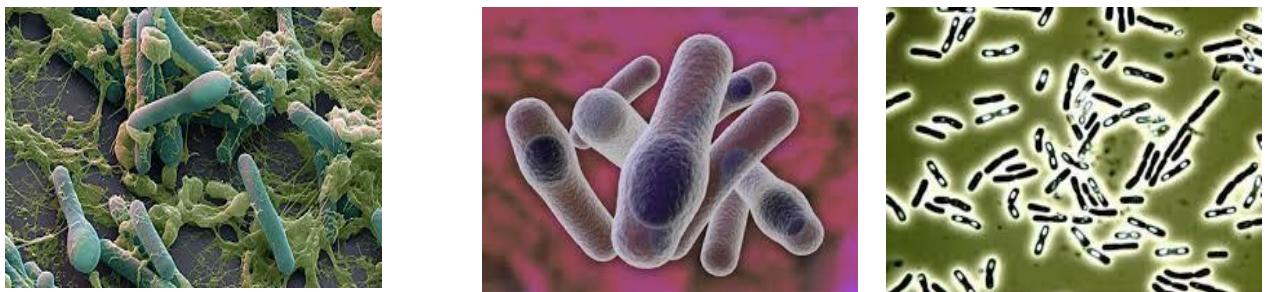


Рисунок 22 – Форма эндоспор и расположение их в клетках бактерий различных видов рода *Bacillus*

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 °C в течение нескольких минут или кратковременному кипячению (10 мин при 100 °C). Тепловой шок должен проводиться непосредственно перед высевом спор, так как процесс активации обратим.

К другим покоящимся формам бактерий относятся цисты, экзоспоры, миксоспоры. 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 метанокисляющих бактерий. **Цисты** – это шарообразные толстостенные клетки, формирование которых характерно для бактерий рода *Azotobacter*. В цисту превращается вся вегетативная клетка. **Миксоспоры** образуются также путем превращения всей

клетки. Формирование миксоспор характерно для миксобактерий рода *Myxosoccus*.

1.3.2.10. Нуклеоид и репликация ДНК у прокариот

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 мембранны. 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 тимины тимидин, меченный тритием (^3H). Известно, что ДНК – единственное вещество в клетке, которое содержит тимин. Если клетки бактерий, включившие тритий в тимины, лизировать с помощью лизоцима на мембранном фильтре, то можно получить радиоавтограф развернутой молекулы бактериальной ДНК. Такие радиоавтографы убедительно доказывают, что ДНК бактерии *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 фиксировании 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 гистоноподобные белки, которые способствуют «упаковке» ДНК, выделены у самых различных микроорганизмов, в том числе и архей. Наибольшее значение в «упаковке» ДНК играет белок HU. Связываясь с ДНК, он меняет конформацию 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» мембранны. С использованием различных методов было показано, что имеются фиксированные точки прикрепления 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, 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 бактерий *Azotobacter chroococcum* в экспоненциальной фазе роста (наиболее интенсивного роста и размножения) на одну клетку приходится 20–25 копий хромосомы, у бактерий *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 бактерии *E. coli* – 4.653.831 п. н. Нить хромосомной ДНК у бактерии *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 имеют одну хромосому. Однако у различных видов родов *Brucella* и *Vibrio*, видов *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 бактерий *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 структуры не могли быть разделены в геле при пульс-форезе. Однако в 1989 г. была опубликована статья о необычном поведении при пульс-форезе хромосомы бактерии *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 шпилечными структурами. У других спирохет (лептоспир и трепонем) хромосома была кольцевой. Линейная хромосома была обнаружена и у фитопатогенных бактерий *Rhodococcus fascians*.

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 полукружия 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.

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

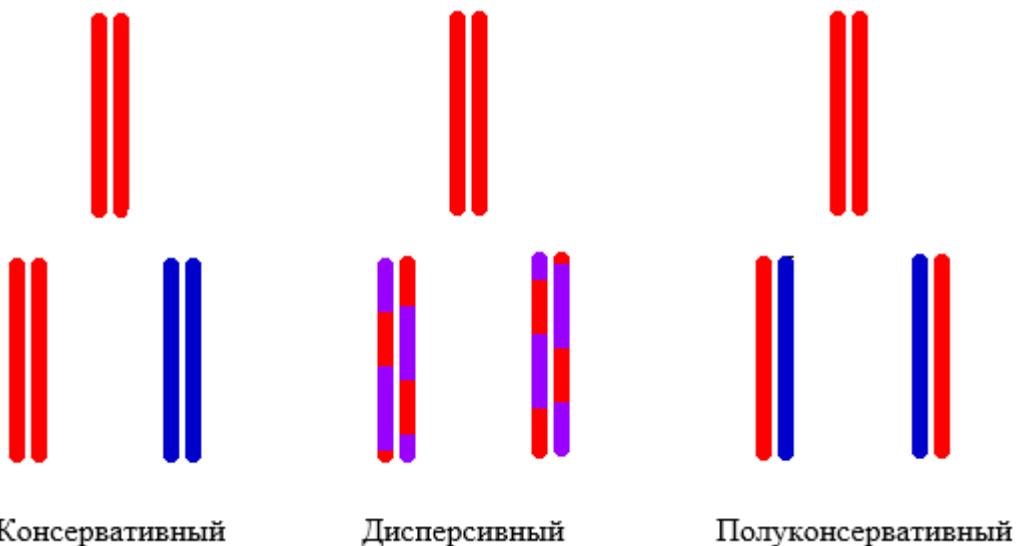


Рисунок 23 – Механизмы репликации ДНК

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

- Дисперсионный**, 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, расплетается и каждая полинуклеотидная цепь служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Таким образом, новая двойная молекула оказывается «гибридом» старой и вновь синтезированной цепей.

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 увеличивалось. 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 (рисунок 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 °С 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.



Рисунок 24 – Схема опыта М. Меселсона и Ф. Стала

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 одноцепочных 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 однонитевой ДНК), которые связываются с однонитевой ДНК и препятствуют ее-renатурации;
- 3) ДНК-гиразы, или топоизомеразы, белки, которые снимают напряжение при раскручивании кольцевых молекул ДНК и способствуют ее расплетанию.

На образовавшихся однонитевых 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 (рисунок 25). Однако цепи ДНК противоположно направлены и поэтому синтез одной из дочерних цепей осуществляется непрерывно с помощью ДНК-полимеразы III в направлении $5' \rightarrow 3'$. ДНК-полимераза III перемещается по цепи $3' \rightarrow 5'$ в направлении раскрытия репликативной вилки и синтезирует новую цепь. Эта цепь называется *ведущей*, или *лидирующей*.

Копия второй цепи ($5' \rightarrow 3'$) 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 ко-роткая 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.

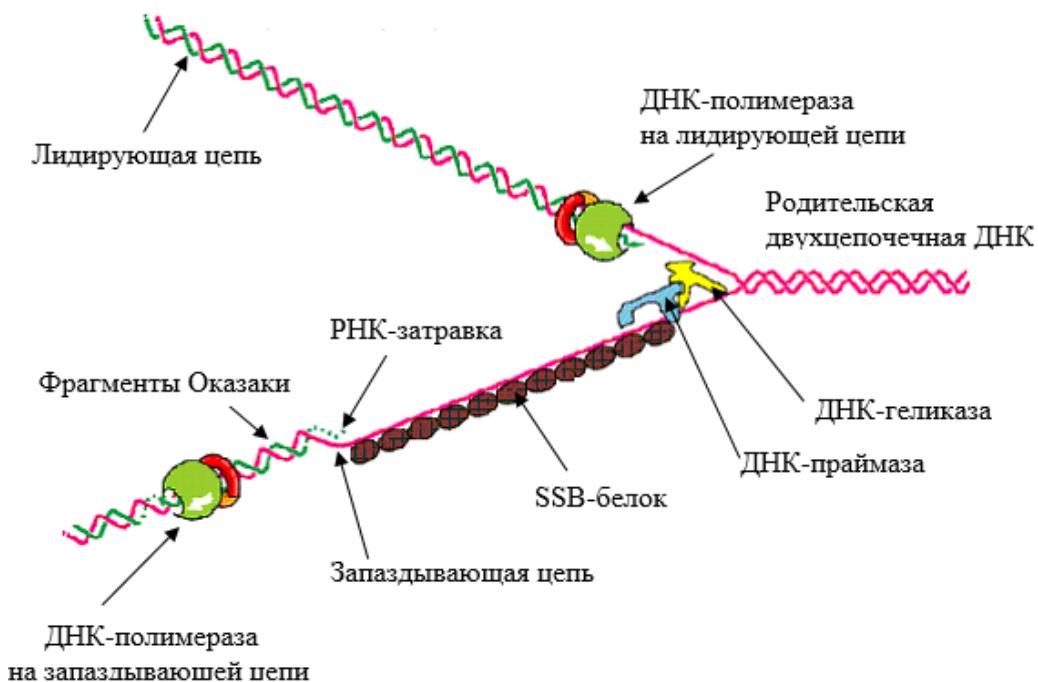


Рисунок 25 – Репликации ДНК у бактерий *E. coli* в соответствии с полуконсервативным механизмом

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.

Связь бактериальной хромосомы или плазмида 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. Кьюзеном

(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. Пritchard, 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.

1.4. 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 таблице 5.

Таблица 5 – 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)	+

Свойства	Вирусы	Прокариоты	Эукариоты
Рост на питательных средах	–	+ (кроме риккетсий)	+
Бинарное деление	–	+	+

1.4.1. 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 вириона состоит из отдельных субъединиц – **капсомеров**. Капсиды некоторых вирионов окружены дополнительной мембраной. Если вирус имеет такую мембрану, то говорят, что он «в оболочке» или окружен суперкапсидом.

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) (рисунок 26). Примером вириона 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.

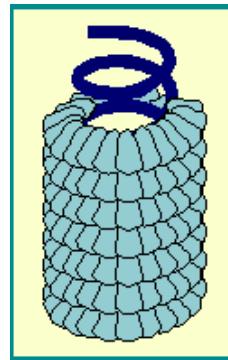


Рисунок 26 – Строение вириона со спиральной симметрией

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 (рисунок 27). К икосаэдрическим вирионам 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 вирионов являются колифаги T2, T4 (т. е. бактериофаги,

инфицирующие клетки бактерий *E. coli*) и др. У некоторых сложных вирусов икосаэдрический капсид включает в себя трубчатый нуклеокапсид.

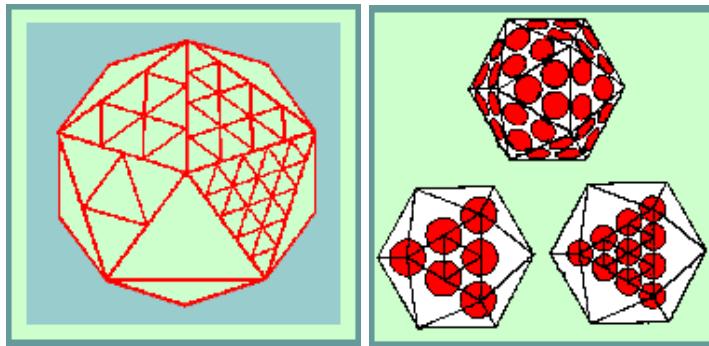


Рисунок 27 – Строение вируса с кубической симметрией

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 колифаги T2, T4, 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 матричная РНК, тогда как у вирусов второго типа на «минус»-цепи должна синтезироваться сначала с помощью клеточных РНК-полимераз «плюс»-цепь РНК, которая и служит матричной 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 помощью 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.

1.4.2. Строение бактериофагов. Взаимодействие бактериофагов с чувствительными клетками бактерий

Строение бактериофагов можно рассмотреть на примере колифага T4, 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** (рисунок 28). В капside головки находится плотно упакованная двухцепочечная линейная ДНК и фермент транскриптаза в неактивном состоянии. Хвостовой 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 пластины находится фермент – бактериофаговый лизоцим, способный разрушать муреин клеточной стенки бактерий. Здесь же имеется АТФаза, которая регенерирует энергию для сокращения чехла отростка бактериофага.

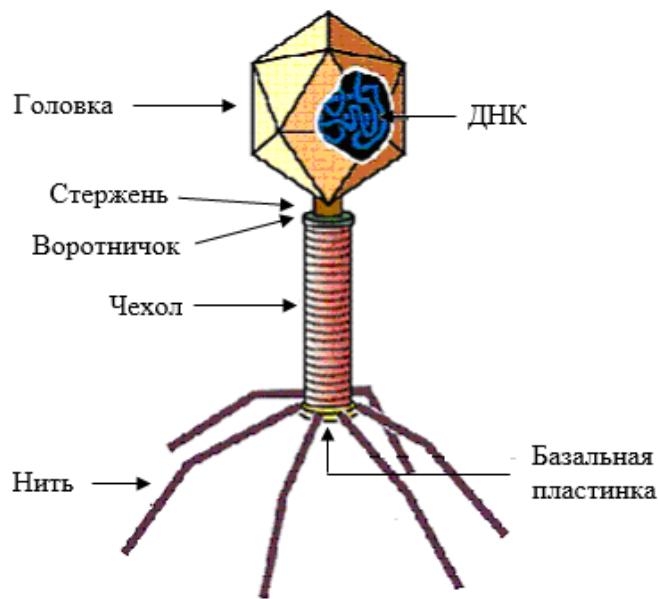


Рисунок 28 – Строение бактериофага T4

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 T1 и T5);

- нитчатые бактериофаги (coli фаг fd);
- состоящие из икосаэдрической головки с коротким несократимым отростком (coli фаги T3 и T7, фаг P22 бактерий *Salmonella typhimurium*).

Большинство бактериофагов содержит двухцепочечную ДНК, но охарактеризованы и бактериофаги с одноцепочечной ДНК (coli фаг M13) и с одноцепочечной РНК (coli фаги 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** (рисунок 29).

Рассмотрим **взаимодействие вирулентных фагов** с чувствительной клеткой хозяином на примере колифага T4.

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, имеющихся 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.

Инъецированная 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 мРНК, 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.

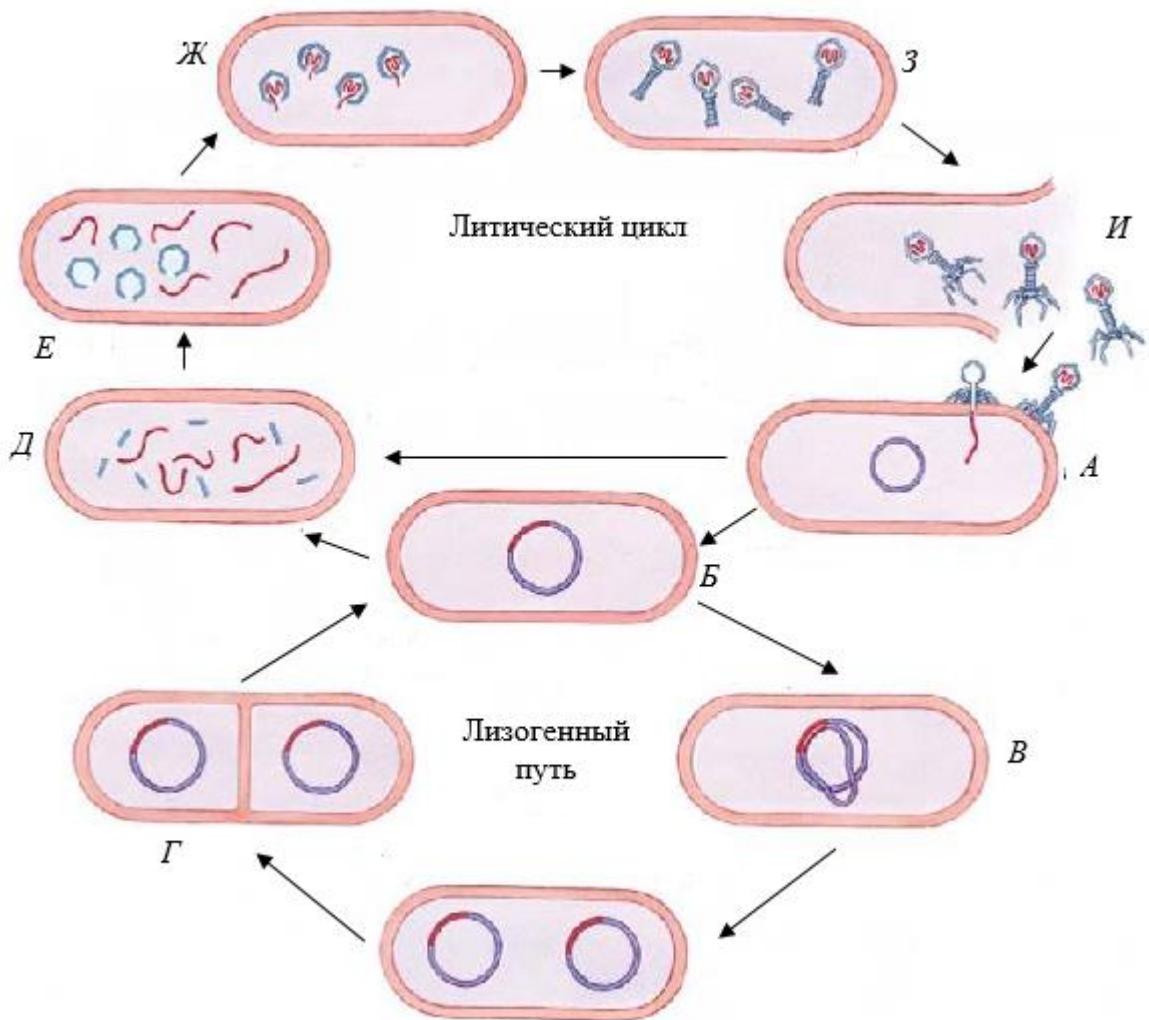


Рисунок 29 – Взаимодействие умеренных и вирулентных бактериофагов с чувствительной клеткой: *А* – адсорбция фага на клетке; *Б* – интеграция фаговой ДНК в хромосому бактерий; *В* – репликация фаговой ДНК вместе с бактериальной; *Г* – деление клетки; *Д* – репликация фаговой ДНК и синтез фаговых белков; *Е* – образование капсидов; *Ж* – упаковка ДНК в капсиды; *З* – созревание фаговых частиц; *И* – лизис клетки и выход фаговых частиц

После синтеза поздних белков и завершения репликации ДНК наступает заключительный процесс – созревание фаговых частиц или соединение фаговой ДНК с белком оболочки и образование зрелых инфекционных фаговых частиц. Созревание Т-четных фагов – сложный многоступенчатый 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 T4 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. Кембелла. Этот процесс называется **сайт-специфической рекомбинацией**, так как встраивание ДНК фага λ осуществляется в одном и том же месте (сайте) между оперонами *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 делении 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 С, 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 (таблица 6).

Таблица 6 – 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	–	–	+

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. Например, показано, что способность дифтерийной палочки (*Coryne-bacterium 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 бактериофага β. Известно, что бактерии *Clostridium botulinum* – возбудители ботулизма, синтезируют смертельный токсин только при лизогенизации их специфическими бактериофагами.

1.5. 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 микроцидные. Факторы внешней среды, полностью или частично угнетающие рост и задерживающие развитие микроорганизмов, относят к **микробостатическим**. **Микроцидные** 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 микроцидное действие.

1.5.1. Действие факторов химической природы

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

- повреждающие клеточную стенку или цитоплазматическую мемрану;
- повреждающие ферменты, участвующие в обмене веществ;
- нарушающие синтез основных биополимеров клетки.

К первой группе относятся химические вещества, повреждающие структуру клеточной стенки (лизоцим и др.), нарушающие избирательную проницаемость цитоплазматической мембранны (фенолы, хлороформ, крезолы, нейтральные мыла, детергенты, эфиры, ионы водорода, спирты, толуолы). Действие фенолов, хлороформа, крезолов, эфиров, толуолов, спиртов связано в первую очередь с растворением липидов цитоплазматической мембранны, что приводит к нарушению ее проницаемости и разрушению. Кроме того, этанол в достаточно высокой концентрации (70 % и больше) вызывает коагуляцию белков и оказывает микроцидное действие. Детергенты способны накапливаться в липопротеиновых мембранах (за счет того, что они, как и мембранны, 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:

- непосредственно на избирательную проницаемость цитоплазматической мембраны;
- косвенно или опосредованно через:
 - а) 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 прокариот, 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 реакции среды микроорганизмы могут быть разделены на несколько групп:

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*, *Enterococcus faecalis* и др.;

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

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 **факультативные** алкалофилы (интервал pH для роста 5 – 11, оптимум pH 9,0 – 10,5), к которым относятся денитрифицирующие и сульфатвосстанавливающие прокариоты, многие аммонификаторы. **Облигатные** алкалофилы растут при высоких значениях pH – 8,5 – 11,0, при оптимуме 9,0 – 10,5. К таким прокариотам относятся бактерии видов *Bacillus pasteurii*, *Vibrio cholerae* некоторые цианобактерии, а также археи родов *Natronococcus*, *Natronobacterium* 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 проницаемости мембраны для ионов водорода.

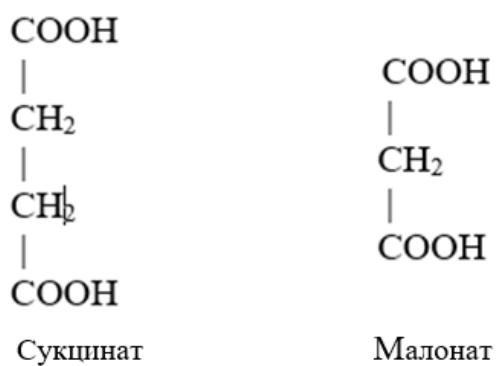
Способность к росту при низких или высоких значениях pH обеспечивает микроорганизму определенные преимущества, так как в этих условиях мала конкуренция со стороны большинства других организмов.

К группе химических веществ, оказывающих микробоцидное действие на микроорганизмы, повреждающих ферменты и вызывающих нарушение обмена веществ, относятся ионы тяжелых металлов, оксид углерода, 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, сульфидрильными, 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 сульфидрильную группу кофермента A. В результате ингибиции 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.

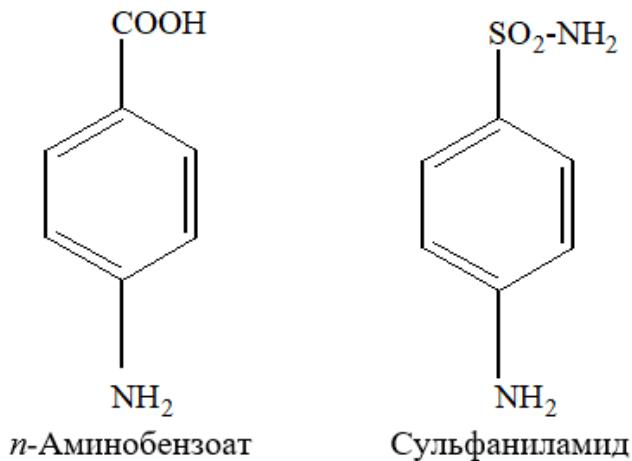
К группе химических веществ, нарушающих синтез клеточных компонентов, относятся структурные аналоги соответствующих соединений – антиметаболиты. Рассмотрим несколько примеров. Структурным аналогом сукцинат является малонат:



В присутствии малоновой кислоты даже в низких концентрациях подавляется превращение сукцинат в фумарат. При этом нормальный метаболит сукцинат конкурирует со своим структурным аналогом малонатом за каталитический центр фермента сукцинатдегидрогеназы. В основе этого

конкурентного ингибиования лежит структурное сходство ингибиторов с нормальными клеточными метаболитами.

Вторым примером конкурентного ингибиования является включение производных сульфаниловой кислоты (сульфаниламидов) в фолиевую кислоту (витамин В₉) 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 микробостатическим агентам, которые ограничивают рост нежелательной микробиоты 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 микробиоты. 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 (SO₂), 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 канцерогенные соединения, поэтому применение нитритов и нитратов в пищевых продуктах сейчас ограничено.

1.5.2. 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.

Каждый вид микроорганизмов характеризуется определенным температурным диапазоном, в пределах которого его представители способны расти, а также температурным оптимумом – значением, при котором наблюдается самая высокая скорость роста популяции (самое малое время генерации). В связи с этими параметрами микроорганизмы принято делить 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 являются бактерии *E. coli*, оптимальная температура роста которых 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 оптимум ниже 15 °С, максимум – около 20 °С; при 30 °С они отмирают. Некоторые из психрофилов способны развиваться при 0 °С и ниже. Самая низкая температура, при которой зарегистрирован рост психрофильных микроорганизмов, составляет (-12) °С. 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 микроорганизмы играют существенную роль в круговороте веществ в регионах с постоянно низкими температурами. В качестве представителей облигатных психрофилов можно привести бактерии *Bacillus psychrophilus*, 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 °C, т. е. они способны расти в условиях, благоприятных для мезофильных 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:

- в клетках содержатся особые ферменты, активные при низких температурах за счет пониженного содержания слабых связей в белковых молекулах и менее выраженных взаимодействий между доменами, что позволяет им сохранять пластичность при низкой температуре. В составе ферментов психрофилов содержится больше а-спиралей и меньше складчатых слоев, чем в составе ферментов мезо- и термофилов;
- проницаемость мембран остается высокой при охлаждении благодаря содержанию в липидах в большом количестве полиненасыщенных жирных кислот или других длинноцепочечных углеводородов с множеством двойных связей, вследствие чего мембранны не застывают и остаются в жидкокристаллическом состоянии при низких температурах. Например, в мембранах антарктических бактерий обнаружены необычные углеводороды с девятью двойными связями;
- рибосомы способны функционировать при низких температурах.

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

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

2) **факультативные термофилы** имеют температурный максимум 50 – 65 °C и минимум менее 20 °C, 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, солениях, 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 °C и не растут при температуре ниже 40 °C. Оптимальная температурная область облигатных термофилов примыкает к их верхней температурной границе роста (65 – 70 °C). Представители облигатных термофилов – бактерии вида *Bacillus stearothermophilus* и др.;

4) **экстремальные термофилы** имеют следующие температурные параметры для роста: оптимум в области 70 – 75 °C, минимальная граница роста – 40 °C и выше, максимальная – около 90 °C. Эти микроорганизмы распространены в горячих источниках, особенно в районах активной

вулканической деятельности. Представители – прокариоты родов *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Thermoplasma* и др.

Природу термоустойчивости объясняют рядом структурных и биохимических особенностей этих микроорганизмов:

- липиды, входящие в состав клеточных мембран, содержат в большом количестве насыщенные жирные кислоты. В связи с этим они имеют более высокую температуру плавления по сравнению с липидами, содержащими ненасыщенные жирные кислоты;

- у экстремально термофильных микроорганизмов 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 ферментов 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 волн. 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 (образование димеров тимина), которые обусловливают нарушение процессов репликации и транскрипции. Кроме нуклеиновых кислот, УФ-лучи поглощают белки и другие макромолекулы, что приводит к нарушению их структуры и функций.

УФ-облучение не всегда приводит клетку микроорганизмов 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.

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

УФ-облучение в лабораторной практике используют для индукции мутаций у микрорганизмов, а также в качестве стерилизующего агента.

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 сульфогидрильных групп белков в дисульфидные и т. д. Чувствительность микроорганизмов различных групп к ионизирующей радиации проявляется в разной степени. Абсолютным «чемпионом» по устойчивости к ионизирующей радиации являются бактерии *Deinococcus radiodurans*, которые обитают в водах атомных реакторов, встречаются в залежах урановых руд. Эти бактерии устойчивы к дозе ионизирующего излучения в 1,5 Мрад, что объясняется наличием в их клетках мощных репарационных систем, призванных исправлять повреждения в молекулах ДНК. Ионизирующее излучение используется в качестве стерилизующего фактора, в том числе для продления срока хранения некоторых продуктов (фруктов, овощей, морепродуктов и др.).

Высокие значения **гидростатического давления** приводят к разрушению клеточных структур, происходит денатурация белков, прекращается деление и клетки приобретают нитевидную форму. Однако существуют микроорганизмы, которые живут на глубине 7000 м и более, где давление достигает более 1000 атмосфер. Из осадков на дне океанов выделяют прокариоты двух групп: баротолерантные и пьезофильные (барофильные). **Баротолерантные микроорганизмы** 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 микроорганизмы (например, бактерии

вида *Bacillus submarinus*) – это обитатели глубоководных впадин морей и океанов.

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: разжигается 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.

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 археи из родов *Halobacterium* и *Halococcus*, живущие в растворах NaCl при концентрациях, близких к насыщающим. У таких архей концентрация солей в цитоплазме равна концентрации внешнего раствора, однако в клетках преобладает не натрий, а калий. Белки галофильных архей 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 археи обнаружены в соленых озерах, в солончаковых почвах. Они обычно вызывают порчу соленой рыбы и мяса.

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.

1.5.3. 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 синтезируется клетками микроорганизмов. В настоящее время появились синтетические антибиотики, многие из которых являются аналогами природных. Найдены также антибиотики, действие которых направлено не на микроорганизмы, а на клетки злокачественных опухолей.

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 антбактериальное действие по отношению к патогенным коккам (рисунок 30). Культуральная жидкость гриба, содержащая антбактериальное 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.

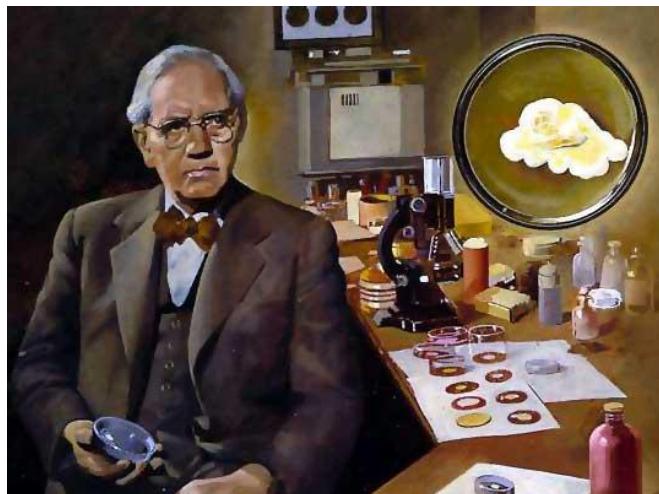


Рисунок 30 – Флеминг в своей лаборатории, знаменитый гриб *Penicillium notatum*

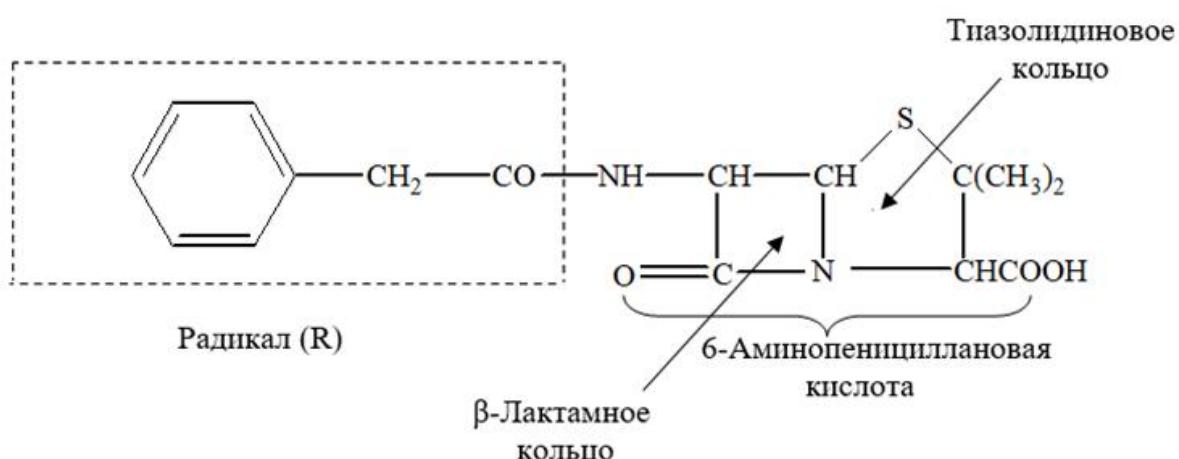
Спустя примерно десять лет после сообщения А. Флеминга, пенициллин начал изучать Э. Чайн. Он был убежден, что это вещество – фермент. В 1940 г. Х. Флори и Э. Чайн получили в кристаллическом виде пенициллин и установили, что это не фермент, а низкомолекулярное вещество пептидной природы.

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, –

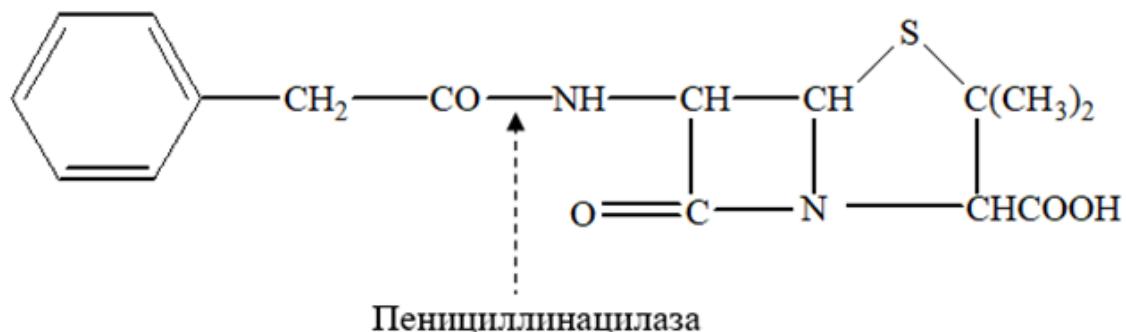
крустозин, сыгравший огромную роль в спасении жизни воинов в годы Великой Отечественной войны.

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 грибы *Penicillium notatum*, но и многие другие виды грибов, например *P. chrysogenum*, *P. nigricans*, *Aspergillus flavus*, *A. nidulans*.

Было установлено, что 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 природного антибиотика пенициллинового ряда – бензилпенициллина, или пенициллина G:

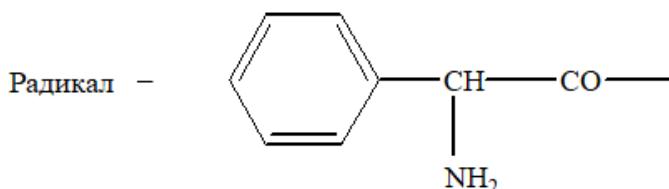


Исходным продуктом для полусинтетических пенициллинов является 6-аминопенициллановая кислота, которую чаще всего получают путем ферментативного расщепления бензилпенициллина или феноксиметилпенициллина с участием фермента пенициллинацилазы:

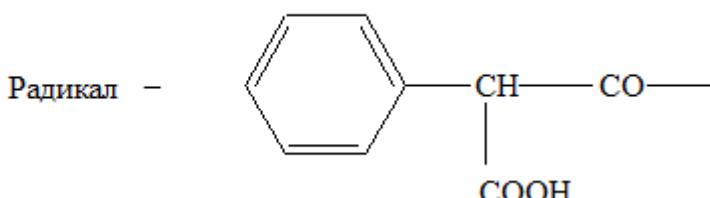


Затем к 6-аминопенициллановой кислоте химическим путем присоединяют различные радикалы. Примером полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда являются:

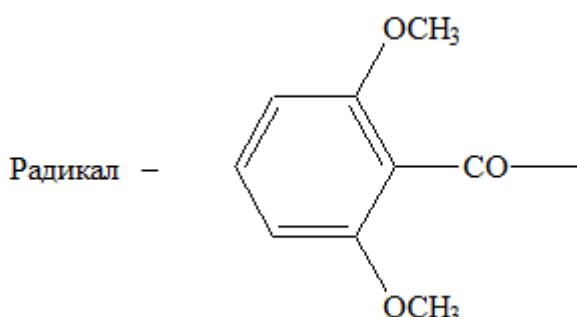
- ампициллин:



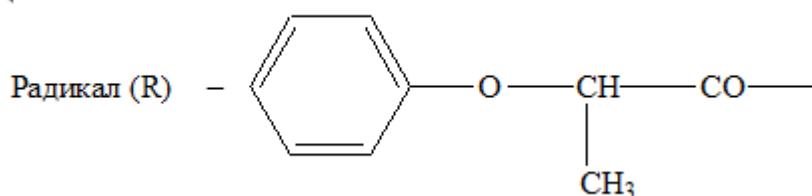
- карбенициллин:



- 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 (в том числе патогенными), 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 вида *Bacillus subtilis*, которые способны синтезировать около 70 различных полипептидных антибиотиков, бактерии *Bacillus polymyxa* – 20 антибиотиков, которые относятся к семейству полимиксиновых, бактерии *Bacillus brevis* – 23 антибиотика пептидной природы. Антибиотики производятся также многими видами плесневых грибов.

Способность к синтезу антибиотиков не является строго специфическим признаком. Один и тот же антибиотик может производиться 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 микроорганизмы в таксономическом отношении, тем меньше вероятность того, 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 Д, 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, микроплактов 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, антпротозойные, 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 соединения легче проникают, так как в ней нет дополнительного барьера – наружной мембранны. 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 клеток микроорганизмов.

В зависимости от механизма действия антибиотики делят на несколько групп:

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

Рассмотрим механизм действия некоторых антибиотиков.

Пенициллины ингибируют синтез муреина, входящего в состав клеточной стенки бактерий. В частности, они нарушают 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 ее разрушению и лизису.

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. В результате ДНК-полимераза не может продвигаться по цепям 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 мРНК.

Рифамицины подавляют 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.) 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 мембранны, образуя каналы, стенки которых имеют липофильную природу снаружи и гидрофильную внутри, что позволяет катионам выходить из клетки.

Действие противогрибковых антибиотиков направлено на структуры в составе клеток грибов, которые отличаются от таковых у человека и других млекопитающих. Например, антибиотики **амфотерицин B** и **нистатин** предпочтительнее связываются с эргостеролом в плазматических мембранах грибов, чем с холестеролом в мембранах млекопитающих, увеличивают их проницаемость и приводят к гибели клетки грибов. Антибиотик **гризофульвин** разрушает митотическое веретено и, таким образом, ингибирует митоз у грибов. И поэтому его как весьма токсичный антибиотик используют чаще для наружного применения при лечении грибковых заболеваний кожи, волосистого покрова головы, ногтей.

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.).

1.6. ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБНОГО РОСТА. СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1.6.1. Питание микроорганизмов

Питание 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 основным макроэлементам, из которых состоят биополимеры микроорганизмов, относятся С, О, Н, Н, Р, S. Кроме того, для построения клеток необходимы важные в качестве электролитов щелочные металлы (К, Na), щелочноземельные металлы (Mg, Ca), выполняющие функции кофакторов ферментов. К микроэлементам относятся металлы переходной группы (V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Wo) и неметаллы (Se, B, Cl и др.). Набор требуемых микроэлементов зависит от вида микроорганизмов. В природе микроэлементы обычно присутствуют в виде свободных катионов или анионов, поглощаемых микробными клетками с помощью относительно специфических транспортных систем. Некоторые из микроэлементов встречаются в форме оксианионов, таких как SeO_3^- (селенит), WoO_4^{2-} (вольфрамат) и MoO_4^{2-} (молибдат). В клетках микроорганизмов они подвергаются ферментативному восстановлению, приобретая валентность, необходимую для ассимиляции.

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 многих 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 него органические вещества своих клеток.

Гетеротрофы – микроорганизмы, 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 в реакциях окисления органических или неорганических веществ.

В зависимости от того, какие питательные вещества – органические или неорганические – являются донорами электронов, все микроорганизмы также подразделяют на две группы. **Органотрофными** являются микроорганизмы, использующие в качестве доноров электронов органические соединения, к **литотрофным** относятся микроорганизмы, 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 (таблица 7).

Таблица 7 – Классификация микроорганизмов по типам питания

Тип питания	Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	Представители
Хемолитоавтотрофия	Окислительно-восстановительные реакции	Неорганические вещества	CO_2	Нитрифицирующие, тионовые, водородные, металлокислящие прокариоты
Хемолитогетеротрофия	» »	» »	Органические вещества	Метаногенные археи, сульфатредуцирующие прокариоты
Хемоорганскоавтотрофия	» »	Органические вещества	CO_2	Факультативные метилотрофные бактерии
Хемоорганско-гетеротрофия	» »	» »	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
Фотоорганскоавтотрофия	» »	Органические вещества	CO_2	Некоторые виды пурпурных бактерий
Фотоорганско-гетеротрофия	» »	» »	Органические вещества	Некоторые виды пурпурных и зеленых бактерий, цианобактерий, галобактерий

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

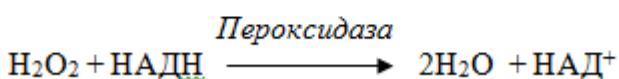
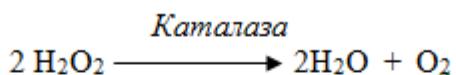
2) **факультативные анаэробы** – бактерии, способные расти как в присутствии, так и в отсутствии O_2 . Они могут переключать свой энергетический метаболизм с аэробного дыхания (в присутствии O_2) на брожение или анаэробное дыхание (в отсутствии O_2). Среди факультативных анаэробов следует выделить **аэротolerантные** 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.

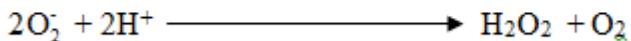
Установлено, что окисление флавопротеинов или других доноров электронов, а также радиация приводят к восстановлению O_2 , сопровождаемому образованием супероксид-радикалов и пероксид-анионов, которые легко связывают протоны и переходят в пероксид водорода (H_2O_2). В ходе последующих перестроек формируются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

Супероксиддисмутаза



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 супероксиддисмутазу. 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 восстановленной форме в виде солей аммония (NH_4^+) и амиака (NH_3). Многие прокариоты используют органические азотсодержащие вещества – белки, аминокислоты, мочевину, разрушая их с выделением амиака. Окисленные формы азота – нитраты (NO_3^-) и нитриты (NO_2^-) – также могут усваиваться различными группами прокариот. Некоторые прокариоты способны использовать атмосферный азот. Это уникальное свойство характерно для азотфикссирующих 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 амиака. Азотфикссирующие прокариоты обеспечивают один из необходимых этапов в круговороте азота в природе.

Микроорганизмам для осуществления жизнедеятельности требуется также в относительно больших количествах железо. Оно входит в состав гемов, FeS-центров и активных центров многих ферментов. Однако, несмотря на достаточно широкое распространение железа в земной коре (по степени распространения является четвертым элементом после кислорода, кремния и алюминия), оно не относится к числу легкодоступных веществ. В аэробных условиях железо присутствует в среде в окисленной форме, Fe^{3+} , образуя практически нерастворимые гидраты оксида железа FeO(OH) , карбонат железа $\text{Fe}_2(\text{CO}_3)_3$ и магнетит Fe_3O_4 . Эти соединения растворимы только при крайне низких значениях pH. Поэтому большинство аэробных микроорганизмов для поглощения железа синтезируют и секретируют в среду *сидерофоры* – органические соединения, образующие хелаты с Fe^{3+} . Далее в виде комплексов

с сидерофорами железо поглощается микробными клетками. Поглощение железа микроорганизмами в аэробных условиях – сложный, строго регулируемый процесс, включающий несколько стадий: 1) синтез сидерофоров; 2) выделение сидерофоров из клетки; 3) транспорт хелатных комплексов Fe^{3+} с сидерофорами в клетку; 4) высвобождение Fe^{3+} из хелатного комплекса и восстановление до Fe^{2+} и 5) включение Fe^{2+} в состав коферментов и простетических групп. Поглощение Fe^{3+} подробно исследовано у бактерий *E.coli*, которые способны синтезировать сидерофоры трех типов: 1) производные катехола; 2) производные гидроксаматов; 3) дикарбоновые и трикарбоновые кислоты. Для прохождения крупных молекул сидерофоров через наружную мембрану бактерий *E. coli* нужны рецепторные белки (белки порины не обеспечивают проникновение сидерофоров в периплазматическое пространство). Хелатные комплексы сидерофоров с Fe^{3+} связываются с этими рецепторными белками и проникают через наружную мембрану в периплазматическое пространство, используя энергию электрохимического потенциала цитоплазматической мембранны. Далее в периплазматическом пространстве они взаимодействуют с связывающими белками, которые передают хелатные комплексы на гидрофобные транспортные белки цитоплазматической мембранны. Перенос Fe^{3+} , связанного с сидерофором, через цитоплазматическую мембрану требует затраты АТФ. Высвобождение железа из комплекса с сидерофорами происходит путем его восстановления либо путем ферментативного гидролиза сидерофора.

В анаэробных условиях железо не является лимитирующим рост элементом, присутствуя в форме Fe^{2+} , хорошо растворимой и в отсутствие кислорода довольно устойчивой. Потребление клетками железа в этой форме обеспечивают обычные транспортные системы.

Микроорганизмы делятся на две группы в зависимости от количества питательного субстрата в среде их обитания. **Олиготрофы** растут только при низких концентрациях углеродсодержащих питательных веществ (от долей до 100 мг/л), а обычные концентрации лимитируют их рост (от 1 до 100 г/л). **Копиотрофы** растут при обычных концентрациях углеродсодержащих питательных веществ (от 1 до 100 г/л).

Истинно олиготрофными считаются организмы, эволюционно приспособленные к росту в условиях с постоянно низкими потоками углерода и энергии. Такой рост обеспечивается высокоэффективными транспортными системами и экономным расходованием питательных веществ и энергии. Для олиготрофов характерны следующие особенности: малые размеры клеток, высокое соотношение поверхности клетки к ее объему, образование различных выростов, отсутствие покоящихся стадий, низкие скорости эндогенного метаболизма, аэробность, высокое сродство ферментов к субстрату, способность к одновременному поглощению всех доступных субстратов, высокая гибкость катаболизма, способность к накоплению резервных веществ, низкие скорости роста в оптимальных условиях, регуляция анabolизма скоростью поглощения веществ.

Микроорганизмы также делятся на две функциональные группы по способности использовать биополимеры, растворимые в воде. *Гидролитики* обладают активными экзоферментами гидролазами, разрушающими высокомолекулярные соединения. Они обеспечивают доступными субстратами себя и микроорганизмы, не имеющие гидролаз, а также способствуют возвращению биогенных элементов в глобальные циклы. *Диссигнотрофы* (микробиота рассеяния) не имеют экзогидролаз и потребляют те вещества, которые по разным причинам остались неиспользованными гидролитиками («рассеялись» в окружающей среде) и имеются в малых количествах.

1.6.2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов

Для культивирования микроорганизмов используются различные по составу питательные среды, в которых должны содержаться все вещества, 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 амино ($-\text{NH}_2-$ -) 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 сульфидильных 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, казеин) 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 дрожжевая 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 элективные и дифференциально-диагностические. **Элективные 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 применяются 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 (бротимоловый синий, бромкрезоловый пурпурный, Андреде 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. Среды 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 бромтиоловый 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 °C и затвердевает при 40 °C. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать микроорганизмы при относительно высокой температуре. Желатина – это экстракт, получаемый из субстратов, богатых коллагеном – белком костей, хрящей, сухожилий, чешуек. Образуемый желатиной гель плавится при температуре 25 °C, которая ниже обычной температуры инкубации многих микроорганизмов (30 – 37 °C). 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 pH среды имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов, то в приготовленных средах всегда следует определять значение pH, 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 ферmentерах, применяемых для проточного культивирования.

1.6.3. Закономерности микробного роста

Различают понятия рост микробной клетки и рост микробной популяции.

Под **ростом клетки** 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.

У большинства микроорганизмов не наблюдается полярности клеток и рост их идет равномерно вдоль одной из осей клетки (обычно длинной). Когда клетка прокариот достигает характерного для данного вида размера, она делится. В некоторых случаях данное свойство может быть нарушено. При определенных условиях клетки могут делиться, не достигая своих максимальных размеров (образуются мини-клетки), либо удлиняются без деления с формированием нитевидных структур (филаментов). Эти явления могут быть связаны с мутацией или нарушением метаболизма при некоторых условиях культивирования. Кроме того нехватка питательных веществ и избыток продуктов метаболизма могут приводить к утрате способности клеток к размножению и образованию вместо этого покоящихся форм или к гибели.

Рост микробной популяции – это увеличение количества клеток в популяции.

В подходящей среде, к которой микроорганизмы 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 микробной 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 микроорганизмов. Коэффициент пропорциональности называют **удельной скоростью роста** (μ). Данная величина отличается для разных культур, и даже для одной культуры 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 микробной культуры (урожай зависит от количества и природы используемых питательных веществ, а также от условий культивирования); $(S_0 - S)$ – количество потребленного субстрата (компонента среды).

1.6.4. Способы культивирования микроорганизмов

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 (рисунок 31). 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.

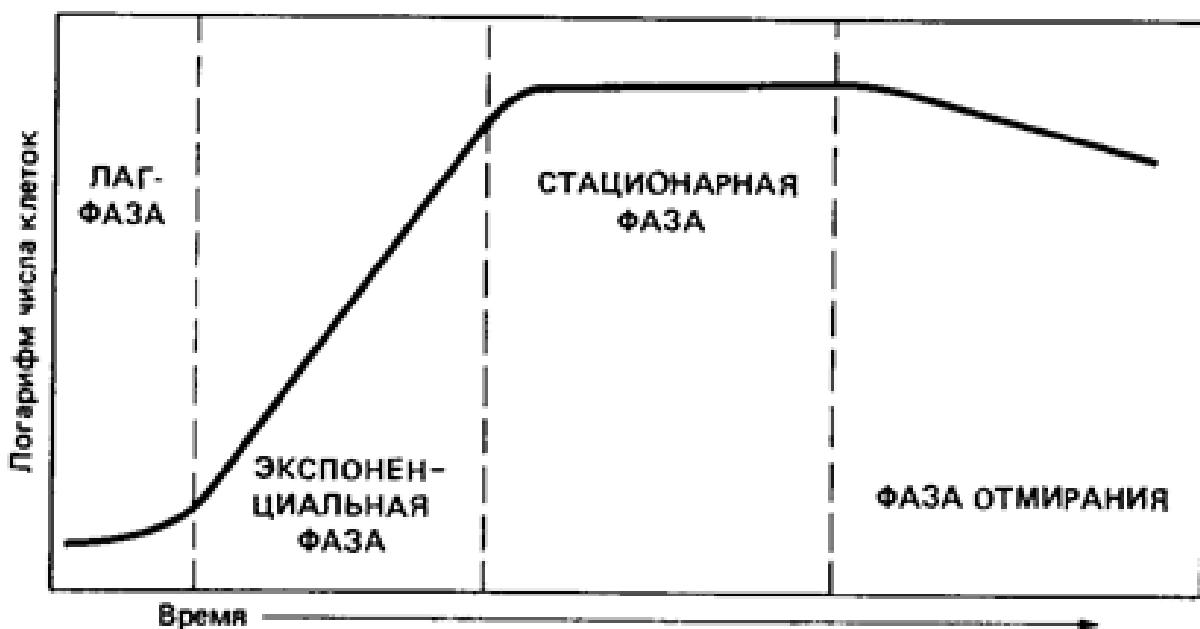


Рисунок 31 – Кривая роста бактериальной популяции

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 °C 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 $2 - 5 \cdot 10^9/\text{мл}$.

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 количество 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 обусловливают 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 (физическими и химическими), 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 суток 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.

Существуют два основных, принципиально различающихся способа непрерывного культивирования, подчиняющихся автоматическому регулированию с использованием хемостатов и турбидостатов.

Хемостат состоит из сосуда-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 (рисунок 32). 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 фото-элементом, соединенным с системой реле, включается подача свежей питательной среды.

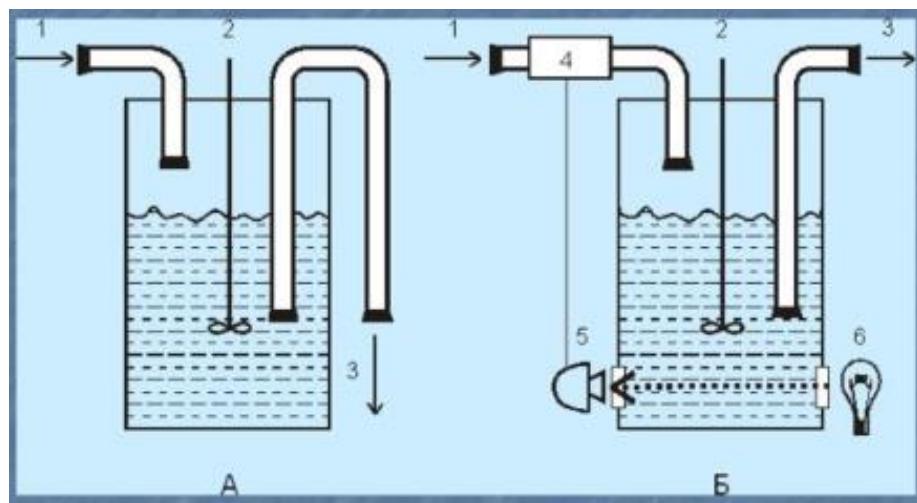


Рисунок 32 – А – хемостат; Б – турбидостат с автоматической регуляцией оптической плотности; 1 – поступление среды, 2 – мешалка, 3 – сток культуры, 4 – насос, 5 – фотоэлемент, 6 – источник света

Для глубинного культивирования бактерий с аэрацией в промышленных и лабораторных условиях применяют *биореакторы*, или *ферментеры* (рисунок 33). 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.



Рисунок 33 – Лабораторный ферментер

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.

Культивирование иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Иммобилизованные клетки микроорганизмов можно использовать практически во всех биотехнологических процессах для получения ценных продуктов (спиртов, кетонов, органических кислот, аминокислот, витаминов, антибиотиков, углеводов, ферментов и др.). Их также применяют для очистки сточных вод, для биодеградации токсичных природных и неприродных соединений (ксенобиотиков), извлечения металлов из руд, горных пород, для удаления серы из угля, для увеличения добычи нефти из нефтекважин и др.

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

Иммобилизация – это процесс фиксации клеток микроорганизмов с помощью физико-химических сил на носителе или в носителе.

В качестве носителей для иммобилизации микроорганизмов используют как органические, так и неорганические материалы. Органические носители делят на природные полимеры и синтетические полимеры. Для иммобилизации микроорганизмов чаще используют синтетические полимеры, так как природные полимеры (полисахариды, белки, липиды) могут ими использоваться в качестве источников углерода и энергии. К синтетическим органическим носителям относятся полимеры на основе стирола, полиакриламид, полиуретановые полимеры, полиамиды и др. Из неорганических носителей для иммобилизации микроорганизмов используют макропористые кремнеземы (чаще всего силикагели).

Методы иммобилизации подразделяются на химические и физические.

Химические методы иммобилизации предполагают образование ковалентных связей между какими-либо из функциональных групп на поверхности клетки микроорганизма и материалом носителя. Однако, химическая иммобилизация микробных клеток может привести к нежелательным изменениям их катализитических и других свойств.

При ***физической иммобилизации*** микроорганизм удерживается на носителе или в нем без образования ковалентных связей. Методы физической иммобилизации микроорганизмов делят на три группы: адсорбция на поверхности нерастворимых носителей, включение в поры геля, иммобилизация в полимерных мембранах. Физические методы иммобилизации реализуются в результате адсорбции микроорганизмов на поверхности различных нерастворимых синтетических или природных пористых материалов, при включении клеток в поры поперечношитого 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 мембранные с использованием коллагена, казеина, миозина и других белков или полипептидов. Мембранные с иммобилизованными клетками сворачивают в рулон и помещают в колонку, через которую пропускают субстрат.

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 микроанаэростатах – вакуумных камерах, снабженных манометром. Анаэростатом может служить обычный стеклянный эксикатор с притертой крышкой. Из анаэростата 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 донышком 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.

1.7. МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

Энергетический метаболизм (катализм) – 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 катализме, 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 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 прокариоты, 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 конститутивных ферментов является ДНК-полимераза. **Индуцибельные 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.

В ходе ферментативного окисления веществ выделяются восстановительные эквиваленты и энергия, образуются пируват и ацетил-КоА, которые имеют большую степень окисленности, чем исходные субстраты. Пируват и ацетил-КоА могут подвергаться дальнейшему окислению до CO_2 и воды в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), вступать в реакции брожения или служить субстратами для биосинтеза собственных клеточных соединений. Энергия и восстановительные эквиваленты, выделяющиеся в процессе реакций окисления, используются в реакциях анаболизма для синтеза клеточных веществ, так как продукты биосинтеза, как правило, характеризуются меньшей степенью окисленности, чем исходные субстраты. Таким образом, в процессе метаболизма превращения субстратов и энергии сопровождаются переносом восстановительных эквивалентов. Этую функцию осуществляют кофакторы,

среди которых центральную роль играют никотинамидные (НАД, НАДФ) и флавиновые (ФАД, ФМН) переносчики. Эти вещества попеременно пребывают в окисленной и восстановленной форме, перенося электроны и водород. Окисленные формы переносчиков восстановительных эквивалентов обозначаются НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД и ФМН, а восстановленные – соответственно НАДН, НАДФН, ФАДН₂ и ФМНН₂.

Таким образом, назначение метаболизма состоит в следующем:

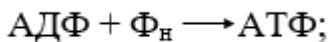
- генерация энергии в молекулах АТФ или других богатых энергией соединениях;
- образование субъединиц, из которых синтезируются макромолекулы основных биополимеров клетки (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, липидов);
- активация образованных субъединиц за счет переноса фосфатной группы с АТФ,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

1.7.1. Общая характеристика энергетического метаболизма

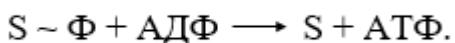
Ранее было отмечено, что по отношению к энергетическим источникам все микроорганизмы подразделяются на две группы: хемотрофные и фототрофные. Хемотрофные микроорганизмы используют для синтеза молекул АТФ энергию, освобождаемую в результате окислительно-восстановительных реакций, фототрофные – световую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

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

- фосфорилированием в дыхательной или фотосинтетической электронтранспортной цепи (*окислительное фосфорилирование*). 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 , S^0 , Fe^{3+} , Mn^{4+} , SeO_4^{2-} , AsO_4^{3-} , ClO_3^- , ClO_4^- и др.), а также органических веществ (фумарата, диметилсульфоксида, триметил-N-оксида 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 фруктозодифосфатный 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-дезокси-6-фосфоглюконатный 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** (рисунок 34). 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 фосфодиоксиацитон. 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).

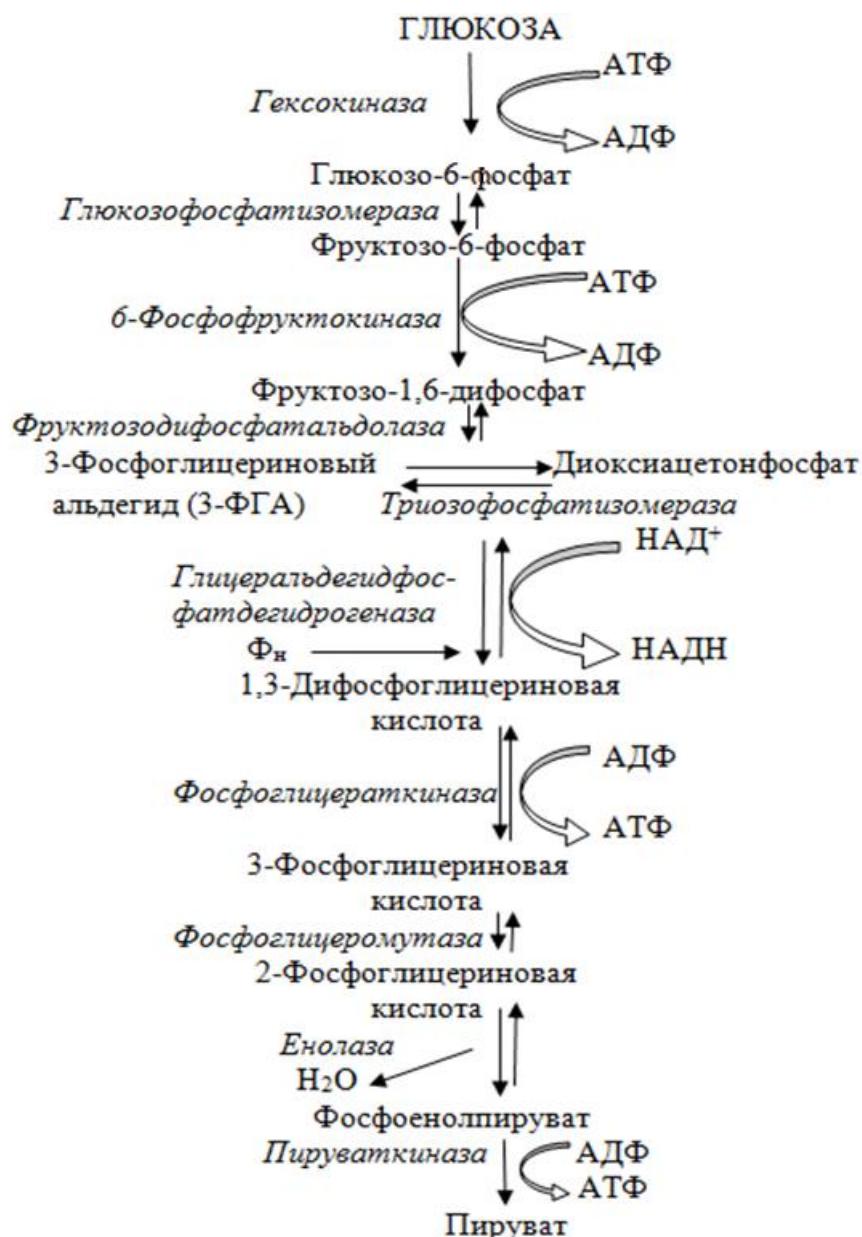
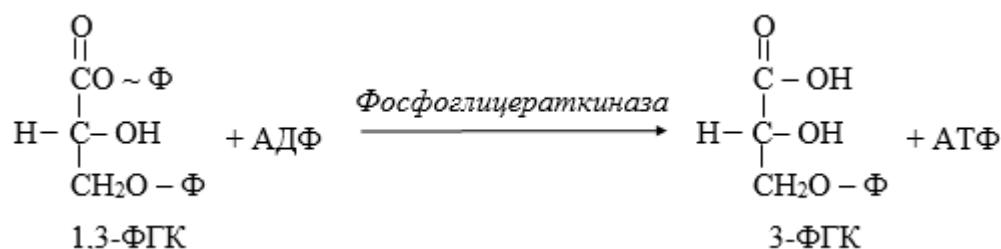


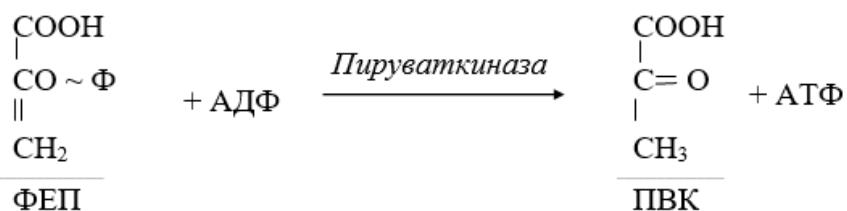
Рисунок 34 – Гликолитический путь расщепления глюкозы

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

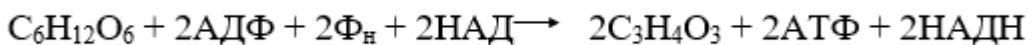
Таким образом, энергия, освободившаяся при окислении 3-ФГА, путем субстратного фосфорилирования оказывается аккумулированной в молекуле АТФ. Образуется 3-фосфоглицериновая кислота (3-ФГК).



Далее 3-ФГК под действием фермента фосфоглицеромутазы 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 НАДФН. 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 (рисунок 35).

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 нукleinовых кислот. Кроме того, в этом цикле образуются две молекулы НАДФН, которые необходимы клетке для восстановительных реакций биосинтеза.

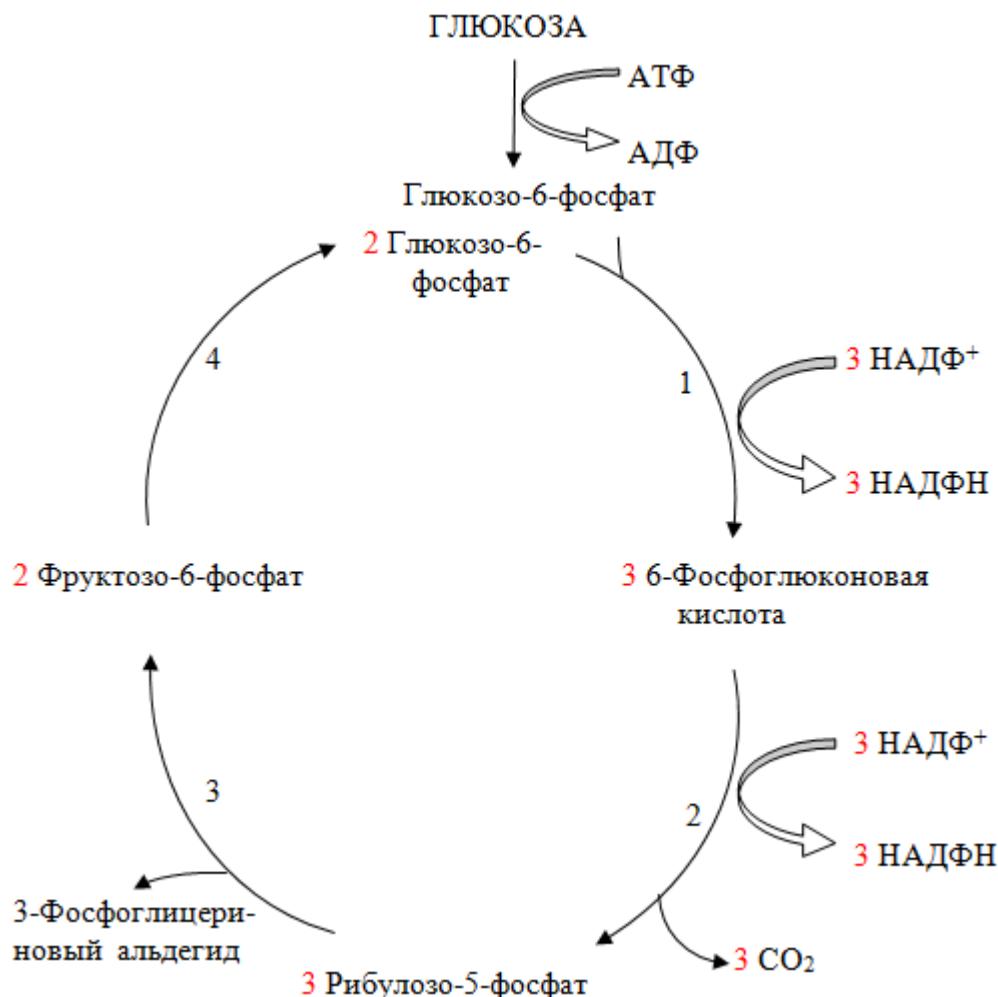


Рисунок 35 – Окислительный пентозофосфатный путь:

1 – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 2 – глюконат-6-фосфатдегидрогеназа; 3 – трансальдолаза и транскетолаза; 4 – фосфоглюкоизомераза

Путь Энтиера – Дудорова встречается у прокариот реже других. Он характерен в основном для псевдомонад, нейсерий, уксуснокислых бактерий, некоторых бифидобактерий, бактерий вида *Zymomonas mobilis* и др. 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 НАДФН и НАДН. Следует подчеркнуть, что путь Энтиера – Дудорова является самым кратчайшим механизмом расщепления углеводов до пировиноградной кислоты (рисунок 36).

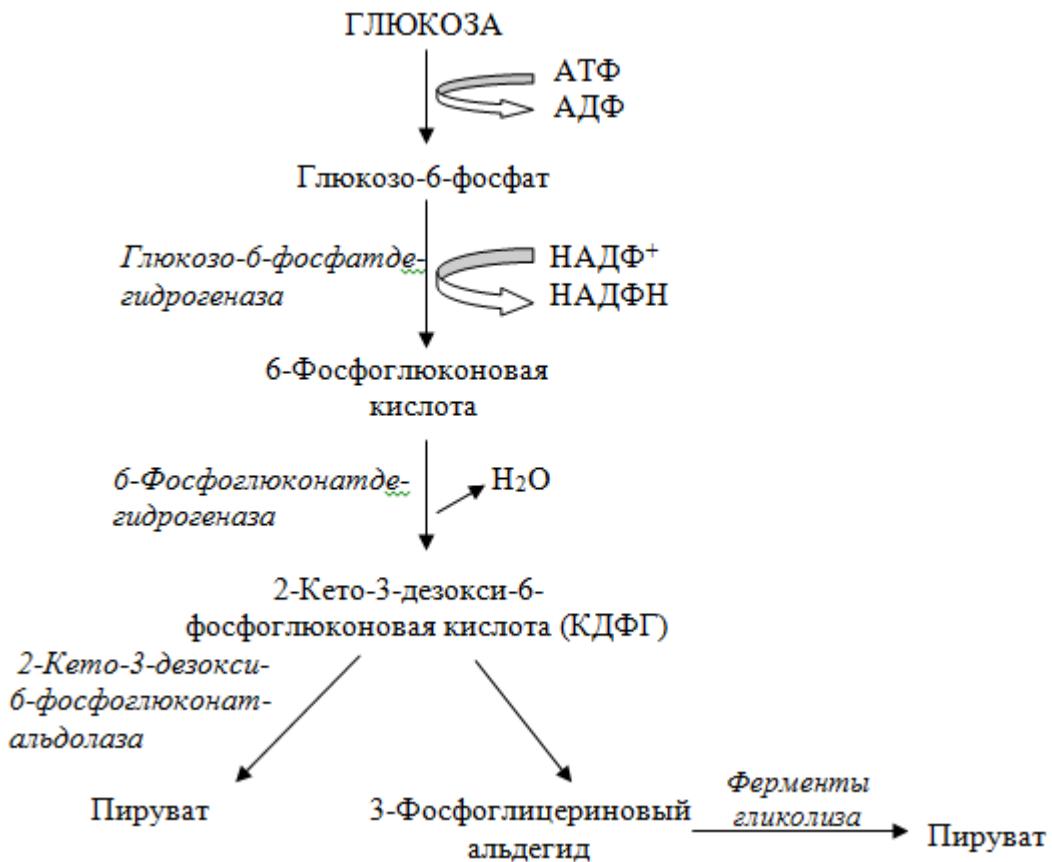


Рисунок 36 – Путь Энтнера – Дудорова

Сравнительная характеристика различных путей катаболизма глюкозы представлена на рисунке 37.

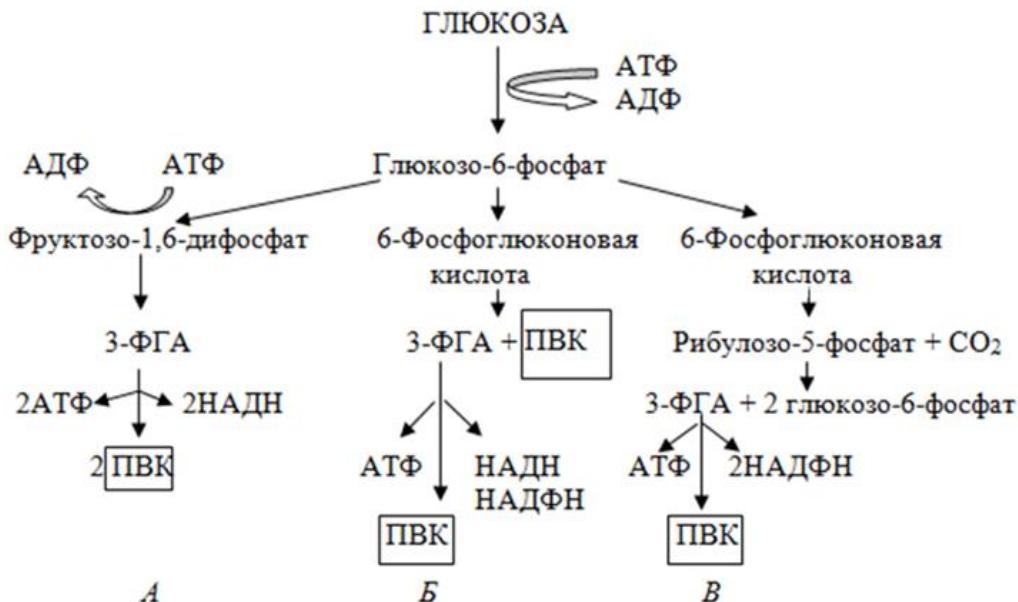


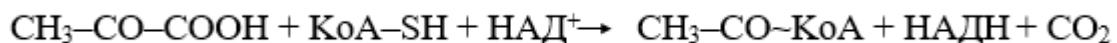
Рисунок 37 – Схема путей катаболизма глюкозы в клетках прокариот:
A – гликолиз; *B* – путь Энтнера – Дудорова; *C* – пентозофосфатный путь

Таким образом, рассмотрев пути катаболизма глюкозы, мы можем заключить, что важнейшим продуктом, образующимся в них, является

пировиноградная кислота, которая подвергается дальнейшим превращениям. Пируват занимает центральное положение в метаболизме клеток и может служить предшественником многих продуктов.

1.7.1.1. 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. 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 пирофосфатов (3НАДН) и два атома – в молекуле флавопротеинов (ФАДН_2) (рисунок 38).

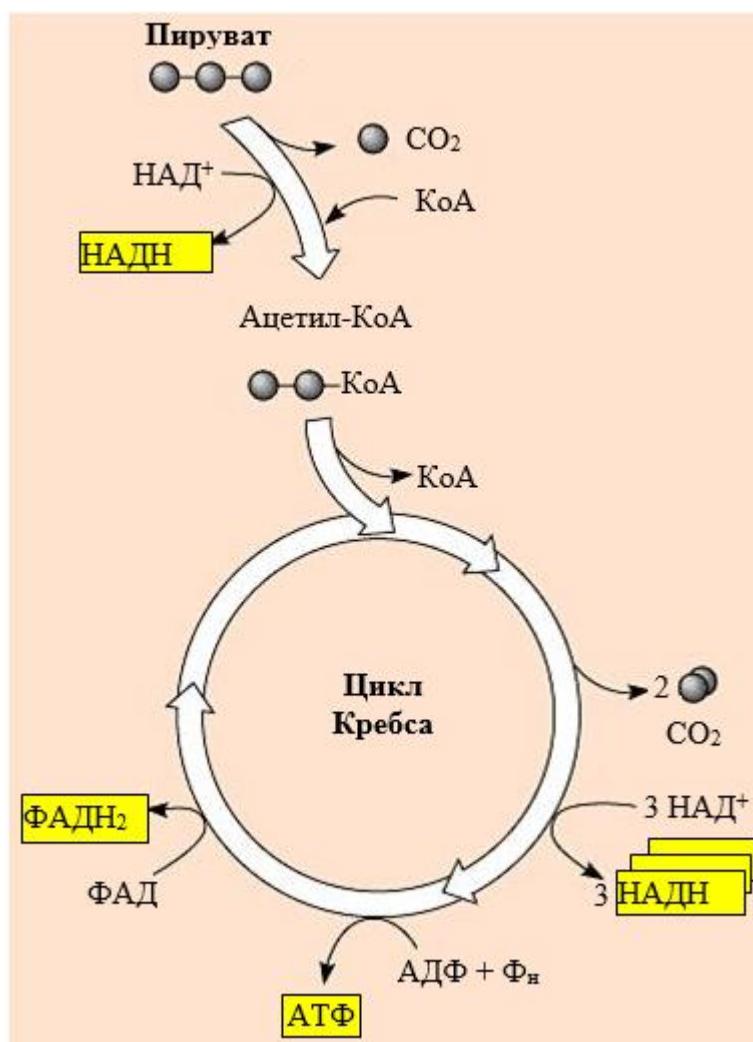


Рисунок 38 – Цикл Кребса

Таким образом, цикл трикарбоновых кислот выполняет функцию конечного окисления органических веществ, обеспечивает образование восстановительных эквивалентов для окислительного фосфорилирования (трёх молекул НАДН и одной молекулы ФАДН₂), синтез одной молекулы АТФ и биосинтетические процессы клетки различными предшественниками, такими как оксалоацетат, сукцинат, α -кетоглутарат и др.

У некоторых прокариот 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.

Образовавшиеся на разных этапах окисления органических веществ НАДН и ФАДН₂, поступают в дыхательную цепь, которая у прокариот находится в цитоплазматической мемbrane, а у эукариот – в мемbrane митохондрий. В дыхательной цепи НАДН и ФАДН₂ вновь окисляются до НАД 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 (рисунок 39).

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

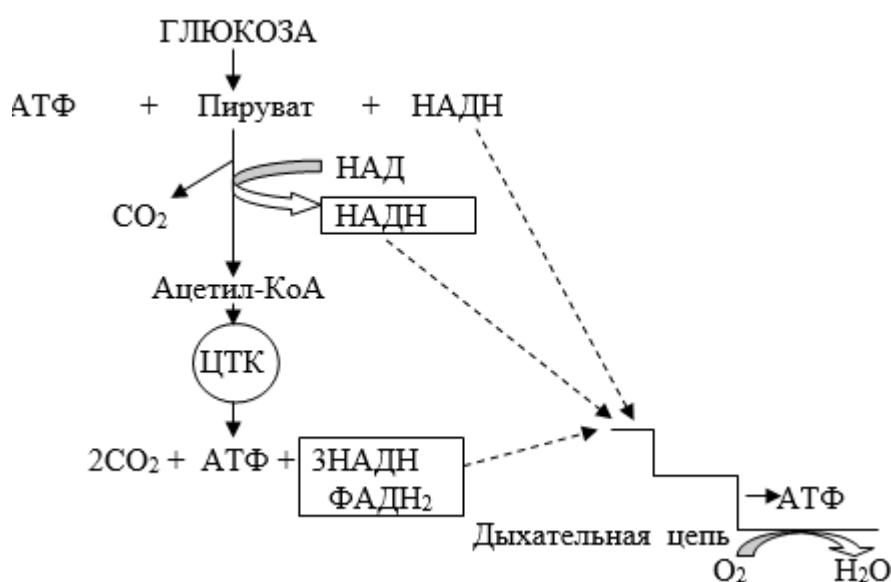


Рисунок 39 – Схема аэробного дыхания

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 флавинмононуклеотид (ФМН)

или флавинадениндинуклеотид (ФАД). Флавопротеины осуществляют перенос атомов водорода, т. е. являются дегидрогеназами. Дегидрогеназа, содержащая в качестве простетической группы ФМН, является НАДФН-дегидрогеназой. Это стартовый переносчик в дыхательной цепи, осуществляющей перенос водорода с НАДФН 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 ФАДН₂ 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 (рисунок 40).



Рисунок 40 – Железосероцентры (FeS- центры) белков

Железосероцентры входят в состав некоторых флавопротеинов (например, сукцинатдегидрогеназы и НАДФН-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 менахиноном (рисунок 41).

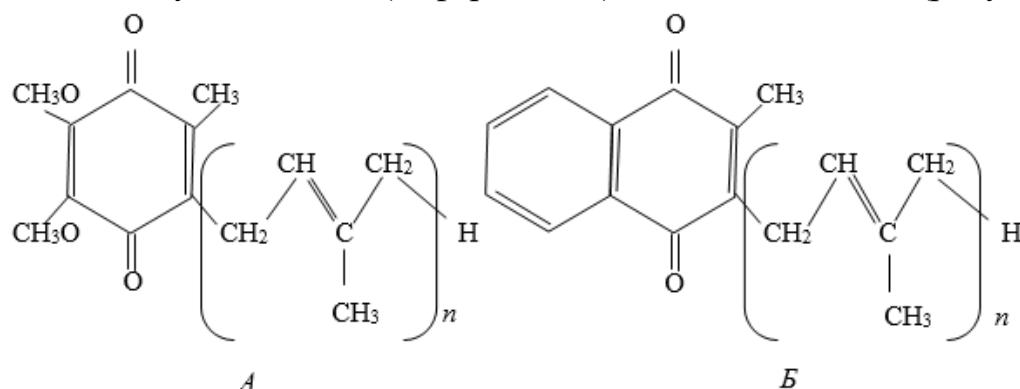


Рисунок 41 – Хиноны грамотрицательных бактерий: *A* – кофермент Q (убихинон); *B* – менахинон

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 передают 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*, *a₃*, *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* + *a₃* 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 (рисунок 42) и у бактерий *E. coli* (рисунок 43).

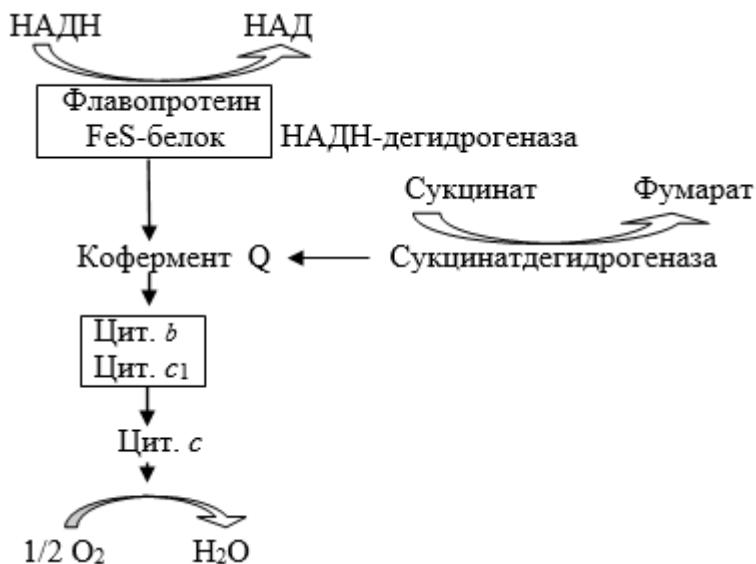


Рисунок 42 – Компоненты дыхательной цепи митохондрий у дрожжей: цит. – цитохром

Из рисунка 42 видно, что митохондриальная дыхательная цепь у дрожжей содержит четыре комплекса:

- комплекс 1 – НАДН-дегидрогеназа; в него входят ФМН и железосерные белки; НАДН-дегидрогеназа переносит водород от НАДН к коферменту Q;
- комплекс 2 – сукцинатдегидрогеназа, содержащая ФАД. Она отдает водород в дыхательную цепь на уровне кофермента Q;
- комплекс 3 – цитохром *b* и цитохром *c1*, 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.

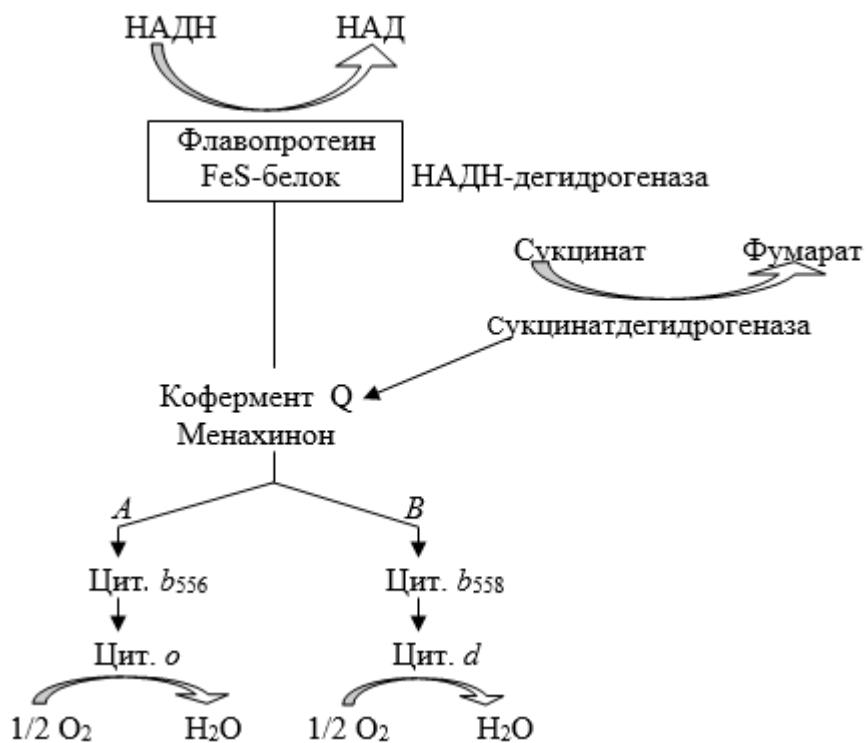


Рисунок 43 – Компоненты дыхательной цепи бактерий *E. coli*:
A – путь при росте в аэробных условиях; *B* – путь при росте с ограниченным снабжением кислородом

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 НАДФН-дегидрогеназы. Второй определяется способностью убихинона переносить водород. Последний локализован в конце дыхательной цепи и связан с активностью цитохромоксидазы. Если роль донора водорода выполняет ФАДН₂, то возможны только два пункта фосфорилирования, так как при этом выпадает участок дыхательной цепи, где располагается НАДФН-дегидрогеназа (рисунок 44).

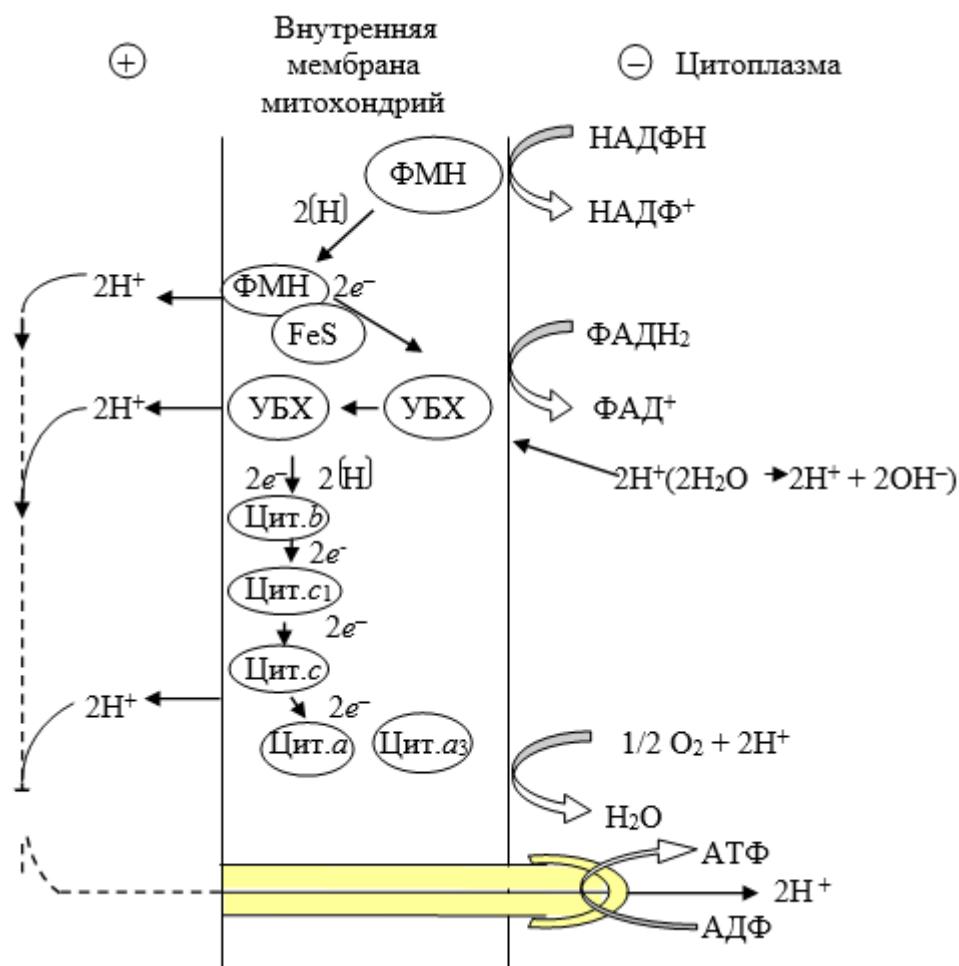


Рисунок 44 – Функциональная организация компонентов дыхательной цепи митохондрий дрожжей: УБХ – убихинон

Как видно из рисунка 44, связывание протонов происходит на внутренней стороне мембраны, а их освобождение – на наружной. Так как внутренняя мембра на митохондрий и цитоплазматическая мембра 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 трансмембранных электрохимического градиента используется в реакциях фосфорилирования.

Установлено, что синтез молекулы АТФ связан с переносом двух протонов через комплекс АТФ-синтазы. Так как при окислении НАДН молекулярным кислородом выделяется шесть протонов, то, следовательно, максимальный выход АТФ в этом процессе составляют три молекулы. При окислении ФАД · Н₂, 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, НАДН и пирувата;
- при окислительном декарбоксилировании двух молекул пирувата образуются две молекулы ацетил-КоА и две молекулы НАДН;
- окисление двух молекул ацетил-КоА в цикле Кребса приводит к образованию шести молекул НАДН, двух молекул ФАДН₂ и двух молекул АТФ.

В итоге образуются четыре молекулы АТФ, 10 молекул НАДН, две молекулы ФАДН₂. Установлено, что при окислении одной молекулы НАДН максимально образуются три молекулы АТФ, при окислении одной молекулы ФАДН₂ – две молекулы АТФ. Следовательно, при окислении 10 молекул НАДН выход составляет 30 молекул АТФ, а двух молекул ФАДН₂ – 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 рисунка 45, 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 НАДН образуются только две молекулы АТФ, а при окислении молекулы ФАДН₂ – одна молекула АТФ.

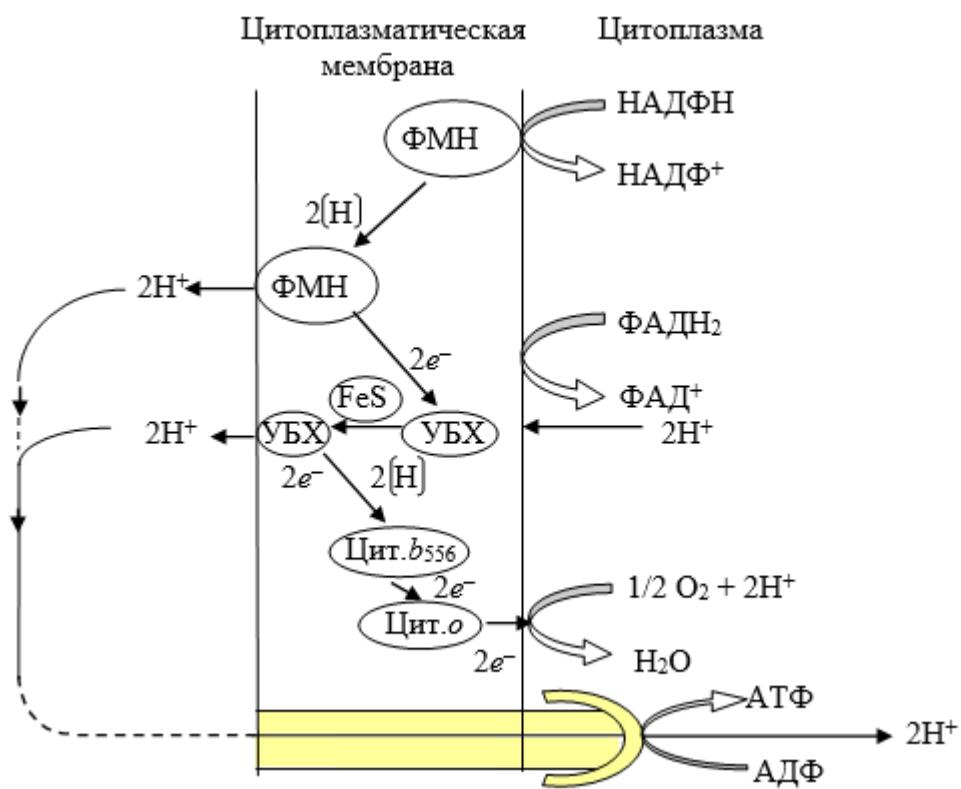


Рисунок 45 – Функциональная организация компонентов дыхательной цепи бактерий *E. coli*

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 НАДН приводят к синтезу 20 молекул АТФ;
- две молекулы ФАДН₂ 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.

1.7.1.2. Получение энергии в результате анаэробного дыхания

При анаэробном дыхании конечным акцептором электронов в электротранспортной цепи являются неорганические или органические соединения. Например, если конечным акцептором электронов является SO_4^{2-} , то процесс называют **сульфатным дыханием**, а прокариоты – **сульфатвосстанавливающими** или **сульфатредуцирующими**. В том случае, если конечным акцептором электронов служит NO_3^- или NO_2^- , то процесс называется **нитратным дыханием** или **денитрификацией**, а прокариоты, осуществляющие этот процесс, – **денитрифицирующими**. В качестве

конечного акцептора электронов может выступать CO_2 , процесс соответственно называют ***карбонатным дыханием***, а микроорганизмы – ***метаногенными***. 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 окислительного фосфорилирования.

По отношению к молекулярному кислороду прокариоты, осуществляющие анаэробное дыхание, являются факультативными или облигатными анаэробами. Например, к облигатным анаэробам относятся сульфатвосстановляющие и метаногенные прокариоты. К факультативным анаэробам – денитрифицирующие прокариоты и прокариоты, 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.

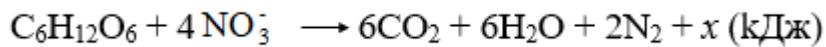
Выход АТФ при анаэробном дыхании меньше, чем при аэробном, но больше, чем при брожении.

Рассмотрим примеры некоторых основных типов анаэробного дыхания.

Нитратное дыхание, или денитрификация

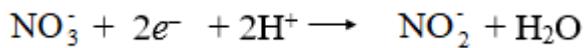
Как уже упоминалось, конечными акцепторами электронов при нитратном дыхании являются нитраты (NO_3^-) или нитриты (NO_2^-). Результатом нитратного дыхания является восстановление NO_3^- или NO_2^- до газообразных продуктов (NO , N_2O или N_2). Следует отметить, что к денитрификации (как, впрочем, и некоторым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

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

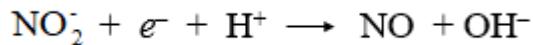


Полный процесс денитрификации состоит из четырех реакций восстановления, каждая из которых катализируется специфическими мембраносвязанными редуктазами.

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

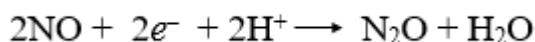


Второй этап: восстановление нитрита до оксида азота, катализируют нитритредуктазы:



Нитрат- и нитритредуктазы очень чувствительны к молекулярному кислороду, который ингибитирует их активность, а также репрессирует синтез. Поэтому данные реакции (восстановление нитрата до нитрита и восстановление нитрита оксида азота) могут протекать только в том случае, когда молекулярный 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:

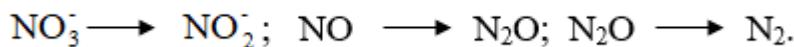


У денитрифицирующих прокариот, которые являются факультативными анаэробами, функционирует полная электронтранспортная цепь в процессе аэробного дыхания, при наличии O_2 в среде, и укороченная – при анаэробном дыхании, при отсутствии O_2 в среде. Электронтранспортные цепи прокариот-денитрификаторов в 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 прокариот 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 (рисунок 46).



Рисунок 46 – Транспорт электронов в процессе денитрификации

Количество синтезируемых молекул АТФ зависит от строения дыхательной цепи, наличия и свойств соответствующих редуктаз. При «полней» денитрификации энергии запасается в большем количестве, чем при «усеченной», когда осуществляются только отдельные этапы этого процесса:



Схематично нитратное дыхание при окислении глюкозы можно представить следующим образом (рисунок 47).

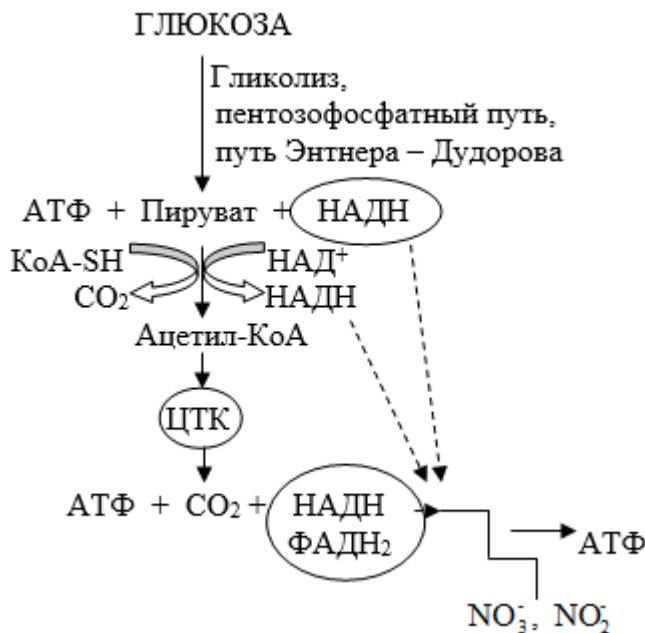


Рисунок 47 – Схема нитратного дыхания

Денитрифицирующие прокариоты широко распространены в природе. Способность к денитрификации обнаружена у представителей более чем 40

родов бактерий и только у одной группы архей, относящихся к экстремальным галофилам. Среди бактерий способностью к денитрификации обладают грамотрицательные протеобактерии родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nutromicrobium* и *Thauera*, а также некоторые представители грамположительных бактерий рода *Bacillus*.

Денитрифицирующие прокариоты – 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 %.

Процесс денитрификации 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 прокариоты являются важным звеном в круговороте азота в природе, обогащающим атмосферу молекулярным азотом. Кроме того, эти прокариоты 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 прокариоты 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 . Прокариоты, осуществляющие этот процесс, получили название сульфатвосстанавливающих или сульфатредуцирующих.

Сульфатвосстанавливающие прокариоты – строгие анаэробы. Они разнообразны по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам. В настоящее время в состав группы сульфатвосстанавливающих прокариот входит более 40 видов. Среди бактерий способностью к сульфатредукции обладают представители родов *Desulfotomaculum*, *Desulfosporococcus*, *Desulfovibrio*, *Desulfovobacterium*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Thermodesulfobacterium*. Сульфаты восстанавливают также археи вида *Archaeoglobus fulgidus*.

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, например, представители родов *Desulfovibrio* (слегка изогнутые, не образующие эндоспор палочки с полярно расположенным жгутиком) и *Desulfotomaculum* (спорообразующие палочки с перитрихиально расположенными жгутиками). Нитчатые формы, для которых характерен скользящий тип движения, представлены бактериями рода *Desulfonema*.

Сульфатредукторы способны расти хемоорганогетеротрофно, используя в качестве источников углерода и энергии, главным образом, органические кислоты (пируват, лактат, сукцинат, фумарат, малат). Обнаружена способность использовать жирные кислоты от 1 до 18 атомов углерода, такие как формиат, пропионат, бутират. Отдельные сульфатредукторы могут использовать спирты, углеводы, циклические соединения. Часть хемоорганогетеротрофных сульфатредукторов окисляет органические вещества до воды и диоксида углерода, а другие осуществляют неполное окисление органических веществ с образованием ацетата, в связи с тем, что у них в ЦТК отсутствует фермент α -кетоглутаратдегидрогеназа.

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 прокариоты 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 прокариот, 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, функционирующими 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 прокариоты содержат ферменты реакций цикла Кребса, но этот цикл «разорван» и функционирует только в условиях конструктивного метаболизма.

В качестве компонентов дыхательной цепи у сульфатвосстанавливающих прокариот идентифицированы flavопротеины, FeS-белки (ферредоксин, рубредоксин), хиноны (типа менахинона), цитохромы *b* и *c*. Особенностью дыхательной цепи многих сульфатвосстанавливающих бактерий является высокое содержание цитохрома *c₃*. Перенос электронов по дыхательной цепи сопровождается возникновением электрохимического градиента с последующим генерированием энергии в молекулах АТФ.

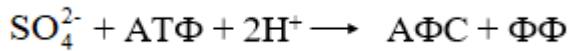
Последний этап, заключающийся в акцептировании сульфатом электронов с помощью нескольких редуктаз, называется *собственно диссимиляционной сульфатредукцией*.

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:

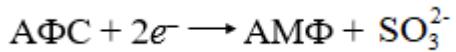
- диссимиляционное восстановление сульфата присуще только узкому кругу высокоспециализированных прокариотических организмов;
- активность процессов диссимиляционной сульфатредукции намного выше, чем ассимиляционных, следствием чего является накопление в среде больших количеств H_2S ;
- механизмы обоих процессов различны.

Рассмотрим химизм диссимиляционной сульфатредукции.

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

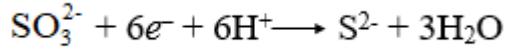


В результате этой реакции образуется аденоинфосфосульфат (АФС) и пирофосфат (ПФ), последний расщепляется пирофосфатазой. Аденоинфосфосульфат с помощью аденоинфосфосульфатредуктазы восстанавливается до сульфита, что сопровождается образованием АМФ (аденозинмонофосфата):

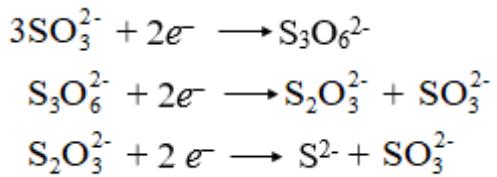


Восстановление сульфита (SO_3^{2-}) до сульфида (S^{2-}) отличается у разных видов бактерий:

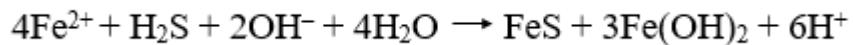
- в первом случае сульфит с помощью сульфитредуктазы прямо восстанавливается до сульфида:



- 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 прокариоты 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 прокариоты могут приносить вред, вызывая коррозию металлических труб и других подводных и подземных сооружений: Показано, что в нефтяных месторождениях биокоррозия труб нефтепроводов в немалой степени связана с развитием на их внутренних поверхностях биоплёнок, содержащих клетки сульфатредукторов.



Серное дыхание

Серное дыхание – процесс окисления в анаэробных условиях молекулярного водорода или органических веществ (ацетата, пропионата и этанола), при котором акцептором электронов является элементарная сера (S^0) в результате чего происходит ее восстановление до сероводорода. Органические вещества при серном дыхании окисляются полностью до CO_2 и H_2O .

Прокариоты, осуществляющие серное дыхание, не способны восстанавливать сульфаты и не так широко распространены в природе, как сульфатвосстанавливающие прокариоты. Больше всего восстанавливающих серу микроорганизмов обнаружено среди архей-экстремофилов. Это представители родов *Thermoproteus*, *Pyrobaculum*, *Desulfurococcus*, *Thermodiscus*, *Pyrodictium*, *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Sulfurococcus*, *Pyrococcus* и др. Среди них имеются как автотрофы, так и гетеротрофы. Многие из архей, способных к серному дыханию, отличаются термофилией (до 113 °C) и ацидофилией (до pH 1,0 – 1,5). Из бактерий лучше изучены восстанавливающие серу грамотрицательные анаэробные бактерии вида *Desulfuromonas acetoxidans*, имеющие форму от палочковидных до овальных или слегка изогнутых, передвигающихся с помощью латерально расположенного жгутика. Они на агаризованных средах формируют розовые колонии. Бактерии *D. acetoxidans* содержат в качестве переносчиков электронтранспортной цепи цитохром c_7 с низким окислительно-восстановительным потенциалом, а также FeS-белок с четырьмя атомами Fe и четырьмя атомами S. Они обладают также ферментами цикла трикарбоновых кислот.

Бактерии *D. acetoxidans* обитают в бескислородных морских осадках и участвуют в круговороте серы в природе. Они способны осуществлять жизнедеятельность в тесной синтрофной ассоциации с фототрофными серными

бактериями, которые окисляют на свету H_2S до серы и фиксируют CO_2 (рисунок 48). В такой синтрофной ассоциации происходит обмен донорами электронов и источниками углерода между двумя видами бактерий.

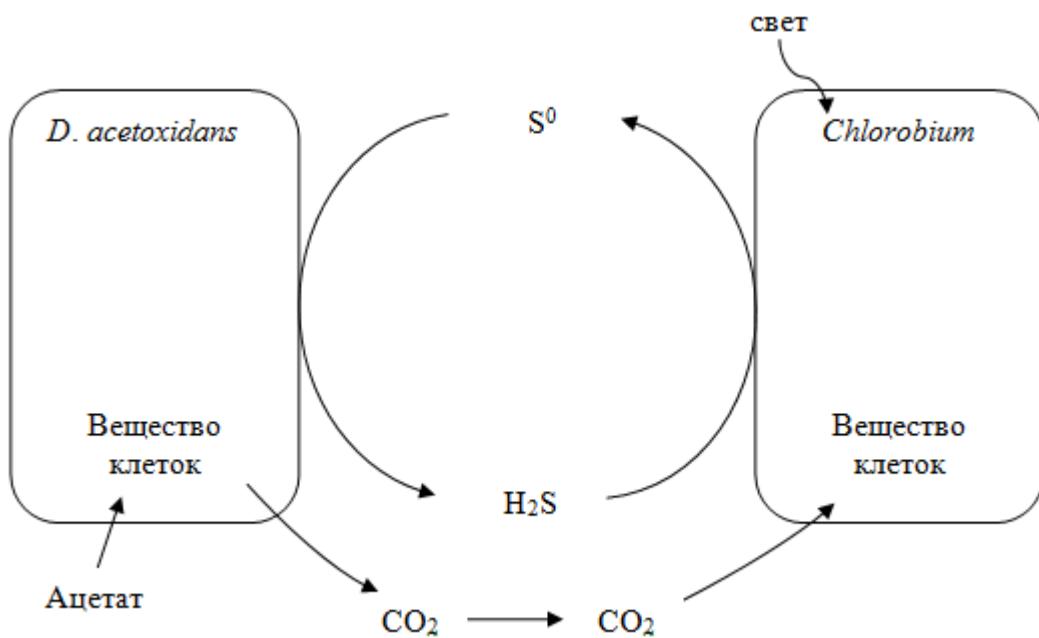


Рисунок 48 – Синтрофные взаимоотношения между бактериями *D. acetoxidans* и бактериями рода *Chlorobium*

Карбонатное дыхание (метаногенез)

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

Метаногенные прокариоты в соответствии с современной филогенетической классификацией относятся к археям (домену *Archaea* филуму *Euryarchaeota*). Метаногенные археи объединены в четыре класса: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanopyri*, *Methanomicrobia*, в которых насчитывается 26 родов (*Methanobacterium*, *Methanospaera*, *Methanothermus*, *Methanococcus*, *Methanomicrobium*, *Methanogenium*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanopyrus* и др.).

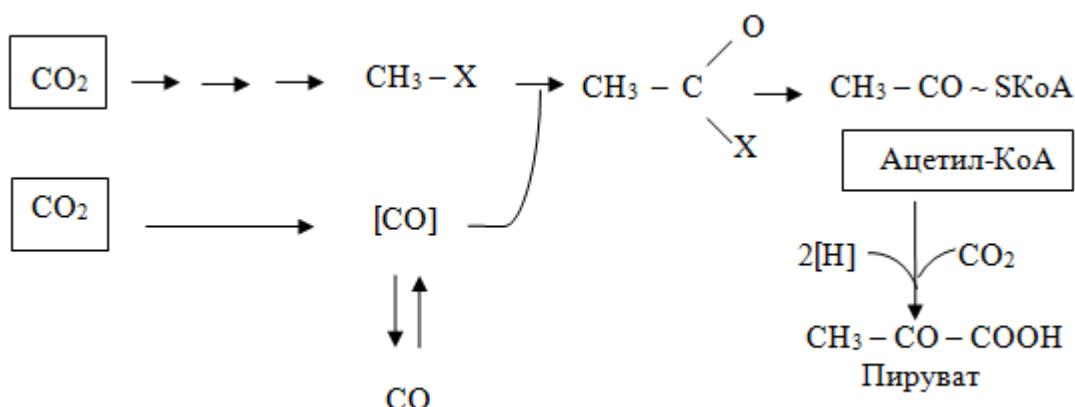
Среди метаногенных архей встречаются прямые или изогнутые палочки разной длины; клетки неправильной или извитой формы. У некоторых видов обнаружена тенденция формировать нити или пакеты клеток. Клетки могут быть неподвижными или передвигающимися с помощью перитрихиально или полярно расположенных жгутиков.

Большинство метаногенных архей имеет температурный оптимум для роста в области $35 - 40^\circ\text{C}$, но есть виды, у которых он сдвинут в сторону более низких ($20 - 25^\circ\text{C}$) или высоких ($65 - 70^\circ\text{C}$) температур.

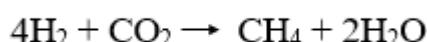
В качестве источника азота метаногенные археи используют аммонийный азот или некоторые аминокислоты. Источником серы могут служить сульфаты, сульфиды или серосодержащие аминокислоты.

В качестве источников углерода для биосинтетических целей метаногенные археи 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. У таких автотрофных метаногенов ассимиляция CO_2 происходит в нециклическом восстановительном ацетил-КоА пути, получившим такое название, поскольку его ключевым метаболитом является ацетил-КоА.

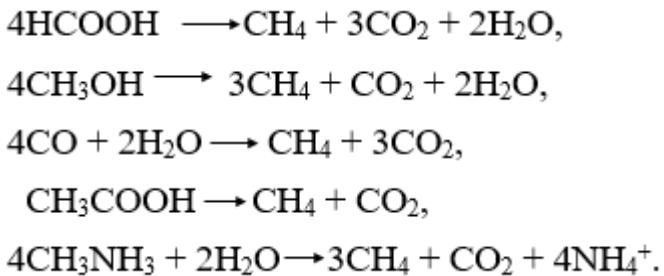
В процессе восстановительного ацетил-КоА пути синтез ацетил-КоА осуществляется из двух молекул CO_2 . Одна молекула CO_2 с помощью фермента CO -дегидрогеназы восстанавливается до карбонильной группы (CO), вторая молекула CO_2 – до метильной группы, связанной с тетрагидроптерином. При дальнейшем взаимодействии карбонильной группы и метильной группы образуется ацетильная группа, связанная с ферментом. При участии КоА эта ацетильная группа высвобождается в составе ацетил-КоА (ацетил-КоА-синтазная реакция). Затем в результате восстановительного карбоксилирования ацетил-КоА с помощью пируватсинтазы образуется пируват. Пируват далее идет на синтез клеточных веществ.



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



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



Механизм энергетических процессов у метаногенных архей 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 архей пока не установлена, хотя показано, что все изученные метаногенные археи имеют необычные по структуре переносчики электронов, содержащие в качестве кофакторов и простетических групп соединения, найденные только у представителей этой группы: фактор F_{420} (производное 5-деазафлавина, назван по максимуму флуоресценции в окисленной форме при 420 мкм), кофермент M (2-меркаптоэтанолсульфат), тетрагидрометаноптерин, метаноуран, фактор F_{430} , фактор F_b , 5-гироксибензимидаэтилгидроксикобамид.

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 рисунка 49 видно, 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 M (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.

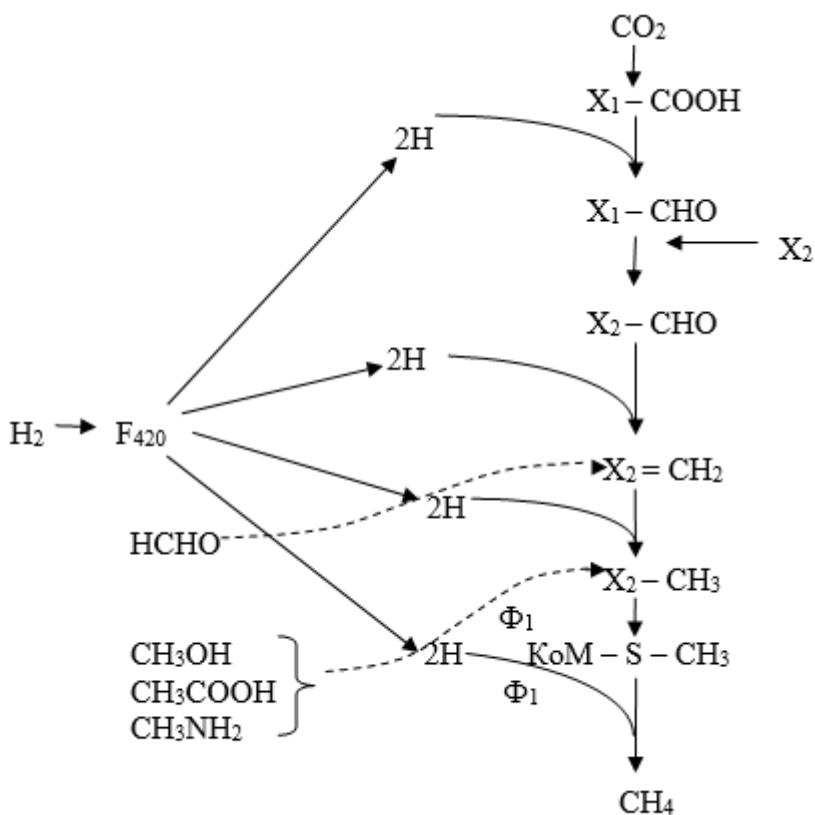


Рисунок 49 – Схема восстановления CO_2 до CH_4 метаногенными археями:
 $\text{X}_1\text{-COOH}$ – карбоксипроизводная; $\text{X}_1\text{-CHO}$ – формилпроизводная;
 $\text{X}_2=\text{CH}_2$ – метиленпроизводная; $\text{X}_2\text{-CH}_3$ – метилпроизводная;
 Φ_1 – метилредуктазная система; KoM-S-CH_3 – метилкофермент M

При восстановлении CO_2 до метана запасается энергия в форме электрохимического ионного потенциала. Фосфорилирование на субстратном уровне у метаногенных архей отсутствует. Количество образуемой 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 несравненно 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 .

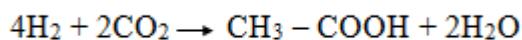
Метаногены считаются древнейшими организмами в истории Земли, которые могли зародиться тогда, когда атмосфера состояла из CO_2 , H_2 и CO . Это самая большая группа архей. Они повсеместно распространены в анаэробных местообитаниях (анаэробные зоны водоемов, богатых органическими соединениями, иловые отложения озер и рек, болота, заболоченные почвы, осадочные слои морей и океанов). Метаногены – типичные обитатели пищеварительного тракта животных и человека, важный компонент

микробиоты рубца жвачных животных. Метаногенные археи занимают важное место в природных экосистемах. Обычно в анаэробных местообитаниях они являются последним звеном пищевой цепи разрушения биополимеров, т. е. в этих условиях они завершают цикл углерода на Земле.

Метаногенные археи 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.

Однако метан – это один из газов, ответственных за «парниковый эффект». Он обладает высокой отражающей способностью и значительным временем существования в атмосфере (8 – 10 лет).

В процессе карбонатного дыхания может происходить также окисление молекулярного водорода с использованием в качестве акцептора электронов молекул CO_2 , приводящее к образованию уксусной кислоты согласно общему уравнению:



Бактерии, осуществляющие такое анаэробное дыхание, называются **ацетогенными**. Ацетогенные бактерии входят в состав родов *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Butyrobacterium*, *Syntrophococcus*, *Sporomusa*, *Eubacterium*. Они относятся к факультативным хемолитоавтотрофам. В присутствии органики ацетогенные бактерии способны переключаться на хемогетеротрофный метаболизм, сбраживая углеводы и другие субстраты с образованием уксусной кислоты.

Анаэробное дыхание с использованием в качестве акцепторов электронов других неорганических ионов

Микроорганизмы в процессе анаэробного дыхания способны использовать в качестве акцепторов электронов такие неорганические ионы как ферри-ионы (Fe^{3+}), мanganаты (Mn^{4+}), селенаты (SeO_4^{2-}), арсенаты (AsO_4^{3-}), хлораты (ClO_3^-) и перхлораты (ClO_4^-).

При использовании в качестве акцепторов электронов трехвалентного железа (Fe^{3+}) происходит его восстановление до двухвалентного (Fe^{2+}). Поскольку оксиды трехвалентного железа практически нерастворимы в воде, бактерии, осуществляющие этот тип анаэробного дыхания, для переноса Fe^{3+} в клетку синтезируют сидерофоры. В качестве доноров электронов используются различные органические соединения. Восстанавливать ионы железа в процессе анаэробного дыхания способны **железоредуцирующие прокариоты** (бактерии родов *Shewanella*, *Geobacter*, *Geospirillum*, *Geovibrio* и некоторые гипертермофильные археи). Считают, что «железное» дыхание – эволюционно

более древнее, чем сульфатное, нитратное и эробное дыхание, и возникло на ранней стадии развития жизни на Земле.

Диссимиляционное восстановление Mn^{4+} в Mn^{2+} осуществляют многие **марганецредуцирующие прокариоты**. Одним из примеров являются бактерии вида *Shewanella putrefaciens*, которые способны в процессе анаэробного дыхания окислять ацетат, используя в качестве акцепторов электронов ионы Mn^{4+} .

Селенатрудящие прокариоты способны использовать в анаэробных условиях соединения селена, восстанавливая сelenаты (SeO_4^{2-}) до селинитов (SeO_3^{2-}) и далее до металла Se^0 . Этот процесс реализуется на практике для удаления селена из воды и почвы в целях биоремедиации загрязненных районов.

Использование в анаэробном дыхании в качестве акцепторов электронов хлоратов (ClO_3^-) и перхлоратов (ClO_4^-) характерно для нескольких видов **хлорат- и перхлоратредуцирующих прокариот**. Они относятся к факультативным анаэробам и поэтому при наличии в среде O_2 осуществляют аэробное дыхание.

Арсенатредуцирующие прокариоты в процессе анаэробного дыхания восстанавливают арсенаты (AsO_4^{3-}) до арсенитов (AsO_3^{3-}). Иногда этот процесс приводит к загрязнению воды и почвы токсичным для живых организмов мышьяком, так как арсениты в отличие от арсенатов растворимы в воде. В некоторых случаях этот процесс оказывается полезным. Например, бактерии рода *Desulfotomaculum* параллельно с восстановлением арсената до арсенита осуществляют сульфатредукцию и переводят сульфаты в сульфиды. Образующийся в результате минеральный комплекс мышьяка и сульфида (As_2S_3) спонтанно выпадает в осадок и откладывается как внутри клеток бактерий *Desulfotomaculum*, так и снаружи. А сам процесс образования минералов, осуществляющийся с использованием бактериальной активности, называется **биоминерализацией**.

Фумаратное дыхание и другие типы анаэробного дыхания с использованием органических веществ в качестве акцепторов электронов

Фумаратное дыхание отличается от всех описанных ранее способов анаэробного дыхания следующими особенностями: во-первых, это 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 прокариот. Во всех известных в настоящее время случаях прокариоты, способные осуществлять фумаратное дыхание – хемоорганотрофы, которые обладают также способностью к брожению. Таким образом, использование фумарата в качестве акцептора электронов при дыхании является лишь дополнительным

механизмом, позволяющим прокариотам получать большее количество энергии в анаэробных условиях.

Восстановление фумарата в клетках прокариот 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 бактерий 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.

Кроме фумарата некоторые прокариоты могут использовать в процессе анаэробного дыхания такие органические акцепторы электронов, как триметил-N-оксид и диметилсульфоксид, которые восстанавливаются до диметиламина и диметилсульфида соответственно. Восстанавливать триметил-N-оксид способны некоторые факультативно-анаэробные хемотрофные бактерии и отдельные фототрофные пурпурные несерные бактерии в темноте, а диметилсульфоксид – представители родов *Campylobacter*, *Escherichia* и многие фототрофные пурпурные бактерии.

В качестве акцепторов электронов при анаэробном дыхании могут также использоваться некоторыми денитрифициирующими, сульфатредуцирующими, метаногенными прокариотами поверхностью-активные вещества алкилбензолсульфонаты и гетероциклические соединения (индол, хинолин, производные пиридина, фурана, никотиновой кислоты), в процессе которого происходит их биодеградация.

1.7.1.3. 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, уксусная, 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

Спиртовое брожение характерно в основном для дрожжей, особенно для видов рода *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. uvarum* и др.) и поэтому большая часть этилового спирта, получаемая промышленным путем, синтезируется в результате анаэробного сбраживания глюкозы и других гексоз этими микроорганизмами.

При спиртовом брожении у дрожжей процесс катаболизма глюкозы происходит по гликолитическому пути до стадии образования пировиноградной кислоты. Далее осуществляется ее декарбоксилирование пируватдекарбоксилазой при участии тиаминпиофосфата, в результате чего образуются ацетальдегид и CO_2 . Образовавшийся ацетальдегид выступает конечным акцептором водорода. Он при помощи алкогольдегидрогеназы восстанавливается до этанола (рисунок 50).

Суммарная реакция процесса спиртового брожения выражается следующим уравнением:

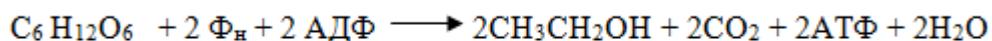


Рисунок 50 – Схема спиртового брожения у дрожжей

Энергетический выход спиртового брожения у дрожжей составляет 2 молекулы АТФ на 1 молекулу катаболизированной глюкозы, что значительно меньше выхода АТФ при аэробном метаболизме. Было установлено, что при смене аэробных условий на анаэробные скорость расщепления глюкозы возрастает в 3 – 4 раза. Переход же от анаэробного метаболизма к аэробному сопровождается снижением скорости катаболизма глюкозы, и образование спирта прекращается, т. е. процесс спиртового брожения ингибируется. Это

явление получило название «**эффекта Пастера**». «Эффект Пастера» – результат взаимодействия между различными энергетическими путями у дрожжей. В присутствии кислорода процессы окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи и субстратного фосфорилирования на уровне гликолиза конкурируют за АДФ и неорганический фосфат. В анаэробных условиях активность фософруктокиназы возрастает, поскольку она активируется АДФ и АМФ, и для ферментов, катализирующих реакции субстратного фосфорилирования, становится доступным большее количество АДФ. Все это способствует большему оттоку субстратов на гликолитический путь.

Спиртовое брожение осуществляют не только дрожжи, но и некоторые виды бактерий, принадлежащие к разным таксономическим группам, например *Sarcina ventriculi*, *Erwinia amylovora*, *Zymomonas mobilis*, *Zymomonas anaerobica*. Бактерии вида *Sarcina ventriculi*, строгие анаэробы, способные расти в чрезвычайно кислой среде, и бактерии вида *Erwinia amylovora*, факультативные анаэробные энтеробактерии, сбраживают глюкозу до этанола и СО₂ по гликолитическому пути с участием пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы. Кроме этанола и СО₂ в небольших количествах образуются и побочные продукты: ацетат и молекулярный водород (*S. ventriculi*) и лактат (*E. amylovora*). У бактерий *Zymomonas mobilis*, используемых в Мексике для получения национального спиртового напитка «пульке», катаболизм глюкозы до пировиноградной кислоты идет по пути Энтиера-Дудорова. Дальнейшее превращение пирувата происходит с участием пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы. Выход продуктов брожения – по 2 молекулы этанола и СО₂ на 1 молекулу сброшенной глюкозы (как и при спиртовом брожении по гликолитическому пути), но энергетический выход в 2 раза ниже, чем при гликолизе: всего 1 молекула АТФ на 1 молекулу сброшенной глюкозы.

Кроме приведенных бактерий, значительные количества этанола образуют в процессе жизнедеятельности такие мезофильные бактерии, как *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Clostridium sporogenes*, *Spirochaeta aurantia*, а также термофильные бактерии *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *C. thermocellum*.

Значение спиртового брожения велико. Этот процесс лежит в основе виноделия, пивоварения, производства спирта, хлебопечения, получения кваса и некоторых кисломолочных продуктов (кефира, кумыса и др.). Сырьем для производства спирта с использованием дрожжей служат углеводы растительного происхождения (картофель, злаки), отходы пищевой (мелассы) и целлюлозно-бумажной (щелока) промышленности, различные сельскохозяйственные отходы, а также гидролизаты древесины. Сбраживание дрожжами фруктовых соков лежит в основе виноделия; сбраживание пивного сусла, приготовленного из проросших зерен ячменя, специальными пивными дрожжами – в основе пивоварения.

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 НАДН, 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) (рисунок 51).

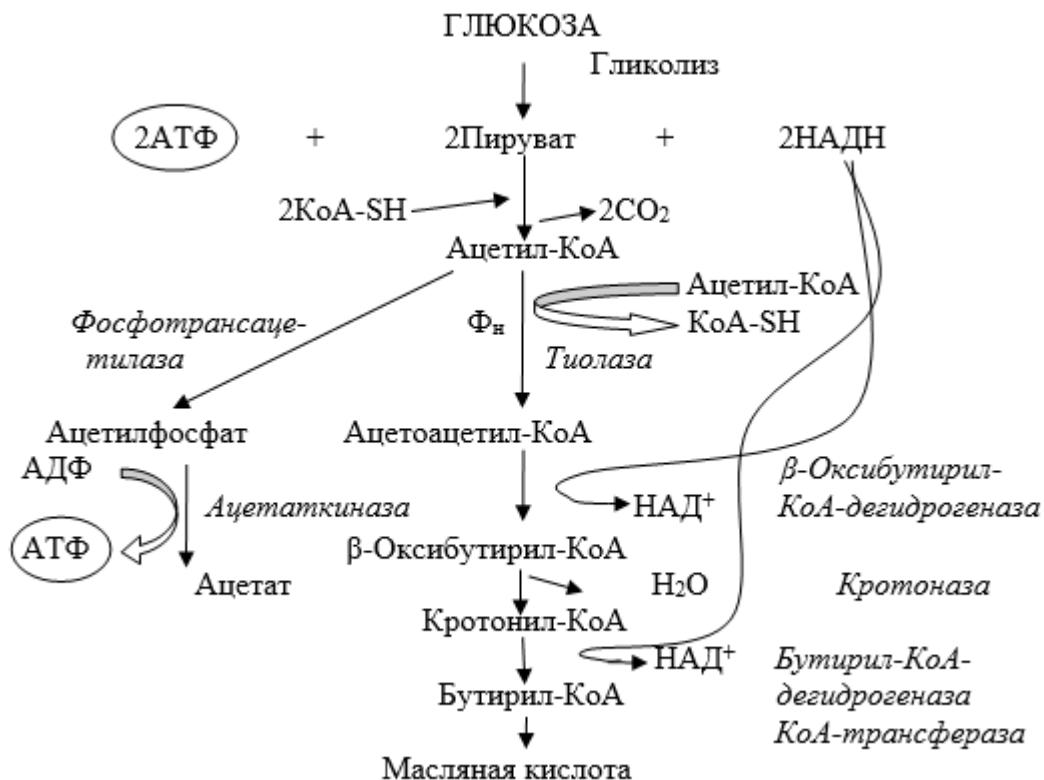


Рисунок 51 – Схема маслянокислого брожения

Определение энергетического выхода маслянокислого брожения и установление его уравнения затруднено из-за лабильности процесса, состоящего из двух основных ответвлений, одного – окислительного, ведущего к синтезу ацетата и АТФ, другого – восстановительного, функция которого – акцептирование водорода, образующегося в процессе гликолиза. Количественное соотношение между обоими ответвлением 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.

Некоторые клоストридии (*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. cellobioparum* и др.) при сбраживании углеводов наряду с кислотами накапливают в среде нейтральные продукты (бутиловый, изопропиловый, этиловый спирты, ацетон). Особенно много нейтральных продуктов образуется культурой *C. acetobutylicum*, что дало основания в свое время выделить как вариант маслянокислого брожения *ацетонобутиловое брожение* (рисунок 52).

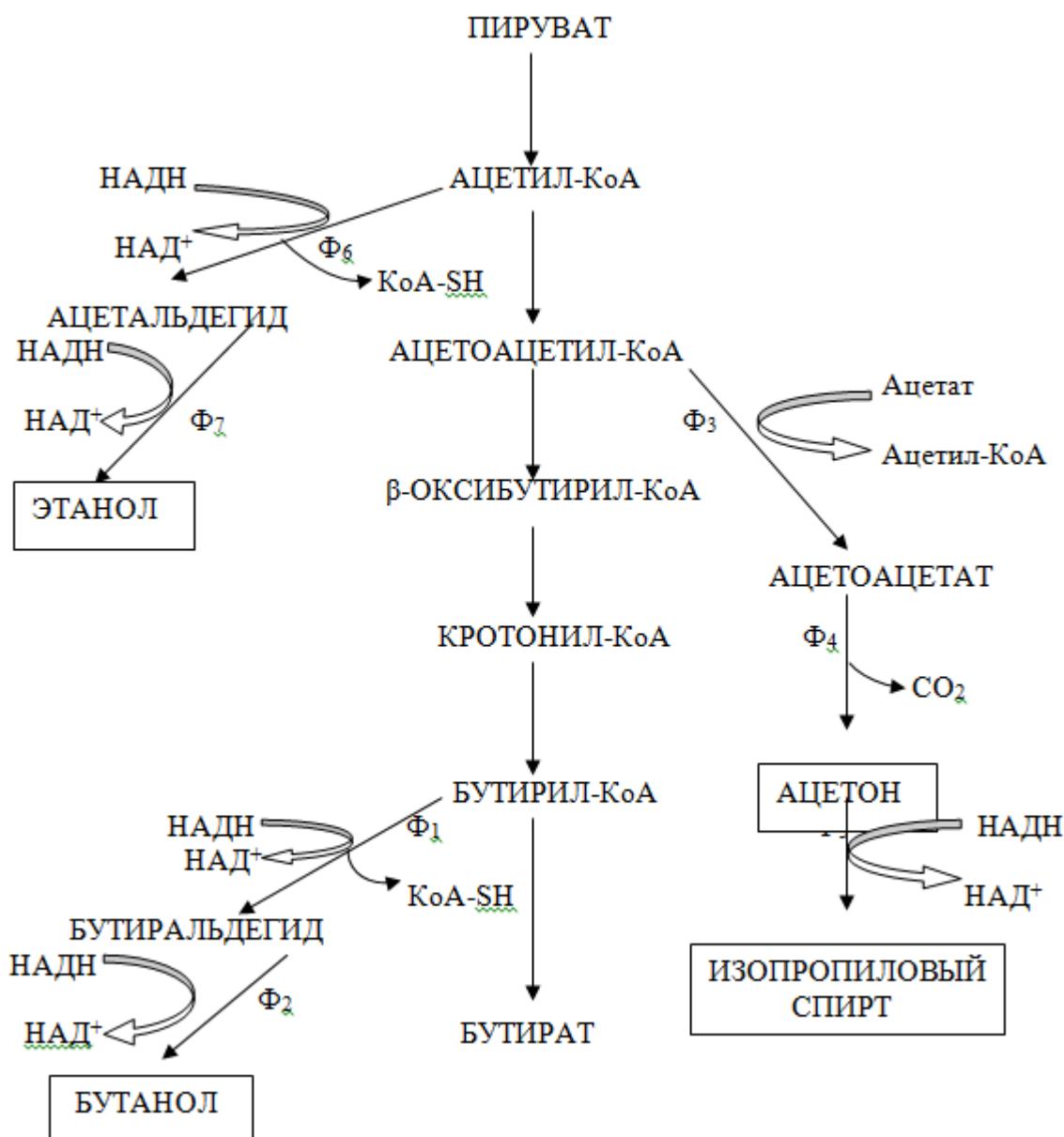


Рисунок 52 – Образование нейтральных продуктов при ацетонобутиловом брожении: Φ_1 – бутиральдегиддегидрогеназа; Φ_2 – бутанолдегиддегидрогеназа; Φ_3 – КоA-трансфераза; Φ_4 – ацетоацетатдекарбоксилаза; Φ_5 – изопропанолдегиддегидрогеназа; Φ_6 – ацетальдегиддегидрогеназа; Φ_7 - алкогольдегидрогеназа

Установлено, что ацетонобутиловое брожение имеет двухфазный характер. В течение первой фазы наблюдается активный рост бактерий, в среде идет накопление преимущественно органических кислот (масляной и уксусной). Во второй фазе брожения снижается pH среды, рост бактерий замедляется, преобладает синтез нейтральных продуктов – ацетона, бутанола и этанола. Бутанол образуется из бутирил-КоА, предшественника масляной кислоты, в результате двух последовательных ферментативных реакций. Первая из них приводит к образованию масляного альдегида (бутиральдегида), который восстанавливается с помощью НАДН в бутанол. Путь, ведущий к образованию ацетона, начинается с переноса от ацетоацетил-КоА кофермента А на ацетат. Декарбоксилирование ацетоуксусной кислоты приводит к образованию ацетона. Получение этанола происходит в результате двухступенчатого восстановления ацетил-КоА.

Двухфазность ацетонобутилового брожения связана с pH среды. Когда кислотность среды в результате накопления органических кислот возрастает до pH 4,5 и более, происходит интенсивное образование нейтральных продуктов, что предупреждает дальнейшее подкисление среды, неблагоприятное для бактерий.

Бактерии рода *Clostridium*, осуществляющие маслянокислое и ацетонобутиловое брожение, находят практическое применение. Их используют в производстве масляной кислоты, необходимой для парфюмерной промышленности, а также для получения в промышленном масштабе ацетона и бутанола. Для производства этих продуктов используют картофель, зерно, мелассу и другое сырье, содержащее углеводы.

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. Кроме того, многие клостридии патогенны и вызывают заболевания человека и животных.

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 (рисунок 53).

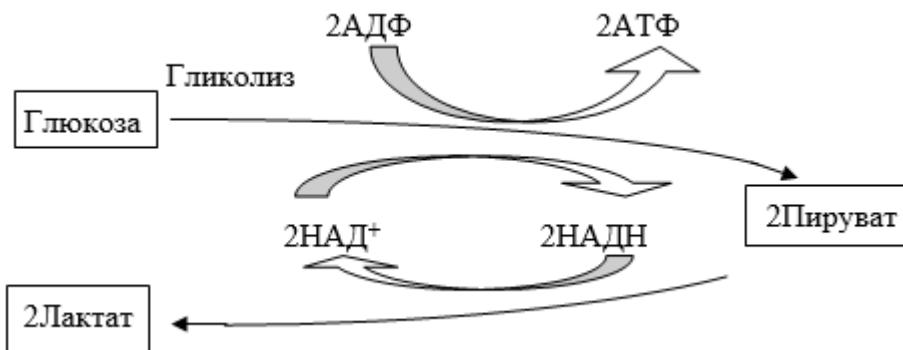


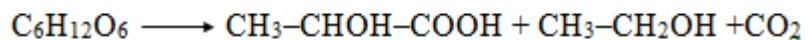
Рисунок 53 – Схема гомоферментативного молочнокислого брожения

Гомоферментативное молочнокислое брожение идет по следующему суммарному уравнению:

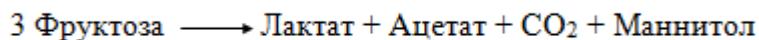


Возбудителями гомоферментативного молочнокислого брожения являются, например, бактерии *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* и др.

Гетероферментативное молочнокислое брожение приводит к образованию не только молочной кислоты, но и этилового спирта и диоксида углерода. При этом типе брожения катаболизм углеводов происходит по пентозофосфатному пути. Конечными акцепторами водорода являются пировиноградная кислота и ацетальдегид. Гетероферментативное молочнокислое брожение осуществляется согласно уравнению:



Некоторые другие гетероферментативные молочнокислые бактерии приводят к образованию также ацетата. При сбраживании фруктозы гетероферментативными молочнокислыми бактериями образуются лактат, ацетат, CO₂ и маннитол:

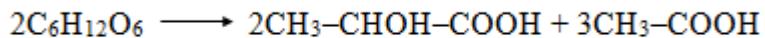


Фруктоза при этом служит акцептором избыточных восстановительных эквивалентов:



Возбудителями гетероферментативного молочнокислого брожения являются бактерии *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum*, *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus* и др.

В процессе брожения, осуществляемого бифидобактериями, образуется лактат и ацетат:



Катаболизм углеводов в этом случае происходит по пентозофосфатному пути или по пути Энтнера – Дудорова. Возбудителями такого брожения являются бактерии вида *Bifidobacterium bifidum* и другие бифидобактерии.

Молочнокислое брожение находит широкое применение в различных отраслях хозяйственной деятельности человека: в процессе приготовления кисломолочных продуктов, сырокопченых и сыровяленых колбас, квашения овощей и фруктов, в хлебопечении, для силосования кормов, биологической выделки кож, получения чистой молочной кислоты, которая используется в качестве консерванта в пищевой и косметической промышленности, как добавка к пищевым продуктам, в производстве пластмасс. Молочнокислые бактерии входят в состав нормальной микробиоты 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 сукцинатата.

Акрилатный путь присущ, по-видимому, только некоторым 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 (рисунок 54).

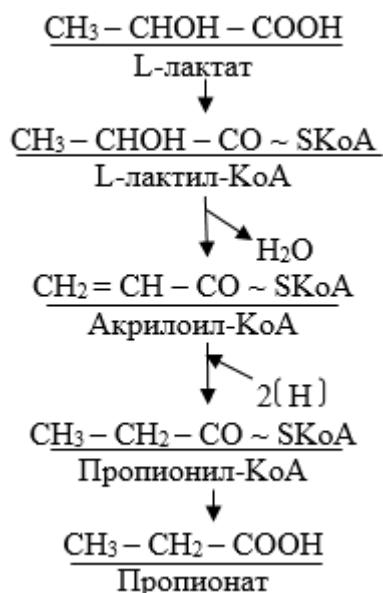


Рисунок 54 – Акрилатный путь пропионовокислого брожения

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 сколько-нибудь значительных количеств сукцината.

Этот тип брожения называют еще метилмалонил-КоА-путем, потому что в нем образуется характерный промежуточный продукт – метилмалонил-КоА (рисунок 55).

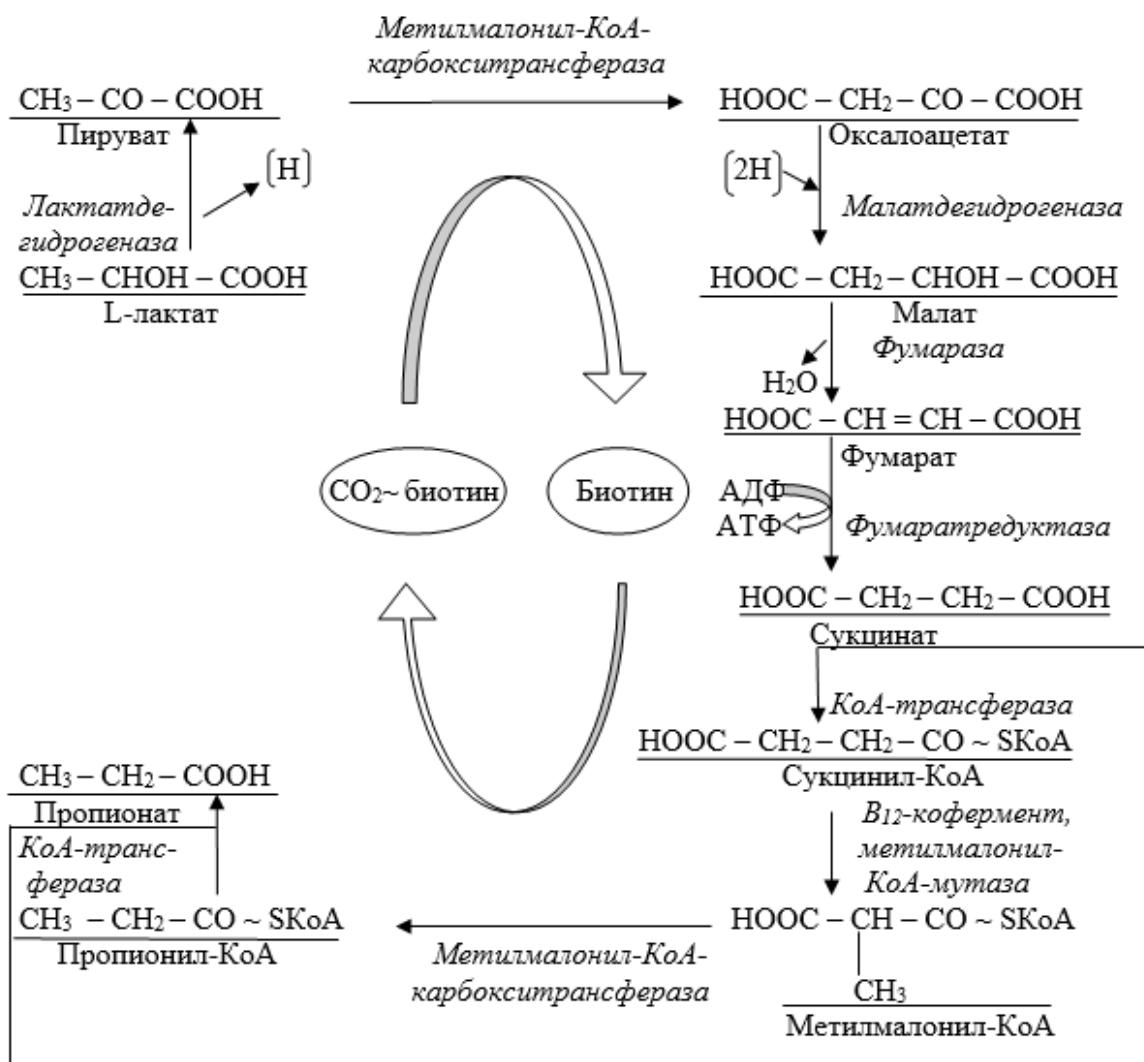


Рисунок 55 – Метилмалонил-КоА-путь образования пропионовой кислоты бактериями

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-мутазы и при участии кофактора В₁₂ превращается в метилмалонил-КоА, после декарбоксилирования которого образуется пропионил-КоА. Молекула CO_2 связывается с метилмалонил-КоА-карбокситрансферазой, что вновь приводит к образованию комплекса $\text{CO}_2 \sim \text{биотин}$. Синтез пропионата происходит в результате реакции переноса КоА от пропионил-КоА на сукцинат при участии фермента КоА-трансферазы. 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, КоA и кофермент В₁₂).

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 В₁₂, их также используют для его промышленного получения.

Брожение смешанного типа, или муравьинокислое брожение

Этот вид брожения характерен в основном 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, СО₂ 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 СО₂ и Н₂ (в соотношении 1:1), образуется этанол и совсем не синтезируется 2,3-бутандиол (рисунок 56).



Рисунок 56 – 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.

Такой тип смешанного брожения характерен также для многих бактерий родов *Bacillus, Aeromonas, Veneckea* и *Photobacterium*.

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 СО₂ и этанола. Кроме того, основным продуктом такого брожения является 2,3-бутандиол и соответственно этот тип брожения называют иначе **бутандиоловым** (рисунок 57).

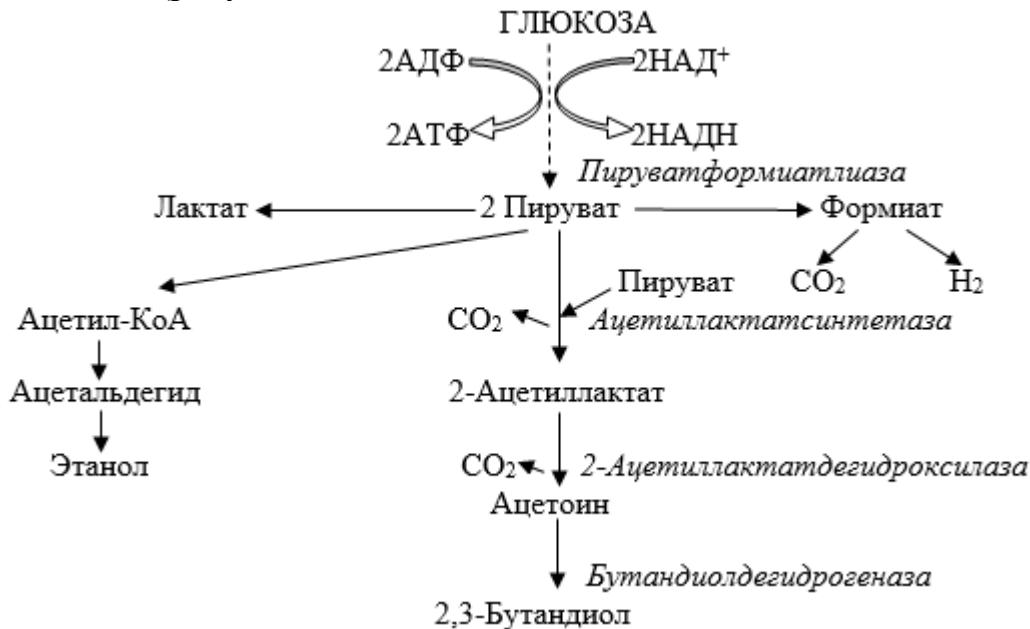


Рисунок 57 – Бутандиоловое брожение, характерное для бактерий родов *Enterobacter, Serratia, Pantoea, Erwinia, Pectobacterium*

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.

Смешанное брожение, сопровождающееся образованием 2,3-бутандиола, характерно также для многих бактерий родов *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio* и *Photobacterium*.

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.

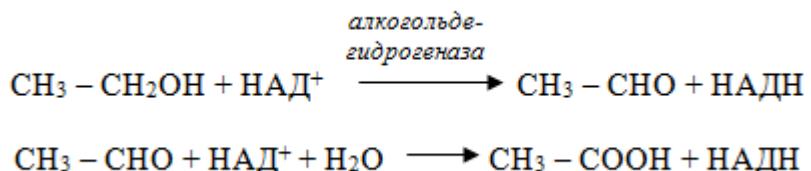
Неполное окисление органических веществ микроорганизмами

Большинство аэробных микроорганизмов окисляет органические вещества в процессе дыхания до CO_2 и воды. Поскольку в молекуле CO_2 достигается высшая степень окисления углерода, то говорят о полном окислении органических веществ. Однако некоторые бактерии и грибы даже простые органические субстраты окисляют лишь частично и выделяют в среду продукты неполного окисления – органические кислоты и другие соединения. Такого рода кислотообразование приводит к снижению рН среды, препятствуя росту других бактерий. Процесс неполного аэробного окисления называют также «аэробным, или окислительным брожением», потому что в нем образуются продукты, сходные с получаемыми при брожениях. При неполном окислении могут образовываться уксусная, глюконовая, фумаровая, лимонная и другие органические кислоты, оксокислоты, кетоны и даже аминокислоты, поэтому оно имеет большое значение для промышленного получения этих веществ.

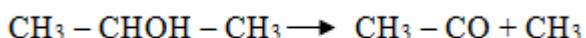
Неполное окисление органических веществ осуществляют облигатно аэробные микроорганизмы. Они могут рассматриваться как специализированная группа микроорганизмов, быстро растущих за счет частичного окисления того или иного органического субстрата, который временно накапливается в среде их обитания в большом количестве. Таким субстратом может быть, например, этанол, образующийся в результате быстрого сбраживания растительных соков (сахаристых выделений растений) кислотоустойчивыми дрожжами. Обитающие совместно с ними уксуснокислые бактерии окисляют этанол до уксусной кислоты. При высокой концентрации этанола и образующейся из него уксусной кислоты другие микроорганизмы могут лишь сохранять жизнеспособность (если они кислото- и спиртоустойчивые), но не расти, т. е. создаются элективные условия для приспособленных к этой экстремальной среде микроорганизмов и предотвращается конкуренция за субстраты со стороны других микроорганизмов.

Уксуснокислые бактерии – облигатно аэробные грамотрицательные бесспоровые палочки с перитрихиально (род *Acetobacter*) или полярно (род *Gluconobacter*) расположеннымными жгутиками. Они сходны с псевдомонадами, но отличаются от них высокой устойчивостью к кислотам, слабой пептолитической активностью и отсутствием пигментов. В природных условиях уксуснокислые бактерии поселяются обычно на растениях. В сахаристых выделениях растений вместе с уксуснокислыми бактериями обитают дрожжи.

Уксуснокислые бактерии осуществляют *уксуснокислое брожение*, окисляя первичные спирты, такие как этанол, до ацетата в два этапа:



Вторичные спирты окисляются до кетонов:



Многоатомные спирты, являющиеся производными сахаров, окисляются этими бактериями в альдозы и кетозы, например: сорбит \rightarrow сорбоза; глицерин \rightarrow диоксиацетон. Альдозы и кетозы могут далее окисляться в соответствующие кислоты.

Таким образом, круг окисляемых соединений различен для разных представителей, входящих в эту группу. Однако, наиболее характерна способность этих бактерий окислять этиловый спирт в уксусную кислоту, давшая название всей группе в целом.

Дальнейшая судьба полученных в результате неполного окисления продуктов различна. Некоторые уксуснокислые бактерии не способны к дальнейшим превращениям образовавшихся соединений. Эти бактерии объединены в род *Gluconobacter* (единственный вид – *G. oxydans*). Они окисляют глюкозу до глюконовой кислоты, этанол до ацетата. Далее эти продукты не могут окисляться из-за отсутствия «замкнутого» цикла трикарбоновых кислот (не синтезируется сукцинатдегидрогеназа).

Вторую группу составляют бактерии, способные к полному окислению органических субстратов до CO_2 и H_2O . Образовавшийся ацетат представляет собой промежуточный этап, и после исчерпания из среды исходного субстрата бактерии начинают медленно окислять ацетат, включая его в механизм конечного окисления – ЦТК. Бактерии этой группы объединены в род *Acetobacter*, типичным представителем которого является вид *A. peroxydans*.

Молекулы АТФ у уксуснокислых бактерий образуются в процессе электронтранспортного (мембранныго) фосфорилирования, т. е. электроны от окисляемых субстратов поступают в дыхательную цепь и далее через систему

переносчиков передаются на O_2 , служащий конечным акцептором электронов. Электронный транспорт приводит к генерированию электрохимического трансмембранныго градиента ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), который затем может быть использован для синтеза АТФ с помощью АТФ-синтазной реакции.

Место включения электронов в дыхательную цепь определяется ферментом, катализирующим соответствующую окислительную реакцию. Если окисление катализируется НАД-зависимой дегидрогеназой (НАДН-дегидрогеназой), электроны (водород) предаются на $NA\bar{D}^+$ и с него на переносчики, локализованные на мембране, что приводит к сопряжению электронного транспорта с тремя трансмембранными перемещениями протонов и, соответственно, синтезу 3 молекул АТФ. У некоторых представителей родов *Acetobacter* и *Gluconobacter* обнаружены дегидрогеназы, содержащие в качестве простетической группы соединение из группы хинонов, способные принимать и отдавать 2 атома водорода. Хинонсодержащие дегидрогеназы локализованы на внешней стороне цитоплазматической мембраны, где и происходит окисление этанола и других соединений. Электроны поступают в дыхательную цепь на уровне цитохромов, а протоны выделяются в периплазматическое пространство.

Уксуснокислые бактерии вида *Acetobacter aceti* применяются в микробиологической промышленности для получения столового уксуса. Еще один биотехнологический процесс, осуществляемый с использованием уксуснокислых бактерий, – это окисление D-сорбитола в L-сорбозу, из которой далее путем химического окисления получают L-аскорбиновую кислоту. D-сорбитол образуют некоторые бактерии, восстанавливающие глюкозу при ее избытке в среде, и поэтому они используются для получения D-сорбитола в качестве исходного субстрата для производства аскорбиновой кислоты.

Показано, что некоторые представители рода *Bacillus* при росте в условиях избытка углеводов также осуществляют неполное окисление глюкозы с образованием ацетата, пирувата, ацетоина и бутандиола – продуктов, характерных для анаэробного брожения. Как и в случае уксуснокислых бактерий, при росте в условиях избытка углеводов за счет неполного окисления у бацилл работает «незамкнутый» цикл трикарбоновых кислот. В условиях дефицита питательных веществ, таких как фосфор или азот, клетки бактерий рода *Bacillus* переходят в стадию споруляции и используют продукты неполного окисления в качестве источника энергии, окисляя их до CO_2 .

Многие органические кислоты получают в промышленных масштабах с помощью грибов, осуществляющих неполное окисление.

В естественных местах обитания грибов, т. е. в почве, никогда не бывает заметного накопления промежуточных продуктов их жизнедеятельности. При недостатке питательных веществ, грибы получают максимум энергии и образуют клеточные вещества за счет полного окисления и ассимиляции субстрата. При избыточном снабжении грибов углеводами и отклонении в обмене веществ (часто этому способствует исключение из среды некоторых микроэлементов) происходит неполное окисление и промежуточные продукты прямо или после незначительных химических изменений выделяются в среду:



Молочную кислоту синтезируют главным образом грибы видов *Rhizopus nodosus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. nigricans*, а также родов *Allomyces*, *Saprolegnia*, *Blastocladiella*. Однако у грибов она никогда не бывает единственным продуктом, как например, у гомоферментативных молочнокислых бактерий. Наряду с молочной кислотой грибы образуют в небольших количествах фумаровую, янтарную, яблочную, муравьиную и уксусную кислоты, а также этанол. Для получения максимального выхода молочной кислоты необходимо присутствие O_2 . Но поскольку грибы не нуждаются в сложных питательных средах и в качестве источника азота могут использовать мочевину, получать молочную кислоту в особо чистом виде с помощью грибов проще, чем использовать молочнокислое брожение, осуществляющее лактобациллами.

Способность к синтезу **фумаровой кислоты** характерна для многих родов грибов (*Mucor*, *Circinella*, *Cunninghamella*, *Rhizopus*).

Глюконовую кислоту синтезируют многие аспергиллы и пенициллы. Это продукт ферментативного окисления глюкозы глюкозооксидазой, выделяемой ими в питательную среду.

Щавелевую кислоту выделяют многие грибы. Её образованию способствует щелочная реакция среды.

Продуцентом **лимонной кислоты** являются, в первую очередь, грибы вида *Aspergillus brasiliensis*. Этот гриб превосходно растет на средах с начальными значениями pH от 2,5 до 3,5 и синтезируют при этом большие количества лимонной кислоты. С повышением pH появляется сначала глюконовая кислота, а затем щавелевая. Низкое начальное значение pH имеет то преимущество, что позволяет не опасаться бактериального загрязнения. Поэтому промышленное производство лимонной кислоты до сих пор часто ведется без соблюдения стерильности, поверхностным способом в кюветах, хотя все более широко применяют глубинный метод.

Итаكونовую кислоту синтезируют лишь немногие штаммы грибов *Aspergillus itaconicus* и *A. terreus*. Этот процесс также происходит при pH среды около 2,0.

1.7.2. 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. (рисунок 58)



Рисунок 58 – Общая схема путей биосинтеза клеточного материала из глюкозы

Мономеры синтезируются из промежуточных метаболитов (амфиболитов), которые образуются при катаболизме глюкозы. Такими промежуточными метаболитами являются пентозофосфаты, фосфоенолпириват, пираноза, 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.

1.7.2.1. Биосинтез аминокислот

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

как α -кетоглутаровая, щавелевоуксусная, пировиноградная, 3-фосфоглицериновая, фосфоенолпироноградная 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 (таблица 8).

Таблица 8 – Предшественники для биосинтеза аминокислот

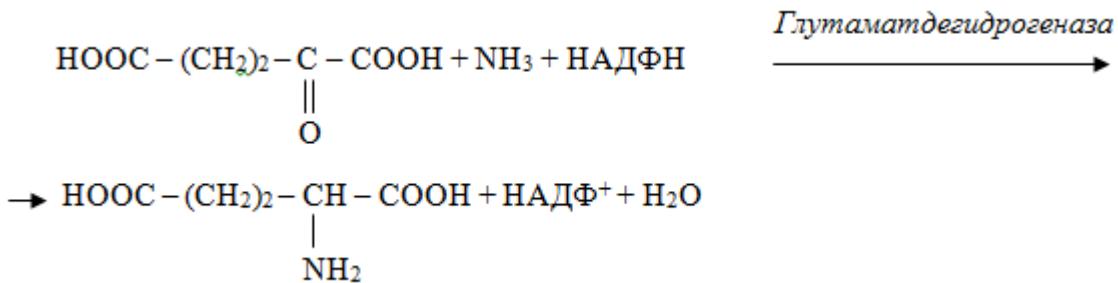
Предшественник	Метаболический путь, приводящий к образованию предшественника	Аминокислоты с общими биосинтетическими путями
Пировиноградная кислота	Гликолиз, путь Энгера – Дудорова, окислительный пентозофосфатный путь	Аланин Валин Лейцин
Щавелевоуксусная кислота	Цикл Кребса, реакции карбоксилирования	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
Фосфоенолпироноградная кислота + эритрозо-4-фосфат	Гликолиз Оксилительный пентозофосфатный путь	Фенилаланин Триптофан Тирозин
5-Фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ	Оксилительный пентозофосфатный путь	Гистидин

Как видно из таблицы 8, щавелевоуксусная кислота представляет собой отправную точку для синтеза шести аминокислот, α -кетоглутаровая кислота является предшественником четырех, а пировиноградная и 3-фосфоглицериновая – трех аминокислот.

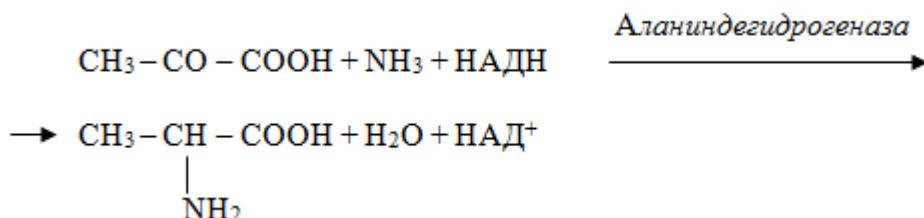
Источником азота для аминокислот у разных групп бактерий являются нитраты, нитриты, молекулярный азот, аммиак. Перевод неорганического азота в органические соединения происходит всегда через образование аммиака, и поэтому нитраты, нитриты, молекулярный азот предварительно восстанавливаются до аммиака и только после этого включаются в состав органических соединений.

Биосинтез аминокислот происходит различными путями. Наиболее простой способ – **восстановительное аминирование кетокислот аммиаком**.

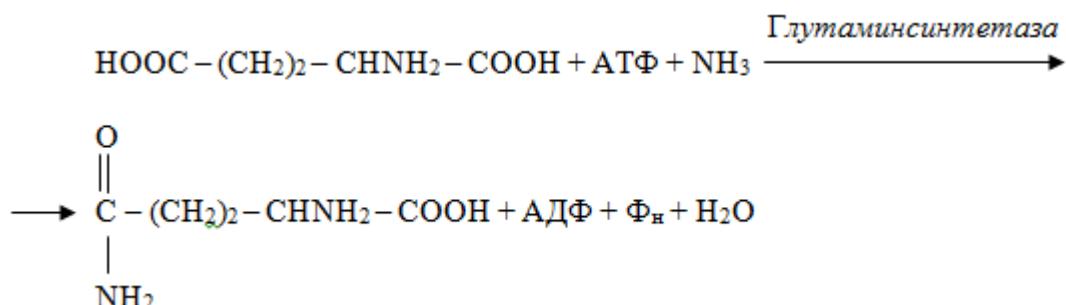
Например, при взаимодействии α -кетоглутаровой кислоты с аммиаком при участии фермента глутаматдегидрогеназы образуется глутаминовая кислота:



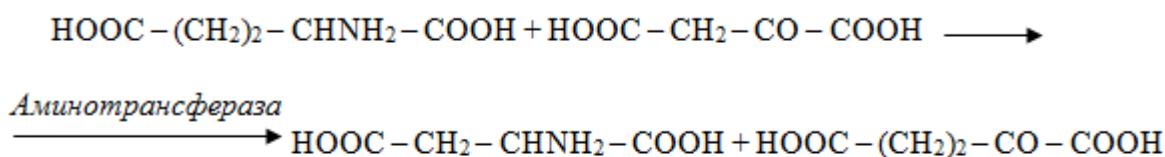
При участии фермента аланиндецидрогеназы пировиноградная кислота взаимодействует с аммиаком с образованием аланина:



Некоторые аминокислоты образуются путем *амидирования*. Например, из глутаминовой кислоты с участием фермента глутаминсингтетазы 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 и тирозина. Как уже отмечалось, исходными веществами для их синтеза являются эритрозо-4-фосфат и фосфоенолпируват, из которых по шикиматному пути образуется хоризмат (рисунок 59).

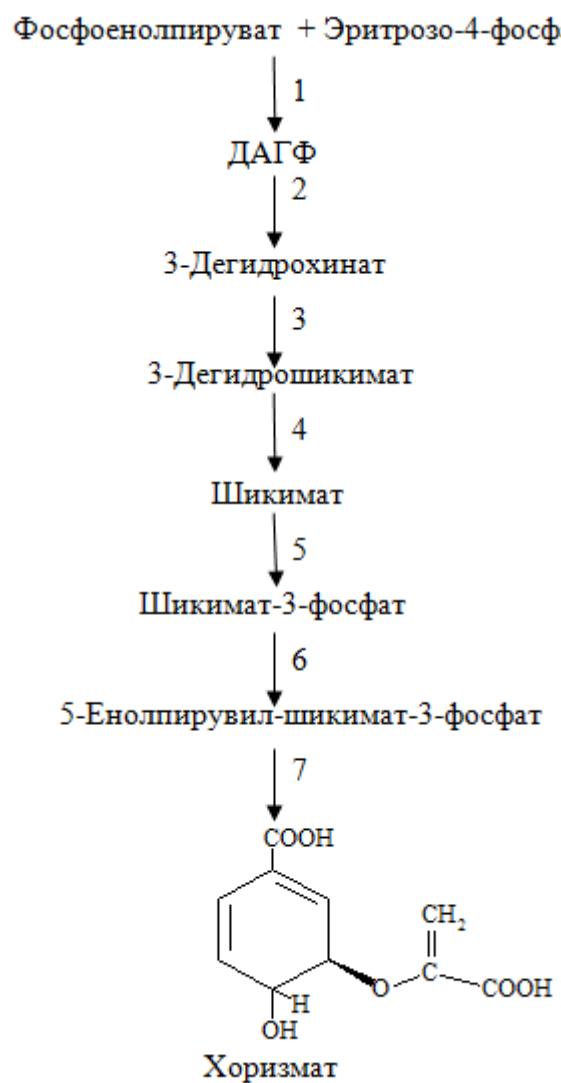


Рисунок 59 – Шикиматный путь синтеза ароматических соединений. Цифрами обозначены ферменты: 1 – ДАГФ-синтаза; 2 – ДГХ-синтаза; 3 – ДГХ-дегидратаза; 4 – шикиматдегидрогеназа; 5 – шикиматкиназа; 6 – ЕПШФ-синтаза; 7 – хоризматсинтаза

Шикиматный путь одинаков у всех известных микроорганизмов и включает семь последовательных реакций. Ключевым ферментом шикиматного пути, на

уровне которого осуществляется контроль синтеза всех без исключения ароматических соединений, является 3-дезокси-D-арабино-гептулозо-7-фосфатсингтаза (ДАГФ-сингтаза), катализирующая реакцию конденсации эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата с образованием 3-дезокси-D-арабиногептулозо-7-фосфата (ДАГФ). После этого в реакцию вступает 3-дегидрохинатсингтаза (ДГХ-сингтаза), катализирующая циклизацию этого соединения, что приводит к образованию 3-дегидрохината, который с помощью 3-дегидрохинатдегидратазы (ДГХ-дегидратаза) превращается в 3-дегидрошикимат. Далее шикиматдегидрогеназа катализирует НАДФН⁺-зависимую реакцию, обеспечивающую превращение 3-дегидро-шикимата в шикимат. Фосфорилирование шикимата в шикимат-3-фосфат осуществляется ферментом шикиматкиназа. После этого 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфатсингтаза (ЕПШФ-сингтаза) катализирует реакцию конденсации шикимат-3-фосфата и фосфоенолпирувата, в результате чего образуется 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфат. Хоризматсингтаза обеспечивает синтез хоризмата из 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфата.

Хоризмат является ключевым соединением, на уровне которого осуществляется разветвление шикиматного пути. Хоризмат служит предшественником большого числа различающихся между собой в функциональном отношении первичных и вторичных метаболитов: аминокислот триптофана, фенилаланина и тирозина (рисунок 60), убихинонов, менахинонов, фолиевой кислоты, сидерофоров катехольного типа, некоторых антибиотиков, а также ряда пигментов.

Биосинтез триптофана из хоризмата осуществляется через антракилат у всех без исключения бактерий и включает пять последовательных реакций. Первая реакция катализируется ключевым ферментом – антракилатсингтазой с образованием антракилата. Дальнейшее превращение антракилата в 5-фосфорибозилантракилат происходит при участии антракилат-5-фосфорибозилтрансферазы. Третий этап синтеза триптофана осуществляется ферментом N-5-фосфорибозил-антракилатизомеразой. Далее образующийся в этой реакции 1-(o-карбоксифениламино)-1-дезоксирибулозофосфат карбоксилируется ферментом индол-3-глицерофосфатсингтазой в индол-3-глицерофосфат. Заключительные реакции синтеза триптофана катализируются ферментом триптофансингтазой, одна субъединица которой осуществляет превращение индол-3-глицерофосфата в индол, а другая производит дальнейшее превращение индола в триптофан при участии L-серина.

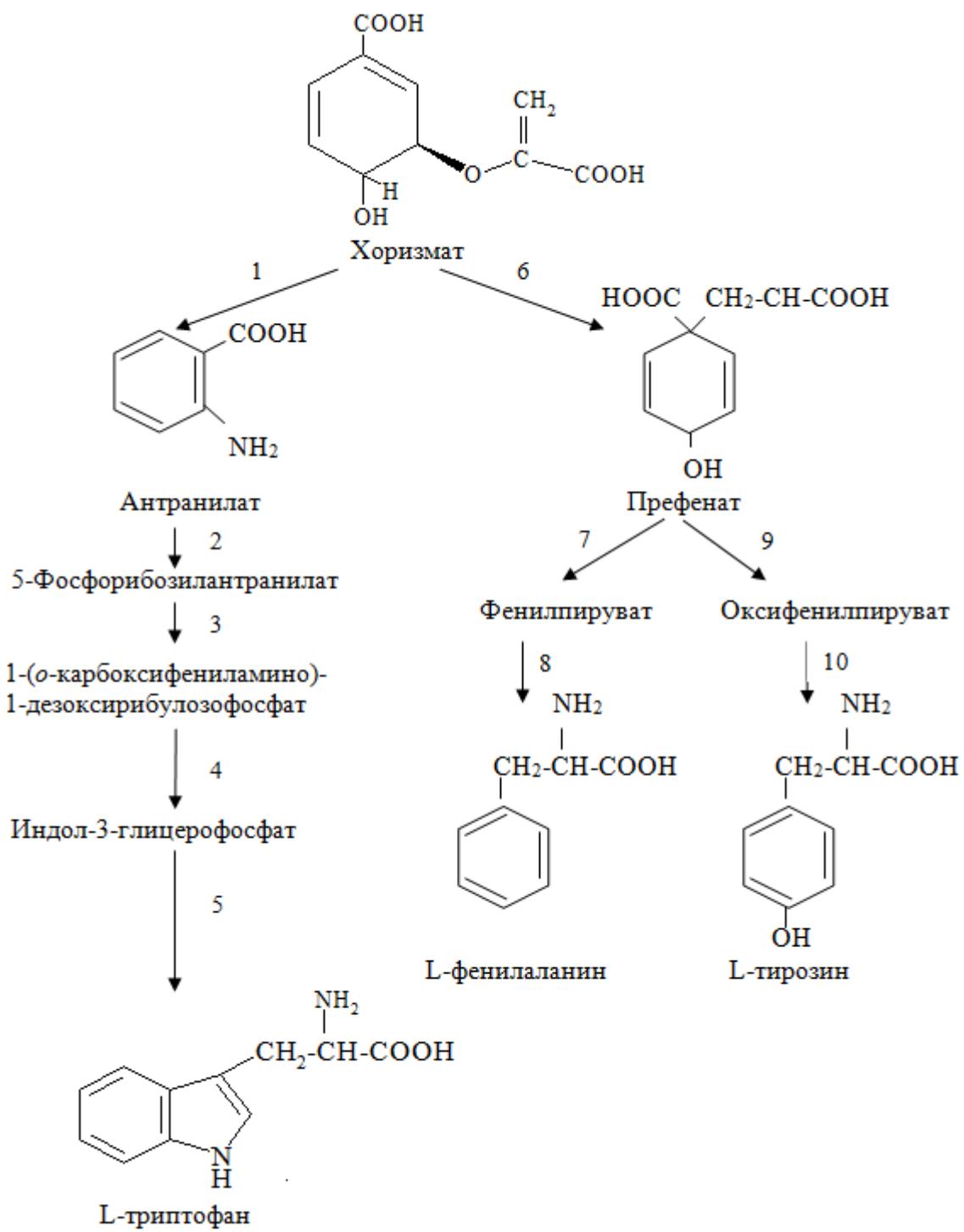


Рисунок 60 – Биосинтез ароматических аминокислот из хоризмата. Цифрами обозначены ферменты: 1 – антранилатсинтаза; 2 – антранилат-5-fosфорибозилтрансфераза; 3 – N-5-фосфорибозилантанилатизомераза; 4 – индол-3-глицерофосфатсинтаза; 5 – триптофансинтаза; 6 – хоризматмутаза; 7 – префенатдегидратаза; 8 – фенилпируватаминотрансфераза; 9 – префенатдегидрогеназа; 10 – тирозинаминотрансфераза.

Вторым важнейшим элементом ароматического пути является биосинтетическая ветвь, обеспечивающая **синтез аминокислот фенилаланина и тирозина**. Синтез данных аминокислот протекает с участием

общего предшественника – префената, синтез которого осуществляется в реакции, катализируемой ферментом хоризматмутазой. Разветвляясь после префената, путь синтеза фенилаланина и тирозина включает два этапа, каждый из которых катализируется ферментами префенатдегидратазой/фенилпируватаминотрансферазой и префенатдегидрогеназой/тирозинаминотрансферазой. Заключительный этап синтеза фенилаланина и тирозина обеспечивается соответствующей аминотрансферазой.

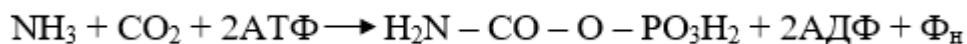
В заключение следует отметить, что некоторые гетеротрофные прокариоты, такие, например, как молочнокислые бактерии, не способны синтезировать некоторые аминокислоты, необходимые для их жизнедеятельности, поэтому их рост возможен только на сложных по составу питательных средах, содержащих ряд продуктов природного происхождения.

1.7.2.2. Биосинтез нуклеотидов

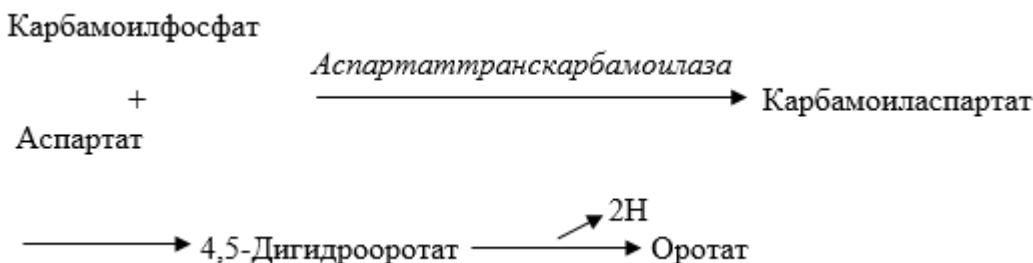
Нуклеотиды являются исходным материалом для биосинтеза нуклеиновых кислот. Кроме того, нуклеотиды входят в состав многих коферментов и участвуют в активации и переносе аминокислот, углеводов, компонентов клеточной стенки и липидов. Нуклеотиды – сложные соединения, состоящие из азотистых оснований (это производные пурина – аденин, гуанин и пуримидина – 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 пуримидиновых нуклеотидов. Предшественниками для синтеза пуримидиновых 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 пуримидиновое кольцо.

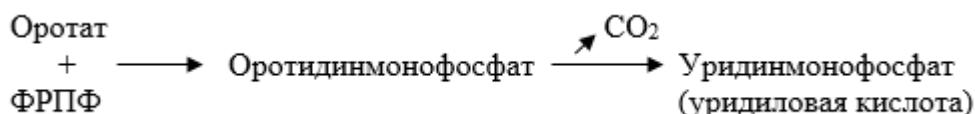


Прежде чем превратиться в одно из пуримидиновых оснований, оротат связывается с рибозо-5-фосфатом, который является исходным соединением для образования пентозного компонента нуклеотидов. Как известно, рибозо-5-фосфат может синтезироваться двумя путями:

- 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.

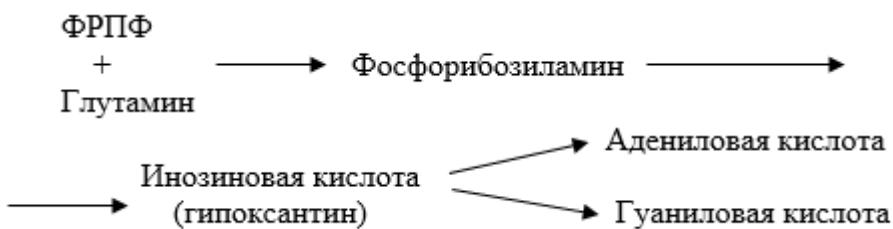
Для синтеза нуклеотидов рибозо-5-фосфат используется в высокоэнергетической форме – в виде фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ).

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 – тимилиловая 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.

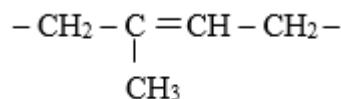


При синтезе дезоксирибонуклеотидов происходит восстановление рибозы до дезоксирибозы. Это происходит на стадии рибонуклеотидов, т. е. синтезируются рибонуклеотиды, а затем происходит восстановление их до дезоксирибонуклеотидов.

Синтезированные клеткой или усвоенные из среды нуклеотиды при участии РНК- и ДНК-полимераз полимеризуются в полинуклеотиды – молекулы РНК и ДНК.

1.7.2.3. 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:



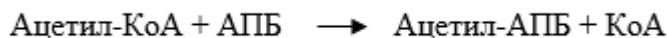
Из изопреновых фрагментов (путем их полимеризации) построены молекулы каротиноидов, хлорофиллов, хинонов. К соединениям липидной природы относятся и некоторые витамины и их производные.

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, входящие в состав цитоплазматической мембраны, – жирные кислоты и фосфолипиды.

Исходным субстратом для *синтеза жирных кислот* с четным числом углеродных атомов служит ацетил-КоА.

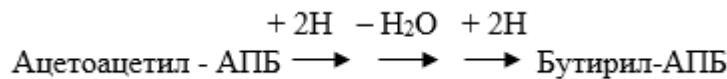
На первом этапе происходит перенос ацетильной группы от ацетил-КоА на молекулу особого белка, называемого ацилпереносящим белком (АПБ):



Ацетил-АПБ выполняет функцию затравки, к которой присоединяется C₂-фрагмент. Донором C₂-фрагмента служит молекула малонил-АПБ, синтезирующаяся также из ацетил-КоА. В результате присоединения C₂-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:

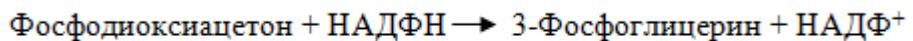


В результате конденсации бутирил-АПБ с новой молекулой малонил-АПБ и последующего восстановления продукта реакции образуется молекула C₆-жирной кислоты (капроил-АПБ). Последовательное наращивание C₂-остатков приводит к синтезу жирных кислот, содержащих обычно 16–18 углеродных атомов.

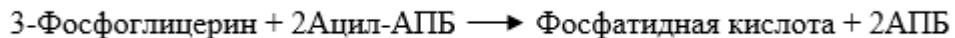
Жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов образуются в результате начальной конденсации пропионил-АПБ и малонил-АПБ.

В клетках бактерий компонентами липидов являются в основном насыщенные жирные кислоты или содержащие одну двойную связь (мононенасыщенные). Полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие две и более двойные связи, найдены до сих пор только у цианобактерий.

Исходным субстратом для **синтеза фосфолипидов** служит фосфодиоксиацитон (один из промежуточных продуктов гликолитического пути). Фосфодиоксиацитон восстанавливается с образованием 3-фосфоглицерина:



3-Фосфоглицерин взаимодействует с двумя остатками жирных кислот в виде комплекса с белком АПБ. Образуется фосфатидная кислота:



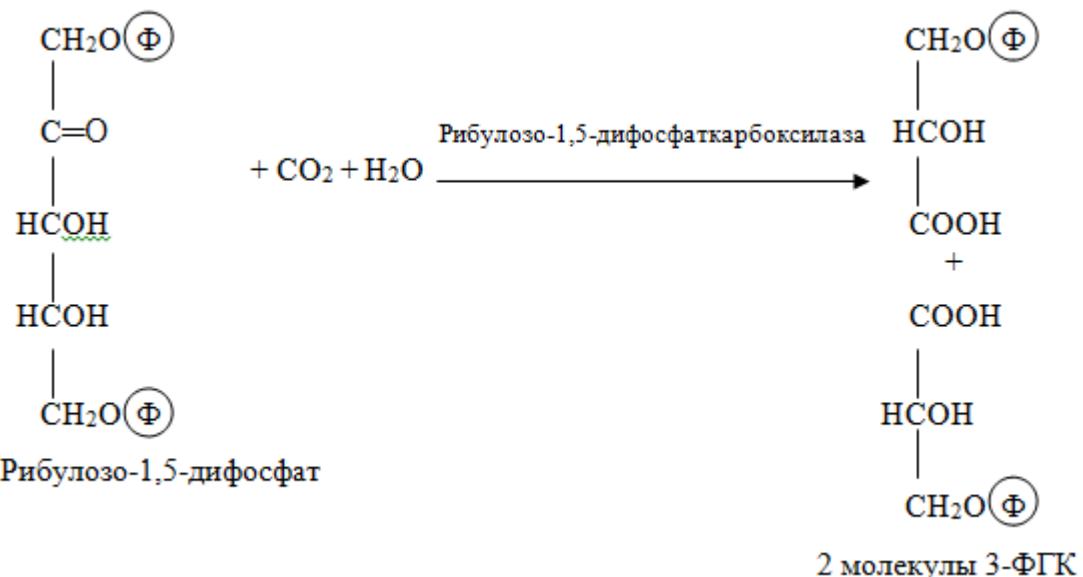
Присоединение к фосфатной группе фосфатидной кислоты серина, инозита, глицерина или другого соединения приводит соответственно, к синтезу фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и фосфатидилглицерина.

1.7.2.4. Биосинтез углеводов

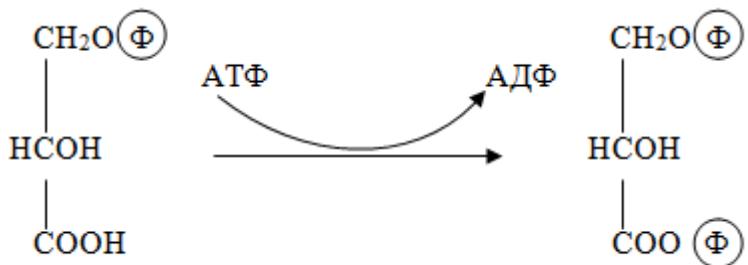
Если микроорганизмы – автотрофы, то исходным веществом для синтеза углеводов является CO_2 . Синтез углеводов происходит у большинства автотрофов в цикле Кальвина (восстановительный пентозофосфатный цикл), который функционирует так же, как и у растений. Цикл Кальвина – сложный путь, включающий некоторые реакции гликолиза и окислительного пентофосфатного пути. Но для цикла Кальвина характерны два специфических фермента, не участвующие в других метаболических путях, – фосфорибулокиназа, и рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза.

Цикл Кальвина можно разделить на три фазы: фиксация CO_2 (реакция карбоксилирования), восстановление фиксированного CO_2 (реакция восстановления) и регенерация акцептора CO_2 .

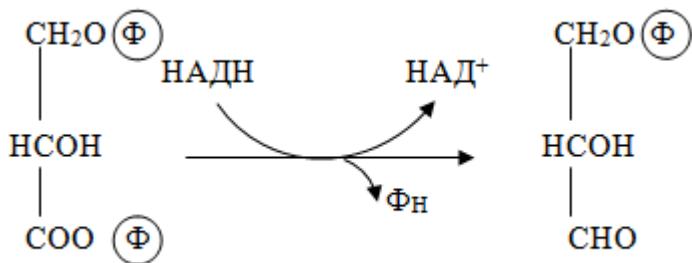
Фиксация CO_2 осуществляется с участием фермента рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы, катализирующей присоединение CO_2 к рибулозо-1,5-дифосфату с образованием двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты (3-ФГК):



В двух последующих реакциях карбоксильная группа 3-ФГК восстанавливается до альдегидной группы – **восстановление фиксированного CO₂**. В процессе первой реакции под действием фермента 3-fosфоглицераткиназы за счет АТФ 3-ФГК превращается в 1,3-ФГК:

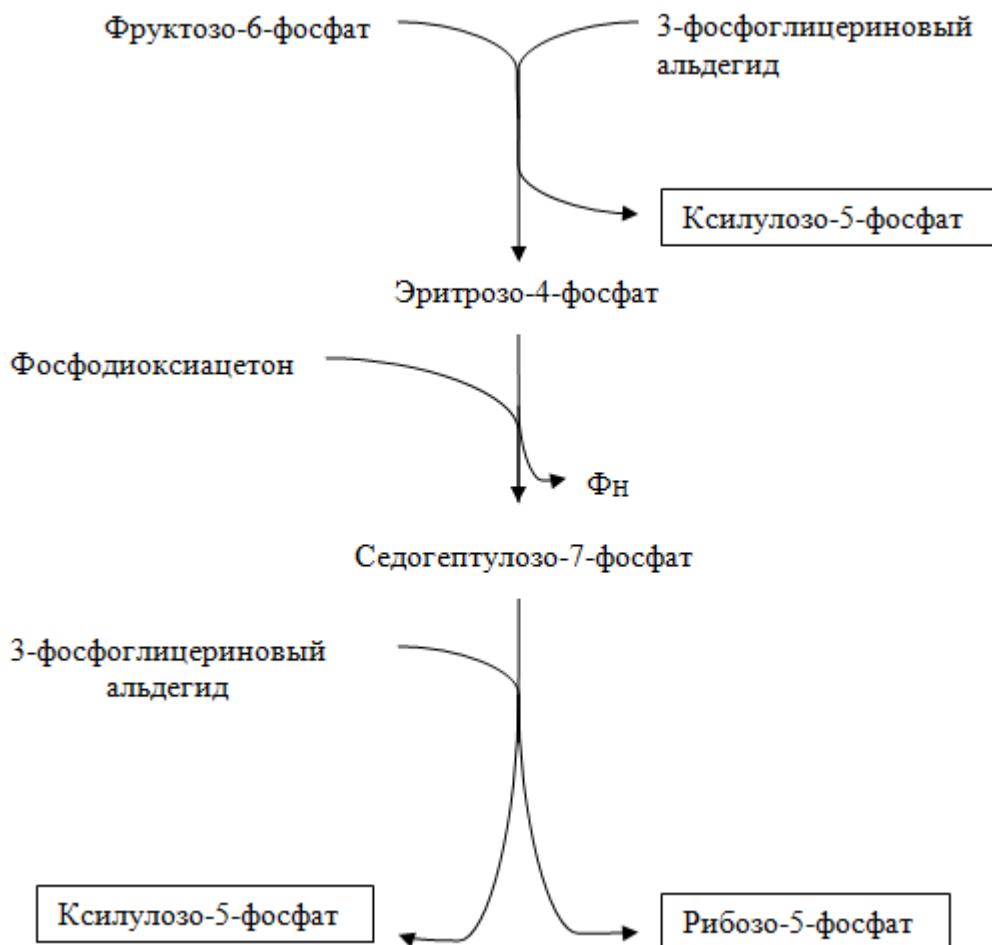


Далее 1,3-ФГК при участии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы за счет НАДН восстанавливается до 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА):

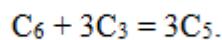


Часть образовавшегося 3-ФГА последовательно при участии триозофосфатизомеразы, фруктозо-1,6-дифосфатальдолазы и 1,6-фосфо-фруктозофосфатазы сначала превращается во фруктозо-6-фосфат и далее в реакциях, катализируемых ферментами глюкозофосфатизомеразой и глюкозо-6-фосфатазой, превращается в глюкозу. Однако, если бы 3-ФГА использовался только для биосинтетических процессов, то фиксация CO₂ вскоре прекратилась

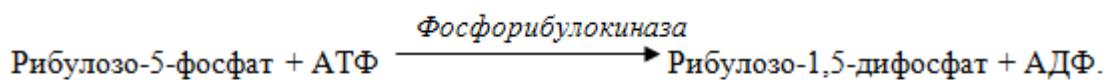
бы из-за недостатка рибулозо-1,5-дифосфата – акцепторов CO_2 . Поэтому для **регенерации акцептора CO_2** одна молекула фруктозо-6-fosфата и три молекулы триозофосфатов (две молекулы 3-ФГА и одна молекула фосфодиоксиациетона) взаимодействуют друг с другом при участии ферментов транскетолазы, трансальдолазы (ферменты окислительного пентозофосфатного пути) и альдолазы (фермент гликолиза) с образованием трех молекул пентозофосфатов (двух молекул ксилулозо-5-фосфата и одной молекулы рибозо-5-фосфата):



Схематически это превращение можно записать следующим образом:



Далее пентозофосфаты ксилулозо-5-фосфат и рибозо-5-фосфат превращается в рибулозо-5-фосфат под действием фосфопентозоэпимеразы и фосфопентозоизомеразы соответственно. Затем рибулозо-5-фосфат фосфорилируется вторым ферментом, участвующим только в цикле Кальвина, – фосфорибулокиназой, и таким образом регенерируется акцептор CO_2 – рибулозо-1,5-дифосфат:



Полностью цикл Кальвина представлен на рисунке 61.

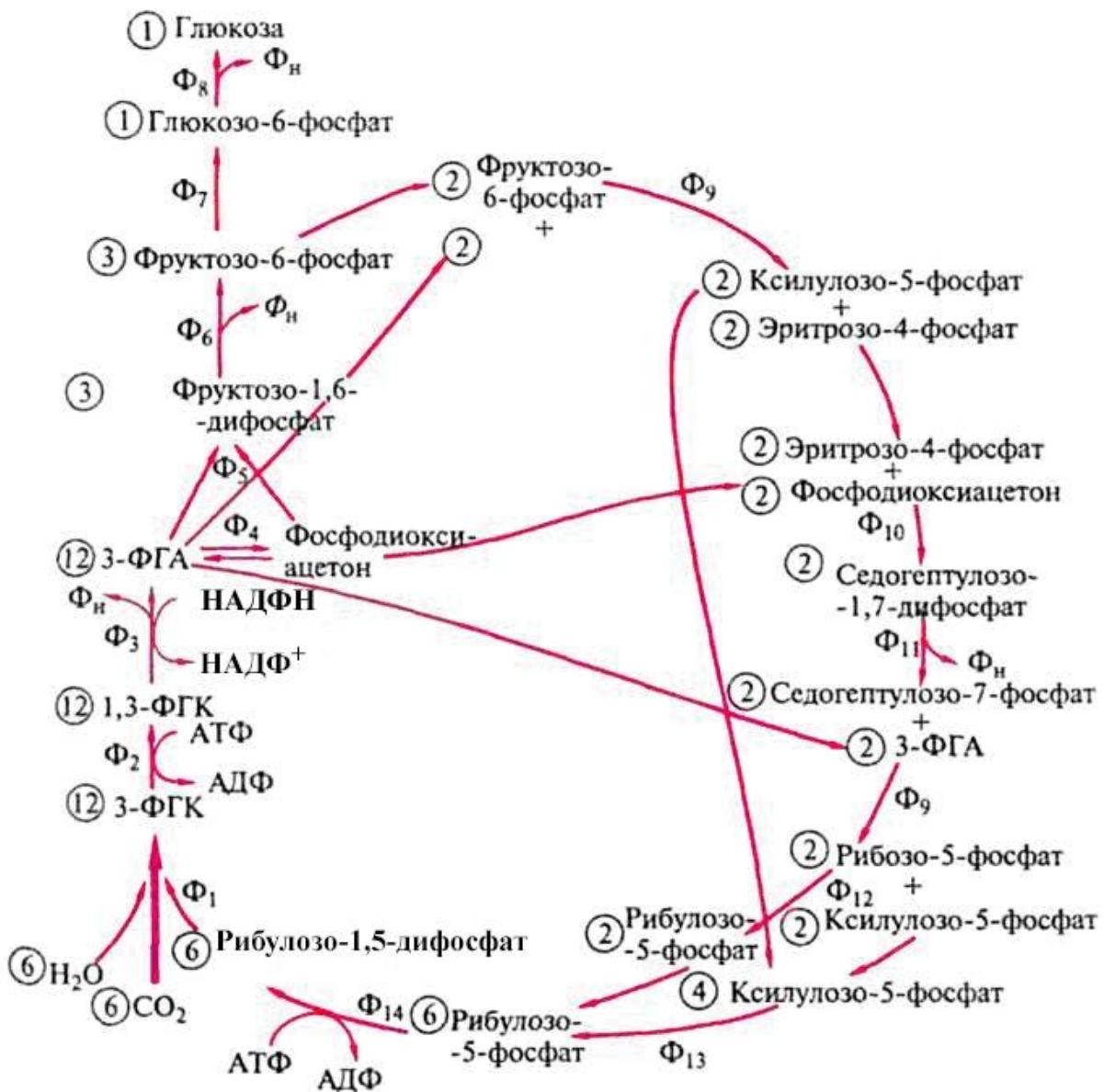
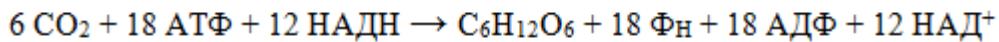


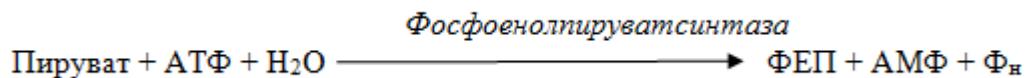
Рисунок 61 – Цикл Кальвина:

$\Phi 1$ – рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза; $\Phi 2$ – 3-фосфоглицераткиназа; $\Phi 3$ – 3-ФГА-дегидрогеназа; $\Phi 4$ – триозофосфатизомераза; $\Phi 5$ – фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза; $\Phi 6$ – 1,6-фосфофруктозофосфатаза; $\Phi 7$ – глюкозофосфатизомераза; $\Phi 8$ – глюкозо-6-фосфатаза; $\Phi 9$ – транскетолаза; $\Phi 10$ – альдолаза; $\Phi 11$ – дифосфатаза; $\Phi 12$ – фосфопентозоизомераза; $\Phi 13$ – фосфопентозоэпимераза; $\Phi 14$ – фосфорибулокиназа. Цифры, заключенные в кружок, обозначают число молекул, участвующих в реакциях

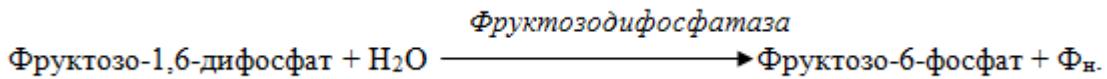
Суммарное уравнение восстановительного пентозофосфатного цикла можно изобразить следующим образом:



У бактерий-гетеротрофов на среде с неуглеводными предшественниками (например, аминокислотами, глицерином, молочной кислотой) синтез углеводов осуществляется с использованием реакций гликолитического пути, идущих в обратном направлении. Этот процесс называется **глюконеогенезом**. Но некоторые ферментативные реакции гликолитического пути необратимы (реакции, катализируемые гексокиназой, фософруктокиназой 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 фосфоенолпируватсингтазы:



Реакция с участием фруктозодифосфатазы



дает возможность обойти вторую необратимую реакцию гликолиза.

Образовавшиеся различными путями углеводы используются бактериями 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.

1.7.2.5. Биосинтез пептидогликана муреина

Пептидогликан муреин, образующий муреиновый мешок, – ригидный слой бактериальных клеточных стенок, который придает клеткам физическую прочность. У грамположительных бактерий муреиновый мешок многослойный, у грамотрицательных бактерий – однослойный. Пептидогликан состоит из углеводных цепей с присоединенными к ним пептидными цепочками. Углеводные цепи (гликан) образованы чередующимися остатками N-ацетилглюкозамина (N-АцГлю) и N-ацетилмурамовой кислоты (N-АцМур), соединенными β -1,4-гликозидными связями. Остатки N-ацетилмурамовой кислоты через карбоксильную группу лактата соединены амидной связью с пептидными цепочками, которые перекрестно связывают между собой углеводные цепи. К типичным аминокислотам, входящим в состав пептидных цепочек пептидогликана, относятся L-аланин (L-Ала), D-глутаминовая кислота

(Д-Глу), мезо-диаминопимелиновая кислота (*m*-ДАП) или L-лизин (L-Лиз) и D-аланин (D-Ала) (рисунок 62).

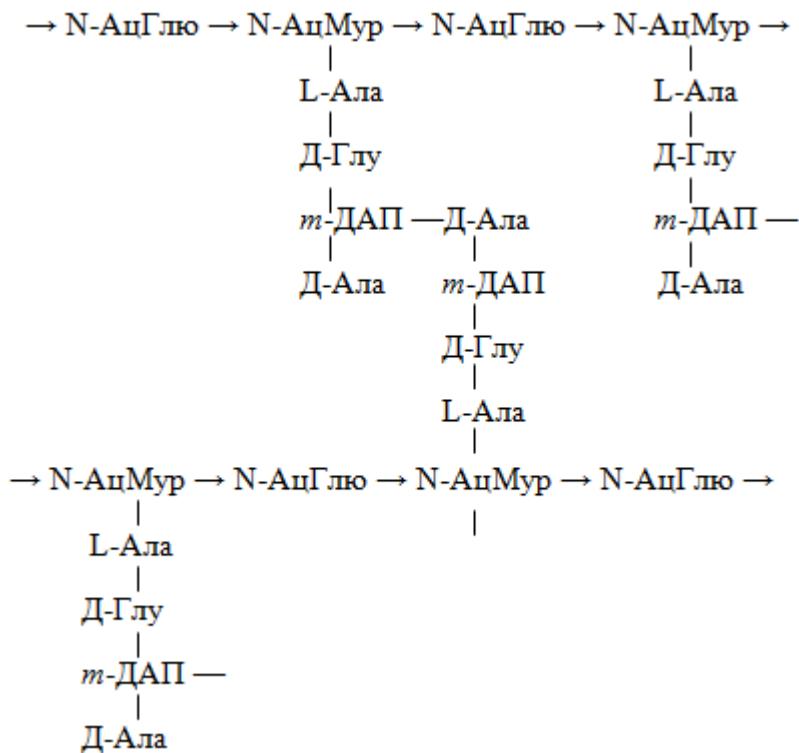


Рисунок 62 – Структура пептидогликана муреина

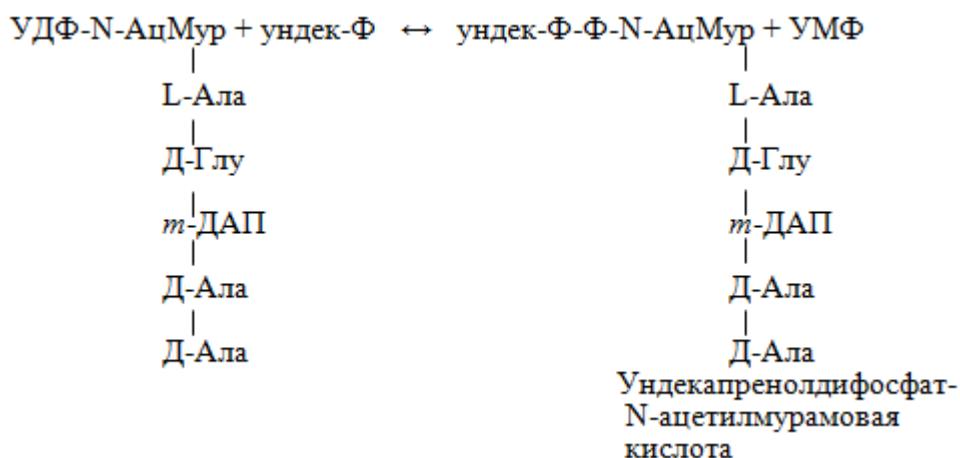
Синтез пептидогликана муреина клеточной стенки бактерий включает биосинтез в цитоплазме активированных предшественников, их полимеризацию и перенос через цитоплазматическую мембрану. Поскольку для сборки пептидогликана снаружи цитоплазматической мембранны не могут быть использованы такие источники энергии, как АТФ, предшественники пептидогликана должны синтезироваться в активированной форме. В синтезе пептидогликана участвует в качестве кофактора специфическое соединение – **ундекапренолфосфат**.

Синтез мономерных компонентов пептидогликана муреина N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты начинается с аминирования фруктозо-6-фосфата у C2-атома с помощью глутамина с образованием глюкозамин-6-фосфата, который претерпевает N-ацетилирование и затем мутазную реакцию, превращаясь в N-ацетил-глюкозамин-1-фосфат. Последний активируется при участии уридинтрифосфата (УТФ) с образованием УДФ-N-ацетилглюкозамина – строительного блока для синтеза муреина и псевдомуреина, а также липида А липополисахаридов.

Вторым предшественником муреина является эфир ацетиленглюкозамина и молочной кислоты – N-ацетилмурамовая кислота. При синтезе N-ацетилмурамовой кислоты образуется простая эфирная связь между образованным УДФ-N-ацетилглюкозамином и фосфоенолпируватом с последующим восстановлением остатка фосфоенолпируата до остатка

молочной кислоты. Далее к карбоксильной группе остатка молочной кислоты УДФ-Н-ацетилмурамовой кислоты с помощью амидной связи происходит последовательное присоединение аминокислотных остатков: L-аланина, D-глутаминовой кислоты, мезо-диаминопимелиновой кислоты или L-лизина и, наконец, двух остатков D-аланина. Последние два остатка D-аланина присоединяются вместе в виде D-аланил-D-аланина, образуемого из L-аланина, в реакциях, катализируемых аланинрацимазой и АТФ-зависимой D-аланин-D-аланинлигазой. Образование каждой амидной связи сопряжено с гидролизом АТФ для активации растущей цепи. В итоге синтезируется второй строительный блок для синтеза пептидогликана – УДФ-Н-ацетилмурамовая кислота с присоединенным пентапептидом.

Связывание образованного комплекса УДФ-Н-ацетилмурамовой кислоты с пентапептидом и УДФ-Н-ацетилглюкозамина происходит на втором этапе синтеза пептидогликана на цитоплазматической мемbrane. Для осуществления этого гидрофильная молекула УДФ-Н-ацетилмурамовой кислоты с пентапептидом сначала должна быть превращена в липофильную, что достигается путем замены уридинифосфата (УДФ) кофактором ундекапренолфосфатом (ундек-Ф) в Mg²⁺-зависимой обратимой реакции:



В результате этой реакции обмена становится возможным перенос готового компонента пептидогликана через цитоплазматическую мембрану на ее периплазматическую сторону с помощью липидного переносчика ундекапренолфосфата.

На третьем этапе происходит встраивание образованных комплексов дисахаридпентапептид, связанных с ундекапренолдифосфатом, в пептидогликановый скелет и образование пептидных связей. Эта поперечная сшивка осуществляется путем транспептидирования с участием фермента трансамида. При этом расщепляется связь между двумя остатками D-аланина и освободившаяся карбоксильная группа связывается с аминогруппой мезо-диаминопимелиновой кислоты или L-лизина второго олигопептида, а концевой D-аланин освобождается. При встраивании освобождается также ундекапренолдифосфат; он подвергается гидролизу и получающийся ундекапренолмонофосфат используется в следующем цикле.

Археи отличаются по строению клеточной стенки от бактерий, кроме того, ее состав различен у разных групп архей. Для некоторых метаногенных архей характерно наличие в клеточной стенке не пептидогликана муреина, а псевдомуреина. Различия между псевдомуреином и муреином состоят в следующем:

- в состав псевдомуреина входят только L-аминокислоты;
- вместо N-ацетилмурамовой кислоты псевдомуреин содержит N-ацетил-L-талозоминуровую кислоту;
- в процессе синтеза псевдомуреина происходит образование УДФ-дисахарида, в котором УДФ-N-ацетилглюкозамин соединен с N-ацетил-талозоминуровой кислотой β -3,1-, а не β -1,4-связью;
- далее к УДФ-дисахариду присоединяются L-аминокислоты, образующие пентапептид (L-глу, L-ала, L-лиз, L-глу, L-ала). Для образования амидной связи между первой аминокислотой олигопептида (L-глутаматом) и уроновой кислотой глутамат активируется УДФ. Далее происходит последовательное присоединение молекул УДФ-L-глутамата с образованием УДФ-пентапептида. Добавление каждого нового аминокислотного остатка к растущему УДФ-олигопептиду требует АТФ-зависимой активации карбоксильной группы последнего аминокислотного остатка в цепочке.

1.8. ГЕНЕТИКА ПРОКАРИОТ

Генетика – наука о наследственности и изменчивости живых организмов. В отличие от классической генетики, генетика прокариот – относительно молодая отрасль микробиологии, первые работы по которой появились в начале 1940-х годов. Генетика прокариот 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 прокариот 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 дрозофилы, мышь, кукуруза, поскольку прокариоты 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 прокариот позволяет изучать биологические явления на уровне одной клетки, избегая их сложных взаимодействий и взаимозависимостей, типичных для высших организмов.

1.8.1. Мутации у прокариот. Доказательства природы возникновения мутаций у прокариот

Термин «мутация» введен Г. Де Фризом (1901), изучавшим изменчивость и наследственность у растений и определившим **мутацию** как «скаккообразное 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 прокариот 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 прокариот 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 засевали на агаризованную среду с фагом T1. В результате на поверхности средыировалось определенное количество колоний, которые можно рассматривать как устойчивые к фагу, т. е. T_{on}^r . Устойчивые к фагу T1 бактерии сохраняют данное свойство также и при последующем их культивировании в отсутствии фага (рисунок 63).

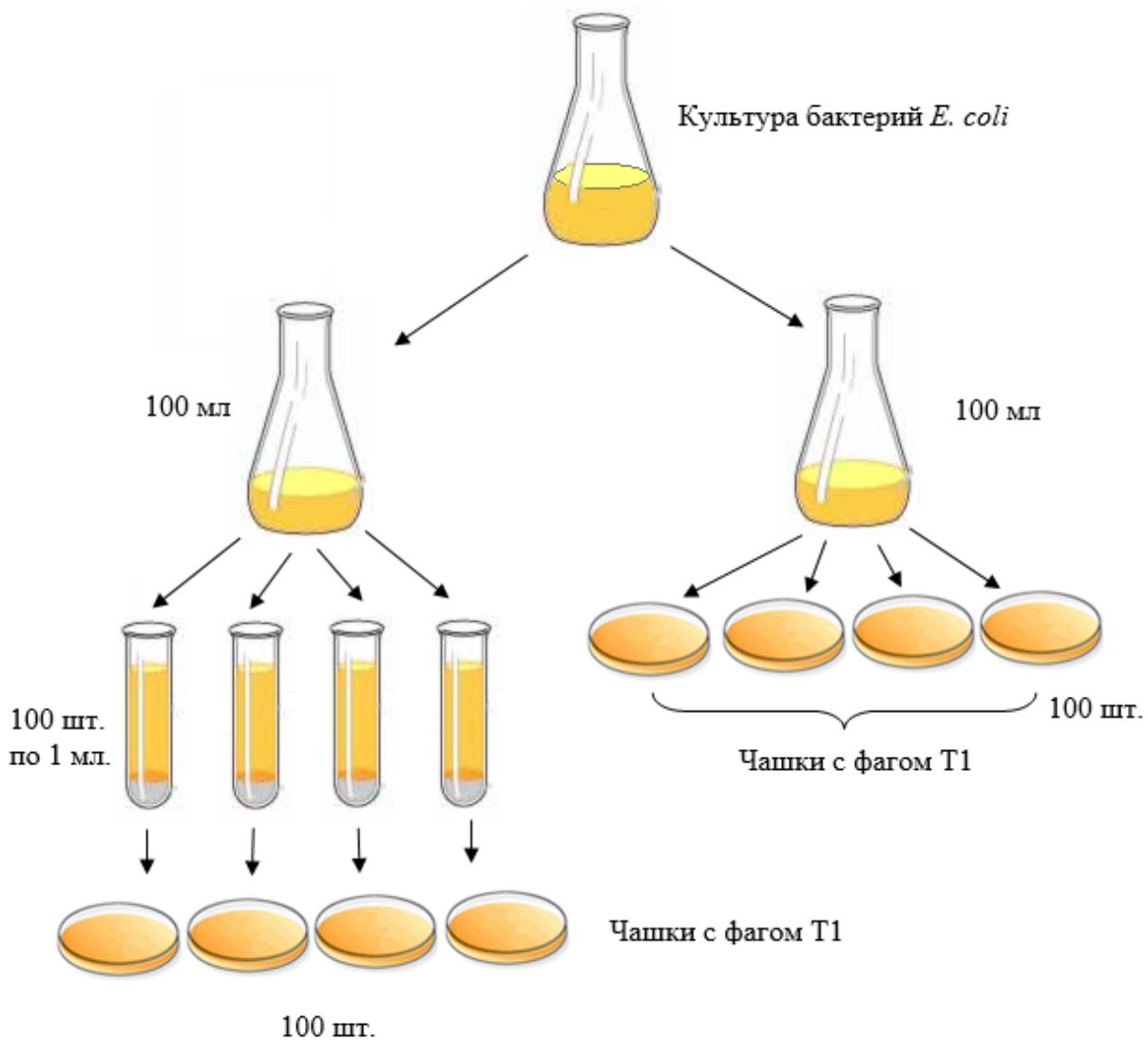


Рисунок 63 – Флуктуационный тест С. Лурия и М. Дельбрюка

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.

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 засевал чашки Петри культурой

E. coli, чувствительной к фагу T1, с образованием сплошного газона. Засеянные чашки инкубировались при оптимальных условиях (37°C) в течение 5 ч. За это время каждая из высеванных 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 (рисунок 64).

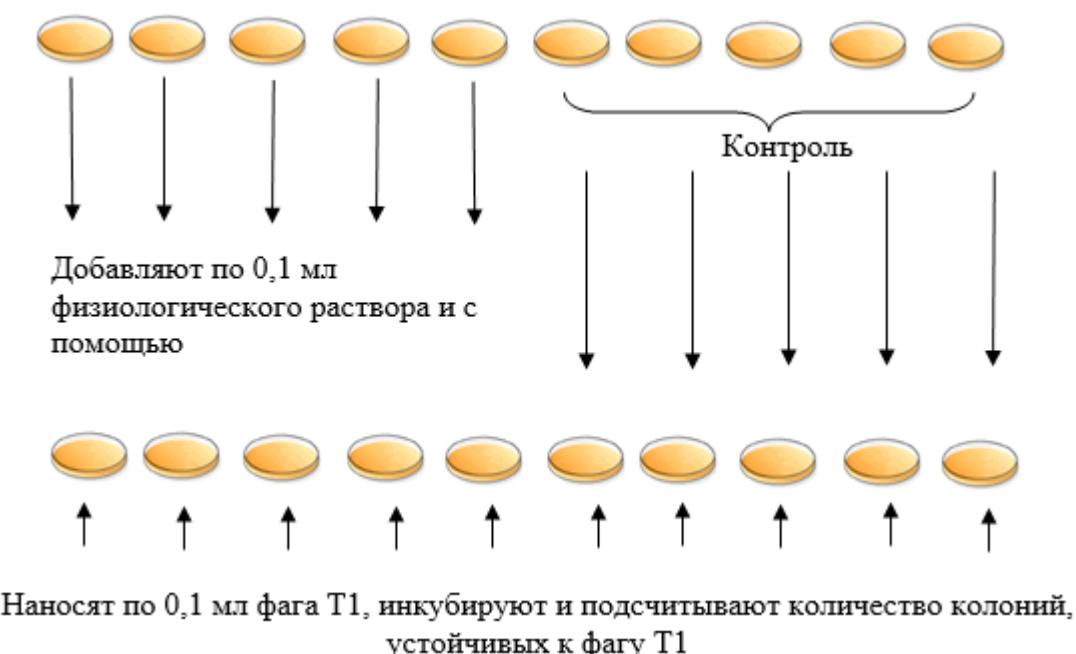


Рисунок 64 – Перераспределительный тест Ньюкомба

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 ненаправленно 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) (рисунок 65).

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.

Кроме генотипической, существует *модификационная изменчивость*, которая рассматривается как ответ на изменение условий окружающей среды. Она 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 индуцибелльные

ферменты, т. е. происходит фенотипическое проявление генов, «молчавших» при отсутствии лактозы в среде.



Рисунок 65 – Непрямой отбор фагоустойчивых мутантов методом реплик

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.

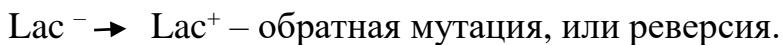
1.8.2. Классификация мутаций у прокариот. Молекулярные механизмы мутационного процесса. Мутагенные факторы

Мутации – изменения, возникающие в генетическом аппарате прокариот 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 популяции.

Индуцированные 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 Mu 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 $Lac^+ \rightarrow Lac^-$, будет считаться прямой.

В результате **обратной** мутации у мутантного организма восстанавливается исходный (или дикий) фенотип:



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, потеря 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 анabolизма;
- 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 молекуле 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 множество 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.

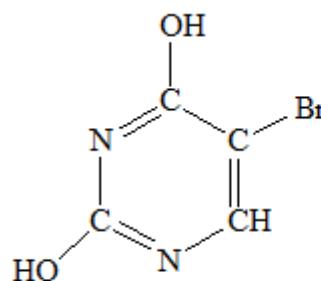
В настоящее время расшифрованы механизмы действия некоторых мутагенов.

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).

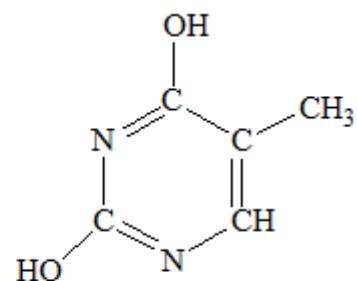
Гидроксиламин (NH_2OH) вступает в реакцию главным образом с цитозином и изменяет его так, что он при репликации ДНК предпочтительно спаривается с аденином вместо гуанина и происходит замена ЦГ–АТ (транзиция).

Аналоги азотистых оснований очень сходны по строению с нормальными пуриновыми и пиридиновыми азотистыми основаниями и, поглощаясь клетками, способны включаться в ДНК. В молекуле ДНК они могут находиться в двух таутомерных формах – обычной кето-, или аминоформе, 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 тимином:



5-Бромурацил



Тимин (5-метилурацил)

Он может включаться вместо тимины в цепь ДНК как комплементарное аденину основание (1 – родительская цепь, 2 – дочерняя цепь (после репликации)):

1	A		BУ	2
	A		T	
	Г		Ц	
	Г		Ц	
	Т		А	
	А		БУ	

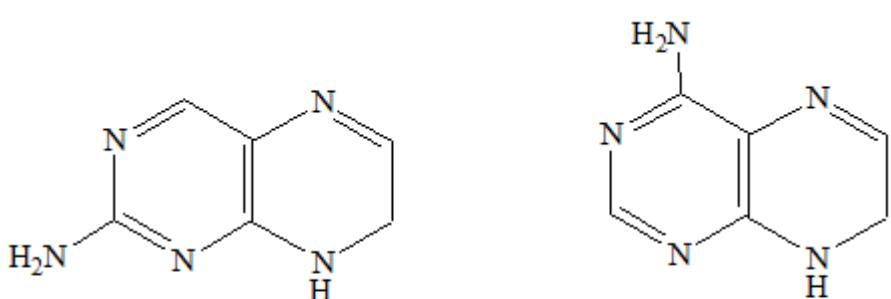
При переходе в енольную форму 5-бромурацил (БУ*) ведет себя при репликации ДНК как цитозин и спаривается с гуанином:

БУ		A
T		A
Ц		Г
Ц		Г
А		Т
БУ*		Г

После третьего цикла репликации вместо пары А–Т в молекуле ДНК обнаруживается пара Г–Ц (транзиция AT–GC):

A		T	
A		T	
Г		Ц	
Г		Ц	
Т		А	
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 тимином, но при переходе в енольную форму может образовывать связи с цитозином, что приводит к изменению пар оснований в ДНК.

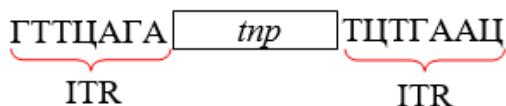
Алкилирующие агенты – нитрозогуанидин, нитрозометилмочевина, этилэтансульфонат, этилметансульфонат, сернистый иприт и другие – принадлежат к наиболее эффективным мутагенам. Они модифицируют (алкилируют) в области репликативной вилки преимущественно пуриновые основания, в первую очередь гуанин, вызывая его спаривание с тимином 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 (Tn-элементы), генные острова и фаги-транспозоны (Mu, Д3112 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 *tsp*, 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. (таблица 9), 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 9 – Фенотипические признаки, детерминируемые некоторыми транспозонами

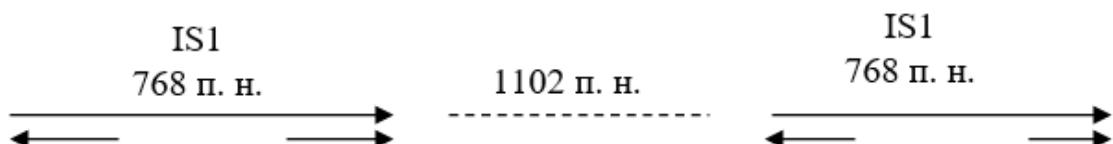
Транспозон	Контролируемое свойство
Tn1, Tn2, Tn3	Ap
Tn4	Ap, Sm, Su, Hg
Tn5	Km
Tn6	Km, Nm
Tn7	Tp, Sm
Tn9	Cm
Tn10	Tc
Tn501	Hg
Tn903	Km
Tn951	Lac
Tn1681	Ent
Tn1699	Gm, Km, Cb, Ap

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; Тр – устойчивость к триметоприму; Сm – устойчивость к хлорамфениколу; Тс – устойчивость к тетрациклину; Lac – сбраживание лактозы; Ent – синтез энтеротоксина; Gm – устойчивость к гентамицину; Сb – устойчивость к карбенициллину.

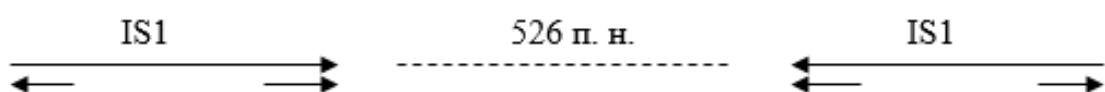
В зависимости от того, какие из IS-элементов и в какой ориентации ограничивают транспозон, можно выделить несколько групп.

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 коинтеграт, 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 (рисунок 66). Участки, в которых происходит рекомбинация Tn3, названы от «*internal resolution site*» – IRS, res или tnpS.

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.

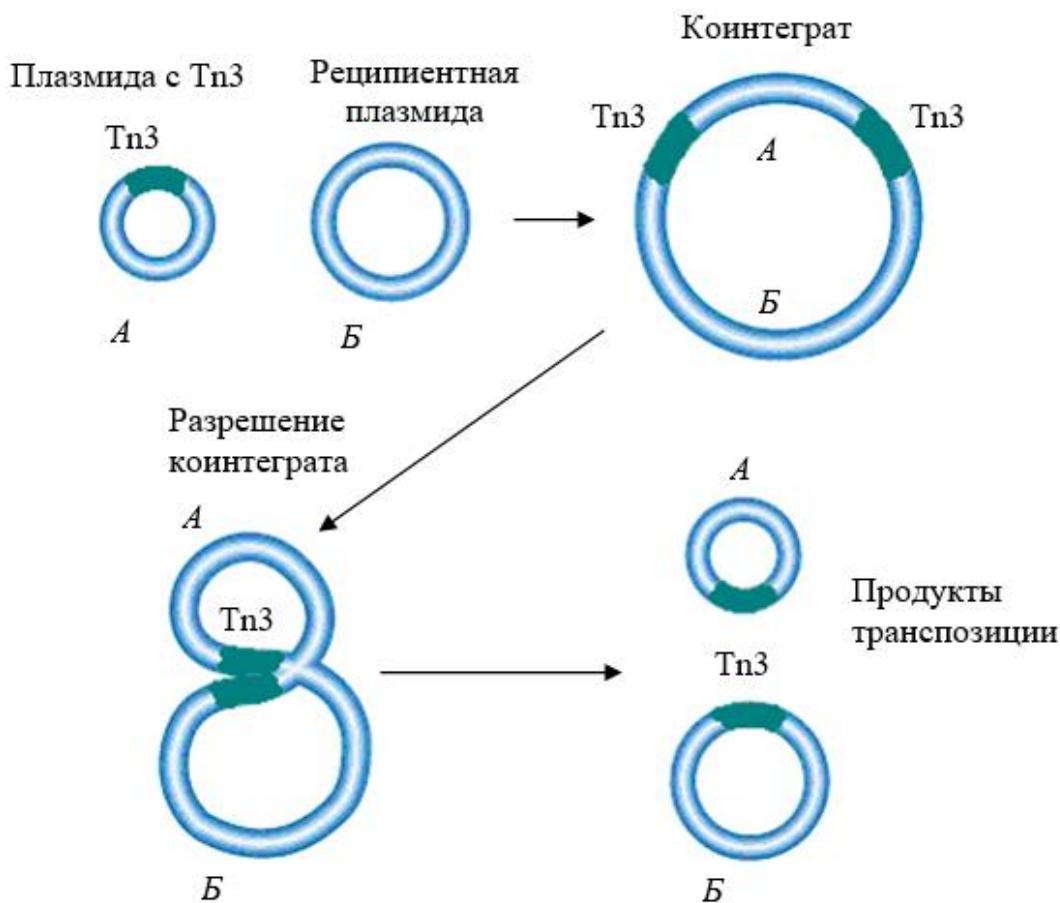
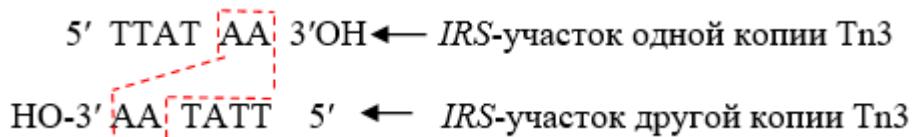


Рисунок 66 – Схема транспозиции через стадию образования коинтеграта

Белок, осуществляющий разрешение коинтеграта (*resolution*), т. е. сайт-специфическую рекомбинацию в *IRS* или *res*-сайтах, был назван **резолвазой** или **TprR-белком**. Синтез этого белка кодируется геном *tprR*. В опытах *in vitro* показано, что ТprR-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 коинтеграторов. Вместе с тем коинтеграторы, образующиеся при транспозии 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 транспозии, предполагающий выщепление (экскизию) 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 (рисунок 67).

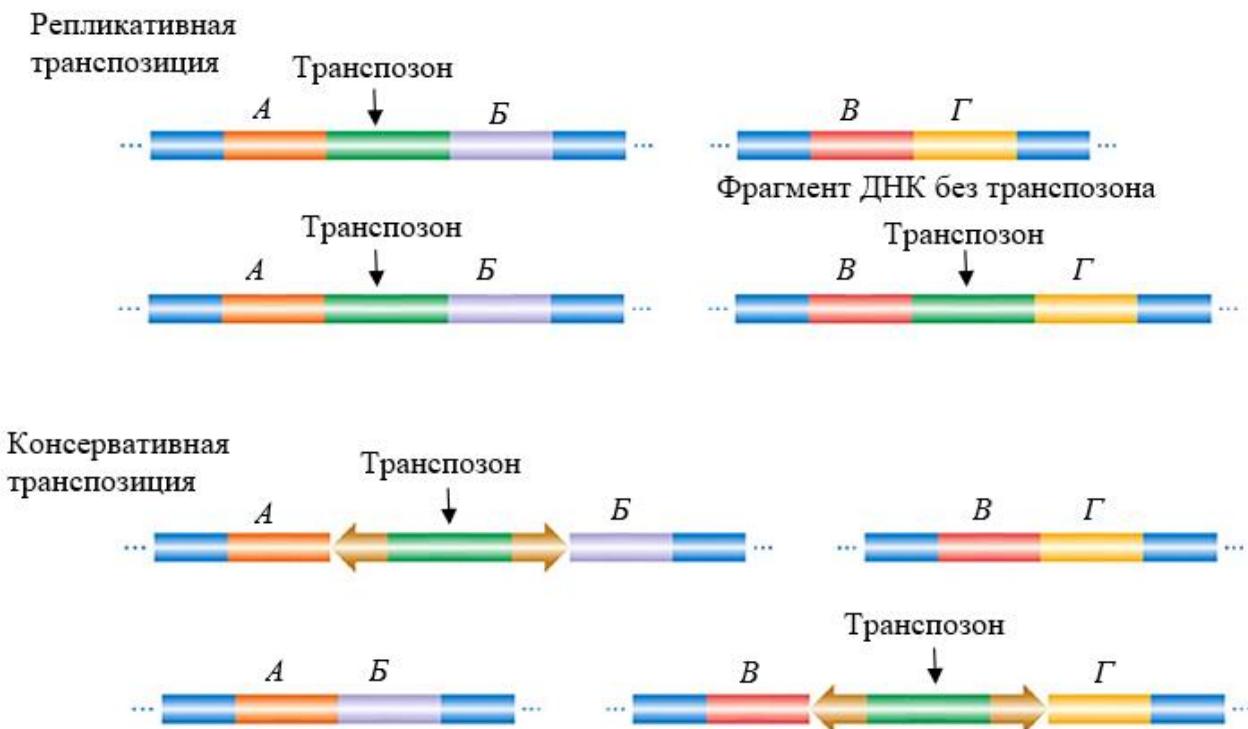


Рисунок 67 – Механизмы перемещения транспозонов

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.);

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.

Генные острова – это крупные гибридные фрагменты ДНК, отличающиеся по ГЦ-составу от хромосомной ДНК клетки-хозяина. Они содержат группы функционально родственных или неродственных генов и гены, продукты которых участвуют в рекомбинации. Большая протяженность (более 10 000 п. н.) делает их нестабильными, а их внедрение в геном хозяина придает нестабильность окружающим группам генов. Некоторые генные острова могут утрачивать гены, ответственные за мобильность, и становиться стабильными фрагментами, отличающимися по ГЦ-составу от генома клетки-хозяина.

Бактериофаг Mi относится к умеренным бактериофагам. Характерной его особенностью является мутагенность, что отражено в названии Mi (*mutator*). Этот бактериофаг был впервые обнаружен у бактерий *E. coli*, но он репродуцируется также в клетках бактерий родов *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 Mi (линейная двусpirальная ДНК – 38 т. п. н.) также имеет на концах инвертированные повторы, но только всего из двух нуклеотидных пар:

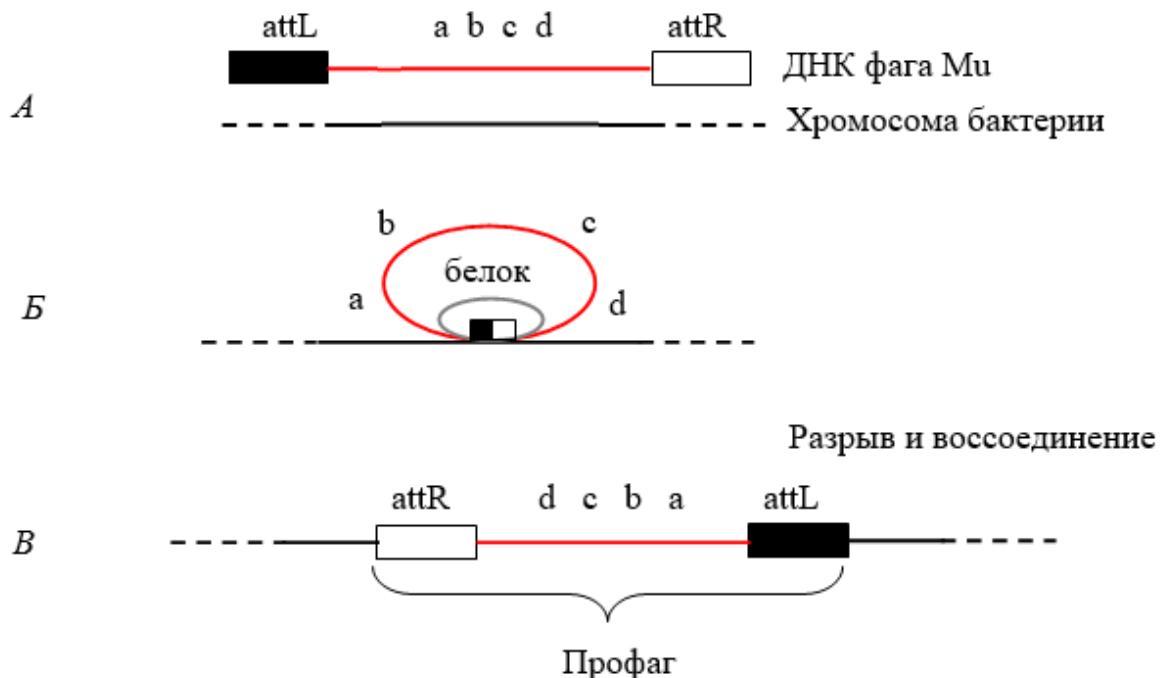


Особенностью ДНК фага Mi, включенной в вирионы, является то, что на ее концах находятся участки бактериальной ДНК, которые захватываются при индукции профага и упаковываются вместе с фаговой ДНК в вирион.

Как и другие умеренные фаги, фаг Mi 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 Mi может в разные места бактериальной хромосомы, вызывая мутации разных генов. «Горячих» участков включения фага Mi в ДНК бактерий не обнаружено. К интеграции фага Mi не применим кемпбелловский механизм, которым объясняется интеграция фага λ в хромосому *E. coli*. В данном случае не обнаружено образования ковалентнозамкнутых колец из линейной ДНК фага Mi как предварительной стадии интеграции. Электронно-микроскопические наблюдения показали, что геном Mi 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, адерживаются 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 реципиентную хромосому не встраиваются. Они элиминируются нуклеазами бактериальной клетки.

Под воздействием различных факторов происходит индукция профага, при которой ДНК фага Mu не вырезается, как у фага λ из бактериальной хромосомы, а реплицируется в интегрированном состоянии, не покидая хозяйскую ДНК. Образующиеся при репликации копии ДНК фага Mu передаются в другие участки генома клетки бактерий.

Таким образом, ДНК-Mu 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 Mu не отличается от других перемещающихся генетических элементов бактерий, но принципиально отличается от остальных умеренных фагов, вырезающихся при индукции и репродуцирующихся вне связи с хозяйской хромосомой. После заражения клетки вирионами фага Mu его геном, прежде всего, интегрируется, и затем только в таком виде реплицируется, тогда как другие умеренные фаги могут репродуцироваться без предварительной интеграции.

1.8.3. 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 высев популяции бактерий на среду, содержащую тот или иной селектирующий агент. Прямыми 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. Прямыми 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 приемах 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). Среды с градиентом антибиотика готовят следующим образом: питательную агаризованную среду заливают в чашку Петри, расположенную под углом к поверхности лабораторного стола:



После затвердения 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) высевают 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 немногочисленные колонии:



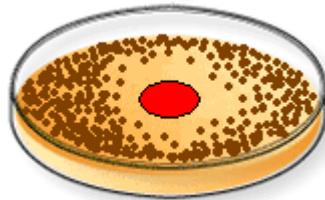
Клоны, образованные клетками устойчивых мутантов, можно либо повторно высевать штрихом по направлению к областям с более высокой концентрацией антибиотика, либо использовать как исходный материал для посева на другую среду с линейным градиентом концентрации антибиотика, причем в данном случае ингибитор 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 агариованной 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 агариированной 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 сохранятся, 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 сусpenзию 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 температуруустойчивыми (при этом антибиотик вызывает гибель клеток дикого типа, растущих при более высокой температуре), неспособными использовать определенный субстрат и др.

1.8.4. Плазмиды прокариот

Основным и обязательным генетическим элементом клеток прокариот является хромосома (или несколько хромосом) – структура, способная к самостоятельной репликации. Наряду с хромосомой в клетке прокариот могут присутствовать плазмиды – стабильно наследуемые внехромосомные генетические элементы.

В большинстве случаев плазмиды прокариот 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 вариабельны. 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 клетки прокариот. Показано, что клетки прокариот можно «излечить» от плазмид (а плазмиды элиминировать) с помощью УФ-облучения, митомицина С, акридиновых красителей и других агентов. Жизнеспособность прокариот 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 клетке может насчитываться от одной до трех копий в расчете на одну копию 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 клетке прокариот 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 **промискуитетными**. Примером таких плазмид является плазмида RP4, относящаяся к классу R-плазмид, выделенная из клеток псевдомонад. Эта плазмида 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 плазмида 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 плазмида. В реципиентных клетках коинтеграты распадаются на два репликона, которые существуют автономно друг от друга.

Многие плазмида способны к *интеграции в бактериальную хромосому*. Интеграция осуществляется с помощью IS-элементов и транспозонов, которые имеются и в хромосоме, и в плазмиде. Плазмида, 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 плазмида 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 плазмида не могут сосуществовать в одной клетке, поскольку они несовместимы. Несовместимость плазмид обусловливается или блокированием репликации ДНК родственной плазмиды, или блокированием распределения дочерних молекул ДНК по клеткам после репликации. Все известные плазмида относятся к определенной группе несовместимости, число которых достигает нескольких десятков, и соответственно в одну группу входят несовместимые друг с другом плазмида. Несовместимыми могут быть плазмида как с одними и теми же, так и с разными фенотипическими особенностями. Например, в группу несовместимости F1 входят плазмида F-типа, Col-типа и R-типа.

Конъюгативным плазмидам присущее еще одно свойство – *поверхностное исключение*, приводящее к тому, что при наличии в клетке плазмида 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. Плазмида, преодолевшие поверхностное исключение, стабильно сосуществуют с плазмидой реципиентной клетки, если они, конечно, совместимы.

Плазмида придают клеткам различные *фенотипические признаки*:

- устойчивость к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, мутагенам (R-плазмида);
- способность вызывать биодеградацию камфоры, ксилола, нафталина, салицилата, толуола, n-алканов и других неприродных и природных соединений (ксенобиотиков). Такие плазмида получили название плазмид биодеградации, или D-плазмид;
- способность синтезировать антибиотики, бактериоцины, пигменты, инсектициды, гемолизины, токсины, фибринолизины, сероводород, поверхностные антигены;
- способность использовать в качестве источника углерода различные углеводы и необычные аминокислоты;
- способность вызывать образование опухолей у растений (Ti-плазмида);
- способность конъюгировать с реципиентными штаммами бактерий, или донорные свойства;

- способность осуществлять рестрикцию-модификацию ДНК и др.

Однако существует большое количество плазмид, фенотипические свойства которых неизвестны, такие плазмиды получили название **криптических**.

1.8.4.1. F-плазмида

F-плазмида (F-фактор) представляет собой конъюгативную episому клеток *E. coli* K-12 со строгим контролем репликации (рисунок 68). Размер ее кольцевой ДНК составляет 94,5 т. п. н. Молекулярная масса F-плазмиды равна $45 \cdot 10^6$ Д. Попадая в F⁻клетки, эта плазмиды изменяет их фенотипические свойства и клетки приобретают половые F-пили, а также чувствительность к F-донорспецифическим бактериофагам MS2, f1, f2, Qβ, становятся донорами ДНК, перестают поддерживать развитие бактериофагов T3 и T7. При конъюгации таких клеток блокируется проникновение в них донорной ДНК (проявляется свойство поверхностного исключения).

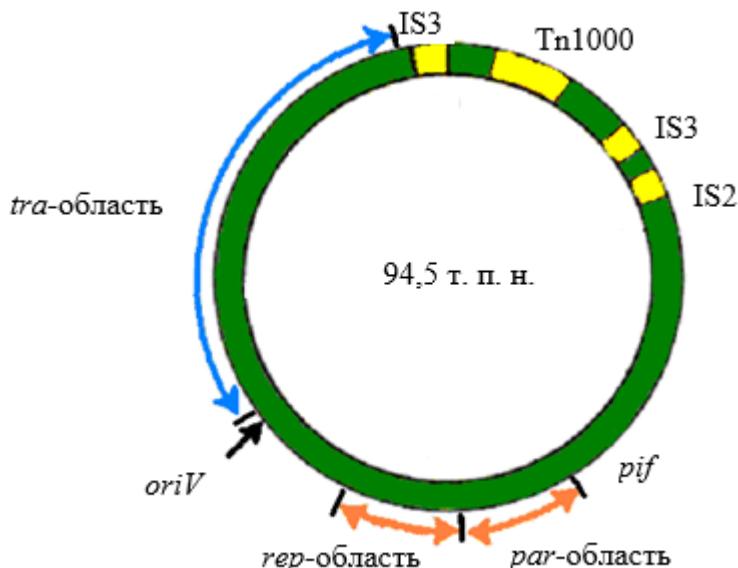


Рисунок 68 – F-плазмида бактерий *E. coli*

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 *rif*, обеспечивающий исключение развития в клетке фагов T3 и T7. 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 неправильной эксцизии F-плазмиды образуется F'-плазмида, т. е. F-плазмида, содержащая в своем составе гены бактериальной хромосомы. Если при эксцизии F'-плазмиды из бактериальной хромосомы *tra*-оперон хотя бы частично делятируется, то образовавшаяся F'-плазмида будет неконъюгативной. Для сохранения свойств репликона F'-плазмида обязательно должна содержать область *rep*.

1.8.4.2. Плазмиды бактериоциногенности

В 1925 г. А. Грация обнаружил колицины – вещества белковой природы, синтезируемые бактериями *E. coli* и обладающие антибактериальным действием в отношении других штаммов бактерий *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, а 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. Но некоторые учёные для названия бактериоцинов используют родовую принадлежность бактерий-продуцентов: стафилококкины – *Staphylococcus epidermidis*, вибриоцины – *Vibrio cotta* 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:

- бактериоцины с низкой молекулярной массой, которые не осаждаются при ультрацентрифугировании, чувствительны к протеолитическому ферменту трипсину, термостабильны и неразличимы в электронном микроскопе;
 - 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;
 - бактериоцины, для которых четко показана ферментативная активность.
- По механизму действия на бактериальную клетку бактериоцины подразделяют на четыре основные группы:
- ингибирующие окислительное фосфорилирование в цитоплазматической мемbrane;
 - разрушающие ДНК;

- блокирующие синтез белков;
- нарушающие избирательную проницаемость 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* (рисунок 69).

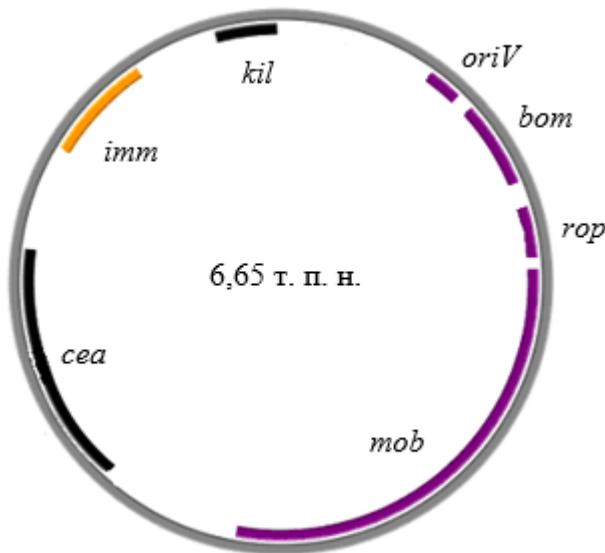


Рисунок 69 – Генетическая карта плазмиды ColE1

Плазмиды ColE1 относятся 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 односторонняя 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.

Плазмиды 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 пока не установлена. Предполагается, что один из этих белков делает разрыв одной из нитей 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 плазиды. Образование коинтеграта между плазмидой ColE1 и конъюгативной плазмидой не происходит, так как плазмида ColE1 не имеет в своем составе ни IS-элементов, ни транспозонов. При такой мобилизации перенос конъюгативной плазиды 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*, *Dickeya chrysanthemi* и др.

1.8.4.3. R-плазиды, 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 трансмиссибельна и может передаваться от одних клеток бактерий *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. 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-плазидами, или R-факторами**.

R-плазиды, как и другие плазиды, представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. Молекулярная масса R-плазид различна – от 3 до 300 МД. В клетке может присутствовать до нескольких десятков копий мелких плазид (плазид с ослабленным контролем репликации), тогда как число копий крупных R-плазид с молекулярной массой ≥ 20 МД, как правило, составляет одну-две на хромосому.

Большая часть известных R-плазид клинических изолятов грамотрицательных бактерий конъюгативна, у грамположительных штаммов выделяют как конъюгативные, так и неконъюгативные R-плазиды.

Плазиды резистентности могут контролировать устойчивость к одному или нескольким антибиотикам, причем комбинации антибиотиков могут быть самыми различными.

Для некоторых R-плазид характерен широкий круг хозяев (возможен их перенос в клетки бактерий разных родов). К таким R-плазидам относится уже упоминаемая нами плазмида RP4.

Любая конъюгативная R-плазмида несет две группы генов. Первая группа – гены, ответственные за передачу плазиды 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 бактерий *E. coli*. Вторая группа – гены, обусловливающие собственно резистентность (r-det).

На примере конъюгативной плазмида R100 со строгим контролем репликации можно рассмотреть общие особенности строения R-плазмид (рисунок 70).

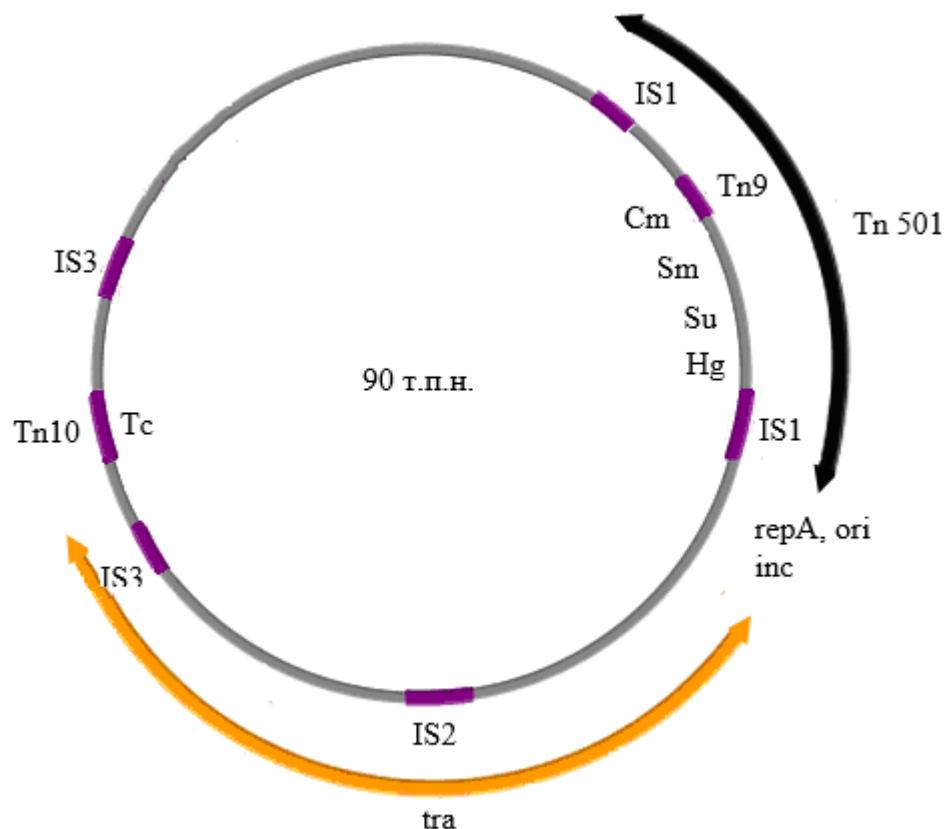


Рисунок 70 – Генетическая карта плазмида R100

Размер плазмида R100 составляет 90 т. п. н. Эта плазмида 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 плазмида 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 мембрany для них.

1.8.4.4. Ті-плазмиды

Ті-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 раковое заболевание растений, получившее название «корончатый галл». Ті-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* Ті-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 прокариот в том смысле, что определяют ряд ее фенотипических свойств, позволяющих более гибко и быстро реагировать на изменение условий окружающей среды. Кроме того, плазмиды прокариот 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. Играют значительную роль в эволюции прокариот.
3. Представляют большую ценность как материал для исследования структуры и функционирования генетического аппарата клетки прокариот.
4. Важны с учетом фенотипов, которые они детерминируют:

- наличие плазмид биодеградации позволяет прокариотам развиваться в средах, содержащих необычные или неприродные источники углерода. Такие прокариоты 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* M-17), бифидумбактерин (высушенная суспензия живых антагонистически активных бифидобактерий), бификол (высушенная суспензия живых антагонистически активных штаммов бифидобактерий и бактерий *E. coli* M-17) и др.

Такие препараты используют в тех случаях, когда антибиотики при чрезмерном их употреблении приводят к нарушениям витаминного баланса, дисбактериозу (нарушению состава естественной микробиоты кишечника) и т. п.:

Бактериоциногенные микроорганизмы используются для типирования штаммов бактерий;

- R-плазмиды обеспечивают прокариотам, 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.

1.8.5. Способы генетического обмена у прокариот

Прокариоты 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, бесполым, способом передачи генов от предков к потомкам у прокариот

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*.

У прокариот 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 прокариот, находящиеся в состоянии компетентности. Последующие этапы, как и при других паразексуальных 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 прокариот 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, автолизом 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 трансдукции 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-плазмида 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 однонитевого разрыва в области *oriT* плазмиды, которая называется точкой начала передачи. Для того чтобы произошла передача хромосомных генов, плазмида F (или другая конъюгативная плазмида) должна интегрироваться в хромосому. Разорванная в области *oriT* нить ДНК разматывается, и однонитевая 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-плазмида. 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.

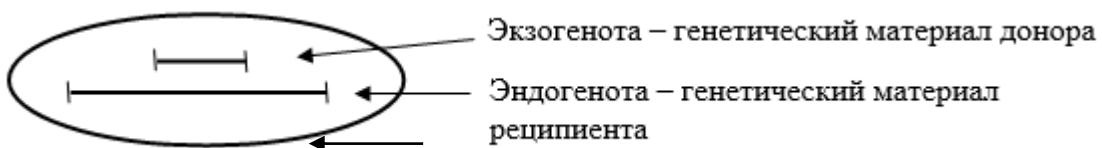
Процессы конъюгации, особенно ведущие к передаче плазмид, очень широко распространены среди прокариот. Конъюгация – наиболее эффективный механизм для горизонтального переноса генов в любой среде обитания прокариот. Конъюгировать могут прокариоты, весьма далекие в систематическом отношении. Плазмиды, осуществляющие конъюгацию между неродственными прокариотами 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 прокариот имеются «обходные пути», функционирующие за счет незаконной (или негомологичной) 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 прокариот являются следующие.

1. Процесс переноса ДНК всегда односторонний, или односторонний: от донорных прокариот 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 протопласти или сферопласти. Исследователь должен сначала получить протопласти или сферопласти 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 протопласти или сферопласти высеваются на специальные среды, на которых создаются условия для регенерации их в морфологически полноценные клетки. В процессе последующей рекомбинации возникают стабильные рекомбинанты, совмещающие некоторые признаки обоих родительских штаммов.

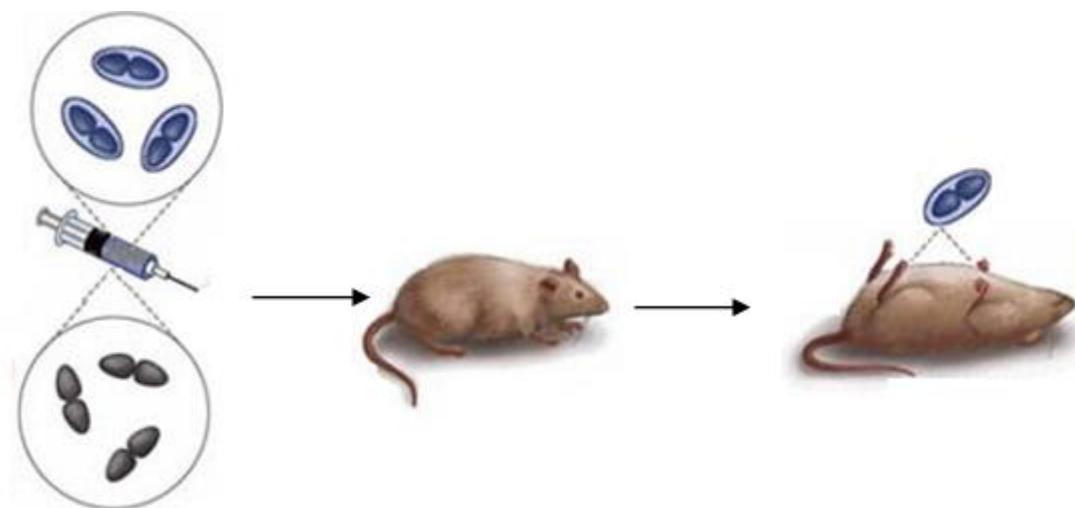
Метод слияния протопластов или сферопластов пока успешно применяется только в отношении грамположительных бактерий. В последнее время разработаны условия для слияния сферопластов таких грамотрицательных бактерий, как *Pseudomonas*, *Erwinia* и др.

В отличие от конъюгации, трансформации и трансдукции, при которых ДНК передается от донора реципиенту, перенос генетической информации при слиянии протопластов или сферопластов не носит одностороннего характера, а родительские клетки вносят равноценный вклад в образование рекомбинантов.

1.8.5.1. Трансформация

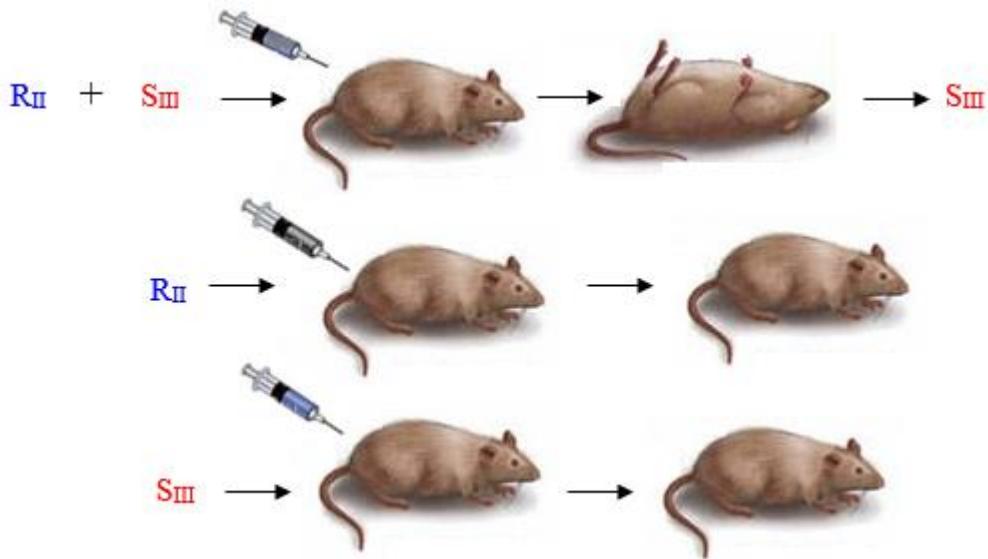
Явление трансформации было открыто Ф. Гриффитом в 1928 г. в опытах на пневмококках (*Streptococcus pneumoniae*) – грамположительных бактериях, относящихся к группе молочнокислых бактерий. Ко времени открытия явления трансформации свойства пневмококков были изучены достаточно хорошо. В частности, было 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 капсул 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 капсул бактерии из S-колоний обладают вирулентными свойствами и вызывают септициемию, размножаясь практически беспрепятственно в организме хозяина, так как капсула защищает их от фагоцитирующих клеток. Бескапсульные клетки являются анирулентными. 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 мыши погибают. Из органов мышей при этом можно выделить живые капсульные клетки пневмококков.

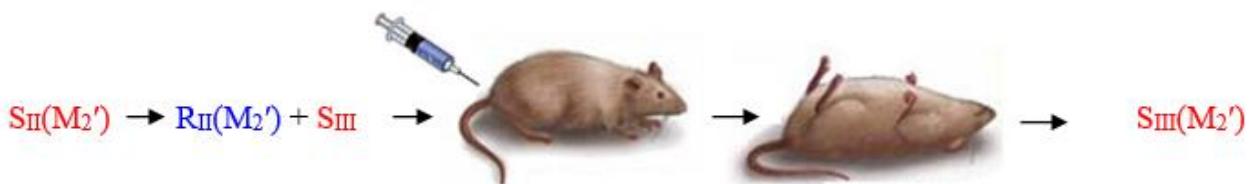


Если мышам вводили живые анирулентные (R) клетки пневмококков и убитые вирулентные (S) клетки пневмококков разных серотипов (клетки имели разные антигены), то выделенные из органов мыши капсульные клетки имели измененный серотип – тот, к которому принадлежали убитые S-пневмококки. В

контрольных опытах введение по отдельности такого же количества живых ацирулентных пневмококков или убитых вирулентных не приводило к появлению живых капсулных форм.



Чтобы доказать отсутствие случайного загрязнения бескапсулной культуры отдельными капсулыми 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 капсулного полисахарида.



Так было доказано отсутствие случайного загрязнения бескапсулной культуры отдельными капсулыми клетками.

На основании полученных результатов Ф. Гриффит сделал вывод, что существует трансформирующее начало, которое превращает бескапсулные клетки пневмококков одного серотипа в капсулные клетки другого серотипа.

В 1930 г. М. Даусон установил, что выдерживание суспензии клеток пневмококков в течение двух суток при температуре 37 °C 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 капсулные клетки и живые бескапсулные 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 пневмококков *S*-типа. Пневмококки были разрушены замораживанием-оттаиванием или дезоксихолатом натрия, и лизат несколько раз переосаждали спиртом.

Полученный осадок растворяли и смешивали с бескапсельными живыми клетками, в результате с высокой частотой происходило образование капсулльных 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 капсулльных клеток. Методика эксперимента заключалась в следующем. Капсулльные клетки пневмококков типа III (S_{III}), убитые нагреванием при температуре 65 °С, лизировали с помощью дезоксихолата 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 пневмококков 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 капсулльных клеток, убитых нагреванием. Оказалось, что протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, проназа) и РНКаза 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 однонитевых фрагментов донорной ДНК.

4. Синапс одноцепочных фрагментов донорной ДНК с двухцепочечной хромосомой реципиента.

5. Интеграцию одноцепочных фрагментов донорной ДНК в реципиентную ДНК в результате рекомбинации и образование рекомбинантных молекул ДНК.

6. Репликацию рекомбинантной молекулы ДНК.

7. Экспрессию генов, переданных от донора, т. е. образование трансформантов.

Состояние компетентности у прокариот

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 прокариот компетентность возникает лишь на определенном этапе роста культуры (естественная компетентность). 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 brasiliensis* – 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 устойчивый к высокой температуре (при нагревании до 100 °C 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 (рисунок 71).

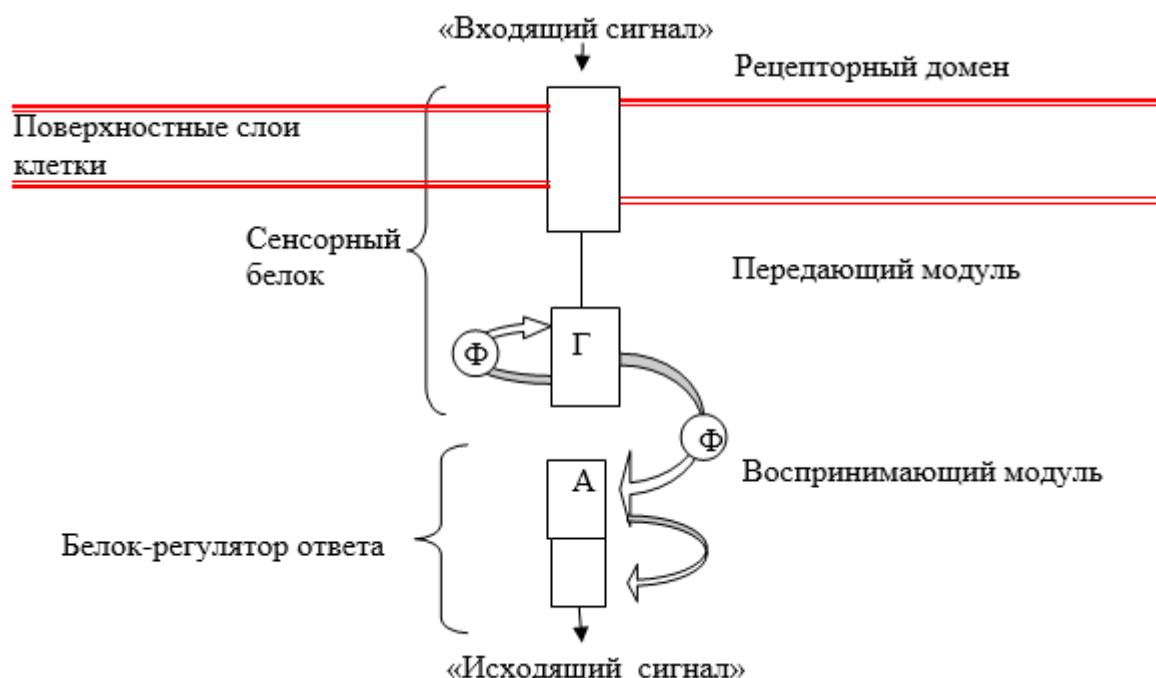


Рисунок 71 – Двухкомпонентная передающая система (по А. А. Прозорову, 2001): Ф – реакция фосфорилирования; Г, А – остатки гистидина и аспартата

Сенсорный белок состоит из трансмембранных рецепторного домена, пронизывающего поверхность 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:

1. обладают сниженным уровнем метаболизма;
2. более устойчивы к пенициллину, чем остальные клетки в популяции;
3. сниженным темпом репликации ДНК или вообще ее отсутствием;
4. меньшими размерами, чем некомпетентные;
5. изменением наружных слоев, наличием обнаженных участков цитоплазматической мембраны;
6. повышенной чувствительностью к осмотическому шоку, тепловой обработке;
7. снижением 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 – **кальциевый метод**. Клетки бактерий выдерживают в присутствии ионов Ca^{2+} (50 мМ) при 0 °C с последующим кратковременным тепловым воздействием при 37 °C или 42 °C. 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 мембранныя 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 добиться 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 бактерий *B. subtilis* адсорбируется за 2 мин (рисунок 72).

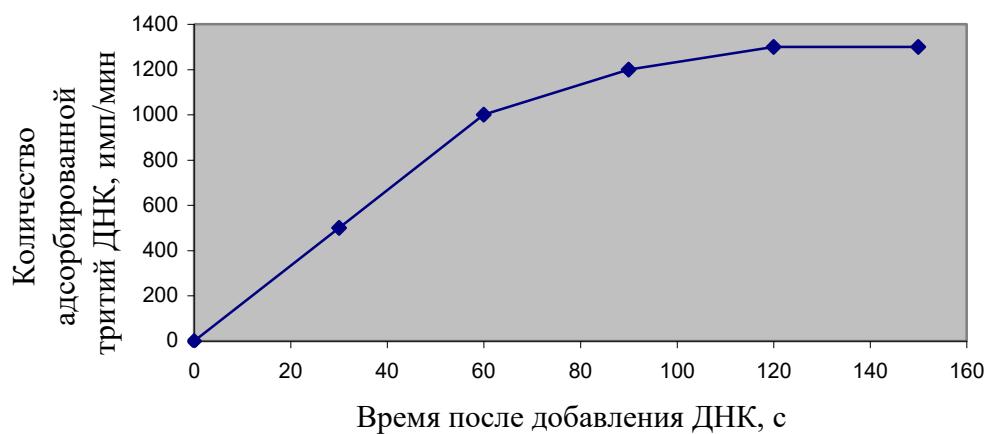


Рисунок 72 – Динамика адсорбции меченой ДНК на клетках компетентной культуры *B. subtilis* (по Д. Дубнау, 1976)

При адсорбции ДНК у бактерий *B. subtilis*, пневмококков и других стрептококков молекулы трансформирующей ДНК прикрепляются к рецепторным участкам – белкам мембранны, 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 адсорбией 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 мембранны 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 однонитевые фрагменты ДНК, которые переходят в цитоплазму.

Таким образом, у всех изученных к настоящему времени прокариот, способных трансформироваться, показано наличие однонитевых 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 трансформирующими активностями. Считают, что наличие эклипс-фазы связано с образованием однонитевых ДНК.

Однонитевая 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 однонитевой 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 (рисунок 73).

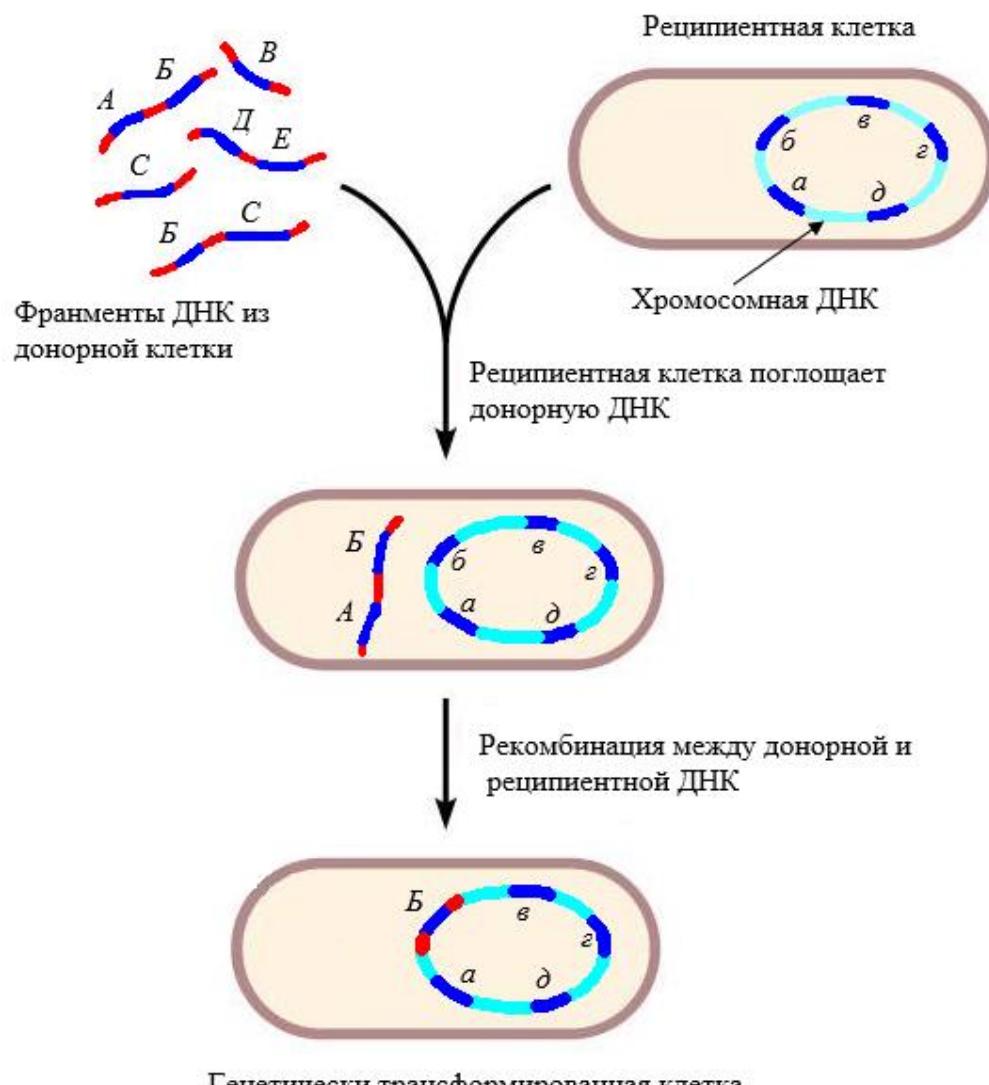


Рисунок 73 – Схема процесса трансформации

После включения однонитевого фрагмента ДНК донора в хромосому реципиента может происходить явление **коррекции**. Оно сводится к выщеплению одной из нитей, принадлежащих донору или реципиенту, из двунитевого гибридного участка ДНК, и репаративному синтезу на месте образовавшейся бреши 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 карттирования 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.

1.8.5.2. 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⁺* (рисунок 74).

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 клонны появлялись с частотой приблизительно $10^{-6} - 10^{-7}$.

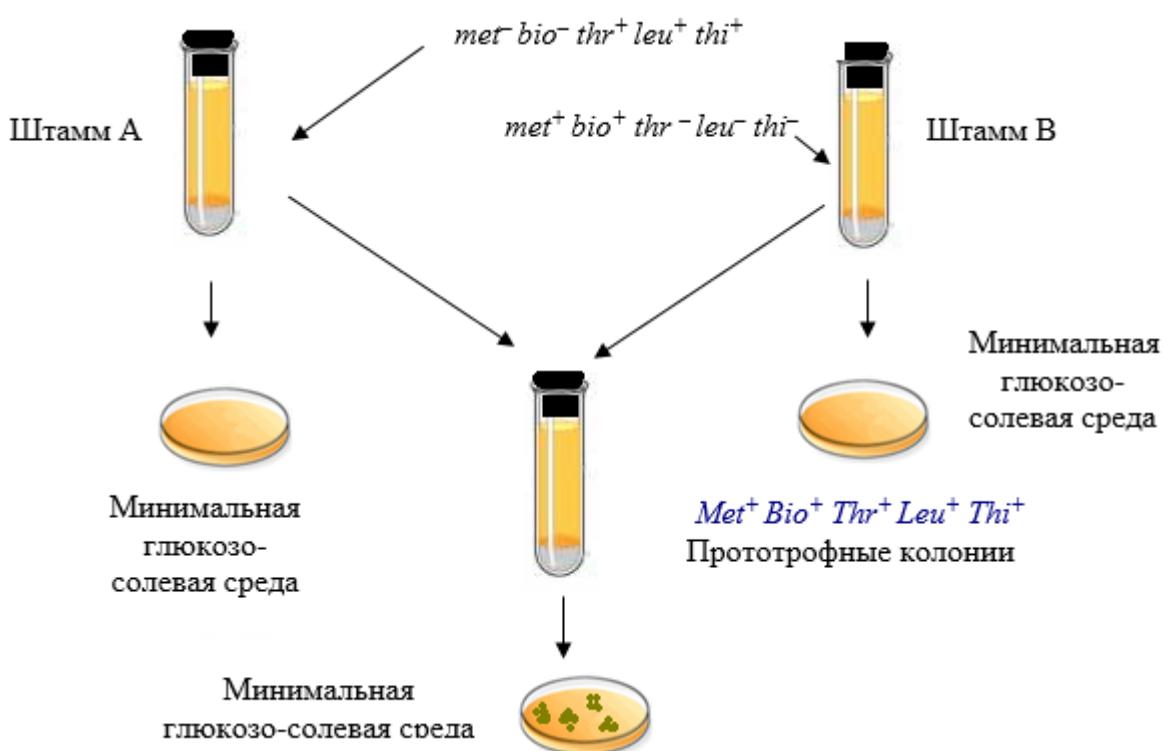


Рисунок 74 – Схематическое изображение классического опыта по скрещиванию ауксотрофных мутантов, проведенного Дж. Ледербергом и Э. Татумом

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:

B *met⁺ bio⁺ thr⁻ leu⁻ thi⁻*
A *met⁻ bio⁻ thr⁺ leu⁺ thi⁺*

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 (штамма А) обрабатывали стерильным фильтратом среды, в которой был выращен другой штамм (штамм В). Смесь высевали на минимальную глюкозо-солевую среду, инкубировали при температуре 37 °C, 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 (рисунок 75).

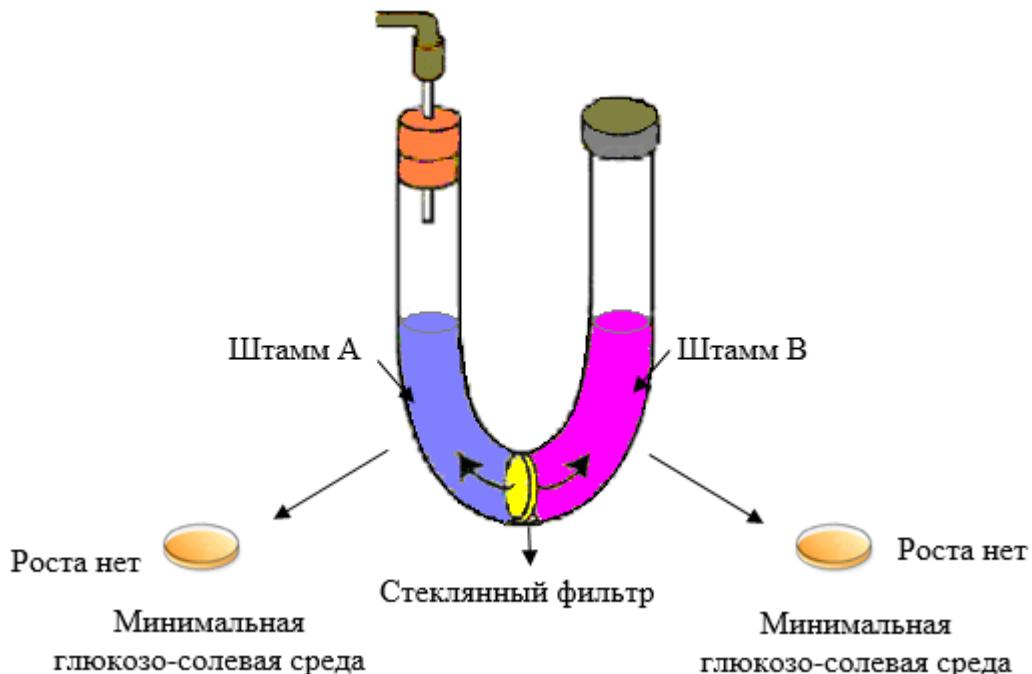


Рисунок 75 – Схема эксперимента Б. Дэвиса

Бактерии двух ауксотрофных штаммов А и В засевали 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 высеивании 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 трансконъюгантные клетки.

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 стрептомициностойчивости и один из скрещиваемых штаммов был устойчивым к этому антибиотику. Если штамм А являлся стрептомициностойчивым, 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 стрептомициностойчивым 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:

$$\begin{array}{l} ♂ \text{ Hfr } thr^+ leu^+ lac^+ gal^+ Str-s; \\ ♀ \text{ F}^- \text{ thr}^- leu^- lac^- gal^- Str-r. \end{array}$$

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 рекомбиванты *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 геном реципиентной клетки. Чем дальше (дистальнее) расположены гены от точки *ori*, тем ниже вероятность их переноса и включения в геном реципиентной клетки (рисунок 76).

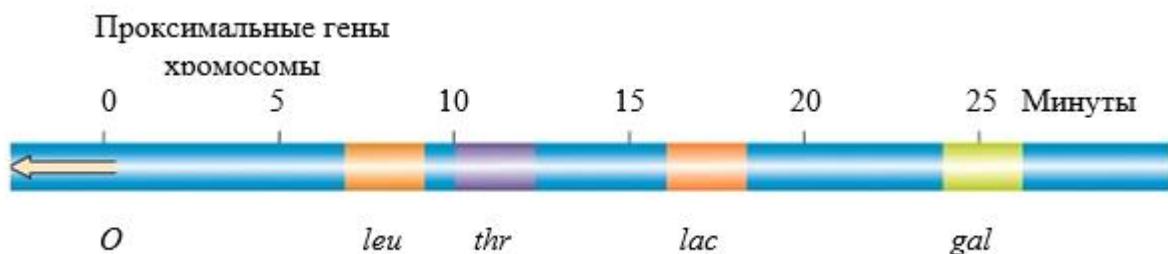


Рисунок 76 – Ориентированный перенос генетического материала

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.

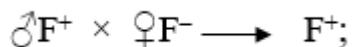
В связи с тем что в хромосоме бактерий *E. coli* имеется несколько IS-элементов и транспозонов, а располагаются они в разных ее участках, встраивание F-фактора может происходить в различных участках генома (\approx в 20 геновых локусах) в различных ориентациях и, как следствие этого, могут образовываться 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 F-фактора 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

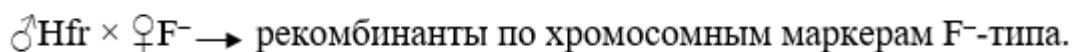
маркера от точки начала переноса), в основном не содержащие в своем геноме F-фактора (F⁻-клетки).

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:

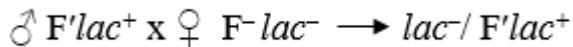


Интеграция F-фактора в бактериальную хромосому обратима. F-фактор может исключаться из хромосомы, и в этом случае клетка Hfr становится F⁺-клеткой. Процесс вырезания, или эксцизии, F-фактора происходит примерно с такой же частотой, что и интеграция. При правильной эксцизии разрыв и воссоединение молекул 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 (рисунок 77).

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 **сексдукции** или **F-дукции**, что схематично можно изобразить следующим образом:



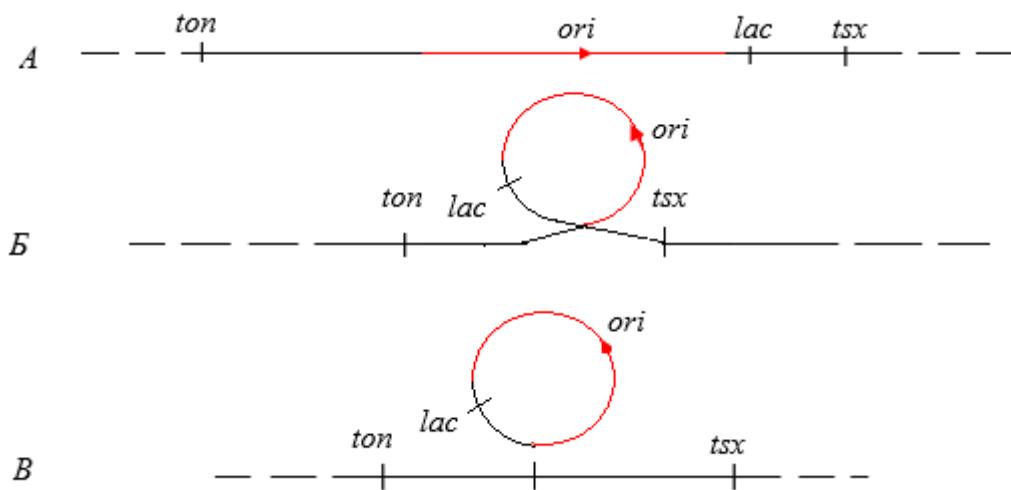


Рисунок 77 – Схема образования F'*lac*⁺-доноров промежуточного типа:
A – F-фактор, включенный в хромосому Hfr-бактерий между геном *ton* и *lac*-опероном; *B* – при «вырезке» F-фактора образуется неправильная петля, вовлекающая участок бактериальной хромосомы с *lac*-опероном; *C* – образовавшаяся кольцевая ДНК F'-фактора содержит бактериальный *lac*-оперон. В бактериальной хромосоме этот оперон отсутствует

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 прокариотами противоположных полов. Однако установлено, что скорость конъюгации в

определенных пределах пропорциональна концентрации клеток прокариот. Поэтому для скрещивания берут культуры прокариот с концентрацией $5 \cdot 10^7$ – $5 \cdot 10^8$ кл/мл. Обычно донорных клеток 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 (рисунок 78).



Рисунок 78 – Подкрашенная микрофотография конъюгирующих клеток бактерий *E. coli*

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 (рисунок 79).

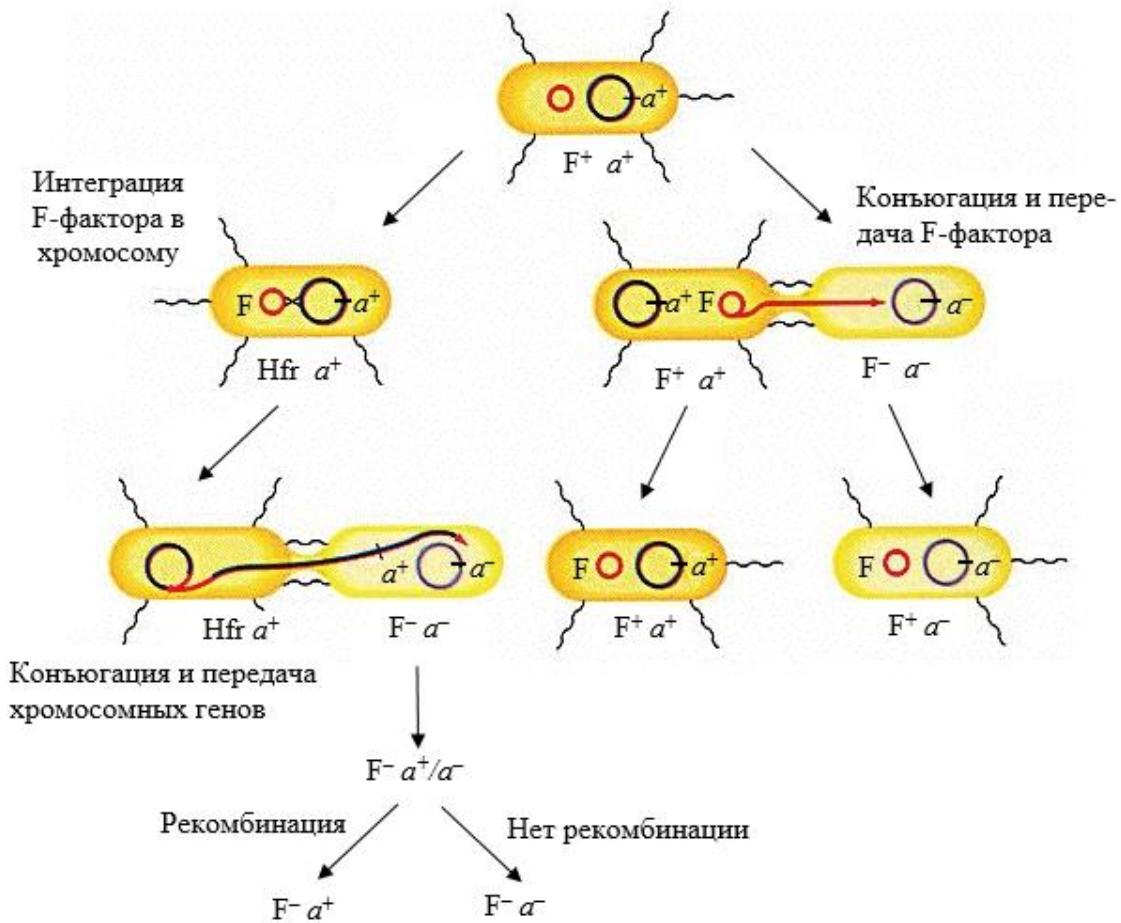


Рисунок 79 – Передача генетического материала при конъюгации

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 прокариот.

1.8.5.3. 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 revertантов 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 22A в концентрации $1 \cdot 10^8$ кл/мл, в другую – такое же количество клеток штамма 2A. После определенного периода инкубации в той ветви пробирки, в которую были внесены клетки штамма 22A, Циндер и Ледерберг обнаружили прототрофные клетки, которые формировались с частотой $1 \cdot 10^{-5}$. В той ветви пробирки, в которую были внесены клетки штамма 2A, прототрофы отсутствовали (рисунок 80).

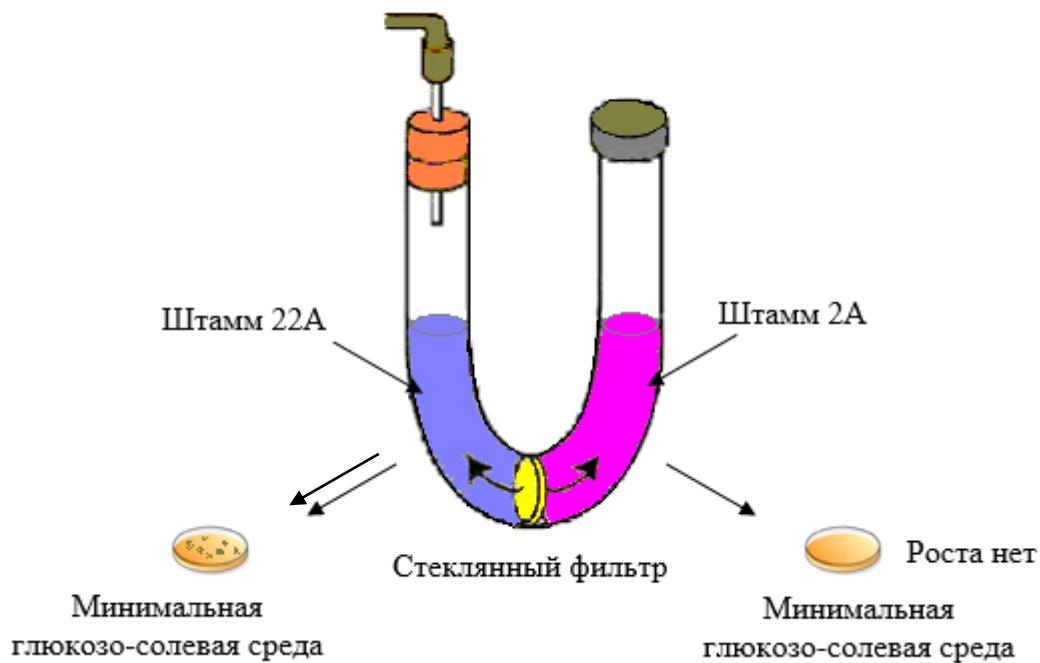


Рисунок 80 – Схематическое изображение классического опыта Н. Циндера и Дж. Ледерберга

Полученные результаты не подтвердили предположение Н. Циндера и Дж. Ледерберга о конъюгационном переносе наследственной информации у штаммов 2A и 22A *S. typhimurium*. Последующая проверка этих штаммов показала, что штамм 22A заражен фагом P22. Этот фаг способен инфицировать и лизировать клетки штамма 2A. После проникновения через стеклянный фильтр он инфицировал клетки штамма 2A, репродуцировался и лизировал их. При этом освобождался фильтрующийся агент (ФА) (так его называли Циндер и Ледерберг), который в свою очередь проникал через стеклянный фильтр. Под влиянием ФА некоторые клетки штамма 22A приобретают специфические наследственные свойства, характерные для того штамма (штамма 2A), 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 P22. Был сделан вывод, что фаг P22 переносит наследственную информацию от клеток штамма 2A в клетки штамма 22A.

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 **трансдукционными**. 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 (рисунок 81).

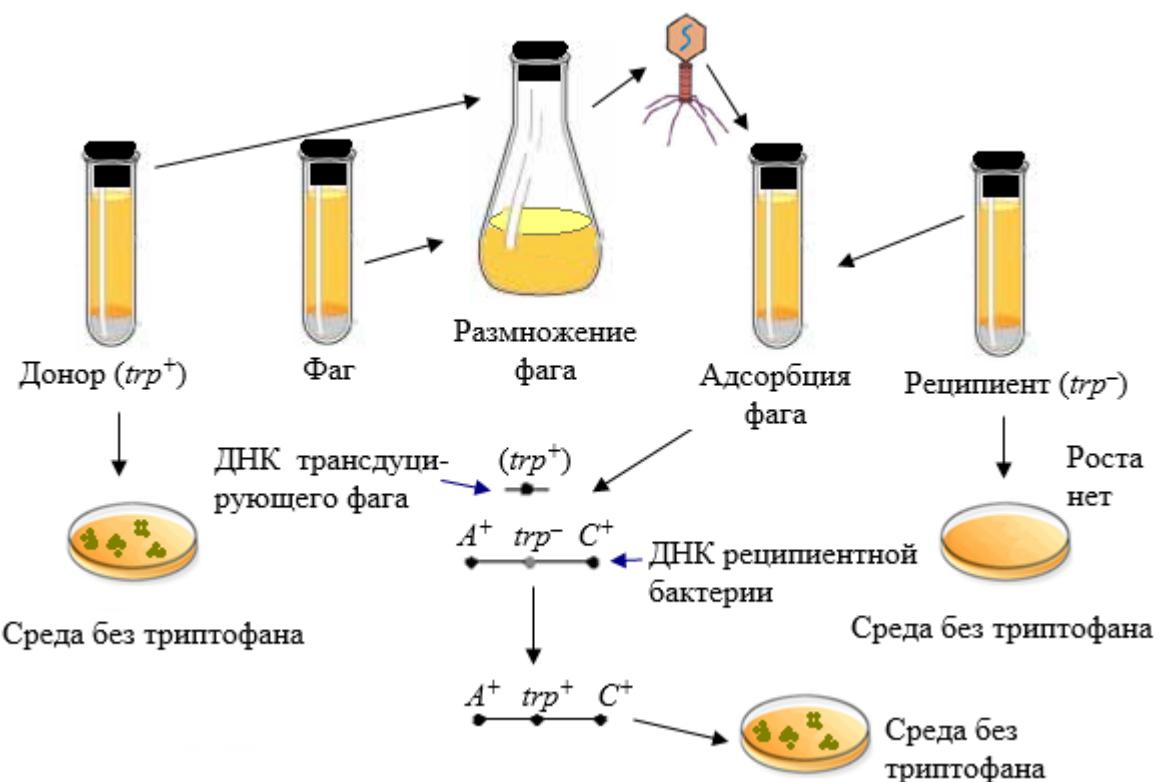


Рисунок 81 – Схема опыта по трансдукции

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 бактериофаг является только переносчиком генетического материала бактерий. При специфической трансдукции фаг 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 бактерий *E. coli*, PBS1 бактерий *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 лизическом 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 упаковывающиеся 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. рекомбинируют с ДНК реципиента линейные фрагменты ДНК донора. Рекомбинация, происходящая при общей трансдукции, находится под контролем *recA*-гена, т. е. это гомологичная рекомбинация, осуществляющаяся путем реципрокного обмена соответствующими гомологичными участками. Возникают рекомбинанты, называемые трансдуктантами. Трансдуктантами называют генетически неизогенные и не обладающие иммунитетом к фагам, так как трансдуцирующие частицы, вызвавшие их образование, не содержат фаговой ДНК (рисунок 82).

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 abortивные трансдуктанты. При *abortивной*, 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 abortивные трансдуктантны на

селективной среде формируют микроколонии по сравнению с колониями истинных трансдуктантов. Такие микроколонии abortивных трансдуктантов содержат только одну клетку, несущую экзогеноту, или привнесенный фагом ген донорной ДНК.

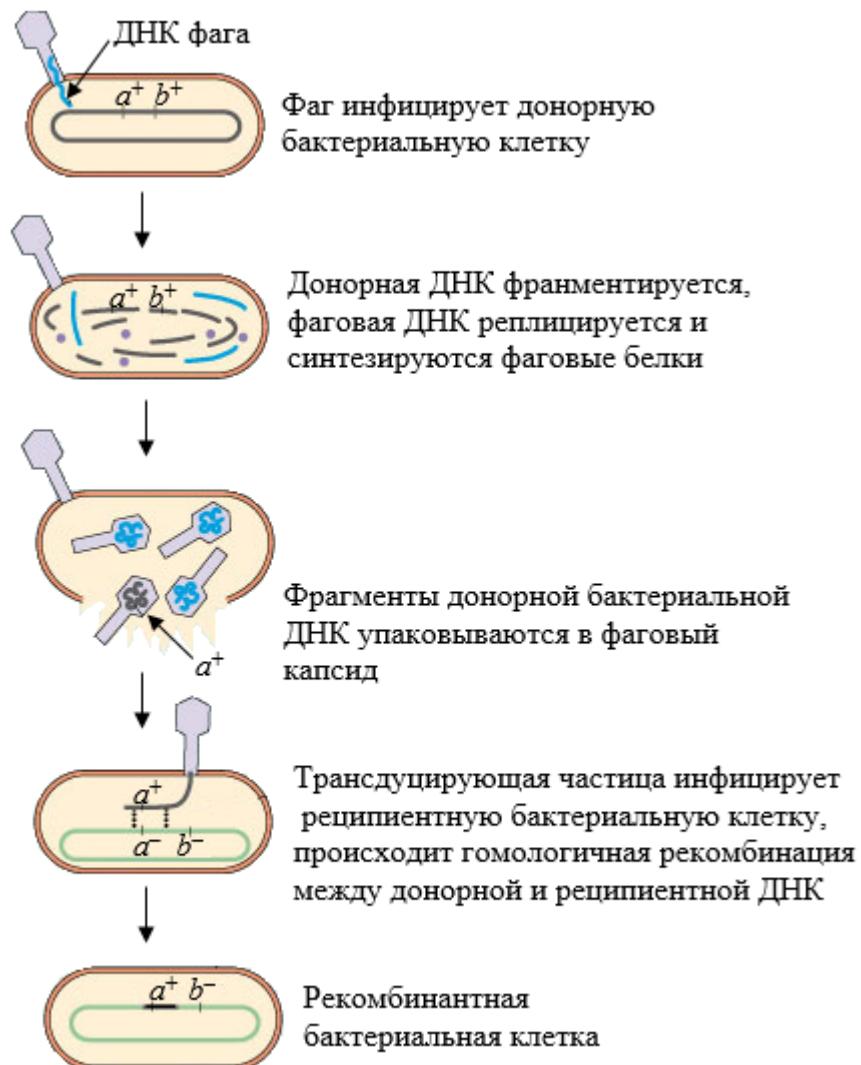


Рисунок 82 – Схема генерализованной трансдукции

Впервые abortивную 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 abortивной трансдукции составляет примерно 1:10, т. е. abortивная 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.

ДНК умеренного фага 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 (эксизия) 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 эксизии профага рекомбинация осуществляется не в *att λ* -сайте, а захватывает участки *gal* либо *bio*. Полагают, что это обусловлено «неправильным» образованием петли при эксизии профага. В результате этого прилегающая к профагу область бактериального генома выпадает 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. Встраиваясь в геном фага бактериальный генетический материал может заместить до 1/3 генетического материала фага.

После упаковки фаговой ДНК, часть которой замещена бактериальной, в головку фага 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 несущественен, 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 (рисунок 83).

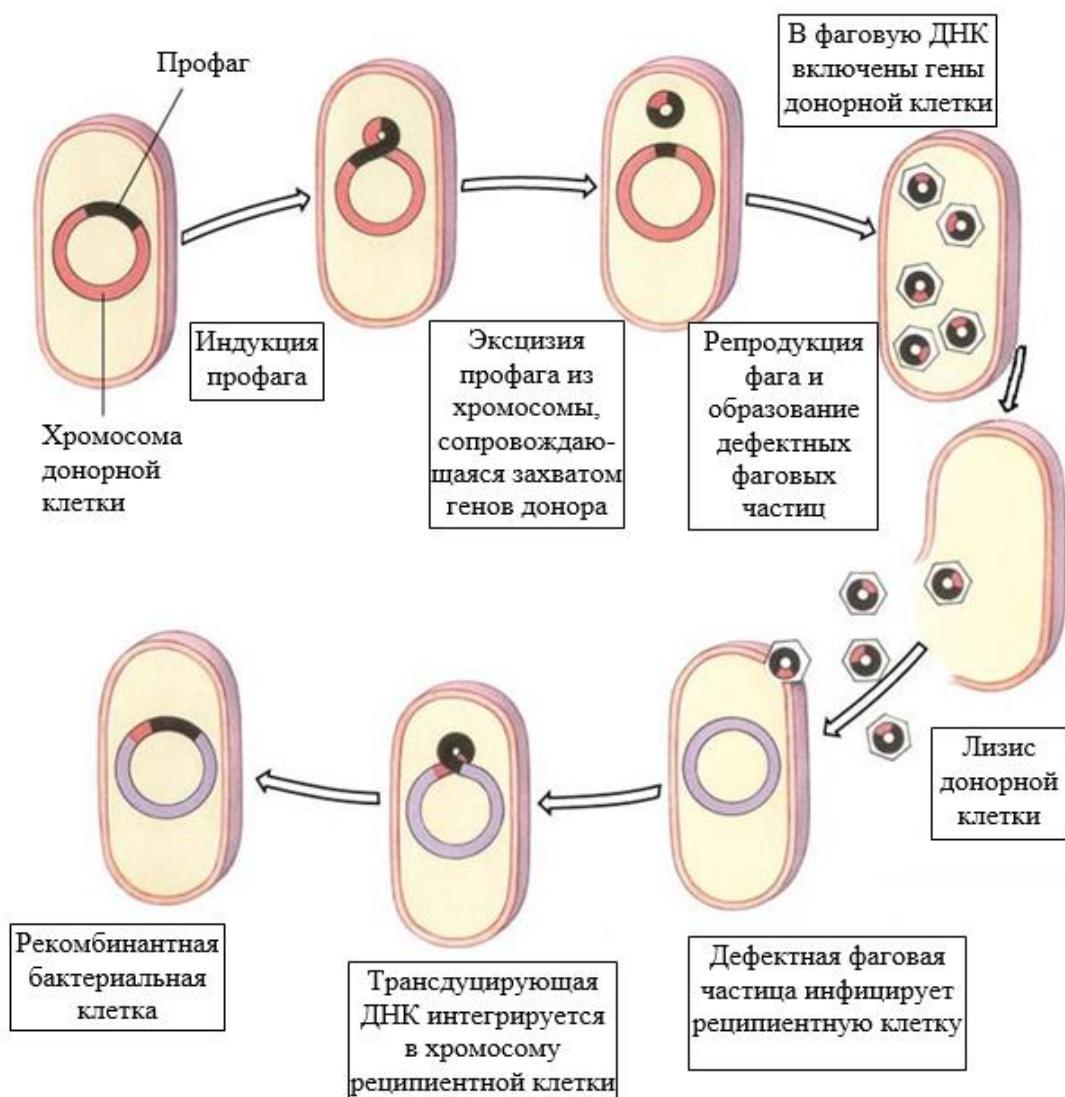


Рисунок 83 – Схема специфической трансдукции

Было установлено, что при индукции профага λ чаще образуются дефектные частицы, содержащие гены локуса *gal*. Такие дефектные частицы обозначают λ *gal* (фаг λ , *defective, gal*). Если в геноме фага λ содержится ген, ответственный за синтез биотина, то – λ *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 ϕ 80, 434, 82 и др. В частности, фаг ϕ 80 включается в хромосому вблизи генов, кодирующих образование ферментов, ответственных за синтез триптофана. По этой причине фаг ϕ 80 пригоден для переноса генов *trp*.

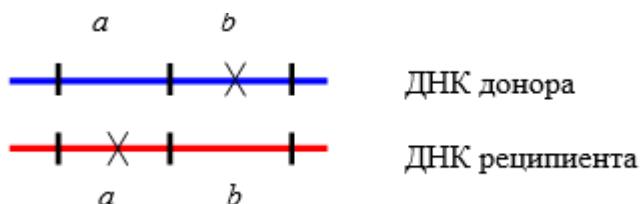
Было установлено, что фаг P22 *S. typhimurium*, кроме общей трансдукции, может осуществлять и специфическую трансдукцию. При литическом цикле развития бактериофаг P22 может осуществлять общую трансдукцию, а при

лизогенизации – специфическую. ДНК фага P22 интегрируется в участок хромосомы рядом с генами, ответственными за синтез пролина. Интеграция профага резко стимулирует образование специфических трансдуцирующих частиц.

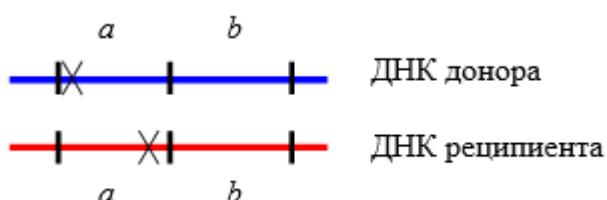
Таким образом, для осуществления специфической трансдукции необходима предварительная лизогенизация бактерий-доноров и последующая индукция профага из клеток. Образовавшиеся при этом дефектные трансдуцирующие частицы фагов заражают клетки реципиентного штамма, происходит их лизогенизация и встраивание профага с участком генома бактерии донора в хромосому реципиента.

Использовать трансдукцию можно в следующих направлениях:

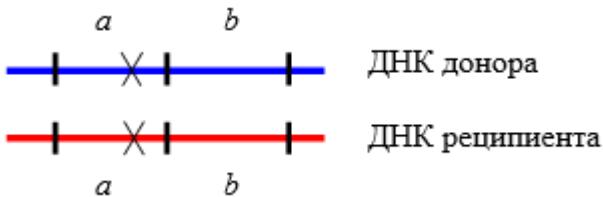
- трансдупировать плазмиды и короткие фрагменты хромосомы донора;
- для конструирования штаммов заданного генотипа, в частности изогенных штаммов. Здесь малый размер передаваемых фрагментов обеспечивает преимущество трансдукции перед конъюгацией. Изогенные штаммы, сконструированные при помощи генерализованной трансдукции, отличаются 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 колонии 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:



1.8.6. Репарация повреждений ДНК у прокариот

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 прокариотах.

Если клетки прокариот 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 следующие механизмы репарации ДНК после повреждений такого типа: фотопрекращение, эксцизионная репарация и пострепликационная, или рекомбинационная репарация и SOS-ответ.

Эксцизионную и пострепликационную репарации называют еще темновой репарацией.

Фотопрекращение – восстановление молекул ДНК, поврежденных УФ-лучами, в результате последующего воздействия на них видимого света. Бактериальные клетки содержат фермент фотопрекращения – дезоксиридилинфотолиазу, синтез которого у бактерий *E. coli* детерминируется геном *phr*. Субстратом для этого фермента служат димеры тимина. Фермент находит в ДНК образовавшийся под действием УФ-лучей пириимидиновый димер иочно связывается с ним. Если клетки перенести на видимый свет, то комплекс фермента фотопрекращения и димеров тимина распадается, при этом происходит восстановление нормальной структуры ДНК, т. е. мономеризация, или расщепление димеров тимина.

Следует отметить, что фотопрекращение 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 рисунке 84. На первом этапе узнавания поврежденная структура распознается эндонуклеазой, которая разрезает цепь ДНК на расстоянии восьми фосфодиэфирных связей с 5'-стороны и четырехпяти связей с 3'-стороны от повреждения. На стадии вырезания 5'-3'-экзонуклеаза 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.

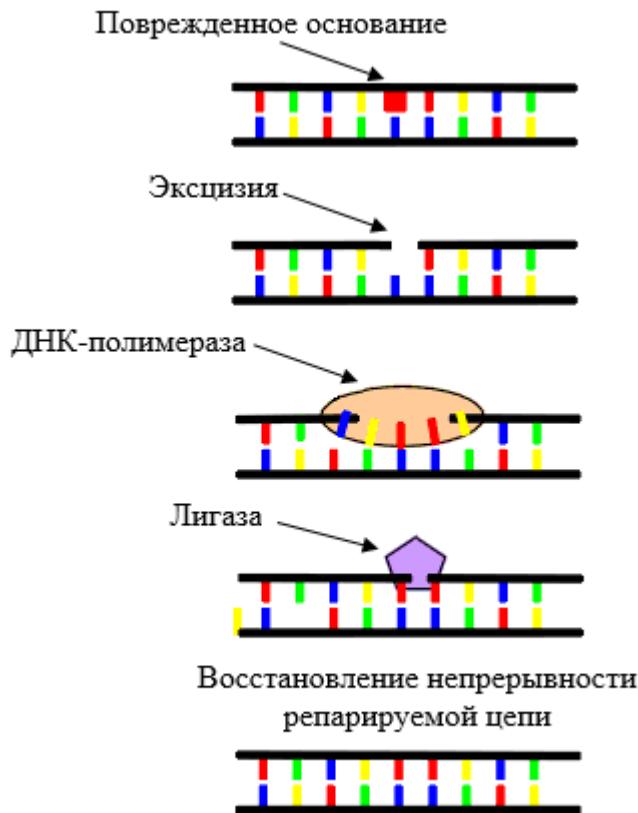


Рисунок 84 – Эксцизионная репарация ДНК

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.

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 однонитевыми пробелами или брешами напротив димера тимила в родительской матричной цепи ДНК. Это говорит о том, что наличие димера тимила в матричной нити ДНК препятствует продвижению ДНК-полимеразы. Через 1 ч после синтеза таких разорванных дочерних цепей эти бреши превращаются в непрерывные цепи ДНК нормальной длины. Бреши 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 тимила, 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 осуществляется белок RecA. Возникающий пробел на второй молекуле заполняется ДНК-полимеразой, считывающей комплементарную нить с матричной неповрежденной нити. Лигаза окончательно восстанавливает непрерывность цепи (рисунок 85).

Многие воздействия, которые повреждают ДНК или ингибируют ее репликацию у бактерий *E. coli*, индуцируют серию фенотипических изменений, получивших название *SOS-ответа*.

Существование этой системы впервые постулировал М. Радман в 1974 г. Он и дал название этому механизму, включив в него международный сигнал бедствия «SOS» («спасите наши души»). SOS-репарация выявлена не только у прокариот, но и у животных и человека. Этот механизм включается тогда, когда повреждений в ДНК становится настолько много, что происходит угроза жизни клетки. В этом случае происходит индукция разных генов, задействованных в различных клеточных процессах, сопряженных с репарацией ДНК. Включение тех или иных генов, определяемых количеством повреждений в ДНК, приводит к различным по значимости клеточным ответам (начиная со стандартной репарации поврежденных нуклеотидов и кончая подавлением клеточного деления).

Наиболее полно SOS-репарация изучена у бактерий *E. coli*. Она осуществляется с помощью двух белков, кодируемых генами *recA* и *lexA*.

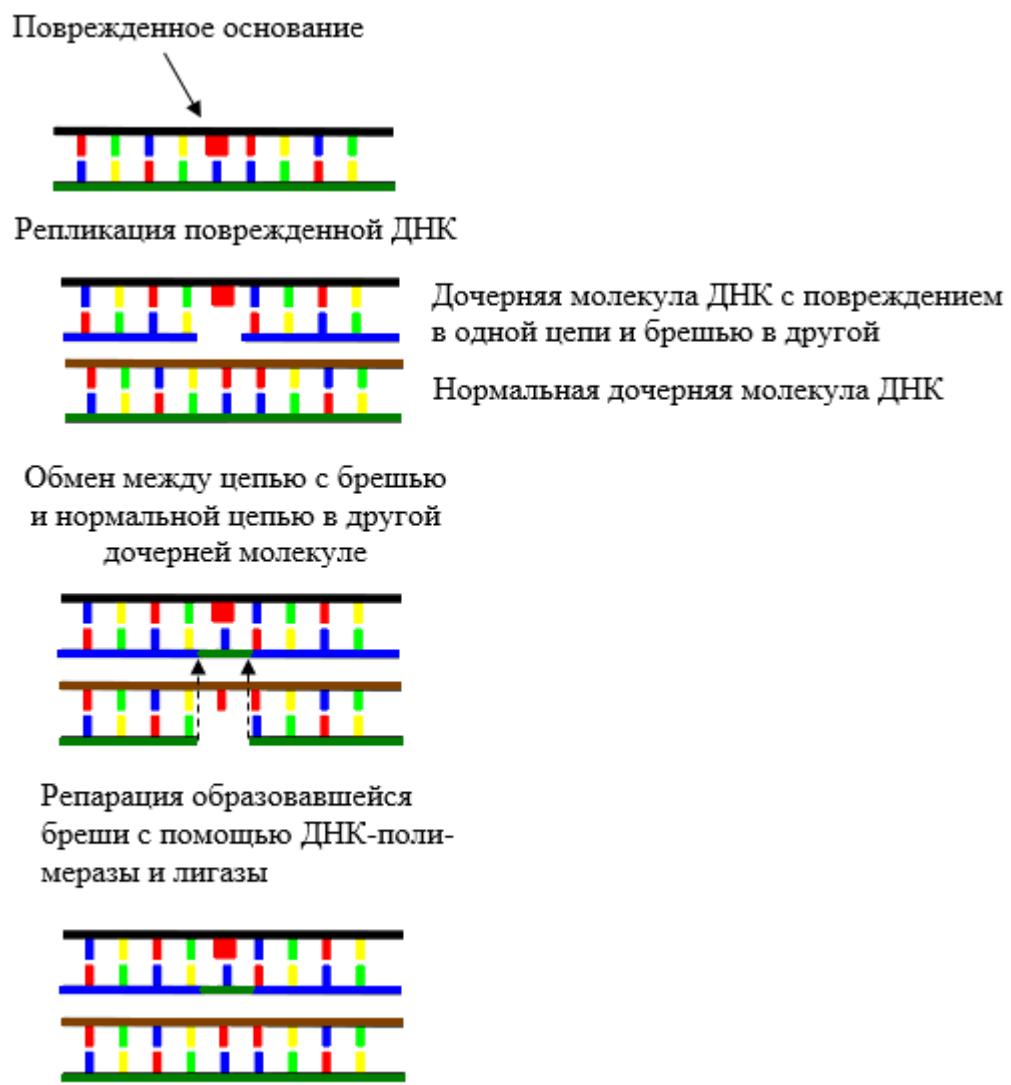


Рисунок 85 – Рекомбинационная репарация ДНК

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*, *itimC* 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 мишениями 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.

За исследования механизмов восстановления ДНК в 2015 г. присуждена Нобелевская премия по химии шведу, работающему в Великобритании Томасу Линдalu, американцу Полу Модричу и американцу турецкого происхождения Азизу Санджару.

1.8.7. Система рестрикции-модификации клеток микроорганизмов

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 зависит от того, имеются или нет на бактериальных клетках рецепторы для адсорбции бактериофага. Кроме того, у бактерий есть и другие механизмы, обусловливающие специфичность взаимоотношений с бактериофагами.

Одним из таких механизмов является CRISPR-защитная система, которая содержит библиотеку коротких последовательностей ДНК, совпадающих с последовательностями ДНК фагов. При инфицировании бактерий последовательностью ДНК, совпадающей с имеющейся в библиотеке, синтезируются ферменты каспазы (Cas), которые раскручивают внедрившуюся ДНК и режут ее на фрагменты, останавливая инфекцию.

Еще одним защитным механизмом у прокариот является система рестрикции-модификации. Система рестрикции-модификации – ферментативная система бактериальной клетки, разрушающая попавшую в нее чужеродную ДНК, например, бактериофагов и плазмид. Система рестрикции-модификации была открыта С. Лурия и др. в 1952 г. в результате изучения молекулярных механизмов явления, называемого «ограничение, контролируемое хозяином» (англ. host-controlled restriction) или «рестрикция».

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 размножаться в клетках нового хозяина. Если же

фаговые частицы, образовавшиеся после цикла репродукции на клетках *E. coli* C, использовать для заражения такой же культуры (*E. coli* C), то размножение бактериофага λ вновь будет проходить normally и эффективность посева составит единицу. Однако если перед заражением бактерий *E. coli* C фаг пропассировать на клетках *E. coli* K-12, то на штамме *E. coli* C 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* C), 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 (рисунок 86).

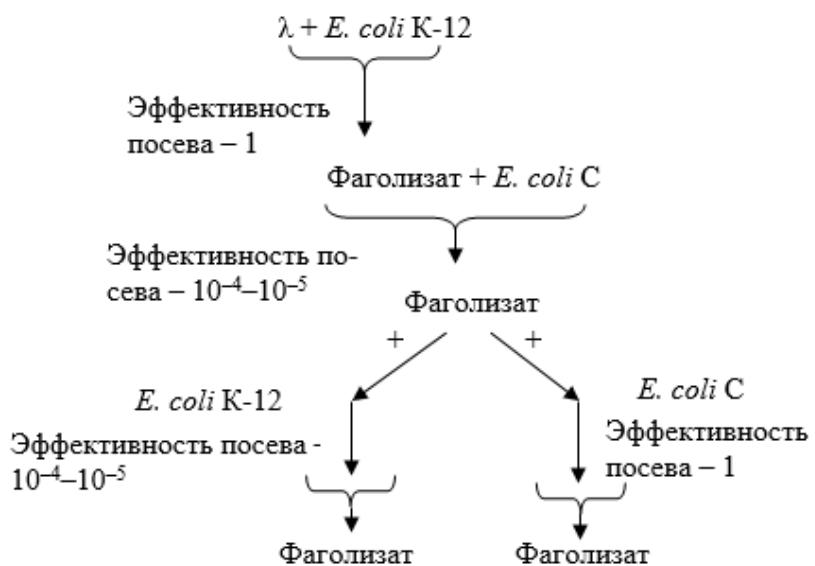


Рисунок 86 – Эксперимент по выявлению системы рестрикции-модификации у бактерий *E. coli*

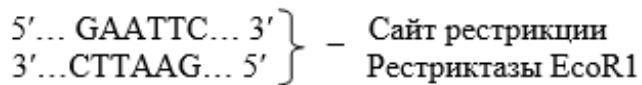
Следовательно, работающая в клетках бактерий система рестрикции-модификации (система R-M) образована двумя специфическими для определенного штамма микроорганизма ферментами – ДНК-модифицирующим (аденин- или цитозинметилаза) и расщепляющим (рестриктаза). Эти ферменты узнают в ДНК одни и те же определенные короткие последовательности нуклеотидов – *сайты*. Метилаза, модифицируя определенные основания внутриклеточной ДНК, защищает ее от действия рестриктазы, узнавшей ту же нуклеотидную последовательность.

Системы рестрикции-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* – Bs, *Escherichia coli* – Eco. Если же в определенном штамме имеется несколько систем рестрикции и модификации, то вводится дополнительное числовое обозначение. Ферменты систем рестрикции-модификации могут кодироваться плазмидными и фаговыми генами, и тогда к названию фермента добавляется название внекромосомного элемента. Например, название EcoR1 относится к ферменту рестриктазе, детерминируемому плазмидой R1; название EcoP1 – к ферменту, кодирующему фагом P1. В настоящее время все известные рестриктазы в зависимости от потребности в кофакторах и характера расщепления нуклеотидных последовательностей ДНК разделяют на несколько типов.

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.

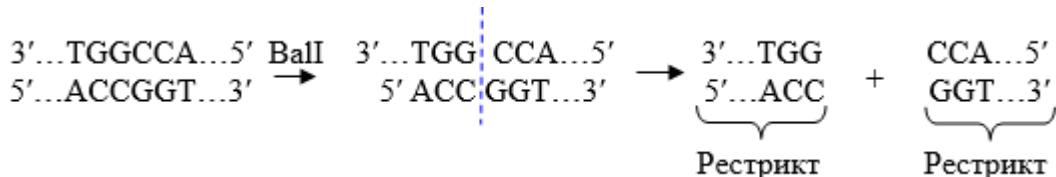
Системы рестрикции и модификации II типа представлены двумя отдельными белками (рестрикционная эндонуклеаза, модификационная метилаза). **Рестриктазы II типа** – относительно просто организованные белки, состоящие из двух субъединиц одного типа со сравнительно небольшой молекулярной массой. Для специфического 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) мелкощепяющие – сайт рестрикции представлен 4 п.н.;
 - 2) среднешепяющие – сайт рестрикции – 6 – 8 п.н.;
 - 3) крупнощепяющие – 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 *Bal*II:



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 однонитевые 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.

1.8.8. Генетическая инженерия. Клонирование генов в клетках микроорганизмов

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 рекомбинантную 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 выдерживают при оптимальных условиях смесь высеваю на селективную среду, позволяющую отобрать по фенотипу клоны, воспринявшим плазмиду.

Схема эксперимента по конструированию рекомбинантной ДНК и клонированию генов в клетках бактерий представлена на рисунке 87.

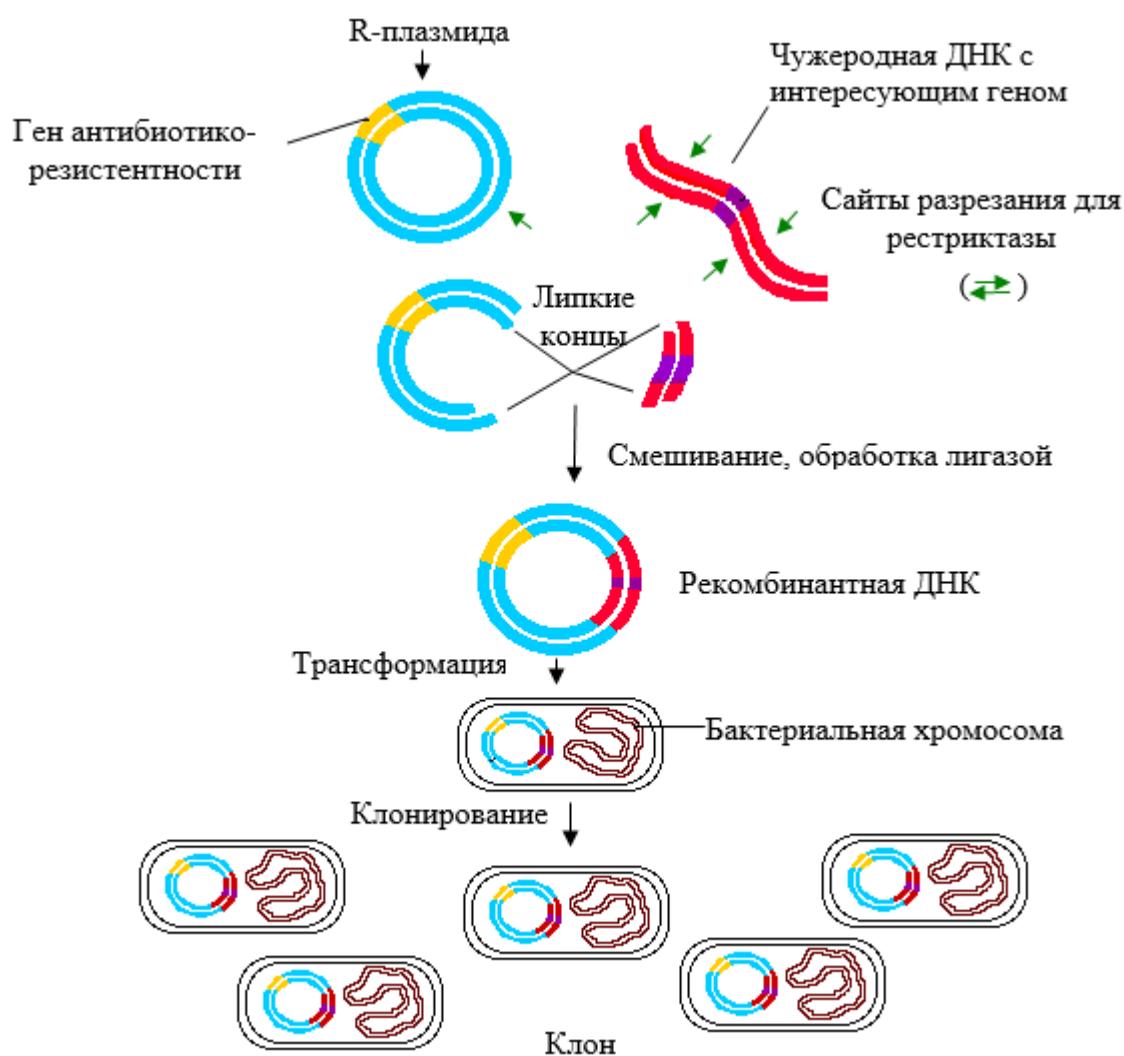


Рисунок 87 – Получение и клонирование рекомбинантной ДНК

Метод клонирования нашел широкое применение. С его помощью можно получать микробиологическим путем продукты, использующиеся 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.

Сегодняшняя биофармацевтика позволяет получать не только простые генно-инженерные белковые лекарственные средства, но и лекарственные средства в виде сложных биомолекул: факторы свертываемости крови, противоопухолевые антитела, цитокины, поверхностные опухолевые антигены, мультивалентные вакцины на основе нескольких генно-инженерных белков и др.

В настоящее время продуцентами генно-инженерных лекарств для медицины и ветеринарии являются не только бактериальные, но и дрожжевые, растительные и животные клетки. Одной из основных причин такого успеха биофармацевтики является постоянный рост народонаселения и острая нехватка лекарственных средств, получаемых из человеческого или природного (животного или растительного происхождения) материала. Кроме того, лекарства, полученные из животных источников, очень опасны иммунными реакциями и побочными эффектами, а также вирусно-прионными контаминациями.

1.8.9. Регуляция метаболизма у прокариот

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 бактерий *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. Карстрем, 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 гидролиза 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 бактерий *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 индуцируемых. Следовательно, в настоящее время различают конститутивные и индуцируемые 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.

1.8.9.1. 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 (рисунок 88).

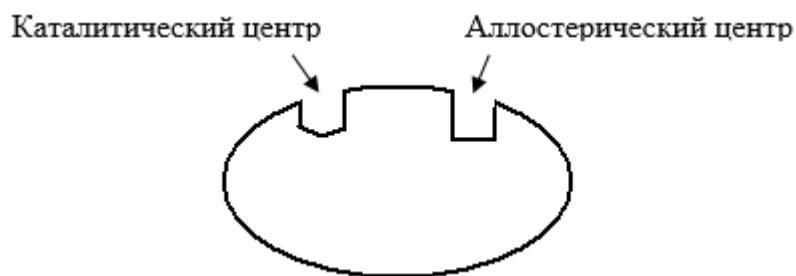


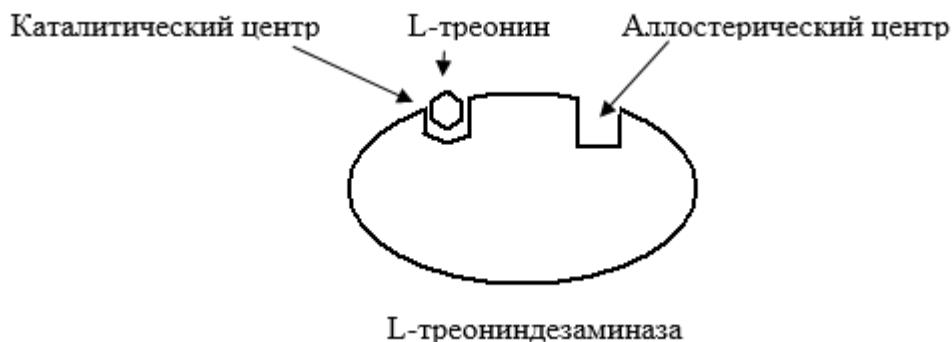
Рисунок 88 – Субъединица аллостерического фермента

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.

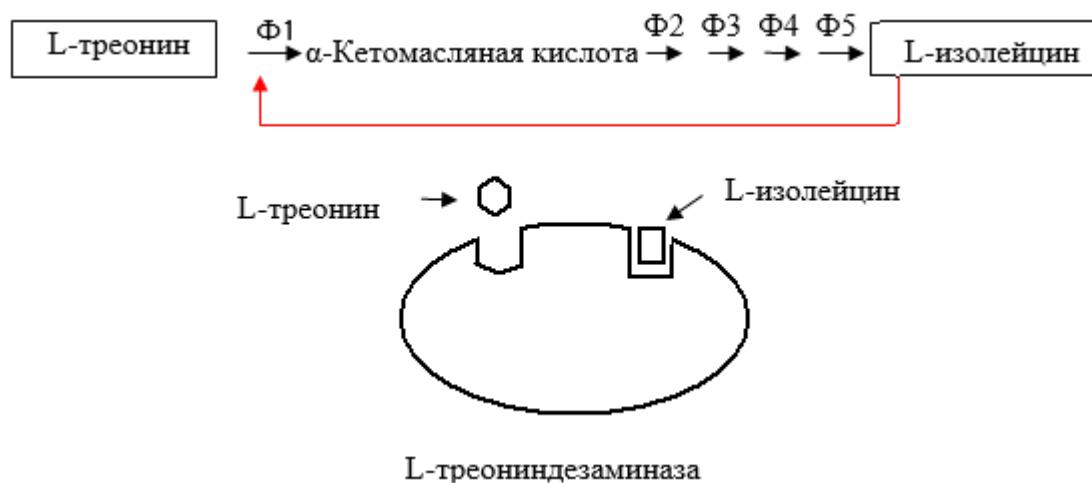
Наиболее простой случай аллостерической регуляции – регуляция конечным продуктом активности первого (ключевого) фермента неразветвленного биосинтетического пути. Если конечный продукт накапливается в избытке, он подавляет активность первого фермента. Этот процесс называется *ретроингибированием* или ингибированием по принципу обратной связи. Примером такого типа регулирования является ингибирование биосинтеза изолейцина. Превращение L-тронина в L-изолейцин включает пять ферментативных реакций:



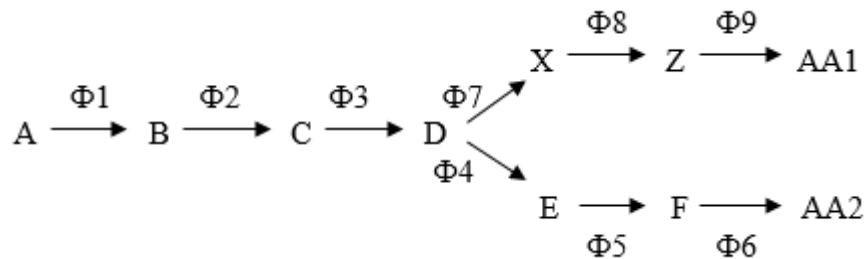
Первый фермент на пути синтеза L-изолейцина L-трониндезаминаза является аллостерическим и ингибируется только L-изолейцином. На поверхности молекулы L-трониндезаминазы имеются два вида участков: каталитический – для связывания субстрата (L-тронина) и регуляторный – для связывания эффектора (L-изолейцина):



При накоплении в клетке L-изолейцина он связывается с аллостерическим центром фермента L-трониндезаминазы, подавляя его активность, и синтез L-изолейцина прекращается:



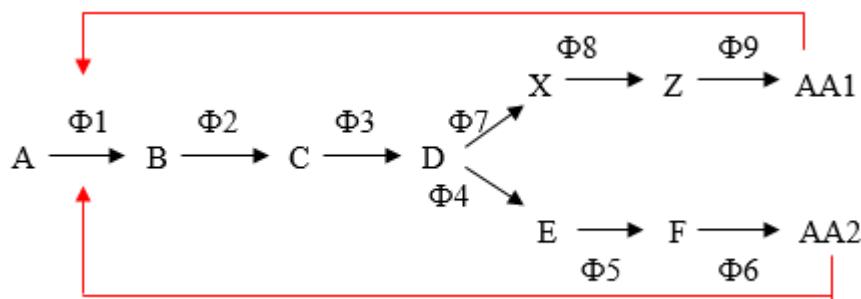
В разветвленных метаболических путях активность аллостерических ферментов регулируется сложнее, так как от активности первого фермента зависит биосинтез нескольких конечных продуктов. Например:



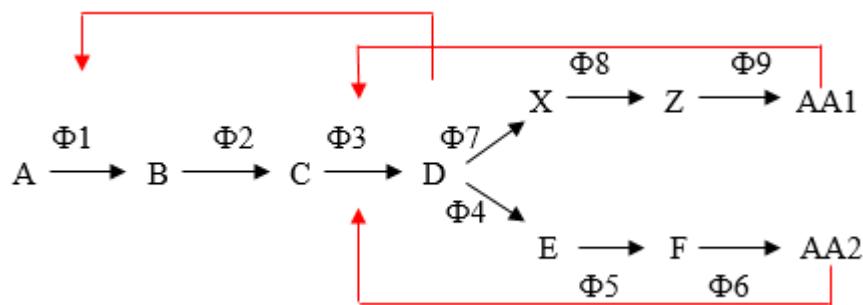
В этом случае на поверхности молекулы фермента (Φ_1), катализирующего первый этап биосинтетического пути, имеются различные аллостерические центры, с каждым из них связывается один из конечных продуктов, выполняющих функцию эффектора. Ингибиование активности этого фермента может происходить двояко:

мультивалентное ингибиование – 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, ингибиование – присоединение к ферменту одного конечного продукта частично снижает его активность, с присоединением каждого последующего конечного продукта эффект ингибиции нарастает:



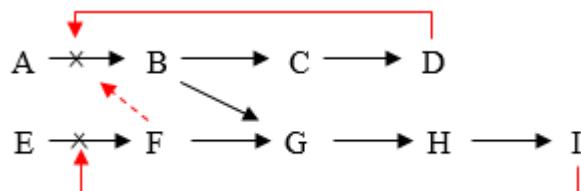
В некоторых разветвленных биосинтетических путях ингибирование первого фермента осуществляется не конечными продуктами каждой из ветвей, а промежуточным продуктом, образующимся непосредственно перед разветвлением. Накопление его в свою очередь контролируется конечными продуктами. Такой вид ингибирования получил название **последовательного**:



Примером такого ретроингибирования является ингибирование фермента ДАГФ-синтетазы (3-дезокси-D-арабиногентулозо-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 A в B ($A \rightarrow B$), но вещество F является активатором этой же реакции. Поэтому вещество D продолжает синтезироваться. Количества вещества B 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 B, 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 ретроингибиционию. Такие мутанты все время синтезируют нужный конечный продукт.

Регуляция активности ферментов может осуществляться путем их ковалентной модификации. При этом одни ферменты модифицируются под действием других ферментов, что приводит к повышению или снижению их активности. Модификация ферментов происходит в процессе их аденилирования, фосфорилирования или ацетилирования. Регуляцию активности ферментов таким способом можно рассмотреть на примере фермента глутаминсингтазы, катализирующего превращение у бактерий глутамата в глутамин в реакции восстановительного аминирования. Затем аминогруппа глутамина с помощью фермента глутаматсингтазы может быть перенесена на 2-оксоглутарат. Таким образом, глутаминсингтаза и глутаматсингтаза нужны бактериям для включения ионов аммония в органические соединения. Этот процесс осуществляется в тех случаях, когда концентрация ионов аммония в среде мала (меньше 1мМ/л). При повышении концентрации ионов аммония в среде, в которой культивируются бактерии, происходит подавление синтеза фермента глутаминсингтазы, а также снижение активности имеющегося фермента в клетках. Снижение активности фермента глутаминсингтазы происходит под действием особого аденилирующего фермента, осуществляющего его химическую модификацию. Когда в клетках бактерий достаточно глутамина, то происходит стимулирование аденилирующего фермента и, соответственно, активность фермента глутаминсингтазы снижается. В результате этого синтез глутамина прекращается.

1.8.9.2. 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 в среде с глюкозой, то β -галактозидаза не синтезируется. Если клетки перенести в среду с лактозой, то содержание фермента β -галактозидазы, участвующего в расщеплении лактозы на глюкозу и галактозу, 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 -галактозидтрансацетилазы, которая ацетилирует галактозу. 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. За это открытие Ф. Жакоб и Ж. Моно в 1965 г. получили Нобелевскую премию.

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 мРНК.

Рассмотрим строение оперона на примере лактозного оперона (*Lac*-оперона) (рисунок 89).

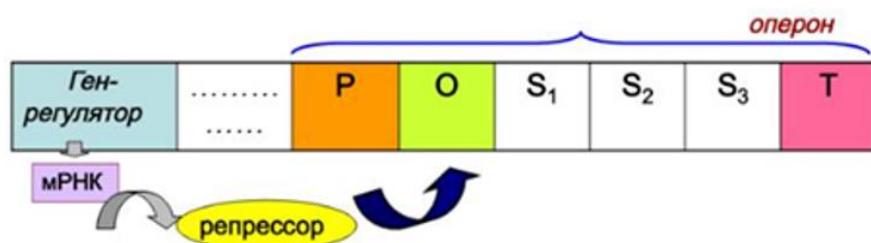


Рисунок 89 – Схематическое изображение лактозного оперона бактерий *E. coli*:
P – промотор; O – оператор; S₁, S₂, S₃ – структурные гены; T – терминатор

Lac-оперон состоит из кодирующей области, представленной тремя структурными генами, ответственными за синтез ферментов: β -галактозидазы, β -галактозидпермеазы и β -галактозидтрансацетилазы; 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. Для связывания с промотором и инициации транскрипции РНК-полимераза нуждается в сигма-факторе (небольшой молекуле белка).

Каждый сигма-фактор дает возможность РНК-полимеразе узнавать специфическую последовательность и транскрибировать именно эти гены. Замена сигма-фактора изменяет экспрессию генов. 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. Терминатор – последовательность нуклеотидов после структурных генов, которая служит для отсоединения РНК-полимеразы после окончания синтеза мРНК. Следовательно, промотор, оператор, структурные гены и терминатор образуют оперон. Оперон – это транскрипционная единица, координированно экспрессируемая с общего промотора и контролируемая общим оператором.

Транскрипционная активность входящих в оперон генов регулируется специальным *геном-регулятором*, или *регуляторным геном*, который может располагаться рядом со структурными генами или на некотором расстоянии от них. Регуляторный ген 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 индуцильные и репрессильные. *Индуцильные опероны* ответственны за катаболизм лактозы, арабинозы, галактозы и других углеводов. Рассмотрим работу индуцильного оперона на примере *Lac*-оперона (рисунок 90).

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.

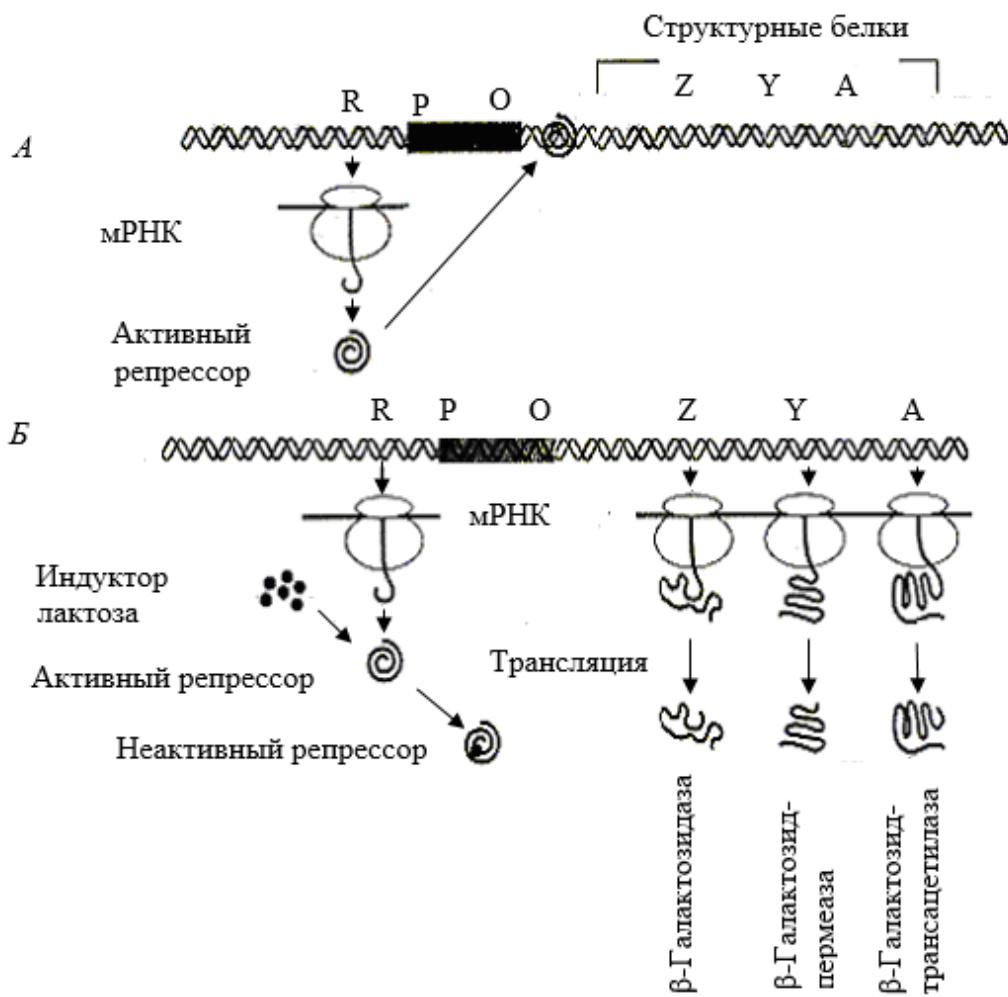


Рисунок 90 – Работа лактозного оперона бактерий *E. coli*:
A – без лактозы; *B* – с лактозой

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 аденоциммофосфат (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 индуцильных оперонов, управляющих катаболизмом углеводов, у бактерий имеются и *репрессиельные 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 репрессиельного оперона включается посредством дерепрессии структурных генов.

Разберем строение триптофанового оперона *E. coli* (рисунок 91). 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, он взаимодействует с апорепрессором 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 терминации транскрипции, а сам процесс аттенуации классифицируется как регулируемая терминация.

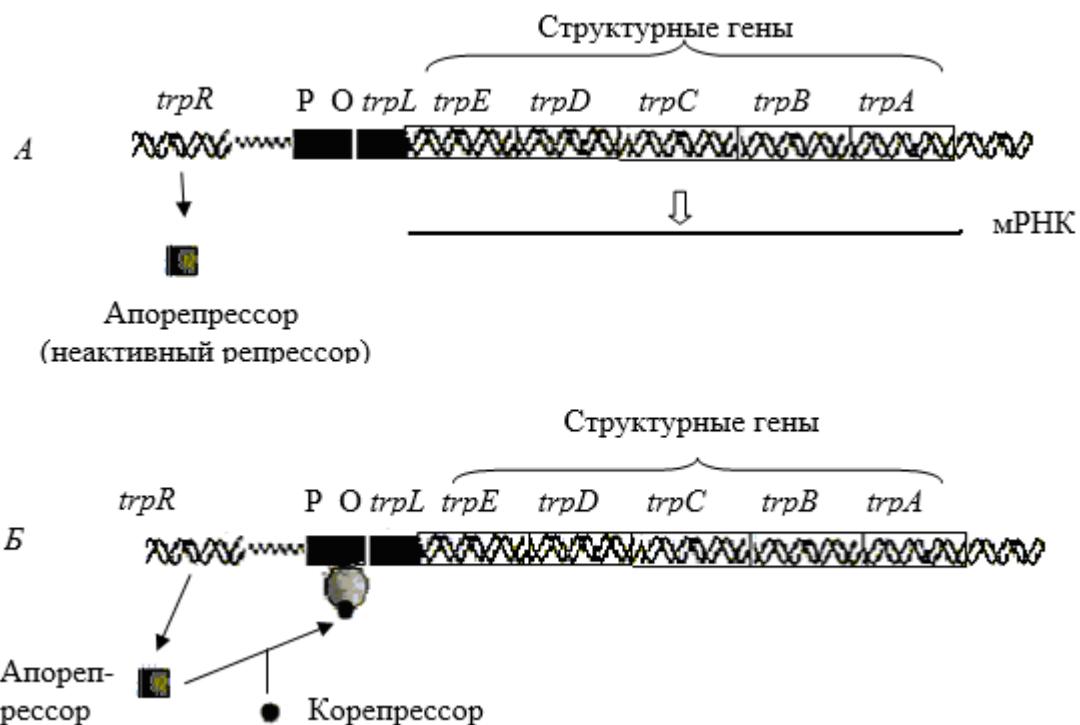


Рисунок 91 – Работа триптофанового оперона бактерий *E. coli*:
А – нет триптофана; Б – избыток триптофана

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. Этот способ регуляции возможен потому, что у прокариот, не имеющих оформленного ядра, процессы транскрипции и трансляции не разделены во времени и пространстве, как у эукариот, и идут одновременно: пока РНК-полимераза синтезирует мРНК, уже синтезированный участок этой мРНК (первые несколько десятков пар оснований) транслируется рибосомой (рисунок 92).

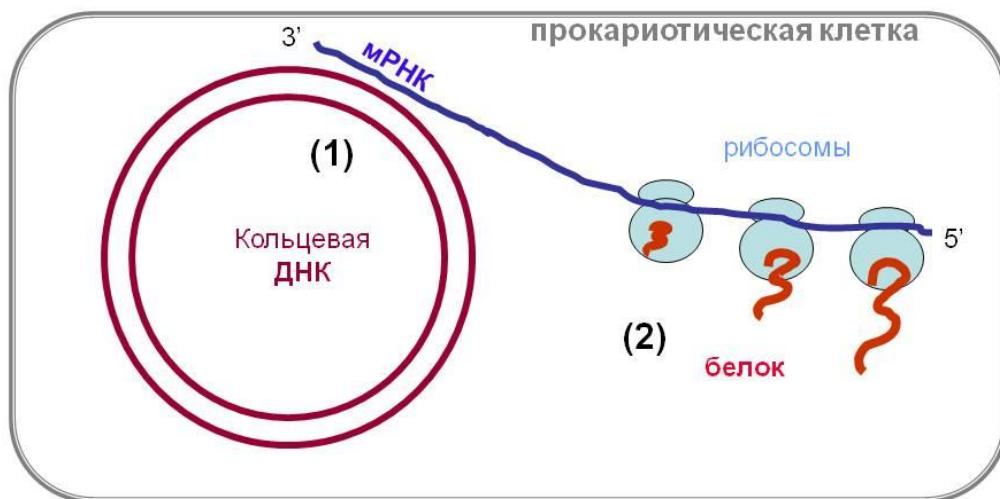


Рисунок 92 – У прокариот транскрипция (1) и трансляция (2) не разделены ни в пространстве, ни во времени

Поэтому процесс трансляции может оказывать непосредственное влияние на транскрипцию оперона. Для осуществления этого механизма регуляции между промоторной областью и первым структурным геном (*trpE*) имеется достаточно протяженный (162 п.н.) участок ДНК, который называется лидерной областью (аттенуатор, L-а). Лидерная область (аттенуатор) кодирует небольшой пептид, который называется лидерным. Аттенуатор содержит четыре комплементарные друг другу последовательности (участки 1 – 4), способные образовывать в мРНК две взаимоисключающие структуры. В первой из них участок 1 спаривается с участком 2, а участок 3 – с участком 4. В результате этого формируются две шпильки. Шпилька 3 – 4 является терминаторной. Перед альтернативными шпилечными структурами на мРНК расположен рибосомсвязывающий сайт, за которым следует транслируемая рамка считывания из 14 кодонов. Десятый и одиннадцатый кодоны этой рамки – триптофановые.

В условиях недостатка триптофана концентрация триптофанил-тРНК невысока, и поэтому рибосомы останавливаются достигнув триптофановых кодонов, в ожидании триптофанил-тРНК. Это позволяет сформироваться полноразмерной шпильке 2 – 3. В таких условиях терминаторная шпилька 3 – 4 образоваться не может. Транскрипция происходит.

Когда в клетке много триптофана рибосома, дойдя до конца лидерного пептида, экранирует большую часть участка 2 (стоп-кодон лидерного пептида находится между комплементарными участками 1 и 2). Это не позволяет формироваться полноразмерной шпильке 2 – 3, поэтому терминальная шпилька 3 – 4 образуется беспрепятственно и это приводит к терминации транскрипции (рисунок 93).

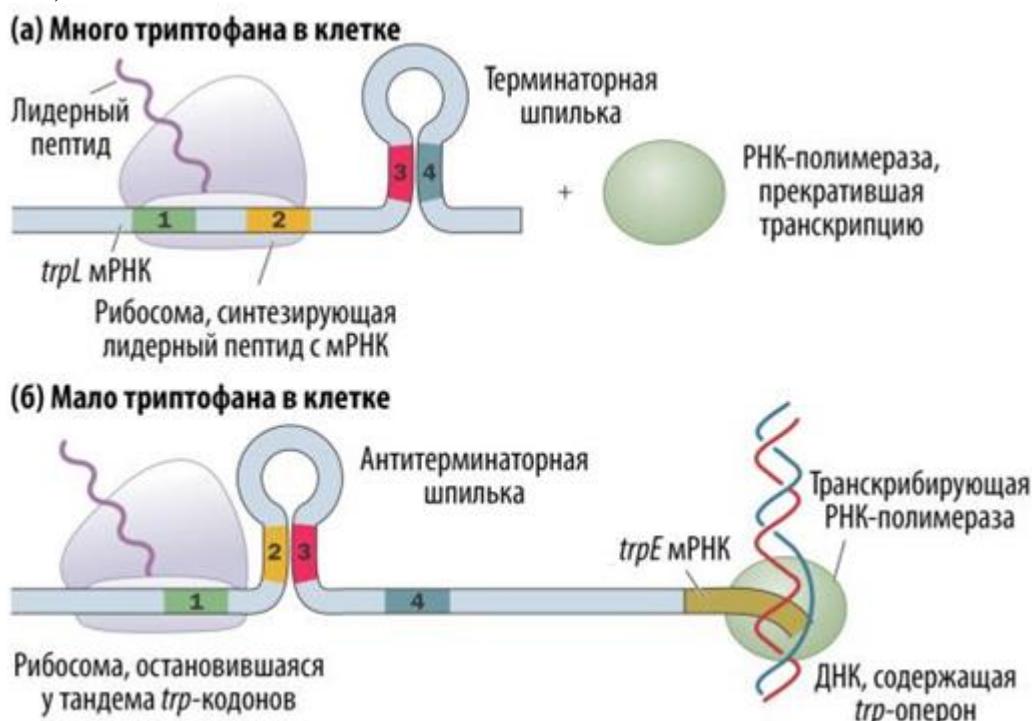


Рисунок 93 – Регуляция транскрипции аттенуатором в триптофановом опероне бактерий *E. coli*

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.

У прокариот имеются более сложные способы регуляции метаболизма. Совокупность оперонов, распределенных тем или иным образом в хромосоме, но регулируемых одним и тем же аллостерическим регуляторным белком (репрессором или активатором), называют регулоном. Опероны, входящие в состав регулона, обычно содержат гены, ответственные за различные участки одного и того же метаболического пути, или гены различных метаболических путей превращения одних и тех же или близкородственных субстратов.

Более высокий уровень регуляции характерен для модулона. Модулон – регуляторная система, в состав которой входят опероны и регулоны, которые регулируются не только своим индивидуальным регуляторным белком, но также общей регуляторной системой. Такая регуляторная система реагирует на условия общего характера, например, голодание или другие стрессовые условия, способные вызвать резкие изменения в метаболизме.

Многие клеточные регуляторные системы превосходят по сложности модулоны. Они обеспечивают протекание таких процессов, как деление, спорообразование или изменения поверхности бактериальных клеток при инфицировании организма-хозяина. Подобные процессы затрагивают функционирование клетки в целом и требуют регуляции на уровне мультигенных семейств.

Однако, регуляция одной клетки не составляет высший уровень сложности. Клетки прокариот способны к межклеточным внутрипопуляционным контактам и кооперативному поведению. Такое поведение обеспечивается системой аутоиндукции, позволяющей клеткам реагировать на плотность своей популяции. Этот феномен получил название «кворум-сенсинг», означающее реакцию на плотность популяции. В процессе роста бактериальные клетки выделяют аутоиндуktor, накапливающийся в среде; когда его концентрация превышает пороговый уровень (обычно при высокой плотности клеток), он вызывает аутоиндуцию, т.е. активацию определенных генов. У грамотрицательных бактерий аутоиндуекторы представляют собой N-ацетилгомосериллактоны. Аутоиндуекторы регулируют, например, такие процессы, как: биolumинесценция у бактерий *Vibrio fischeri*, роение у бактерий *Proteus mirabilis*, вирулентность у бактерий *Pectobacterium carotovorum* и *Pseudomonas aeruginosa*, превращение нормальных клеток

бактерий *Rhizobium* spp. в бактероиды, наблюдаемые в ферментерах эффекты слипания и флокуляции клеток, а также другие типы кооперативного поведения.

1.9. ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ДРУГ С ДРУГОМ И С МАКРООРГАНИЗМАМИ

1.9.1. 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 постоянно 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 микробиоты, 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 получить 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 высеcвы 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 микробиологии 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 ассоциации 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 фотосинтезирующую партера 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 акцепторами электронов при нитратном дыхании денитрифицирующих прокариот. 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, производящие 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 для дрожжей. 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**. 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. Стэрр 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 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.

1.9.2. 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 асимибиотических. 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 плазмidaх.

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;
- **комменсаллизм** – 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 может изменяться при смене условий окружающей среды, так что взаимоотношения, начавшиеся как взаимовыгодные, могут стать паразитическими, и наоборот.

1.9.2.1. Мутуалистические взаимоотношения между микроорганизмами и макроорганизмами

Одним из мутуалистических взаимоотношений между микро- и макроорганизмами 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, посевя на данном участке какое-либо бобовое растение, например клевер или люцерну. Известно также, что на корнях бобовых растений образуются особые клубеньковые структуры, или нарости (рисунок 94).

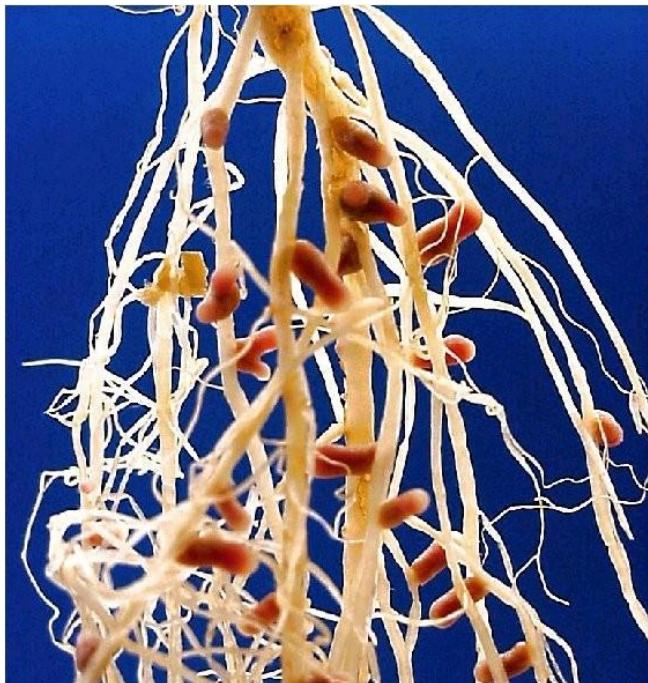


Рисунок 94 – Клубеньки на корнях бобовых растений (симбиоз с *Rhizobium spp.*)

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 «бактериондов» – мелких палочковидных или разветвленных телес, 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 структуры. Лектины находятся на наружной поверхности корневых волосков. Видоспецифичные же углеводы входят в состав наружной мембранны клеточной стенки клубеньковых бактерий. Взаимодействие поверхностных лектинов корневого волоска с углеводами мембранны 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-нодулинов), обеспечивающих межвидовое взаимодействие.

В корневой волосок проникает сразу несколько клеток клубеньковых бактерий. Проникновение сопровождается инвагинацией мембранны 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, булавовидными или сферическими и называются **бактероидами**. На стадии бактероидов 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 ответственен *nif*-оперон, который локализован в Sym-плазмидах (от англ. *symbiosis inducing*). В Sym-плазмидах также находятся *hos*-гены, обусловливающие 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 $[Fe_4S_4]$ -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 бактероидами, а белковый компонент – при участии растения. Благодаря связыванию избытка кислорода леггемоглобином бактероиды 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 мутуалистических взаимоотношений является **взаимоотношение бактерий рода *Bradyrhizobium* с 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.

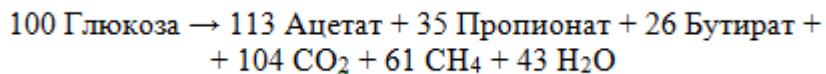
Значительно хуже изучены **симбиозы между другими азотфиксирующими бактериями и растениями**. К симбиотическим азотфиксаторам относятся также актиномицеты, принадлежащие к роду *Frankia*. Хозяевами актиномицетов-симбионтов могут быть более 200 видов двудольных древесных растений, принадлежащих к 8 семействам, среди которых ольха (*Alnus*), облепиха (*Hippophae*), стланик (*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 *Psichotria*. На листьях этих растений в результате симбиоза с бактериями образуются своеобразные клубеньки, в которых осуществляется азотфиксация.

Азотфиксющие 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 фиксация 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 взаимоотношений 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 целлюлозы, 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). Микробиота рубца очень разнообразна и представлена пектолитическими, молочнокислыми, пропионовокислыми, маслянокислыми, целлюлолитическими бактериями, метаногенными археями, 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). Суммарный микробиологический процесс, происходящий в рубце, можно представить следующим уравнением:



Как видно из уравнения, в рубце отсутствует молочная кислота (основной продукт молочнокислого брожения), так как пропионовокислые бактерии сбраживают ее с образованием пропионата, ацетата, H_2 и CO_2 . Следует отметить, что метан не является прямым продуктом разложения целлюлозы: он имеет вторичное происхождение и образуется из жирных кислот, CO_2 и H_2 . Образующиеся 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, входящие 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 мочевину или аммиак, которые у большинства млекопитающих являются продуктами выделения.

Взаимовыгодные 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). Среди эпифитов широко распространены бактерии вида *Pantoea agglomerans* и молочнокислые бактерии. Встречаются азотфикссирующие *Klebsiella* spp., *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* spp., метанокисляющие бактерии. В 1 г свежесобранных листьев может содержаться до 10^6 бактериальных клеток. Микрофлора-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 сапротрофные 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 ризосфера 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 взаимоотношений является также формирование и развитие **нормальной микробиоты** человека, млекопитающих и других животных.

Нормальная микробиота сопутствует своему хозяину на протяжении всей его жизни. С современных позиций, нормальную микробиоту рассматривают как совокупность множества микробоценозов, характеризующихся определенным видовым составом и занимающих ту или иную нишу в организме. В любом микробоценозе следует различать автохтонную и аллохтонную (транзиторную, временную) микробиоту. **Автохтонная микробиота.** Это характерные, постоянно встречающиеся виды микроорганизмов. Они обычно обнаруживаются в соответствующих местах тела человека. Состав этой микробиоты зависит от возраста человека. Видовой состав представителей этой микробиоты относительно невелик, но численно они всегда представлены наиболее обильно. **Аллохтонная** (транзиторная, временная) **микробиота** попадает на кожу или слизистые оболочки из окружающей среды, не вызывая заболеваний и не обитая постоянно на поверхностях тела человека. Аллохтонная микробиота представлена сапрофитными условно-патогенными микроорганизмами, которые обитают на коже или слизистых оболочках в течение нескольких часов, дней или недель. Присутствие транзиторной микробиоты определяется не только поступлением микроорганизмов из окружающей среды, но и состоянием иммунной системы организма хозяина и составом постоянной нормальной микробиоты. Видовой состав аллохтонных микроорганизмов разнообразен, но они немногочисленны. Состав аллохтонной микробиоты человека может меняться в зависимости от: возраста, условий внешней среды, условий труда, рациона питания, перенесенных заболеваний, травм и стрессовых ситуаций.

Нормальная микробиота характеризуется анатомическими особенностями – каждая экологическая ниша тела человека имеет свой видовой состав. Микроорганизмы, составляющие нормальную микробиоту, образуют четкую морфологическую структуру – биопленку, толщина которой колеблется от 0,1 до 0,5 мм. Биопленка представляет собой полисахаридный каркас, состоящий из микробных полисахаридов и муцина, который продуцируют клетки макроорганизма. В этом каркасе иммобилизованы микроколонии бактерий – представителей нормальной микробиоты, которые могут располагаться в несколько слоев. В состав нормальной микробиоты входят как анаэробные, так

и аэробные бактерии, соотношение которых в большинстве микробиоценозов составляет 10 : 1 – 100 : 1.

Заселение бактериями различных областей тела начинается в момент рождения человека и продолжается на протяжении всей его жизни. Формирование качественного и количественного состава нормальной микробиоты регулируется сложными антагонистическими и синергическими отношениями между отдельными ее представителями в составе микробиоценозов.

В норме многие ткани и органы здорового человека свободны от микроорганизмов, т. е. стерильны. К ним относятся: внутренние органы; головной и спинной мозг; альвеолы легких; внутреннее и среднее ухо; кровь, лимфа, спинномозговая жидкость; матка, почки, мочеточники и моча в мочевом пузыре. Это обеспечивается наличием неспецифических клеточных и гуморальных факторов иммунитета, препятствующих проникновению микробов в эти ткани и органы.

Однако, на всех открытых поверхностях и во всех открытых полостях формируется достаточно стойкая микробиота, специфичная для данного органа, биотопа или его участка – эпитопа. Наиболее богаты микроорганизмами: ротовая полость; толстый кишечник; верхние отделы дыхательной системы; наружные отделы мочеполовой системы; кожа, особенно ее волосистая часть.

Каждый участок тела представляет особую экологическую нишу, в которой формируется характерная микробиота. Например, *на коже* поселяются главным образом пропионовокислые бактерии, микроплактины, микобактерии, негемолитические стрептококки и стафилококки, дрожжи. Наиболее частыми представителями кожной микробиоты являются бактерии видов *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* и дрожжи рода *Candida*. Микроорганизмы кожи развиваются за счет питательных веществ, содержащихся в поте. Нормальная кожная биота 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 antimикробное или конкурентное действие за счет синтеза бактериоцинов, антибиотиков, органических кислот и других соединений. Полезные функции кожной микробиоты 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.

В ротовой полости у человека проживает около 600 видов микроорганизмов. Нормальными обитателями ротовой полости и горла являются грамположительные кокки, к которым относятся микроплактины, пневмококки, стрептококки. Кроме того, здесь обнаруживается большое количество грамотрицательных и грамположительных палочек, главным образом лактобациллы, спирохеты, фузобактерий, 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 внедряться в ткани тела и вызвать то или иное заболевание.

В желудке здорового человека и многих млекопитающих развивается специфическая микробиота. Это обусловлено действием желудочного сока. Нормальную микробиоту желудка составляют дрожжи, сарцины, лактобактерии, стафилококки, стрептококки, кампилобактерии и др. (всего до 30 видов), но не гнилостные бактерии. Изменение состава микробиоты, 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 микробиотой. Содержание микроорганизмов может достигать $10^{12}/\text{г}$ фекальных масс. Природа этой микробиоты изменяется в зависимости от питания и возраста человека. Например, у грудных младенцев при естественном вскармливании в кишечной микробиоте 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 1200 видов микроорганизмов. Микробиоту толстого кишечника можно разделить на четыре группы.

1. Основную массу микробиоты составляют грамположительные бактерии рода *Bifidobacterium* и грамотрицательные бактерии семейства *Bacteroidaceae*. На долю бифидобактерий и бактероидов приходится до 96 – 99 % всей микробиоты толстого кишечника.

2. Факультативные анаэробы, представленные главным образом кишечной палочкой, грамположительными энтерококками (*Enterococcus faecalis*) и молочнокислыми бактериями рода *Lactobacillus*, на долю которых приходится до 1 – 4 % всей микробиоты 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 микробиоте может вызвать непродуманное применение в лечебных целях антибиотиков и сульфаниламидов, что приводит к нарушению качественного и количественного состава кишечной биоты. При этом развитие дрожжеподобных грибов активизируется, а бактерий – подавляется. Явление,

когда происходит качественное и количественное нарушение состава микробиоты 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 скучен. Верхние отделы мочевыводящих путей у здорового человека обычно стерильны; в нижних отделах доминируют *Staphylococcus epidermidis*, негемолитические стрептококки, дифтероиды, микоплазмы; также достаточно часто выделяют грибы родов *Candida*, *Torulopsis* и *Geotrichum*. В наружных отделах доминирует *Mycobacterium smegmatis*.

Роль нормальной микробиоты 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 ***гномобионтами***. 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 микробиота 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 инактивации токсичных продуктов, проникающих извне и/или образующихся эндогенно. Кислоты и газы, выделяющиеся в ходе жизнедеятельности микробиоты 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 микробиоты 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 микробиоты, которые при определенных условиях могут вызывать заболевания макроорганизма, относятся к **оппортунистическим (условно-патогенным)**, а заболевания, вызываемые ими, называются **эндогенными инфекциями**.

На основании вышеизложенного можно заключить, что нормальная микробиота млекопитающих представляет собой один из примеров симбиотических взаимоотношений, которые имеют ряд переходных форм от мутуализма к паразитизму и наоборот.

1.9.2.2. Паразитические взаимоотношения между микро- и макроорганизмами

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 авивирулентном 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. **LD_{50}** – 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 диффундирующй 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 адгезируетя 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), липопротеины и липополисахариды (у грамотрицательных бактерий). Клетки макроорганизма также обладают довольно сложным рецепторным аппаратом. Например, в кишечнике энтеробактерии «прилипают» к гликопротеиновому покрову ворсинок клеток энteroцитов – гликокаликсу. При этом энтеропатогенные кишечные палочки, вызывающие колиэнтериты у детей, а также холерные вибрионы, взаимодействуя с микроворсинками энteroцитов, колонизируют их, размножаясь на поверхности данных образований. Шигеллы и дизентериеподобные кишечные палочки, некоторые сальмонеллы в процессе адгезии изменяют микроворсинки энteroцитов 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 **агgressivностью** штамма, что зависит от синтеза ферментов:

- **коагулазы**, свертывающей плазму крови;
- **уреазы**, гидролизующей мочевину с образованием амиака;
- **ДНКазы**, вызывающей деполимеризацию ДНК;
- **декарбоксилаз 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 агрессины – **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,очно 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 палочка) 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 назвали 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 специфический 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 хорошо изучен. Например, α-токсин одного из возбудителей 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 фактором элонгации 2 (АДФ-рибозилтрансферазой) 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 мембранный аденилатциклизазу, 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 типа, 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 молекулы, 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 эндотоксический 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 их 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 *Pectobacterium carotovorum*;
- **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 бактерии *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**, действующих 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. Например, токсин, синтезируемый бактериями *Pseudomonas syringae*, является низкомолекулярным пептидом, ингибирующим синтез глутаминсингтетазы, 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. Кутинула, 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 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 *ришигин*, 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 бактериями. 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 болезнестворных 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.

1.10. 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.

1.10.1. 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 (рисунок 95).

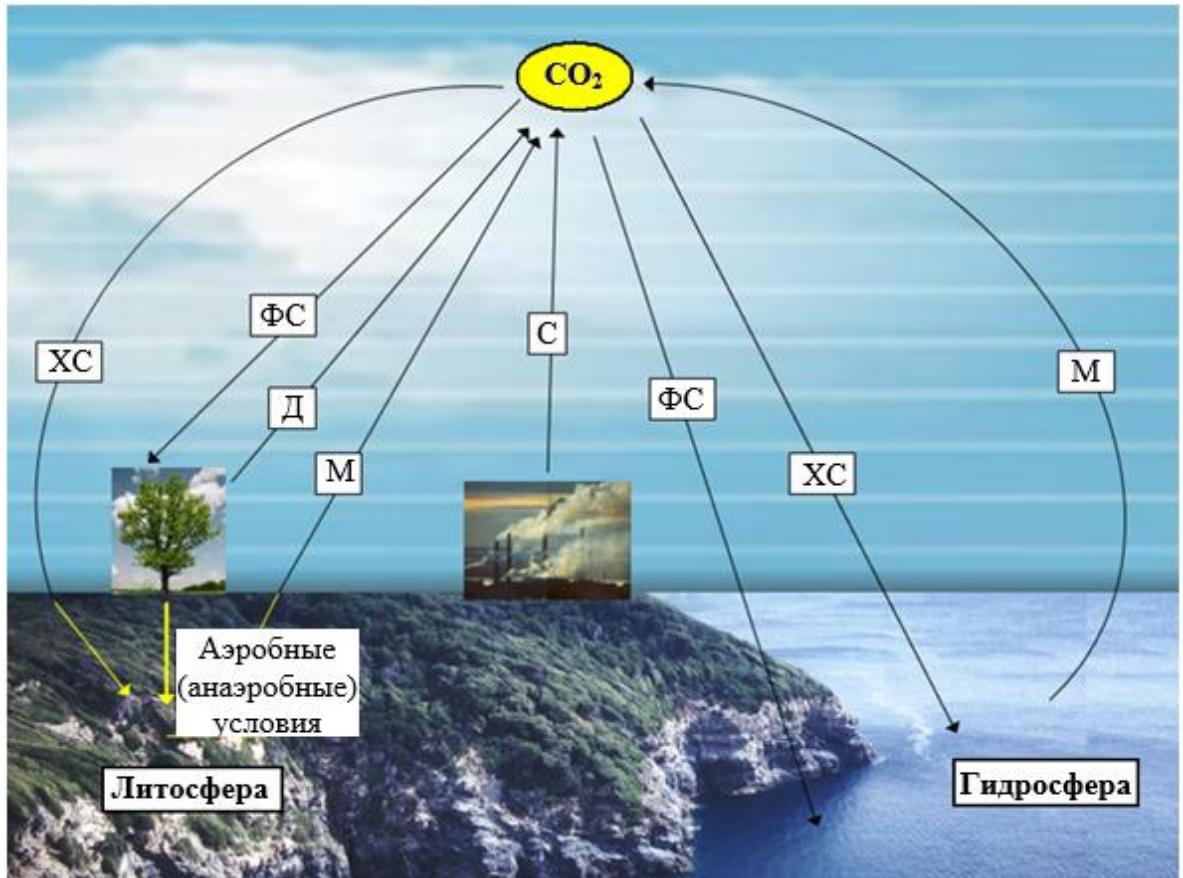
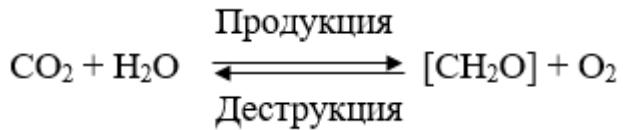


Рисунок 95 – Схема круговорота углерода:
ФС – фотосинтез; ХС – хемосинтез; Д – дыхание; М – минерализация; С – сжигание

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 наблюдается связь между процессами образования органического углерода, выделения O_2 и потребления CO_2 , что следует из уравнения:



Необходимо отметить, 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 метанокисляющими микроорганизмами.

1.10.2. Участие микроорганизмов в круговороте азота в природе

Азот является вторым наиболее важным биогенным элементом. В результате биохимической деятельности микроорганизмов могут образовываться его соединения с валентностью от -3 до +5 (в зависимости от окислительно-восстановительных условий).

Круговорот азота состоит из четырех этапов (рисунок 96).

Первый этап – **фиксация молекулярного азота**. Он осуществляется аэробными и анаэробными азотфиксирующими прокариотами, 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, мочевина и другие. 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.

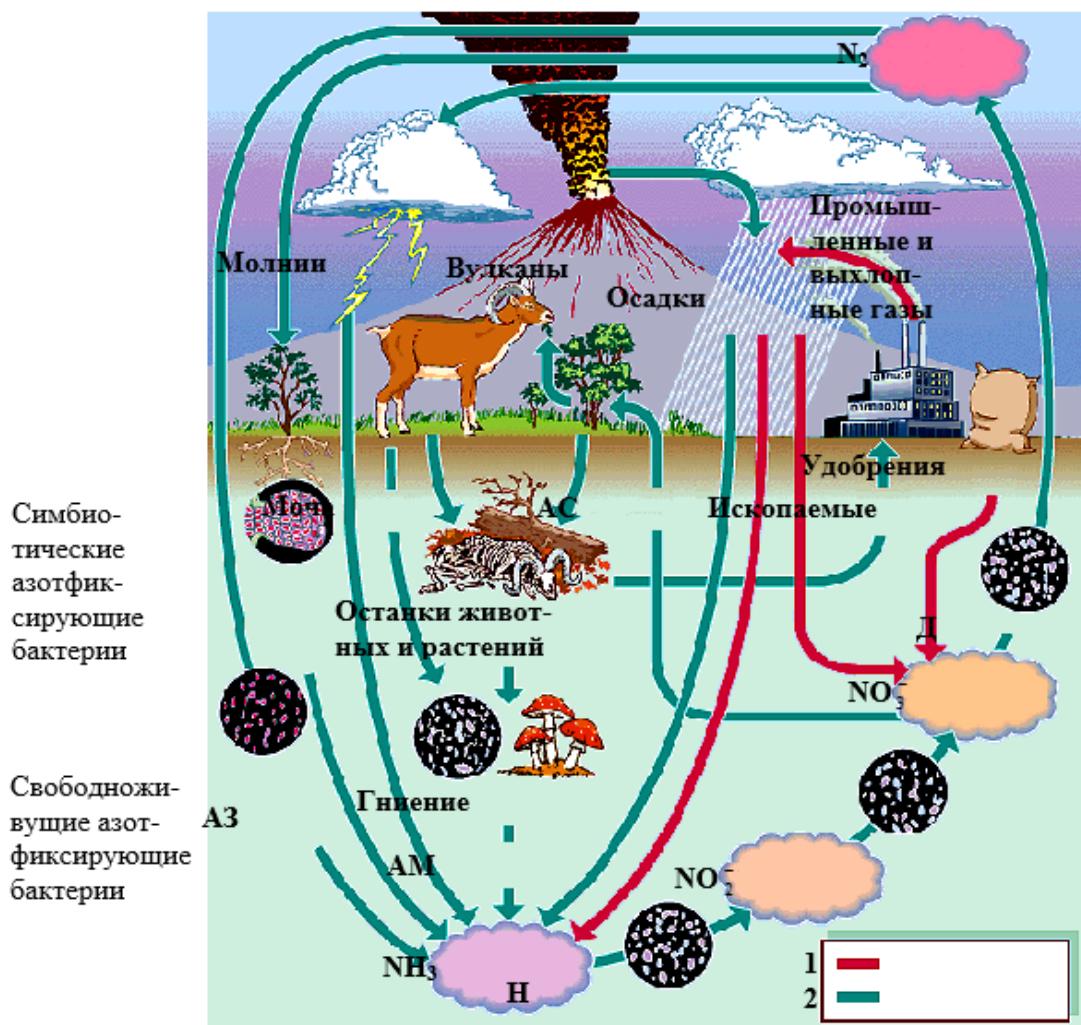


Рисунок 96 – Схема круговорота азота: 1 – деятельность человека; 2 – природная активность; АМ – аммонификация; АС – ассимиляция растениями и микроорганизмами; АЗ – азотфиксация; Д – денитрификация; Н – нитрификация

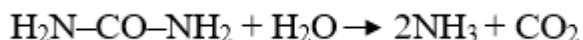
В аммонификации принимают участие многие микроорганизмы, включая неспорообразующие и спорообразующие бактерии, актиномицеты, микроскопические грибы. В зависимости от стадии минерализации органического вещества доминируют те или другие представители. Активными возбудителями аммонификации являются бактерии 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 мочевина. Большое число бактерий способно использовать мочевину 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 мочевину (*Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina urea*, *Proteus vulgaris* и др.), уреаза представляет 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 прокариот.

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 прокариотами, 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 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 (рисунок 97).

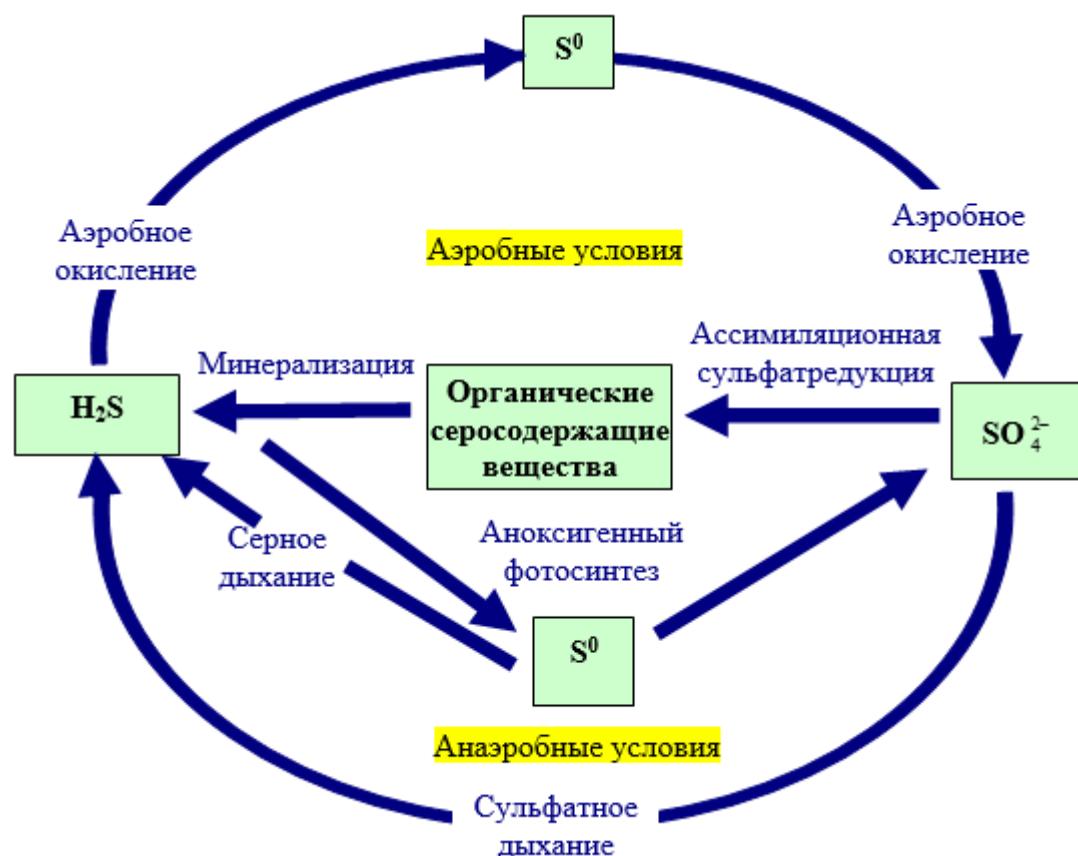


Рисунок 97 – Схема круговорота серы

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). В настоящее время установлено, что в процессе минерализации серосодержащих соединений образуется не только сероводород, но и другие соединения: меркаптаны, минеральная сера и сульфаты.

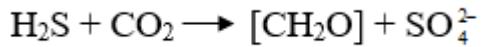
Окисление минеральной серы, получившее название *сульфофикации*, включает процессы окисления сероводорода, элементарной серы, тио- и тетрасоединений до серной кислоты. Эти процессы вызываются особыми группами прокариот – бесцветными серопрокариотами, зелеными и пурпурными серными бактериями, тионовыми прокариотами 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* и археи, 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 pH

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 прокариот – 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 мицелии.

Минерализацию фосфорсодержащих органических веществ осуществляют почти все гетеротрофные микроорганизмы, синтезирующие различные ферменты, такие как нуклеазы, фосфолипазы, фитазы и др.

Круговорот фосфора в основном является односторонним, 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 суши – 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 проблемам 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.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Программа лабораторных занятий

Тема 1. Способы культивирования микроорганизмов (2 ч).

Тема 2. Микроскопические методы исследования микроорганизмов (простые методы окрашивания, окраска цитоплазматических включений) (2 ч).

Тема 3. Микроскопические методы исследования микроорганизмов (окраска по методу Грама, определение кислотоустойчивости) (2 ч).

Тема 4. Микроскопические методы исследования микроорганизмов (окраска эндоспор, капсул) (2 ч).

Тема 5. Изучение подвижности микроорганизмов. Выделение чистых культур прокариот (2 ч).

Тема 6. Изучение основных физиолого-биохимических свойств прокариот. Видовая идентификация прокариот (2 ч).

Тема 7. Взаимоотношения между микроорганизмами (2 ч).

Тема 8. Действие физических и химических факторов на микроорганизмы (2 ч).

Тема 9. Количественный учет микроорганизмов (2 ч).

Тема 10. Способы генетического обмена у прокариот (2 ч).

3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

3.1. Перечень рекомендуемых средств диагностики

Учебным планом специальностей 6-05-0511-06 Биотехнология и 1-31 01 04 Биоинженерия и биоинформатика в качестве формы итогового контроля по учебной дисциплине рекомендован экзамен.

Для оценки профессиональных компетенций студентов используется следующий диагностический инструментарий:

- тест – выполнение заданий в тестовой форме;
- коллоквиум – устный опрос на лабораторных занятиях;
- отчет – проверка ведения лабораторных журналов и отчет о проделанной работе;
- реферат – защита подготовленного студентом реферата.

3.2. Примерный перечень заданий для управляемой самостоятельной работы студентов

Тема 1. *Морфология и структурная организация клеток прокариот.* (2 ч/ДО)

Форма контроля – компьютерное тестирование на портале *edubio.bsu.by* или *biotech.bsu.by* БГУ в LMS Moodle.

Примерный перечень вопросов:

1. Химический состав, строение и функции клеточной стенки бактерий. Отличия клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий.
2. Техника и механизм окраски бактерий по методу Грама.
3. Химический состав, организация и функции поверхностных структур бактериальной клетки (капсулы, слизистые слои, чехлы, ворсинки, гликокаликс).
4. Методы выявления бактериальных капсул.
5. Цитоплазматическая мембрана бактерий. Химическая природа, строение и функции. Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану. Производные цитоплазматической мембранны и их функции.
6. Цитоплазма бактерий. Химический состав и организация. Внутрицитоплазматические включения, их природа и значение для клетки. Органеллы цитоплазмы и их функции.
7. Выявление резервных веществ бактериальной клетки.
8. Ядерный аппарат бактериальной клетки. Его химическая и структурная организация, функции.
9. Органеллы движения микроорганизмов. Строение и функционирование бактериальных жгутиков. Другие типы движения у бактерий.

10. Методы изучения подвижности бактериальных клеток. Методы выявления бактериальных жгутиков и техника их окраски.

11. Строение, химический состав и особенности бактериальных эндоспор. Цитология и биохимия процесса спорообразования. Практическое значение. Другие покоящиеся формы бактерий.

12. Методы выявления бактериальных эндоспор.

13. Микроскопические методы исследования в микробиологии.

14. Методы прижизненного изучения микроорганизмов.

15. Простые и сложные методы окраски бактериальных клеток и их назначение.

Тема 2. Метаболизм микроорганизмов. (2 ч/ДО)

Форма контроля – компьютерное тестирование на портале *edubio.bsu.by* или *biotech.bsu.by* БГУ в LMS Moodle.

Примерный перечень вопросов:

1. Метаболизм микроорганизмов. Виды и основные назначения метаболических реакций, общая характеристика и особенности.

2. Энергетический метаболизм микроорганизмов. Характеристика типов энергетического метаболизма.

3. Аэробное дыхание – один из типов энергетического метаболизма. Синтез молекул АТФ в дыхательной цепи.

4. Нитратное дыхание. Распространение и роль денитрифицирующих прокариот в природе.

5. Сульфатное и серное дыхание. Биологические особенности, распространение и значение сульфатвосстанавливающих и серных прокариот.

6. Карбонатное дыхание. Биологические особенности, экология, роль в природе и практическое использование метаногенных архей.

7. Спиртовое брожение. Энергетический выход спиртового брожения. Практическое использование.

8. Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение: химизм и практическое использование.

9. Типы молочнокислого брожения. Использование молочнокислых бактерий.

10. Пропионовокислое брожение. Пути образования пропионовой кислоты у прокариот.

11. Брожение смешанного типа. Бутандиоловое брожение.

12. Биосинтез аминокислот прокариотами: основные предшественники и пути биосинтеза.

13. Биосинтез нуклеотидов прокариотами.

14. Биосинтез жирных кислот и фосфолипидов прокариотами.

Биосинтез углеводов прокариотами.

Питание клеток прокариот. Химические вещества как питательные субстраты. Физиологические группы питания прокариот.

Тема 3. Генетика прокариот. (2 ч/ДО)

Форма контроля – компьютерное тестирование на портале edubio.bsu.by или biotech.bsu.by БГУ в LMS Moodle.

Примерный перечень вопросов:

1. Мутации у прокариот. Классификация мутаций и молекулярные основы мутационного процесса. Мутагенные факторы. Практическое использование мутаций.
2. Общая характеристика способов генетического обмена у прокариот. Практическое использование.
3. Бактериальная трансформация: открытие, механизм, стадии трансформации. Компетентность реципиентных клеток и ее природа. Практическое значение трансформации.
4. Бактериальная конъюгация: открытие, механизм, основные особенности как способа обмена генетической информацией. Стадии конъюгации. Практическое использование.
5. Донорные и реципиентные бактерии и их характеристика. Половой фактор E.coli, его организация и функции.
6. Типы бактерий-доноров. Механизм их образования и основные отличия. Особенности потомства, возникающего при скрещивании с использованием доноров различного типа. Феномен сексдукции.
7. Бактериальная трансдукция: открытие и механизм. Типы трансдукции. Использование трансдукции в практических целях. Отличие трансдукции от фаговой конверсии.
8. Плазмиды клеток прокариот: природа, организация, особенности и функции. Типы плазмид.
9. Мигрирующие генетические элементы бактерий (IS-элементы, транспозоны и фаги-транспозоны).
10. Регуляция биохимической активности бактериальной клетки.
11. Оперонный принцип организации бактериальных хромосом. Лактозный оперон кишечной палочки и механизм его функционирования. Катаболитная репрессия.
12. Механизм функционирования репресибельных оперонов. Аттенуация.

3.3. Темы реферативных работ

1. Химический состав, организация и функции основных структур бактериальной клетки.
2. Бактериофаги: строение частиц, лизический цикл, лизогения. Распространение и практическое использование бактериофагов.
3. Адаптация микроорганизмов к экстремальным условиям внешней среды.
4. Рост и питание микроорганизмов.
5. Синтез молекул АТФ у микроорганизмов при аэробном росте на средах с глюкозой.
6. Синтез молекул АТФ у прокариот в анаэробных условиях.
7. Организация генетического материала у прокариот. Стабильность и изменчивость генома прокариот.
8. Мутанты прокариот и методы их выделения.
9. Мигрирующие генетические элементы прокариот.
10. Плазмиды микроорганизмов.
11. Горизонтальный перенос генов у прокариот в лабораторных и естественных условиях.
12. Антимикробные вещества микроорганизмов.
13. Современная систематика прокариот.
14. Система рестрикции-модификации у микроорганизмов.
14. Регуляция метаболизма у прокариот.
15. Взаимоотношения микроорганизмов с животными.
16. Факторы вирулентности патогенных для человека и животных бактерий.
17. Взаимоотношения микроорганизмов с растениями. Факторы вирулентности фитопатогенных бактерий.

3.4. Примерный перечень вопросов к экзамену

1. Роль Левенгука, Пастера и Коха в развитии микробиологии. Вклад русских ученых в процесс формирования микробиологической науки. Основные направления микробиологических исследований в Беларуси.
2. Химический состав, строение и функции клеточной стенки бактерий. Отличия клеточных стенок грамотрицательных и грамположительных бактерий.
3. Мембранные структуры бактериальных клеток: химическая природа, строение, функции. Производные цитоплазматической мембраны и их функции.

4. Цитоплазма бактериальной клетки: химический состав и организация. Внутрицитоплазматические включения; их природа и значение для клетки. Органеллы цитоплазмы и их функции.

5. Ядерный аппарат бактериальной клетки: химическая и структурная организация, функции и методы выявления.

6. Поверхностные структуры клеток прокариот: капсулы, слизистые слои, чехлы, ворсинки, гликокаликс, S-слои.

7. Движение бактерий. Строение, расположение на клетке и функционирование бактериальных жгутиков. Подвижность спирохет и бактерий со скользящим типом передвижения.

8. Строение, химический состав и свойства бактериальных эндоспор. Цитология и биохимия процесса спорообразования. Другие покоящиеся формы бактерий.

9. Рост клетки и микробной популяции. Сбалансированный и несбалансированный рост. Основные параметры роста культур: время генерации, удельная скорость роста, выход биомассы, экономический коэффициент.

10. Закономерности роста чистых культур микроорганизмов при периодическом и непрерывном культивировании. Синхронные культуры. Культивирование иммобилизованных клеток микроорганизмов.

11. Действие факторов физической природы на жизнедеятельность микроорганизмов.

12. Характер и механизм действия химических веществ на микроорганизмы.

13. Антибиотики: химическая природа, механизмы действия на клетки микроорганизмов (на конкретных примерах).

14. Питание микроорганизмов. Химические вещества как питательные субстраты. Факторы роста микроорганизмов. Физиологические группы микроорганизмов.

15. Энергетический метаболизм у микроорганизмов. Характеристика типов энергетического метаболизма. Способы синтеза АТФ у микроорганизмов. Источники энергии у микроорганизмов.

16. Аэробное дыхание. Синтез АТФ в дыхательной цепи прокариотических и эукариотических микроорганизмов.

17. Основные виды анаэробного дыхания у прокариот и их характеристика. Биологические свойства, распространение в природе и значение прокариот, осуществляющих анаэробное дыхание.

18. Спиртовое брожение: химизм, характеристика возбудителей, практическое использование.

19. Молочнокислое брожение. Молочнокислые бактерии; их физиологобиохимические особенности и практическое значение. Патогенные представители молочнокислых бактерий.

20. Маслянокислое и бутандиоловое брожение. Характеристика бактерий, осуществляющих данные процессы, их распространение в природе и практическое значение.

21. Пропионовокислое брожение: пути образования пропионовой кислоты у прокариот. Пропионовокислые бактерии; их биологические свойства, распространение и значение.

22. Брожение смешанного типа и бутандиоловое брожение. Энтеробактерии и родственные бактерии; их характеристика и значение отдельных представителей для человека. Бактерии *E.coli* как санитарный показатель загрязнения внешней среды.

23. Биосинтез аминокислот бактериями; основные предшественники и пути биосинтеза.

24. Биосинтез нуклеотидов бактериями.

25. Биосинтез жирных кислот и фосфолипидов бактериями.

26. Биосинтез углеводов бактериями.

27. Мутации у прокариот. Классификация мутаций и молекулярные основы мутационного процесса. Мутагенные факторы.

28. Мигрирующие генетические элементы у прокариот (IS-элементы, транспозоны, фаги-транспозоны).

29. Плазмиды прокариот: их свойства, распространение, значение для прокариот и практическое использование. Организация плазмид Col E1 и R 100.

30. Общая характеристика способов генетического обмена у прокариот. Практическое использование.

31. Донорские и реципиентные бактерии. Половой фактор бактерий *E.coli*, его организация и функции. Типы бактерий-доноров; механизм их образования. Особенности потомства, которое образуется в скрещиваниях с использованием разных доноров.

32. Конъюгация у прокариот: открытие, механизм, стадии. Практическое использование конъюгации.

33. Трансформация у прокариот: открытие, механизм, стадии, применение.

34. Компетентность реципиентных клеток при трансформации и ее природа. Методы получения компетентных культур бактерий.

35. Трансдукция у прокариот: открытие, механизм, применение. Отличие трансдукции от фаговой конверсии.

36. Типы бактериальной трансдукции и механизмы их осуществления.

37. Регуляция биохимической активности у прокариот.

38. Оперонный принцип организации хромосом у прокариот. Индуцибельные и репрессибельные опероны; механизм их функционирования. Катаболитная репрессия. Аттенуация.

39. Формы взаимоотношений между микроорганизмами и факторы, которые их определяют. Примеры взаимоотношений.

40. Конкурентные взаимоотношения между микроорганизмами. Бактериоцины: химическая природа, свойства, механизмы действия на бактериальные клетки, значение для бактерий и использование.

41. Взаимоотношения микроорганизмов с животными. Типы взаимоотношений, примеры. Нормальная микробиота человека, ее представители и значение для организма.

42. Бактерии, патогенные для высших животных и факторы их вирулентности.

43. Бактериальные токсины; их классификация, химическая природа и свойства. Действие токсинов на восприимчивый организм.

44. Взаимоотношения микроорганизмов с растениями. Типы взаимоотношений. Эпифитная, ризосферная и ризопланная микробиота растений.

45. Бактерии, патогенные для растений и факторы их вирулентности. Механизмы растений, которые противодействуют заражению фитопатогенными микроорганизмами.

46. Классификация прокариот. Критерии классификации прокариот. Современная филогенетическая и фенетическая классификация прокариот.

47. Энтеробактерии и родственные бактерии: систематика, характеристика и значение отдельных представителей для человека. Бактерии *E. coli* как санитарный показатель загрязнения внешней среды. Коли-титр и коли-индекс.

48. Актиномицеты: систематика, особенности структурной организации, биологические свойства, роль в природе, практическое использование.

49. Псевдомонады и родственные бактерии: систематика, биологические свойства, распространение в природе, практическое значение.

50. Риккетсии и хламидии: систематика, характеристика, распространение в природе и практическое значение.

51. Миксобактерии и цитофаги; их характеристика, распространение и роль в природе.

52. Археи; их отличия от бактерий и эукариот, характеристика основных групп, распространение в природе, значение.

53. Свободноживущие и симбиотические азотфикссирующие бактерии; их характеристика и роль в круговороте азота. Практическое использование азотфикссирующих бактерий.

54. Бактерии, образующие эндоспоры; их систематика, характеристика, распространение в природе и практическое значение.

55.Spiroхеты: систематика, характеристика, распространение в природе и значение.

56. Микоплазмы: систематика, биологические свойства, роль в природе и значение.

57. Хемолитотрофные прокариоты. Механизм окисления неорганических веществ хемолитотрофными бактериями. Характеристика основных групп

хемолитотрофных прокариот. Распространение в природе, значение и роль хемолитотрофных прокариот в круговороте веществ.

58. Фототрофные прокариоты: систематика, биологические свойства, распространение в природе. Строение фотосинтетического аппарата. Фотосинтез с выделением и без выделения молекулярного кислорода.

59. Распространение микроорганизмов в природе. Использование микроорганизмов человеком.

60. Простые и сложные методы окраски бактериальных клеток и их назначение.

61. Микроскопия в микробиологии: темнопольная, фазово-контрастная, электронная, люминесцентная. Отличия разных типов микроскопии и возможности использования.

62. Микроскопические методы исследований в микробиологии (прижизненного изучения и в фиксированных препаратах).

63. Техника и механизм окраски по методу Грама.

64. Методы выявления бактериальных капсул.

65. Методы выявления бактериальных эндоспор.

66. Методы выявления резервных веществ у микроорганизмов.

67. Методы изучения подвижности бактериальных клеток. Техника окраски бактериальных жгутиков.

68. Питательные среды в микробиологии (классификация, принцип приготовления). Среды пестрого ряда Гисса.

69. Методы стерилизации, используемые в микробиологической практике.

70. Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях.

71. Методы культивирования аэробных микроорганизмов.

72. Методы культивирования анаэробных микроорганизмов.

73. Поддержание (хранение) культур микроорганизмов.

74. Накопительная культура микроорганизмов; методы ее получения.

75. Чистая культура бактерий и методы ее выделения.

76. Методы количественного учета микроорганизмов.

77. Методы определения количества жизнеспособных клеток микроорганизмов.

78. Методы определения количества клеток микроорганизмов в микроскопе и их возможности.

79. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

80. Изучение чувствительности бактерий к УФ-облучению.

81. Изучение зависимости выживаемости бактерий от дозы УФ-облучения.

82. Принципы видовой идентификации бактерий.

83. Методы определения ферментативной активности бактерий.

84. Методы определения утилизации микроорганизмами органических азотсодержащих веществ.
85. Методы изучения микробного антагонизма.
86. Методы выявления бактериоциногенной активности у бактерий.
87. Методы выделения мутантов бактерий устойчивых к антибиотикам.
88. Методы выделения ауксотрофных мутантов у бактерий. Пенициллиновая методика обогащения при выделении бактериальных мутантов.
89. Техника скрещивания бактерий. Принцип отбора рекомбинантов (на конкретном примере).

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

4.1. Рекомендуемая литература

1. *Ильяшенко, Н.Г.* Микробиология / Н.Г. Ильяшенко, Л.Н. Шабурова, М.В. Гернет. – Москва: ИНФРА-М, 2022.
2. *Кисленко, В.Н.* Микробиология. Практикум / В.Н. Кисленко. – Москва: ИНФРА-М, 2022.
3. *Куранова, Н.Г.* Микробиология. В 3 ч. / Н.Г. Куранова, Г.А. Купатадзе. – Москва: Прометей, 2020 – 2021.
4. *Лысак, В.В.* Микробиология / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2008.
5. *Лысак, В.В.* Физиология микроорганизмов / В.В. Лысак. – Минск: Изд. центр БГУ, 2014.
6. *Лысак, В.В.* Микробиология: практикум / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2015.
7. *Нетрусов, А.И.* Микробиология: теория и практика. В 2 ч. / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Издательство Юрайт, 2023.

Перечень дополнительной литературы

1. *Белясова, Н.А.* Микробиология / Н.А. Белясова. – Минск: Выш. шк., 2012.
2. *Брюханов, А.Л.* Молекулярная микробиология / А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак, А.И. Нетрусов. – М.: Издательство Московского университета, 2012.
3. *Емцев, В.Т.* Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005.
4. *Левинсон У.* Медицинская микробиология и иммунология / У. Левинсон. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.
5. *Лысак, В.В.* Систематика микроорганизмов / В.В. Лысак, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2014.
6. *Нетрусов, А.И.* Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Издательский центр «Академия», 2012.
7. *Нетрусов, А.И.* Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.
8. *Нетрусов, А.И.* Экология микроорганизмов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2004.
9. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. Т. 1–2.
10. Современная микробиология / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. Т. 1–2.
11. *Шлегель Г.* Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987.

12. Шлегель Г. История микробиологии / Г. Шлегель. – М.: Едиториал УРСС, 2002.

13. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – New York, Heidelberg, Berlin: Springer – Verlag, V.1 – 2001, V.2 – 2005, V.3 – 2009, V.4 – 2010, V.5 – 2011.

4.2. Электронные ресурсы

1. Образовательный портал БГУ по специальности 6-05-0511-06 Биотехнология. Курс «Микробиология». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://biotech.bsu.by/course/view.php?id=30> – Дата доступа: 08.01.2024.

2. Биоинженерия и биоинформатика. Учебная программа учреждения высшего образования по учебной дисциплине «Микробиология» для специальности: 1-31 01 04. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/296391> – Дата доступа: 08.01.2024.

3. Лысак, В.В. Систематика микроорганизмов / В.В. Лысак, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2014. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/98207> – Дата доступа: 08.01.2024.

4. Лысак, В.В. Микробиология: практикум / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2015. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/141935> – Дата доступа: 08.01.2024.