

Министерство образования Республики Беларусь  
Белорусский государственный университет  
Биологический факультет  
Кафедра микробиологии

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ С.Л. Василенко

14 января 2025 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

\_\_\_\_\_ В.В. Хрусталёв

15 января 2025 г.

Физиология микроорганизмов

Электронный учебно-методический комплекс  
для специальности  
6-05-0511-03 «Микробиология»

Регистрационный № 2.4.2-24 / 575

Автор:

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

Рассмотрено и утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ  
16.01.2025 г., протокол № 6.

Минск 2025

УДК 579.22(075.8)

Л 886

Утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ.  
Протокол № 6 от 16.01.2025 г.

Решение о депонировании вынес  
Совет биологического факультета  
Протокол № 6 от 15.01.2025 г.

А в т о р:

Лысак Владимир Васильевич, профессор кафедры микробиологии биологического факультета, кандидат биологических наук, доцент, Белорусский государственный университет

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, главный научный сотрудник лаборатории взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»

Лысак, В.В. Физиология микроорганизмов: электронный учебно-методический комплекс для специальности 6-05-0511-03 «Микробиология» / В.В. Лысак; БГУ, Биологический фак., Каф. микробиологии. – Минск: БГУ, 2025. – 182 с.: 61 ил. – Библиогр.: с. 181.

Электронный учебно-методический комплекс предназначен для студентов общего высшего образования специальности 6-05-0511-03 «Микробиология». Содержание ЭУМК посвящено изучению основных физиологических процессов, протекающих в клетках микроорганизмов, и механизмов их регуляции.

## СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА.....	5
<b>1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....</b>	<b>7</b>
1.1. ВВЕДЕНИЕ.....	7
1.2. ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	11
1.2.1. Транспорт веществ в клетку прокариот.....	16
1.2.2. Автотрофные способы питания микроорганизмов.....	21
1.2.3. Ассимиляция CO <sub>2</sub> хемогетеротрофными микроорганизмами.....	25
1.3. МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	26
1.3.1. Общая характеристика энергетического метаболизма.....	28
1.3.1.1. Аэробное дыхание.....	34
1.3.1.2. Процессы анаэробного дыхания.....	42
Нитратное дыхание, или денитрификация.....	43
Сульфатное дыхание, или диссимиляционная сульфатредукция.....	46
Серное дыхание.....	49
Карбонатное дыхание (метаногенез).....	50
Анаэробное дыхание с использованием в качестве акцепторов электронов других неорганических ионов.....	54
Фумаратное дыхание и другие типы анаэробного дыхания с использованием органических веществ в качестве акцепторов электронов.....	55
1.3.1.3. Процессы брожения.....	56
Спиртовое брожение.....	57
Молочнокислородное брожение.....	59
Маслянокислородное и ацетонобутиловое брожение.....	61
Пропионовокислородное брожение.....	64
Брожение смешанного типа, или муравьинокислородное брожение.....	67
Неполное окисление органических веществ микроорганизмами.....	69
1.3.1.4. Разложение микроорганизмами природных высокополимерных органических соединений.....	73
Разложение целлюлозы.....	73
Разложение гемицеллюлоз.....	76
Разложение крахмала и других глюкоанов.....	77
Разложение лигнина.....	79
Разложение пектиновых веществ.....	80
Разложение хитина и хитозана.....	80
1.3.1.5. Использование белков микроорганизмами.....	82
Аэробное расщепление аминокислот.....	84
Сбраживание аминокислот микроорганизмами.....	86
1.3.1.6. Использование микроорганизмами азотистых оснований.....	88
Анаэробное разложение (сбраживание) азотистых оснований.....	89
Аэробное окисление азотистых оснований.....	90
1.3.1.7. Окисление липидов и фосфолипидов микроорганизмами.....	92
1.3.1.8. Разложение углеводов микроорганизмами.....	94

Разложение алканов (парафинов) микроорганизмами.....	94
Разложение ароматических углеводородов (аренов) микроорганизмами.....	95
1.3.1.9. Разложение ксенобиотиков микроорганизмами.....	98
1.3.1.10. Окисление неорганических соединений микроорганизмами.	102
Процесс нитрификации .....	103
Окисление восстановленных неорганических соединений серы .....	106
Окисление ионов металлов .....	110
Окисление оксида углерода .....	116
Использование микроорганизмами одноуглеродных соединений ....	117
1.3.1.11. Использование микроорганизмами солнечной энергии .....	123
Фотосинтез у прокариот.....	128
1.3.2.    Конструктивный метаболизм микроорганизмов .....	137
1.3.2.1. Биосинтез аминокислот .....	138
1.3.2.2. Биосинтез нуклеотидов .....	143
1.3.2.3. Биосинтез липидов.....	145
1.3.2.4. Биосинтез углеводов.....	146
1.3.2.5. Биосинтез пептидогликана.....	150
1.4.    ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА (АЗОТФИКСАЦИЯ, ДИАЗОТРОФИЯ) МИКРООРГАНИЗМАМИ.....	153
Биохимия азотфиксации .....	156
1.5.    БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ У БАКТЕРИЙ .....	159
1.6.    РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА У ПРОКАРИОТ .....	162
1.6.1.    Регуляция активности ферментов .....	163
1.6.2.    Регуляция на уровне генов, или регуляция синтеза ферментов.	167
<b>2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ .....</b>	<b>175</b>
ПРОГРАММА ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ .....	175
<b>3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ .....</b>	<b>176</b>
3.1.    ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМЫХ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ.....	176
3.2.    ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ЗАДАНИЙ ДЛЯ УПРАВЛЯЕМОЙ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ .....	176
3.3.    ТЕМЫ РЕФЕРАТИВНЫХ РАБОТ.....	177
3.4.    ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЭКЗАМЕНУ .....	177
<b>4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ.....</b>	<b>181</b>
4.1.    РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА .....	181
4.2.    ЭЛЕКТРОННЫЕ РЕСУРСЫ .....	182

## ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Физиология микроорганизмов» создан в соответствии с ОСВО 6-05-0511-03-2023 специальности 6-05-0511-03 Микробиология, утвержденным Постановлением Министерства образования Республики Беларусь №225 от 02.08.2023, примерным учебным планом 6-05-05-006/пр., утвержденным 02.12.2022, учебными планами БГУ: № 6-5.6-36/02, утвержденным 15.05.2023, № 6-5.6-36/22з, утвержденным 31.05.2023.

Содержание разделов ЭУМК соответствует образовательному стандарту высшего образования по данной специальности. Учебная дисциплина относится к государственному компоненту и входит в модуль «Структурная организация клеток и физиология микроорганизмов».

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

### **Задачи учебной дисциплины:**

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

### **Требования к компетенциям:**

Освоение учебной дисциплины «Физиология микроорганизмов» должно обеспечить формирование следующей компетенции:

**БПК.** Использовать знания структурной организации, биохимического состава и физиологии клеток микроорганизмов для решения стандартных задач профессиональной деятельности.

В ЭУМК существенное место отводится изучению истории развития физиологии микроорганизмов; физиологических групп питания микроорганизмов; особенностей энергетического и конструктивного метаболизма микроорганизмов; механизма азотфиксации и биoluminesценции у микроорганизмов. Особое внимание уделено рассмотрению регуляции метаболизма у микроорганизмов на уровне активности и синтеза ферментов, его пластичности.

Цель ЭУМК – оказание методической помощи студентам в получении современных знаний по учебной дисциплине «Физиология микроорганизмов», 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

Физиология микроорганизмов – один из разделов микробиологии, изучающий процессы жизнедеятельности, которые происходят в клетках микроорганизмов.

Физиология микроорганизмов как наука внесла важный вклад в изучение метаболизма живого мира. Это обусловлено двумя главными факторами. Первый – это свойственное только микроорганизмам уникальное разнообразие форм метаболизма. Второй фактор – это биологическая специфика микроорганизмов как объектов исследований. Будучи целостной, эволюционно сложившейся живой системой, клетка микроорганизмов является удобной моделью для изучения глубинных основ метаболизма в его тесной взаимосвязи со средой. Преимущество микроорганизмов как объектов исследований обусловлено и такой характерной для них особенностью, как способность к быстрому размножению, что делает их незаменимыми при изучении биохимии метаболических процессов. По словам американского биохимика Г. Палладе (1964) «Бактериальная клетка представляет собой минимальный, но типичный образец клеточного уровня в целостной структурной иерархии уровней живой материи». Таким образом, возможность использования клеток микроорганизмов, с одной стороны, как целостного биологического индивидуума, наделенного функциями самостоятельного организма, а с другой – как структурного компонента сложной биологической системы и предопределила особую роль физиологии микроорганизмов в изучении важнейших проблем общей физиологии и биохимии. «Благодаря поразительному разнообразию биохимических свойств микробов, – отмечал ученик А. Клюйвера К. ван. Ниль (1959), – исследования их внесли большой вклад в понимание сущности обмена веществ».

Становлению физиологии микроорганизмов в качестве научной дисциплины предшествовал многовековой период стихийно-эмпирического познания многообразия микроскопического мира в процессе трудовой деятельности человека. Первооткрывателем бактерий считается голландский естествоиспытатель Антони ван Левенгук (1632–1723). Научившись искусно шлифовать линзы, он создал простейший микроскоп, состоящий лишь из двояковыпуклой линзы с увеличением примерно в 280 раз. С помощью этих микроскопов А. ван Левенгук рассматривал налет с зубов, капельки дождевой и колодезной воды, стоявшей несколько дней в бочке, капельки испорченного мясного бульона и другие объекты и обнаружил в них огромное количество живых существ, не видимых никем до сих пор. О своих наблюдениях А. ван Левенгук в письмах сообщал в Лондонское королевское общество. Таким образом результаты его исследований получили известность. А. ван Левенгук открыл и описал представителей всех основных групп микроорганизмов: бактерий, дрожжей, простейших, микроводорослей, причем сделал это с

большой точностью. Его работы положили начало описательному периоду в истории микробиологии.

Начало *физиологическому этапу* развития микробиологии положил французский ученый Луи Пастер (1822–1895). Он доказал, что микроорганизмы различаются не только по форме, но и по характеру обмена веществ. Первыми работами Л. Пастера по микробиологии были исследования брожений. Он доказал, что брожения – спиртовое, молочнокислое, маслянокислое и другие – вызываются жизнедеятельностью микроорганизмов, и выявил возбудителей этих процессов. Л. Пастером было сделано замечательное открытие, заключающееся в том, что некоторые микроорганизмы, названные им анаэробами, могут жить без доступа молекулярного кислорода. Таким образом, Л. Пастер открыл принципиально новое биологическое явление – *анаэробноз*.

Большой интерес представляют исследования Л. Пастера о невозможности самозарождения микроорганизмов. Он доказал, что если питательные среды простерилизованы, т. е. надежно обезврежены от микроорганизмов, то жизнь в них даже в примитивных формах зародиться не может. За эти исследования Л. Пастеру присуждена премия Французской академии наук.

Л. Пастер также доказал, что прокисание вина и пива вызывают уксуснокислые бактерии, и разработал метод борьбы с ними. Поскольку кипятить вино и пиво нельзя, так как они изменяют свои свойства, Л. Пастер предложил нагревать их до температуры 70 – 80 °С. При этом продукты сохраняют свои качества, а подавляющая масса бактерий (в том числе и уксуснокислые) погибает. Этот процесс получил название *пастеризации*.

Исследуя брожение, Л. Пастер не мог пройти мимо такого распространенного и важного процесса, как гниение белковых веществ, который ранее рассматривали как химический. Он доказал биологическую природу гниения и установил также, что распад мочевины вызывают бактерии, отдельные виды которых ученый описал.

И наконец, работы Л. Пастера в области изучения инфекционных болезней человека и животных (болезнь шелковичных червей, сибирская язва, куриная холера, бешенство) позволили ему доказать микробную природу этих заболеваний. Установив, что эти болезни вызываются микроорганизмами, он разработал методы получения вакцин для прививок против куриной холеры, сибирской язвы, бешенства и других болезней.

Л. Пастер был основоположником экспериментального направления в микробиологии. Он ввел много новых методов и способов постановки опытов в практику микробиологических исследований. Все они основывались на конкретной идее, концепции, теоретическом положении. Так, метод чистых культур, основоположником которого был Л. Пастер, основывался на идее морфофизиологической специфичности микроорганизмов; метод отбора и накопления конкретного вида – на идее специфических потребностей микроорганизмов к условиям среды. Л. Пастер в совершенстве разработал метод периодических культур, в котором обнаруживаются и элементы непрерывного проточного культивирования. Он вполне осознавал

эффективность этого способа экспериментального изучения физиологии микроорганизмов.

В своих экспериментах по изучению брожений, вызываемых микроорганизмами, Л. Пастер учитывал роль химических реакций, определял выделение ферментов микроорганизмами. Однако выделить эти ферменты не удавалось. Открытие сбраживания углеводов бесклеточным экстрактом дрожжей принадлежит Э. Бухнеру. Он, в 1897 г., приготовив экстракт дрожжей для иммунологических исследований, добавил к нему сахар лишь для того, чтобы сохранить от порчи до утра, и через 20 мин в экстракте началось образование пены. А. Гарден и В. Янг в 1906 г. исследовали процесс брожения в бесклеточном экстракте более детально и обнаружили образование в нем фруктозо-1,6-дифосфата.

Дальнейший импульс (1911–1912) к изучению процессов брожения дали работы К. Нейберга (1877–1956) и С.П. Костычева (1887–1931), которые исследовали кинетику окислительно-восстановительных реакций. Участие водорода, входящего в состав субстрата, во многих ферментативных реакциях было открыто благодаря применению метиленового синего в качестве акцептора водорода.

В 1920-х гг. были получены чистые культуры большинства бактерий, осуществляющих брожение. С. Орла-Йенсен (1919) изучил большое число молочнокислых бактерий и провел разделение между гомо- и гетероферментативными типами осуществляемого ими брожения. А. Гарден (1906) определил продукты сбраживания глюкозы клетками бактерий *Escherichia coli* и обнаружил отличия их от продуктов, образующихся при сбраживании глюкозы бактериями родов *Klebsiella* и *Serratia*. Маслянокислое брожение, открытое в 1861 г. Л. Пастером, изучали М. Бейеринк (1894) на культурах бактерий *Clostridium butylicum* и С. Н. Виноградский (1895) на бактериях *Clostridium pasteurianum*.

В начале XX в. А. Клюйвер (1888–1956) и его ученики провели сравнительные биохимические исследования в относительно далеко отстоящих друг от друга физиологических группах микроорганизмов. Было изучено много форм микроорганизмов и примерно к середине 50-х гг. XX в. сформулирована теория биохимического единства жизни. А. Клюйвер доказал, что все живые организмы построены из однотипных химических молекул, универсальной единицей биологической энергии служит АТФ, в основе физиологического разнообразия живых существ лежит несколько основных метаболических путей.

Большой вклад в развитие физиологии микроорганизмов внесли русский микробиолог С.Н. Виноградский (1856–1953) и голландский микробиолог М. Бейеринк (1851–1931). С.Н. Виноградский разработал метод элективных питательных сред. Используя этот метод он в 1893 г. выделил из почвы анаэробный азотфиксатор, названный им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*. С.Н. Виноградский также открыл способность некоторых микроорганизмов использовать энергию, освобождающуюся при окислении неорганических соединений азота, железа, серы. Эти микроорганизмы

получили название *хемолитотрофных*. М. Бейеринк разработал методику получения накопительных культур почвенных микроорганизмов. Он впервые получил чистые культуры клубеньковых бактерий (симбиотических азотфиксаторов) и выделил из почвы аэробные свободноживущие азотфиксирующие бактерии *Azotobacter chroococcum*. М. Бейеринку принадлежат также работы по исследованию физиологии клубеньковых бактерий, изучению процесса денитрификации и сульфатредукции, работы по изучению ферментов разных групп микроорганизмов.

Ученик С.Н. Виноградского В.Л. Омелянский (1867–1928) много сделал для изучения нитрифицирующих, азотфиксирующих, пектинолитических и целлюлозоразрушающих бактерий. В.Л. Омелянский написал первый русский учебник по микробиологии.

Большой вклад в выяснение трансформации микроорганизмами соединений, содержащих углерод, внес В.С. Буткевич (1872–1942), результаты исследований которого также в области физиологии грибов, привели к разработке микробиологического способа получения лимонной кислоты.

Значительную роль в развитии физиологии и биохимии микроорганизмов сыграли работы М.В. Федорова (1898–1961), который изучал механизм фиксации молекулярного азота и взаимоотношения микроорганизмов с высшими растениями.

Русский исследователь в области общей и технической микробиологии В.Н. Шапошников (1884–1968), изучая обмен веществ микроорганизмов, установил двухфазность процессов брожения.

Изучение метаболизма микроорганизмов послужило основой для теоретических разработок, объясняющих различия между катаболизмом и анаболизмом, роль промежуточного метаболизма, сущность процессов репликации и транскрипции ДНК, трансляции мРНК, функций мембраны и множества клеточных механизмов. Рассмотрим некоторые примеры. При изучении пропионовокислого брожения Х. Вудом (1907–1991) в 1935 г. была открыта гетеротрофная фиксация  $\text{CO}_2$ . Он обнаружил, что при сбраживании глицерола бактериями *Propionibacterium arabinosum*,  $\text{CO}_2$  служит субстратом многих реакций промежуточного метаболизма (например, карбоксилирование пирувата). С. Орла-Йенсен (1936) при исследовании молочнокислого брожения установил зависимость роста молочнокислых бактерий от наличия в среде рибофлавина, а американский исследователь Э. Снелл (1936–1951) в своих работах выявил их потребность в пантотеновой, никотиновой и фолиевой кислотах, производных пиридоксаля, а также в биотине и открыл способность авидина связывать биотин. Эти открытия внесли также существенный вклад в общую биохимию.

Изучение антибиотиков, продуцируемых микроорганизмами, послужило основой многих достижений в молекулярной биологии. Начало изучению антибиотиков положили открытие пенициллина А. Флемингом (1881–1955) в 1929 г. и последующие фундаментальные исследования Г.Флори (1898–1968) и Э. Чейна (1906–1979), проведенные в конце 1940-х гг. Выяснение механизмов действия антибиотиков на клетки мишени имело важное значение для развития

молекулярной биологии, для изучения репликации и транскрипции ДНК, трансляции мРНК и функций мембран.

Таким образом, научные успехи в области физиологии микроорганизмов – основа успеха многих биологических наук.

В связи с активным использованием микроорганизмов в различных народно-хозяйственных отраслях знания в области физиологии микроорганизмов очень важны, так как ни один технологический процесс с участием микробных клеток не может быть осуществлен без понимания закономерностей роста, питания, метаболизма микроорганизмов, их отношения к факторам окружающей среды и т. д. Кроме того, без знаний по физиологии микроорганизмов нельзя успешно получать штаммы-продуценты для использования их в биотехнологической промышленности.

## 1.2. 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, N, P, S. Кроме того, для построения клеток необходимы важные в качестве электролитов щелочные металлы (K, 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  $\text{SeO}_3^-$  (селенит),  $\text{WoO}_4^{2-}$  (вольфрамат) и  $\text{MoO}_4^{2-}$  (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 организмы, использующие в качестве доноров электронов органические соединения, к *литотрофным* относятся организмы, способные использовать в качестве доноров электронов неорганические вещества ( $H_2$ ,  $NH_3$ ,  $H_2S$ ,  $CO$ ,  $Fe^{2+}$  и т. д.).

В соответствии с тремя вышеуказанными критериями (источник энергии, источник углерода, донор электронов) все микроорганизмы могут быть разделены на восемь физиологических групп (таблица 1).

Клетки микроорганизмов не могут существовать без кислорода. Основным источником кислорода является вода. Кроме того, он содержится в  $CO_2$  и различных 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 **аэротолерантные** бактерии, которые могут расти в присутствии атмосферного кислорода, но не способны его использовать в качестве акцепторов электронов, получая энергию исключительно с помощью брожения;

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

Таблица 1 – Классификация прокариот по типам питания

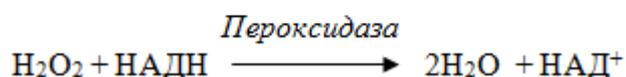
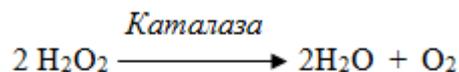
Тип питания	Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	Представители
Хемолито-автотрофия	Окислительно-восстановительные реакции	Неорганические вещества	$CO_2$	Нитрифицирующие, тионовые, водородные, металлоокисляющие прокариоты
Хемолитогетеротрофия	» »	» »	Органические вещества	Метаногенные археи, сульфатредуцирующие прокариоты
Хемоорганавтотрофия	» »	Органические вещества	$CO_2$	Факультативные метилотрофные бактерии
Хемоорганогетеротрофия	» »	» »	Органические вещества	Большинство бактерий (энтеробактерии, молочнокислые бактерии, маслянокислые бактерии и др.)
Фотолито-автотрофия	Солнечный свет	Неорганические вещества	$CO_2$	Некоторые виды пурпурных и зеленых бактерий, цианобактерий
Фотолитогетеротрофия	» »	» »	Органические вещества	Некоторые виды пурпурных и зеленых бактерий
Фотоорганавтотрофия	» »	Органические вещества	$CO_2$	Некоторые виды пурпурных бактерий
Фотоорганогетеротрофия	» »	» »	Органические вещества	Некоторые виды пурпурных и зеленых бактерий, цианобактерий, галобактерий

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.

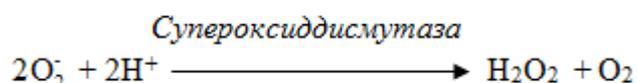
Установлено, что окисление флавопротеинов или других доноров электронов, а также радиация приводят к восстановлению  $O_2$ , сопровождаемому образованием супероксид-радикалов и пероксиданионов, которые легко связывают протоны и переходят в пероксид водорода ( $H_2O_2$ ). В ходе последующих перестроек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

способными окислять сульфгидрильные группы ферментов, приводя к их инактивации, а также вызывать повреждения в молекулах ДНК.

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



Супероксиды разлагаются под действием супероксиддисмутазы:



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

Одним из основных элементов, из которых построены клетки микроорганизмов, является азот. В расчете на сухое вещество его содержание в клетке составляет около 10 %. В природе азот встречается в форме окисленных и восстановленных соединений, а также в виде молекулярного азота атмосферы. Большинство прокариот потребляют азот в восстановленной форме в виде солей аммония ( $\text{NH}_4^+$ ) и аммиака ( $\text{NH}_3$ ). Многие бактерии используют органические азотсодержащие вещества – белки, аминокислоты, мочевины, разрушая их с выделением аммиака. Окисленные формы азота – нитраты ( $\text{NO}_3^-$ ) и нитриты ( $\text{NO}_2^-$ ) – также могут усваиваться различными группами бактерий. Некоторые бактерии способны использовать атмосферный азот. Это уникальное свойство характерно для азотфиксирующих микроорганизмов. Среди них выделяют как свободноживущие (бактерии родов *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, некоторые виды родов *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, некоторые цианобактерии, пурпурные бактерии и зеленые серные бактерии и др.), так и симбиотические (бактерии родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Frankia*, некоторые виды родов *Chromatium*, *Klebsiella*, некоторые цианобактерии и др.). В процессе биологической фиксации молекулярный азот восстанавливается до аммиака. Азотфиксирующие бактерии обеспечивают один из необходимых этапов в круговороте азота в природе.

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  $Fe_2(CO_3)_3$  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 мембраны. Далее в периплазматическом пространстве они взаимодействуют со связывающими белками, которые передают хелатные комплексы на гидрофобные транспортные белки цитоплазматической мембраны. 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 ростом 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 расходом 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 анаболизма 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. *Диссинотрофы* (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.

### 1.2.1. Транспорт веществ в клетку прокариот

Различают следующие способы поступления веществ в клетку бактерий: простая, или пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт и транслокация группы (рисунок 1).

*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 газов, таких как  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2$  и  $NH_3$ , а также низкомолекулярных веществ (например, воды и спиртов), ядов, ингибиторов, гидрофобных (растворимых в липидах) соединений, к которым относятся алифатические (например, бутанол) и ароматические соединения (например, бензол). Для многих растворимых веществ, представляющих собой слабые кислоты или основания, способность проникать через цитоплазматическую мембрану зависит от их протонирования. Они легко проникают в клетку в незаряженной форме и гораздо труднее преодолевают барьер проницаемости в заряженной форме. Примерами таких веществ могут быть уксусная кислота (переходит через мембрану в протонированной форме) и аммоний (проникает через мембрану в депротонированной форме). Скорость перемещения веществ через мембрану путем простой диффузии невелика.

У грамотрицательных бактерий дополнительным барьером является наружная мембрана. Она непроницаема для гидрофильных веществ, таких как углеводы, аминокислоты, белки и др. Перенос этих молекул через наружную мембрану происходит с помощью каналобразующих белков, которые представляют собой наполненные водой поры и поэтому называются

**поринами.** С помощью поринов осуществляется пассивное проникновение растворенных веществ через наружную мембрану грамотрицательных бактерий.

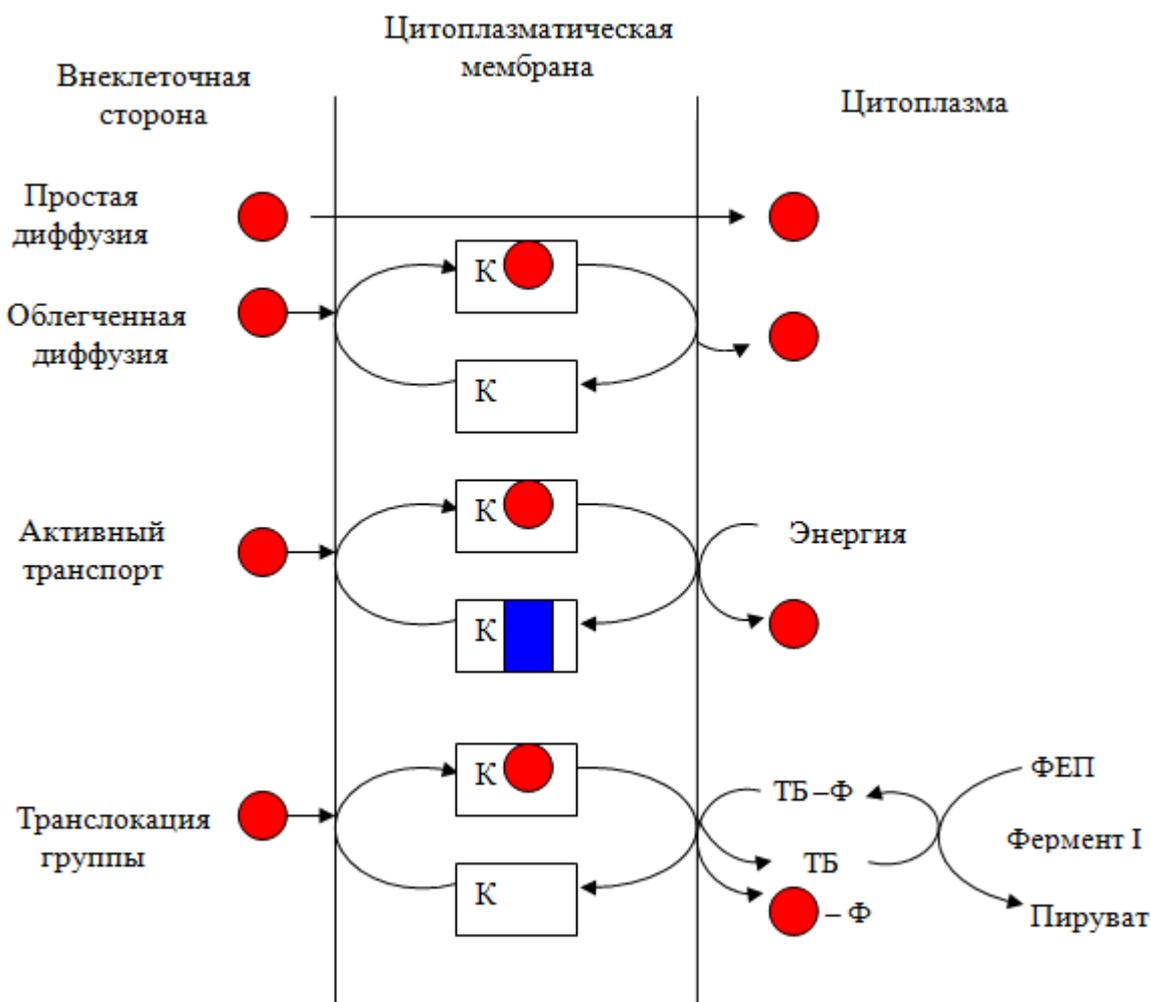


Рисунок 1 – Основные способы переноса веществ через мембрану в клетки бактерий: красный кружок – транспортируемый субстрат; К – белок-переносчик; К с синим прямоугольником – энергизованный белок-переносчик; ФЕП – фосфоенолпируват; ТБ – термостабильный белок; Ф – фосфатная группа

Перенос веществ при **облегченной диффузии (унипорте)** также происходит по градиенту концентрации переносимого вещества. Этот процесс не требует затраты метаболической энергии и осуществляется с участием специальных переносчиков (транслоказ, или пермеаз). Переносчики – вещества белковой природы, локализованные в мембране и характеризующиеся высокой субстратной специфичностью, – связываясь с субстратом они подвергаются конформационным изменениям и вследствие этого приобретают способность к перемещению субстрата с одной стороны цитоплазматической мембраны на другую, где происходит его высвобождение. Таким способом происходит транспорт в клетку глюкозы у бактерий *Zyotomonas mobilis*, лизина у бактерий *Bacillus stearothermophilus*, глицерола у многих бактерий, ионов аммония и др.

**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 транспортных белков пермеаз. В отличие от облегченной диффузии для активного транспорта необходимы затраты энергии. Источником энергии может быть ионный потенциал или молекулы АТФ. Наиболее распространенным механизмом активного поглощения субстратов является **транспорт с использованием энергии электрохимического протонного потенциала** (активный транспорт первого класса), который называют термином, предложенным П. Митчеллом, – протондвижущая сила ( $\Delta p$ ). Энергия, запасенная в виде электрохимического протонного потенциала или потенциала других ионов, например  $\text{Na}^+$  (**система первичного транспорта**), используется в **системах вторичного транспорта** для осуществления движения растворенных веществ против градиента их концентрации. Движущей силой вторичного транспорта служит суммарный электрохимический потенциал, соединений, участвующих в этом процессе. Системы вторичного транспорта действуют по механизму симпорта и антипорта. При **симпорте** переносятся два вещества одновременно в одном направлении. Примерами симпорта является перенос протона ( $\text{H}^+$ ) и молекулы лактозы у бактерий *E.coli*, перенос пролина и иона  $\text{Na}^+$  у бактерий *E.coli*, поглощение глутамата у *E.coli* и двух ионов натрия и др. Из этих примеров видно, что для вторичного транспорта субстратов через цитоплазматическую мембрану может использоваться как протонный, так и натриевый потенциал.

В случае **антипорта** два вещества транспортируются в противоположных направлениях. Принцип антипорта состоит в сопряжении двух потоков – движущего потока (происходит по градиенту концентрации субстрата) и движимого потока (происходит против градиента), таким образом, что один поток невозможен в отсутствие другого. Хорошо изучены механизмы антипорта субстрата и продукта реакции, например, антипорт малат/лактат при сбраживании малата до лактата у *Lactococcus lactis*, транспорт оксалат/формиат у *Oxalobacter formigenes*, лактоза/галактоза и аргинин/орнитин у молочнокислых бактерий, а также механизмы антипорта относительно различающихся соединений, например, фосфата и сахарофосфата у *E.coli*, или токсичных соединений и продуктов их детоксикации (например, антипорт катион/тетрациклин).

В системах активного транспорта второго класса **перенос растворенного вещества сопряжен с синтезом или гидролизом АТФ**. К этому классу относятся АТФазы, или АТФ-синтазы. АТФазы участвуют в переносе небольших одновалентных ( $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) или двухвалентных ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) катионов, превращая энергию фосфатной связи АТФ в электрохимический градиент переносимого иона или наоборот – энергию градиента в энергию АТФ, как и в случае АТФ-синтаз, сопряженных с дыхательной цепью.

Ко второму классу транспортных систем относится также **транспорт веществ, зависимый от периплазматических субстрат-связывающих белков**. Этот транспорт связан с гидролизом АТФ и присутствует в основном у

грамотрицательных бактерий. У бактерий *E.coli* обнаружено более 20 таких транспортных систем. Они переносят разнообразные субстраты, включая аминокислоты, пептиды, моносахариды, дисахариды, органические анионы, нуклеотиды, коферменты, неорганические ионы, такие как сульфат или фосфат. Хорошо изучены системы поглощения мальтозы, гистидина и олигопептидов у *E.coli* и *Salmonella typhimurium*. Как правило, молекулы белков-переносчиков пермеаз в этих системах состоят из четырех субъединиц, или доменов (рисунок 2). Две субъединицы высокогидрофобны и погружены в мембрану, а две другие лишь соединены с ней с цитоплазматической стороны. Отличительная особенность этих систем состоит в том, что молекулу субстрата должен транспортировать к пермеазам дополнительный водорастворимый субстратсвязывающий белок, локализованный в периплазматическом пространстве. На рисунке 2 показан механизм транспорта мальтозы у бактерий *E.coli*. Мальтоза проникает в периплазматическое пространство через специфичный к этому углеводу порин Lam B и прочно связывается с субстратсвязывающим белком MalE. В результате связывания конформация этого белка изменяется. При взаимодействии комплекса белок MalE-субстрат с расположенными в мембране субъединицами MalF и MalG пермеазы происходит высвобождение субстрата и перенос его в цитоплазму. Этот процесс сопряжен с гидролизом АТФ, который осуществляют мембраносвязанные субъединицы пермеазы MalK.

Системы поглощения субстратов, зависящие от периплазматических субстрат-связывающих белков, характеризуются однонаправленностью транспорта. Они обладают высоким сродством к субстрату и отличаются относительно низкой максимальной скоростью транспорта.

Таким образом, транспортные системы, связанные с водорастворимыми субстратсвязывающими белками образуют обширное суперсемейство. Для переносчиков во всех этих системах характерно наличие общих аминокислотных последовательностей, образующих участок связывания АТФ. Поэтому этот класс транспортных АТФаз назван семейством **АВС-переносчиков** (от **АТР-binding cassette**). Белки АВС-переносчики сходны по аминокислотной последовательности и структурной организации. Они участвуют во многих физиологических процессах, таких как поглощение растворенных веществ, выведение антибиотиков, гемолизинов, полисахаридов и различных токсинов.

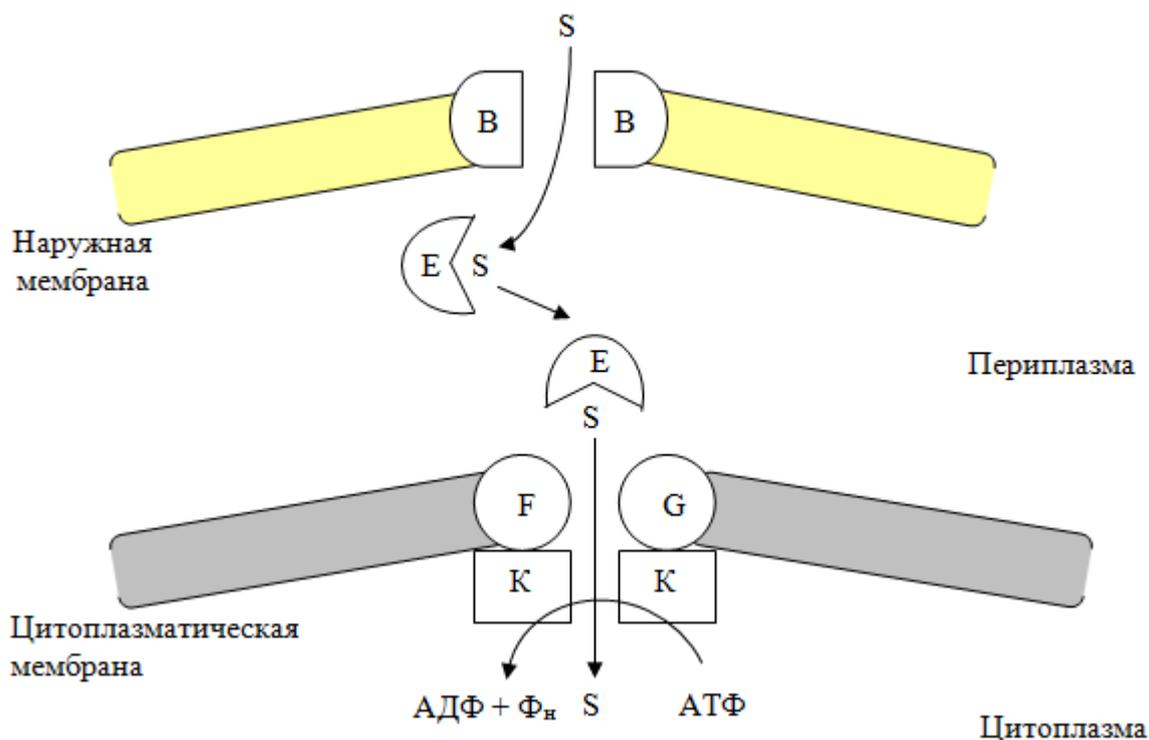
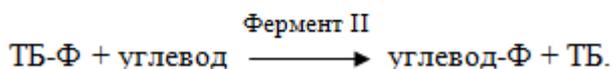
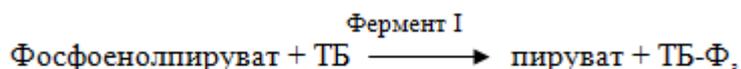


Рисунок 2 – Система поглощения мальтозы, зависящая от субстратсвязывающих белков у *E.coli*. Обозначения субъединиц:  
 В – LamB; Е – MalE; F – MalF; G – MalG; К – MalK. S – субстрат

К третьему классу активного транспорта относятся специфические транспортные системы, которые осуществляют **выделение их клеток ионов натрия, сопряженное с декарбоксилированием**. Эти системы открыты у бактерий *Propionigenium modestum*, *Klebsiella pneumoniae* и *Salmonella typhimurium*. Декарбоксилированию подвергаются карбоновые кислоты, например оксалоацетат или метилмалонил-КоА. Процесс катализирует мембраносвязанная, биотинзависимая декарбоксилаза.

При **транслокации группы** происходит химическая модификация переносимых молекул, тогда как при пассивной диффузии, облегченной диффузии и активном транспорте они поступают в клетку в химически неизменном виде. Так происходит поступление в клетку многих прокариот углеводов, в процессе которого они фосфорилируются. Источником фосфатной группы служит фосфоенолпируват, от которого фосфат с помощью фермента (фермента I), находящегося в цитоплазме, переносится на молекулу специального термостабильного белка (ТБ), а с него, при участии второго фермента (фермента II), локализованного в цитоплазматической мембране и обнаруживающего высокое сродство к определенным углеводам, фосфатная группа переносится на углевод на наружной стороне цитоплазматической мембраны:



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

### 1.2.2. Автотрофные способы питания микроорганизмов

Значительное количество микроорганизмов обладает способностью использовать  $\text{CO}_2$  в качестве единственного источника углерода. Эти организмы, называемые **автотрофами** (самопитающимися), относятся к различным эволюционным ветвям микроорганизмов.

Среди автотрофных микроорганизмов можно выделить несколько типов по способу питания. **Облигатные автотрофы** практически не способны использовать органические вещества, по-видимому, из-за отсутствия у них соответствующих транспортных систем. **Факультативные автотрофы** при появлении в среде доступных органических субстратов переключаются на их использование, прекращая автотрофную фиксацию  $\text{CO}_2$ . **Миксотрофные бактерии** способны ассимилировать  $\text{CO}_2$  одновременно с органическими субстратами. Некоторые фототрофные бактерии – факультативные автотрофы – предпочтительно используют органические субстраты, однако в процессе ассимиляции, например жирных кислот, в которых углерод более восстановлен, чем углерод клеточных компонентов, они должны «сбрасывать» избыток восстановительных эквивалентов, осуществляя для этого фиксацию  $\text{CO}_2$ . У таких бактерий цикл Кальвина, а также иногда другие механизмы фиксации диоксида углерода выполняют важную роль в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса.

Известно четыре различных механизма фиксации  $\text{CO}_2$ . Наиболее распространен у прокариот цикл Кальвина (см. рисунок 52), осуществляющийся также в хлоропластах растений. Он характерен для аэробных бактерий, хотя у аэробных архей он, по-видимому, отсутствует.

Второй механизм фиксации  $\text{CO}_2$  – восстановительный цикл трикарбоновых кислот (цикл Арнона) (рисунок 3), который функционирует у зеленых серных бактерий рода *Chlorobium*, у некоторых сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfobacter*, у термофильных водородных бактерий рода *Hydrogenobacter*,

окисляющих водород в микроаэробных условиях, и у анаэробных сульфатредуцирующих архей рода *Thermoproteus*.

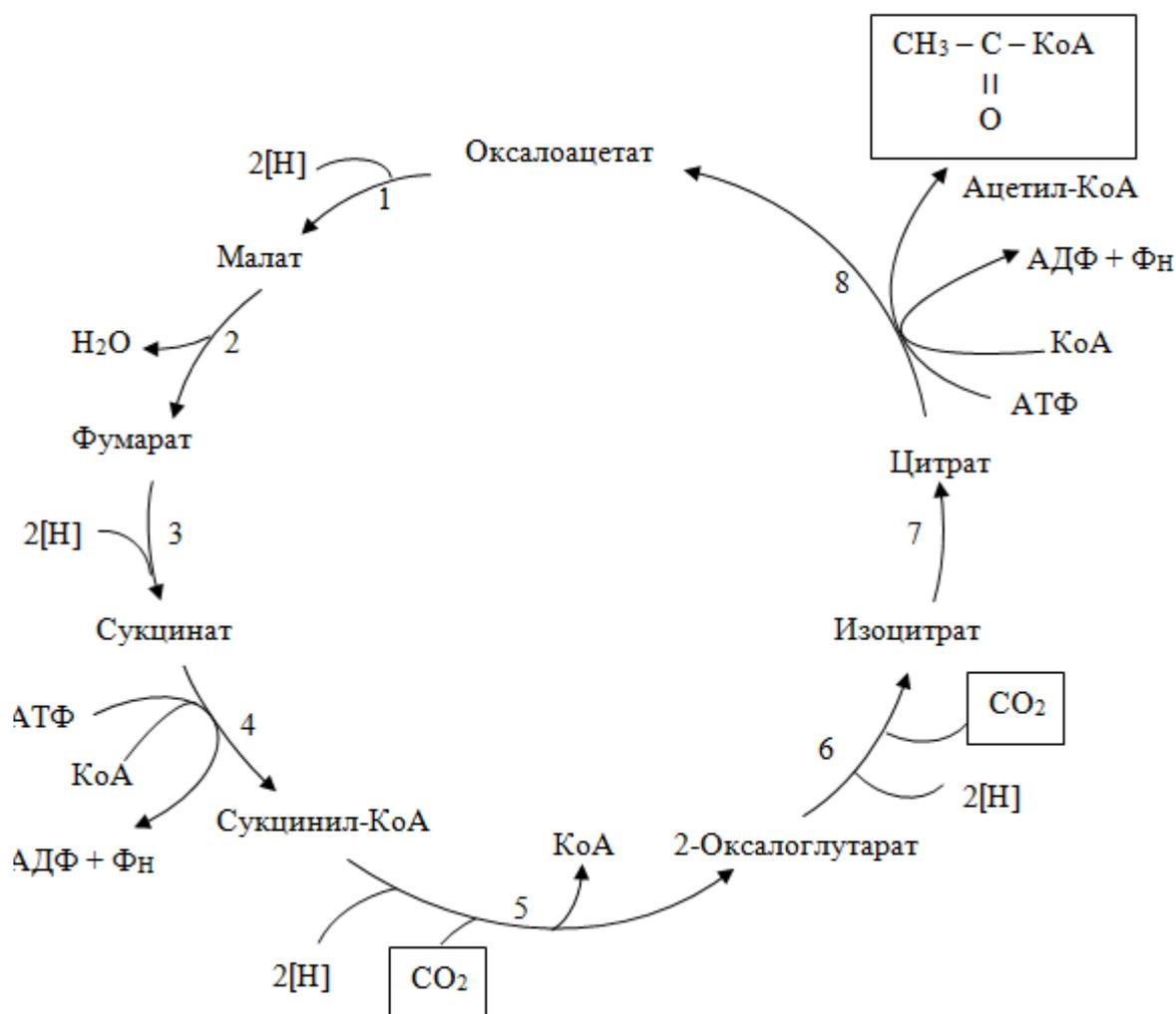


Рисунок 3 – Реакции восстановительного цикла трикарбоновых кислот: 1 – малатдегидрогеназа; 2 - фумаратгидратаза (фумараза); 3 – фумаратредуктаза; 4 – сукцинил-КоА-синтаза; 5 – 2-оксоглутарат:ферредоксин-оксидоредуктаза; 6 – изоцитратдегидрогеназа; 7 – аконитатгидратаза (аконитаза); 8 – АТФ-цитратлиаза

Из рисунка 3 видно, что в восстановительном цикле трикарбоновых кислот осуществляется синтез ацетил-КоА с затратой двух молекул АТФ – одной в сукцинил-КоА-синтазной реакции и другой при АТФ-зависимом расщеплении цитрата.

Третий механизм автотрофной фиксации  $\text{CO}_2$  - восстановительный ацетил-КоА путь осуществляется у некоторых сульфатредуцирующих бактерий (род *Desulfobacterium*) и архей (род *Archaeoglobus*), а также у большинства ацетогенных бактерий и метаногенных архей, т.е. только у строгих анаэробов (см. карбонатное дыхание).

Наконец, специфический четвертый путь – 3-гидроксипропионатный цикл – пока обнаружен только у фототрофной зеленой несерной бактерии

*Chloroflexus aurantiacus*, по-видимому, он функционирует и у некоторых аэробных архебактерий. Этот циклический механизм, по которому происходит синтез глиоксилата из двух молекул бикарбоната (рисунок 4), описывается следующим уравнением:



Глиоксилат относится к метаболитам-предшественникам, используемым в биосинтетических реакциях.

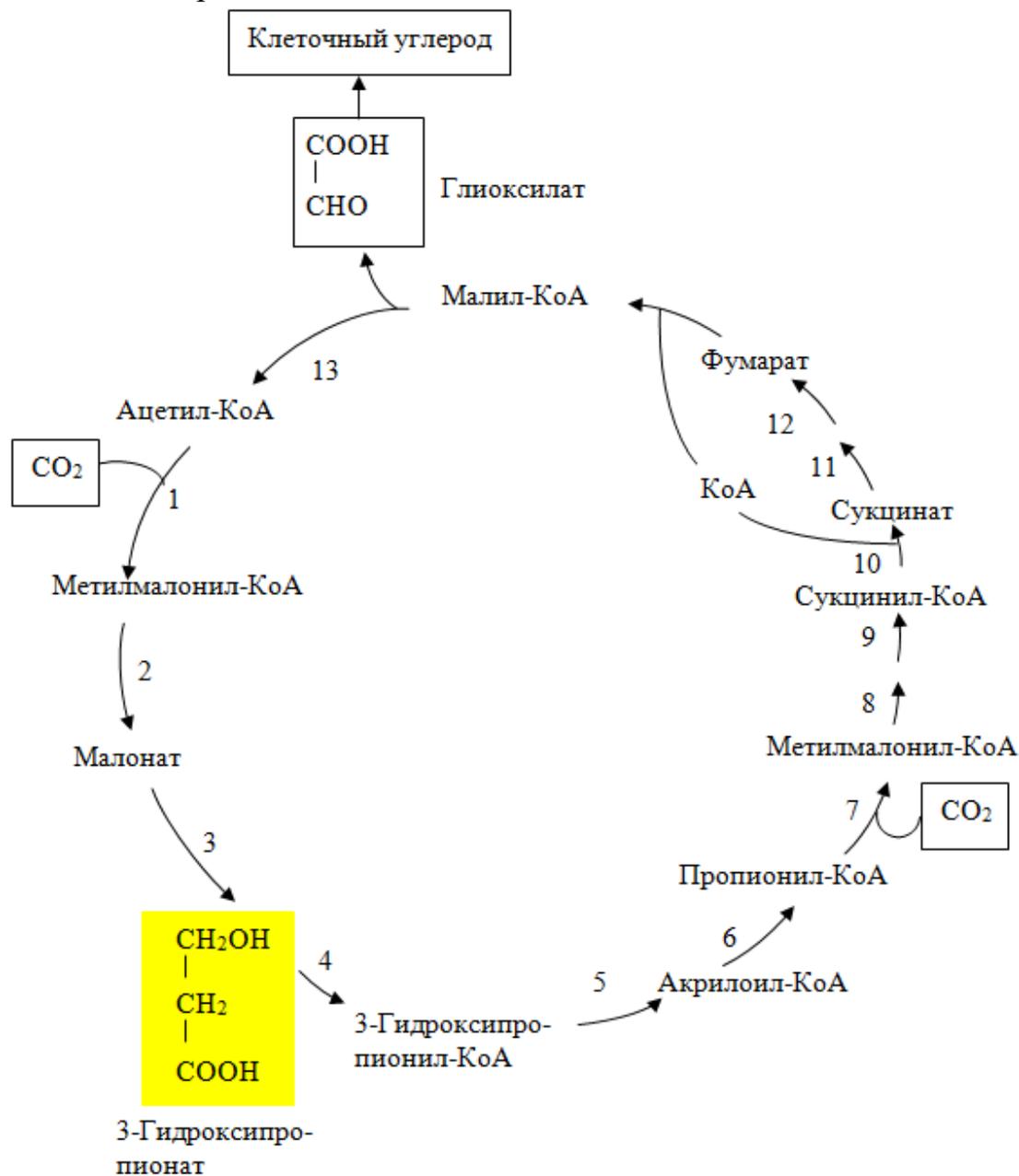


Рисунок 4 – Реакции 3-гидроксипропионатного цикла:

- 1 – ацетил-КоА-карбоксилаза; 2 – дегидрогеназа малонового полуальдегида;  
 3 – 3-гидроксипропионатдегидрогеназа; 4 – 3-гидроксипропионат-КоА-лигаза;  
 5 – акрилоил-КоА-гидратаза; 6 – акрилоил-КоА-редуктаза; 7 – пропионил-КоА-карбоксилаза;  
 8 – метилмалонил-КоА-эпимераза; 9 – метилмалонил-КоА-мутаза;  
 10 – сукцинил-КоА:и малат-КоА-трансфераза; 11 – сукцинатдегидрогеназа;  
 12 – фумаратгидратаза; 13 – малил-КоА-лиаза

Сравнение автотрофных механизмов фиксации CO<sub>2</sub> представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнение автотрофных путей ассимиляции CO<sub>2</sub>

Путь фиксации CO <sub>2</sub>	Затрата АТФ на синтез 1 молекулы триозофосфата	Затрата восстановителя на синтез 1 молекулы триозофосфата	Фермент, осуществляющий фиксацию CO <sub>2</sub>	Продукт фиксации CO <sub>2</sub>	Ключевые ферменты
Цикл Кальвина (восстановительный пентозофосфатный цикл)	9	6 молекул НАДФН	Рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза	3-фосфоглицерат	Рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза; фосфорибулокиназа
Цикл Арнона (восстановительный цикл трикарбоновых кислот)	5	3 молекулы НАДФН; 2 молекулы восстановленного ферредоксина; 1 молекула неизвестного донора	2-оксоглутаратсинтаза; изоцитратдегидрогеназа; пируватсинтаза	2-оксоглутарат; изоцитрат; пируват	2-оксоглутаратсинтаза; АТФ-цитратлиаза
Восстановительный ацетил-КоА путь	4 – 5	3 – 4 молекулы НАДФН; 2 – 3 молекулы восстановленного ферредоксина; 1 – H <sub>2</sub> (у метаногенов)	Ацетил-КоА-синтаза/СО-дегидрогеназа; формиатдегидрогеназа; пируватсинтаза	СО, связанный с ферментом; формиат; пируват	Ацетил-КоА-синтаза/СО-дегидрогеназа; фермент, восстанавливающий СО <sub>2</sub> до СН <sub>3</sub> -Н <sub>4</sub> -птерина
3-Гидроксипропионатный цикл	?	?	Ацетил-КоА-карбоксилаза; пропионил-КоА-карбоксилаза	Малонил-КоА; метил-малонил-КоА	Ферменты, восстанавливающие малонил-КоА до пропионил-КоА; малил-КоА-лиаза

Из данной таблицы видно, что четыре механизма автотрофной фиксации CO<sub>2</sub> различаются по количеству молекул АТФ, расходуемых на синтез молекулы триозы из трех молекул CO<sub>2</sub>, и используемым восстановителям. В анаэробных механизмах (восстановительный цикл трикарбоновых кислот и восстановительный ацетил-КоА путь) помимо НАДФН используется восстановленный ферредоксин и фиксация CO<sub>2</sub>, как правило, заключается в реакции восстановительного карбоксилирования. Характерный признак анаэробных механизмов фиксации CO<sub>2</sub> – обратимость их реакций. У одного и того же организма в автотрофных условиях они обеспечивают автотрофную фиксацию CO<sub>2</sub>, тогда как в хемогетеротрофных условиях – окисление ацетил-КоА как продукта катаболизма органических субстратов.

### 1.2.3. Ассимиляция CO<sub>2</sub> хемогетеротрофными микроорганизмами

Все гетеротрофные микроорганизмы с помощью определенных ферментативных реакций активно включают диоксид углерода в метаболизм, при этом у прокариот пути использования его намного многообразнее, чем у эукариот. Диоксид углерода у прокариот активно используется по путям как конструктивного, так и энергетического метаболизма. В конструктивном метаболизме он входит в состав веществ клетки, выполняя две основные функции:

- присоединение CO<sub>2</sub> в качестве C<sub>1</sub>-группы к молекуле клеточного метаболита приводит к удлинению ее углеродного скелета;
- при присоединении CO<sub>2</sub> происходит регулирование общего уровня окисленности-восстановленности клеточных метаболитов, так как это приводит к заметному повышению окисленности молекулы метаболита.

В энергетическом метаболизме ряда анаэробных эубактерий, получающих энергию в процессе брожения, а также некоторых эубактерий и архебактерий, осуществляющих анаэробное дыхание, CO<sub>2</sub> служит для удаления избытка восстановителя, т.е. используется как конечный акцептор электронов. В этом случае, CO<sub>2</sub>, участвующий в реакциях энергетического метаболизма, не включается в вещества клетки, а продукты его восстановления (в виде молекул метана, формиата, ацетата) накапливаются в среде.

Основным путем включения CO<sub>2</sub> в вещества клетки у хемогетеротрофных прокариот служат реакции карбоксилирования. Важнейшие реакции включения CO<sub>2</sub> в состав веществ клетки приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Важнейшие реакции включения CO<sub>2</sub> в клеточные метаболиты у хемогетеротрофов

Фермент	Акцептор CO <sub>2</sub>	Реакция
Пируватсинтаза	Ацетил-КоА	Ацетил-КоА + CO <sub>2</sub> + Ф <sub>Двосст</sub> → пируват + Ф <sub>Док</sub> + КоА-SH
Пируваткарбоксилаза	Пируват	Пируват + CO <sub>2</sub> + АТФ → оксалоацетат + АДФ + Ф <sub>н</sub>
Фосфоенолпируват-карбоксилаза	Фосфоенолпируват (ФЕП)	ФЕП + CO <sub>2</sub> → оксалоацетат + Ф <sub>н</sub>
ФЕП-карбоксикиназа	ФЕП	ФЕП + CO <sub>2</sub> + АДФ → оксалоацетат + АТФ
ФЕП-карбокситранс-фосфорилаза	ФЕП	ФЕП + CO <sub>2</sub> + Ф <sub>н</sub> → оксалоацетат + ФФ <sub>н</sub>
Ацетил-КоА-карбоксилаза	Ацетил-КоА	Ацетил-КоА + CO <sub>2</sub> + АТФ → малонил-КоА + АДФ + Ф <sub>н</sub>
Пропионил-КоА-карбоксилаза	Пропионил-КоА	Пропионил-КоА + CO <sub>2</sub> + АТФ → метилмалонил-КоА + АДФ + Ф <sub>н</sub>
Изоцитратдегидрогеназа	2-Оксоглутарат	α-Кетоглутарат + CO <sub>2</sub> + НАДФН → изолимонная кислота + НАДФ <sup>+</sup>
Малатдегидрогеназа	Пируват	Пируват + CO <sub>2</sub> + НАДФН → яблочная кислота + НАДФ <sup>+</sup>
α-Кетобутиратсинтаза	Пропионил-КоА	Пропионил-КоА + CO <sub>2</sub> + Ф <sub>Двосст</sub> → α-кетобутират + Ф <sub>Док</sub> + КоА-SH
α-Кетоглутаратсинтаза	Сукцинил-КоА	Сукцинил-КоА + CO <sub>2</sub> + Ф <sub>Двосст</sub> → α-кетоглутарат + Ф <sub>Док</sub> + КоА-SH

### 1.3. Метаболизм микроорганизмов

#### 1.3.1. Общая характеристика типов метаболизма

**Метаболизм** – это совокупность биохимических процессов, протекающих в клетках микроорганизмов и обеспечивающих их жизнедеятельность. Метаболизм складывается из двух процессов: энергетического метаболизма (катаболизма) и конструктивного метаболизма (анаболизма).

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

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

Конструктивный и энергетический метаболизм состоит из ряда последовательных ферментативных реакций, протекание которых условно можно представить следующим образом. На начальном этапе воздействию подвергаются молекулы химических веществ, которые служат исходными субстратами для метаболизма обоих типов. Иногда эту часть метаболического пути называют **периферическим метаболизмом**, а ферменты, катализирующие первые этапы превращения субстрата, – периферическими. Последующие превращения (**промежуточный метаболизм**) включают ряд ферментативных реакций и приводят к синтезу промежуточных продуктов. Образующиеся на последних этапах конечные продукты конструктивных путей используются для построения вещества клеток, а энергетических ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ) – выделяются в окружающую среду.

Конструктивные и энергетические процессы протекают в клетках микроорганизмов одновременно и тесно связаны между собой. В процессе анаболизма синтезируются многочисленные ферменты, регенерируются окисленные формы переносчиков восстановительных эквивалентов (НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, ФАД, ФМН) и АДФ, без которых не может осуществиться ни один катаболитный процесс и взаимопревращение энергии. С другой стороны, в реакциях катаболизма выделяются энергия и восстановительные эквиваленты для биосинтетических целей, а также образуются многие промежуточные продукты, которые необходимы для синтеза веществ, входящих в состав клеточных структур.

Метаболизм микроорганизмов, как энергетический, так и конструктивный, отличается чрезвычайным разнообразием. Это является результатом того, что микроорганизмы 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 сложные полимерные молекулы исходных субстратов (белки, полисахариды, липиды) до более простых, мономерных (аминокислоты, моносахариды, жирные кислоты, глицерол). Образующиеся в результате действия таких ферментов вещества поступают в клетки микроорганизмов и подвергаются поэтапным химическим превращениям, включающим реакции окисления, под действием ферментов промежуточного метаболизма. Эти ферменты называются **эндоферментами**, так как они локализируются 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, осуществляющих метаболические реакции, может изменяться в зависимости от условий, в которых обитают бактерии, соответственно все ферменты подразделяют на две группы: конститутивные и индуцибельные. **Конститутивные ферменты** синтезируются независимо от наличия веществ-субстратов. В клетке они обнаруживаются в более или менее постоянных концентрациях. Примером конститутивных ферментов являются ДНК-полимеразы. **Индукцибельные ферменты** синтезируются в ответ на появление в среде субстрата-индуктора. К ним относится большинство гидролаз. Способность к индукции синтеза таких ферментов обеспечивает быструю приспособляемость микроорганизмов к конкретным условиям.

В ходе ферментативного окисления веществ выделяются восстановительные эквиваленты и энергия, образуются пируват и ацетил-КоА, которые имеют бóльшую степень окисленности, чем исходные субстраты. Пируват и ацетил-КоА могут подвергаться дальнейшему окислению до  $\text{CO}_2$  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. Эту 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  $\text{НАД}^+$ ,  $\text{НАДФ}^+$ , ФАД и ФМН, а восстановленные – соответственно НАДН, НАДФН,  $\text{ФАДН}_2$  и  $\text{ФМНН}_2$ .

Итак, назначение метаболизма микроорганизмов состоит в том, чтобы взять из окружающей среды чужие органические или неорганические вещества, превратить их в более простые с запасанием энергии, а из этих простых

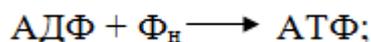
веществ построить свои, индивидуальные по структуре и функциям, соединения, затратив на это добытую энергию.

### 1.3.1. Общая характеристика энергетического метаболизма

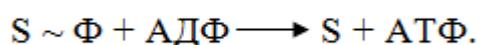
Ранее было отмечено, что по отношению к энергетическим источникам все микроорганизмы подразделяются на две группы: хемотрофные и фототрофные. Хемотрофные микроорганизмы используют для синтеза молекул АТФ энергию, освобождаемую в результате химических реакций, фототрофные – световую энергию в процессе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

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

- окислительным фосфорилированием в дыхательной или фотосинтетической электронтранспортной цепи. Этот процесс у микроорганизмов 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 микроорганизмов 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 ( $\text{H}^+$ ). 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 микроорганизмов – **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** – это процесс окисления органических субстратов или молекулярного водорода с использованием в качестве конечного акцептора электронов не молекулярного кислорода, а других неорганических веществ (нитрата –  $\text{NO}_3^-$ , нитрита –  $\text{NO}_2^-$ , сульфата –  $\text{SO}_4^{2-}$ , сульфита –  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{S}^0$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  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 микроорганизмов 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-дезоксиглюконоатный путь (КДФГ-путь), или путь Энтнера – Дудорова.

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

Все пути катаболизма начинаются с того, что глюкоза, поступившая в клетку, сначала фосфорилируется при участии фермента гексокиназы и АТФ

как донора фосфата. Образуется глюкозо-6-фосфат, который представляет метаболически активную форму глюкозы в клетке и служит исходным соединением для любого из трех путей катаболизма углеводов.

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

Наиболее распространенным путем катаболизма глюкозы у многих микроорганизмов является *гликолиз* (рисунок 5). При этом глюкозо-6-фосфат изомеризуется с помощью глюкозофосфатизомеразы и фосфорилируется далее в фруктозо-1,6-дифосфат, который затем расщепляется на 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) и фосфодиоксиацетон. Последний под действием фермента триозофосфатизомеразы превращается в 3-ФГА. Таким образом, из одной молекулы глюкозы образуются две молекулы 3-ФГА. На эти реакции превращения глюкозы в 3-ФГА затрачивается энергия двух молекул АТФ. Далее происходит окисление каждой молекулы 3-ФГА до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (1,3-ФГК).

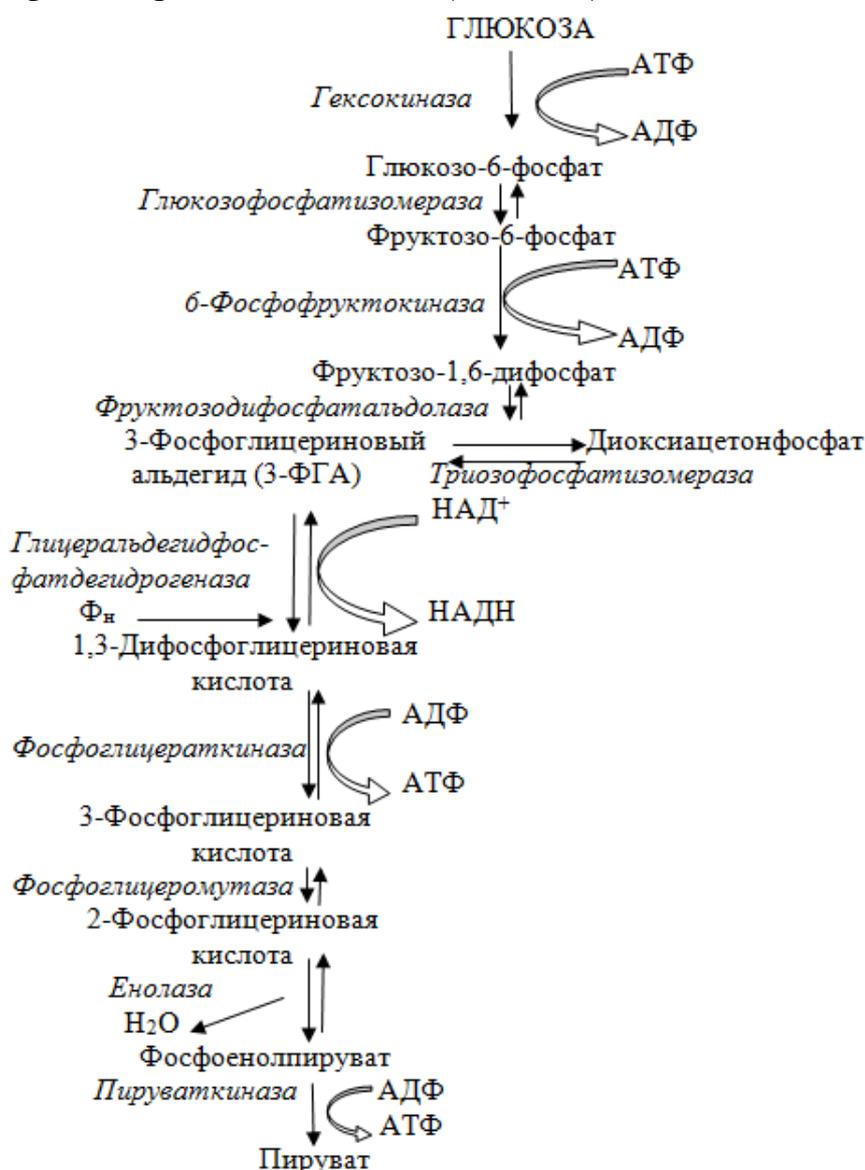
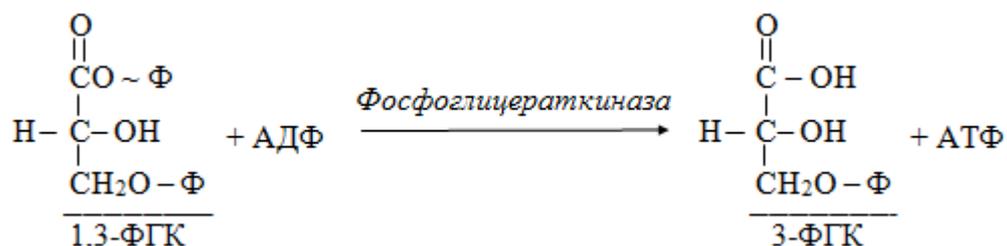


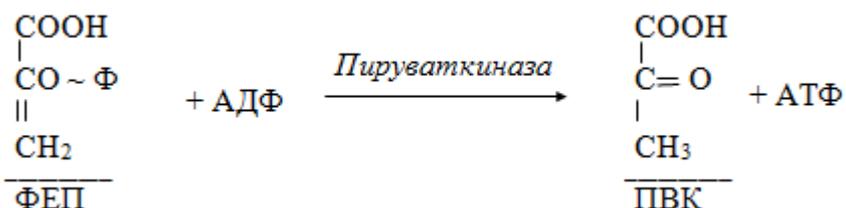
Рисунок 5 – Гликолитический путь расщепления глюкозы

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

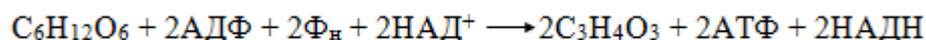
Таким образом, энергия, освободившаяся при окислении 3-ФГА, путем субстратного фосфорилирования оказывается аккумулированной в молекуле АТФ. Образуется 3-фосфоглицериновая кислота (3-ФГК).



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



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



**Пентозофосфатный путь** расщепления углеводов характерен для некоторых представителей семейства *Enterobacteriaceae*, а также для гетероферментативных молочнокислых бактерий и некоторых маслянокислых бактерий. В этом цикле глюкозо-6-фосфат, образующийся путем активирования глюкозы молекулой АТФ, превращается через ряд промежуточных реакций в 6-фосфоглюконовую кислоту, которая подвергается окислению и декарбоксилированию с образованием рибулозо-5-фосфата,  $\text{CO}_2$  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 6).

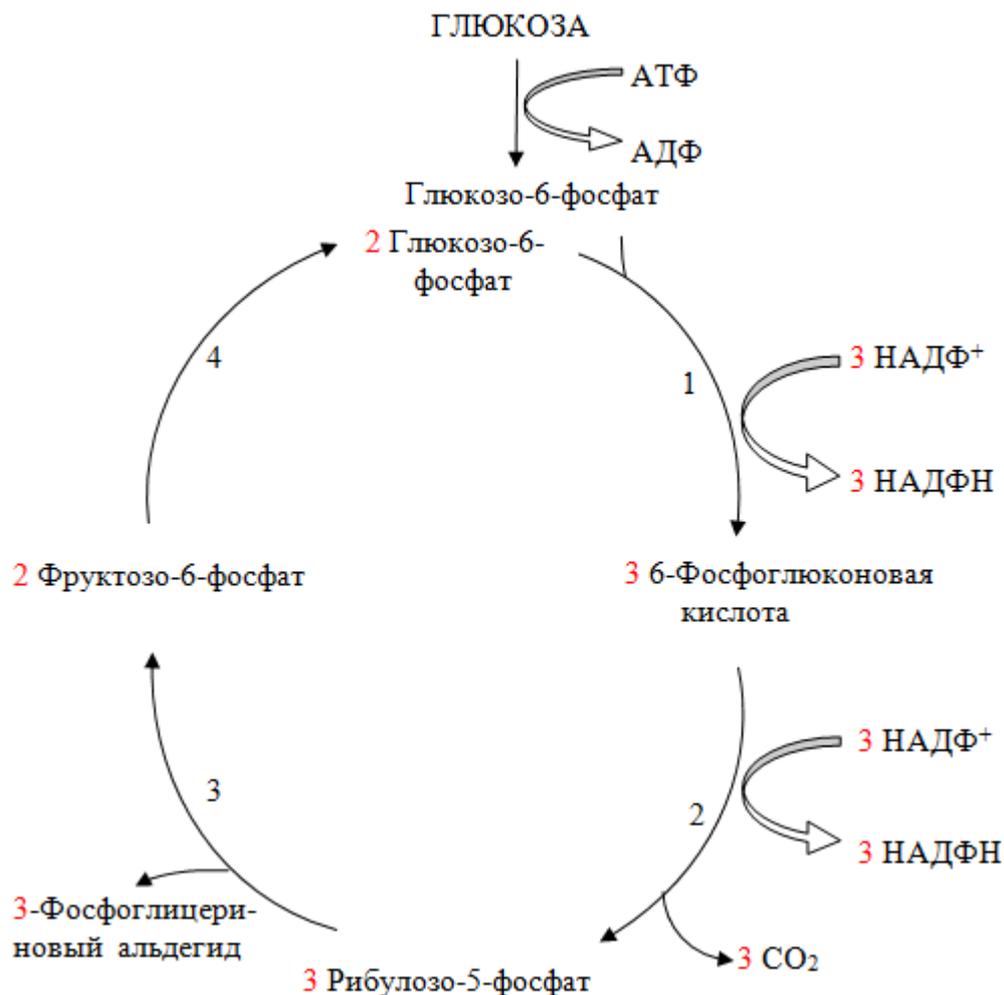


Рисунок 6 – Окислительный пентозофосфатный путь:

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

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

**Путь Энтнера – Дудорова** встречается у прокариот реже других. Он характерен в основном для псевдомонад, уксуснокислых бактерий, нейссерий, 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 (рисунок 7). Далее 3-ФГА подвергается действию ферментов гликолиза и превращается во вторую молекулу пировиноградной кислоты. В результате из одной молекулы глюкозы при функционировании этого пути синтезируется одна молекула АТФ, по одной молекуле НАДФН и НАДН. Следует подчеркнуть, что путь Энтнера –

Дудорова является самым кратчайшим механизмом расщепления углеводов до пировиноградной кислоты.

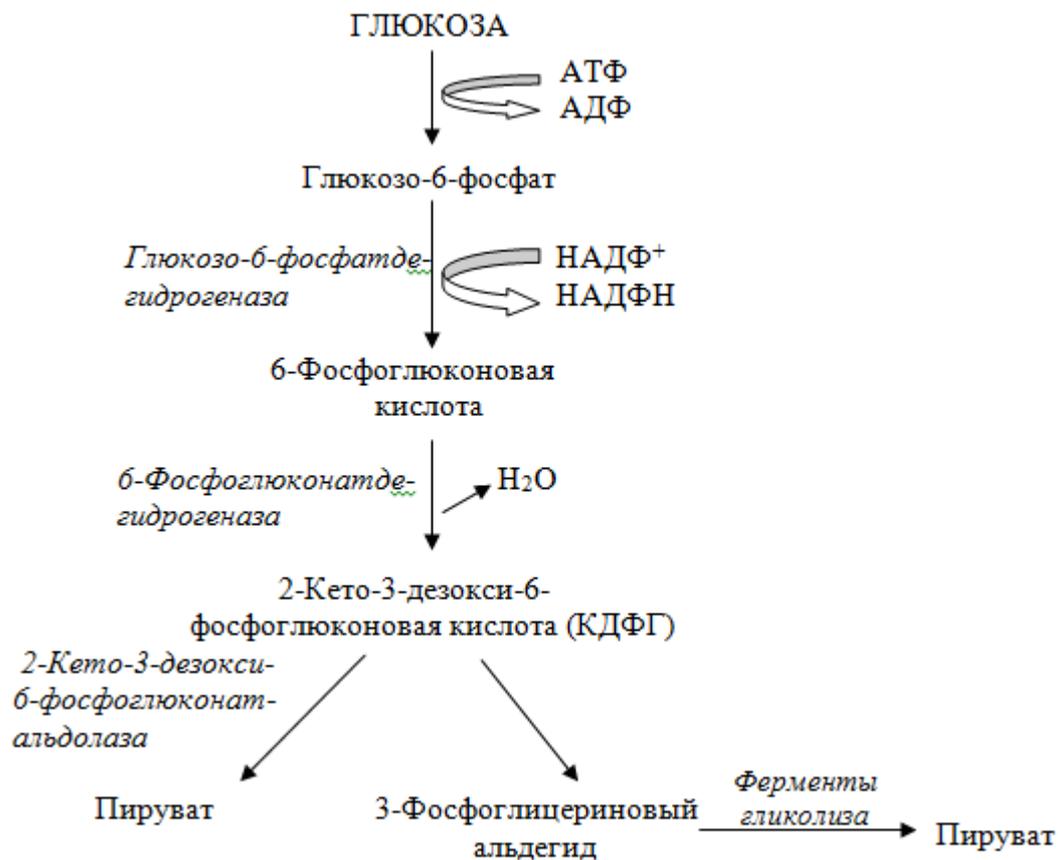


Рисунок 7 – Путь Энтнера – Дудорова

Сравнительная характеристика различных путей катаболизма глюкозы представлена на рисунке 8.

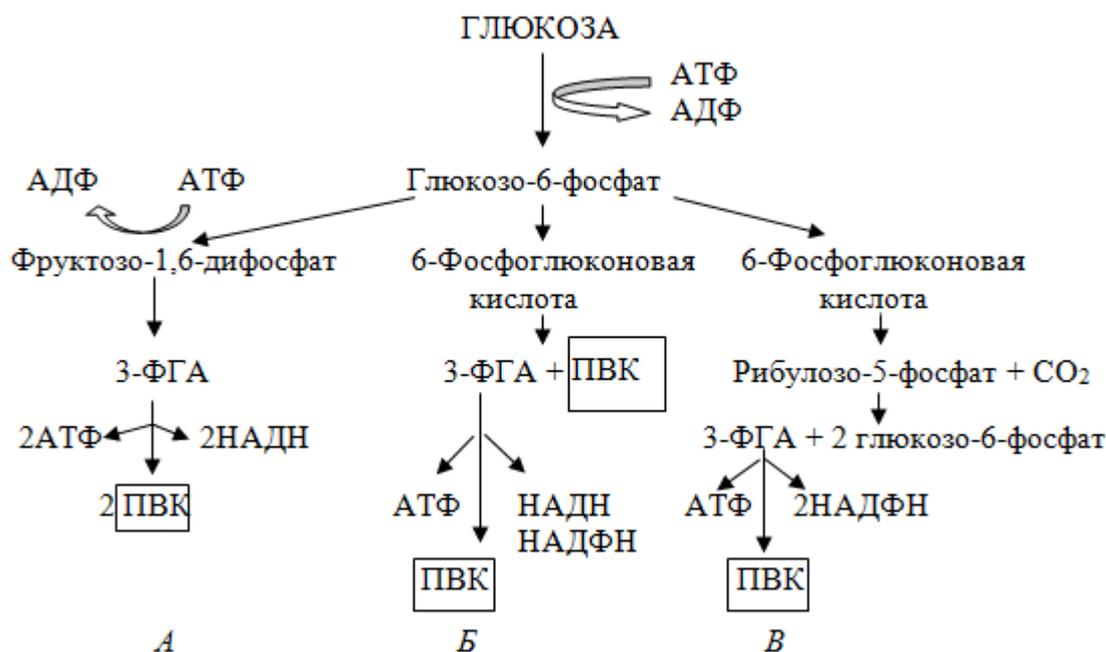


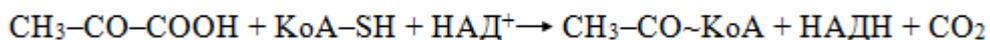
Рисунок 8 – Сравнительная характеристика путей катаболизма глюкозы в клетках прокариот:

А – гликолиз; Б – путь Энтнера – Дудорова; В – пентозофосфатный путь

Таким образом, рассмотрев пути катаболизма глюкозы, мы можем заключить, что важнейшим продуктом, образующимся в них, является пирувиноградная кислота, которая подвергается дальнейшим превращениям. Пируват занимает центральное положение в метаболизме клеток и может служить предшественником многих продуктов.

### 1.3.1.1. Аэробное дыхание

Пирувиноградная кислота, образующаяся в одном из трех вышеперечисленных путей катаболизма глюкозы, в процессе реакции окислительного декарбоксилирования с участием коэнзима А окисляется до ацетил-КоА. Реакцию катализирует пируватдегидрогеназный комплекс, состоящий из трех ферментов и пяти кофакторов:



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

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

В конечном итоге окисление ацетил-КоА в ЦТК приводит к образованию двух молекул  $\text{CO}_2$ , одной молекулы АТФ и восьми атомов водорода, из которых шесть атомов связаны в молекулах пиридиннуклеотидов и два атома – в молекулах флавопротеинов (рисунок 9).

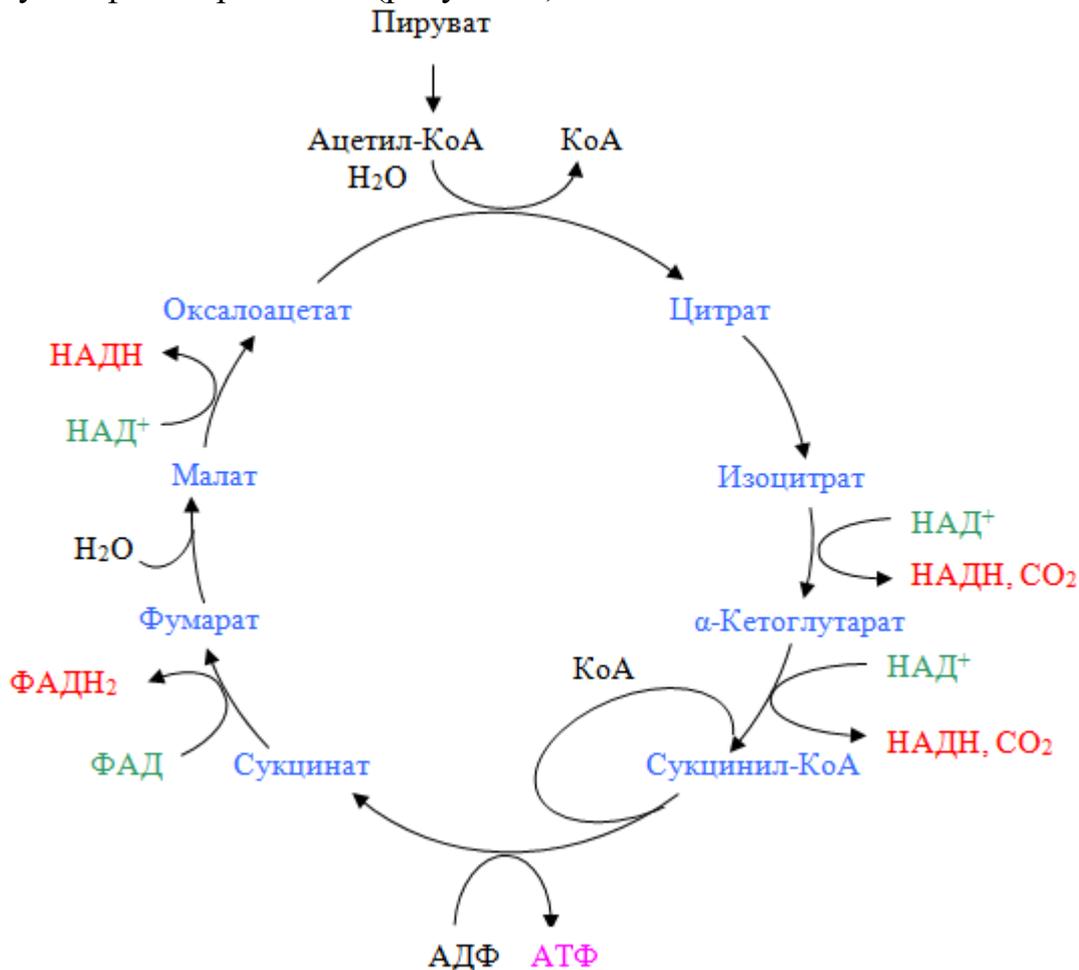


Рисунок 9 – Цикл Кребса

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

У некоторых бактерий цикл трикарбоновых кислот «разорван». Наиболее часто отсутствует этап превращения  $\alpha$ -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  $\text{ФАД} \cdot \text{H}_2$ , поступают в дыхательную цепь, которая у бактерий находится в цитоплазматической мембране, а у эукариот – в мембране митохондрий. В дыхательной цепи НАДН и  $\text{ФАДН}_2$  вновь окисляются до  $\text{НАД}^+$  и  $\text{ФАД}$ , а отщепившийся от них водород передается не менее чем через пять

переносчиков на заключительный участок цепи, где соединяется с молекулярным кислородом, образуя воду (рисунок 10).

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 (мембранного) фосфорилирования**. В реакциях окислительного фосфорилирования принимает участие специальный фермент АТФ-синтаза, который катализирует превращение АДФ в АТФ.

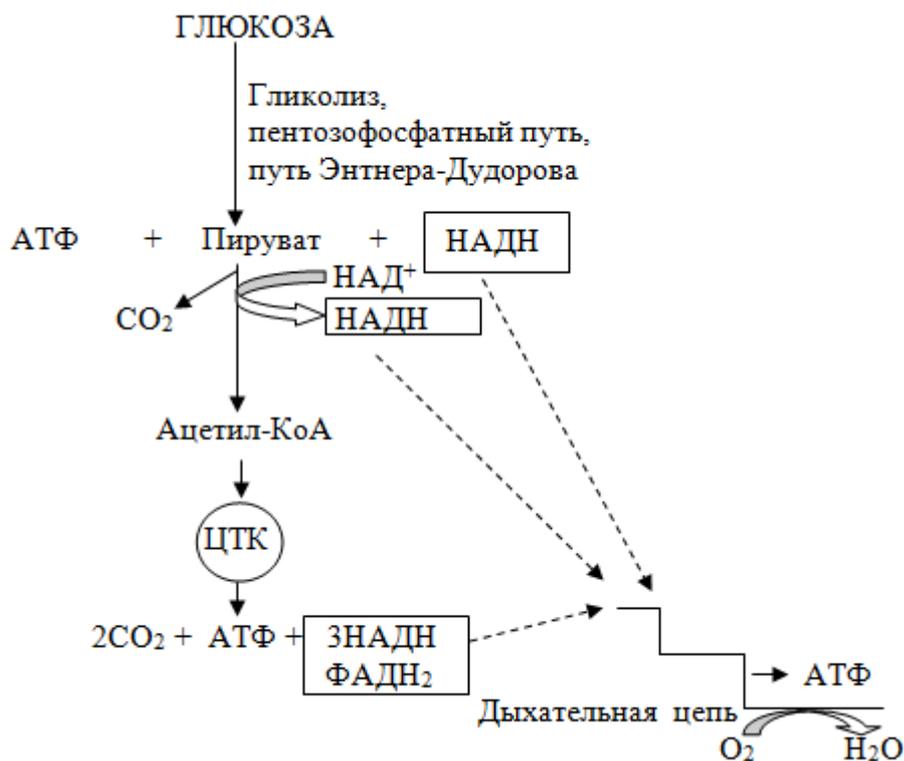


Рисунок 10 – Схема аэробного дыхания

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

**Флавопротеины** – ферменты, содержащие в качестве простетических групп флавинонуклеотид (ФМН) или флавинадениндуклеотид (ФАД). Флавопротеины осуществляют перенос атомов водорода, т. е. являются дегидрогеназами. Дегидрогеназа, содержащая в качестве простетической группы ФМН, является НАДН-дегидрогеназой. Это стартовый переносчик в дыхательной цепи, осуществляющий перенос водорода с НАДН 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 ФАДН<sub>2</sub> поступают сразу на хиноны, локализованные на последующих 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 11).

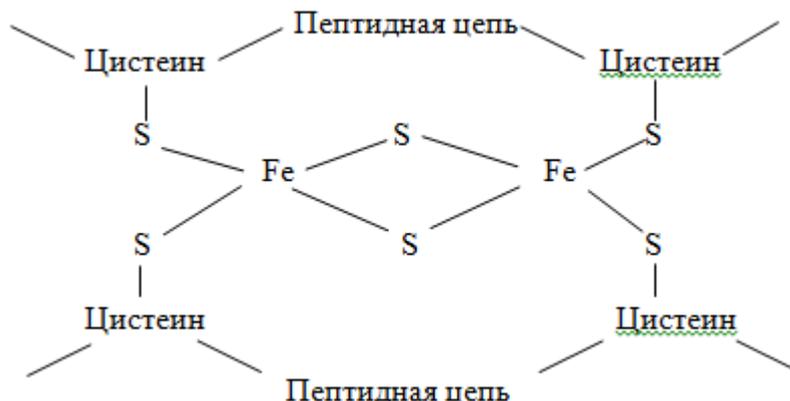


Рисунок 11 – Железосероцентры (FeS-центры) белков

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

**Хиноны** – жирорастворимые соединения. У грамотрицательных бактерий и у эукариотических микроорганизмов они представлены убихинонами (кофермент Q) или менахинонами (рисунок 12), у грамположительных бактерий – нафтохинонами.

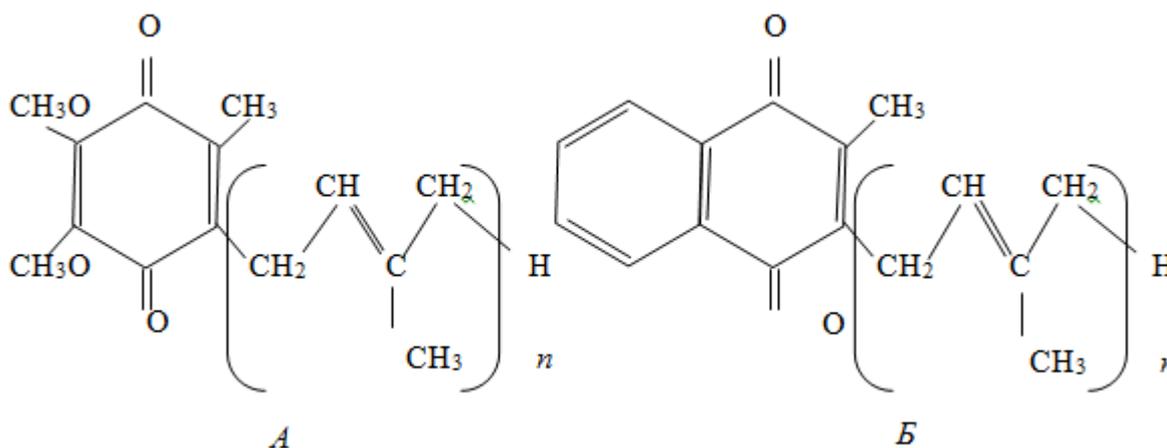


Рисунок 12 – Хиноны грамотрицательных бактерий:  
 А – кофермент Q (убихинон); Б – менахинон

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*, *a*<sub>3</sub>, *b*, *c*, *o* и ряд других. Наиболее широко распространен цитохром *c*. Он найден почти у всех организмов, обладающих дыхательной цепью. Конечные (терминальные) цитохромы дыхательной цепи – это цитохромы *a* + *a*<sub>3</sub> 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 13) и цитоплазматических мембранах бактерий *E. coli* (рисунок 14).

Из рисунка 13 видно, что митохондриальная дыхательная цепь у дрожжей содержит четыре комплекса:

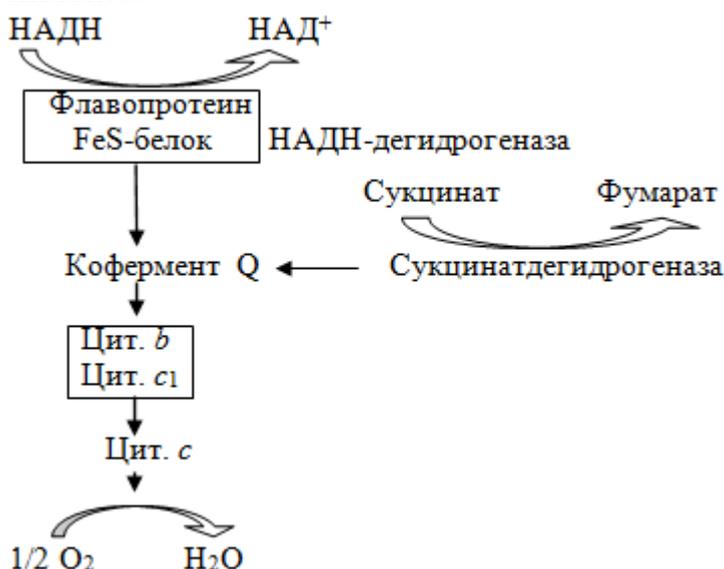


Рисунок 13 – Компоненты дыхательной цепи митохондрий у дрожжей:  
цит. – цитохром

- 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 *c*<sub>1</sub>, 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 (рисунок 14):

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

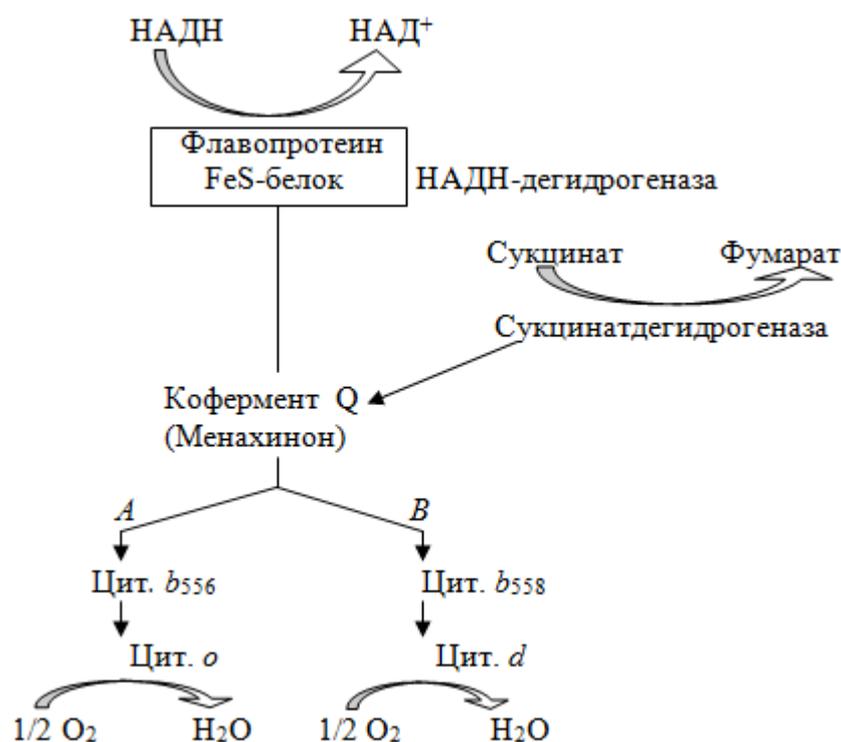


Рисунок 14 – Компоненты дыхательной цепи бактерий *E. coli*:

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

В клетках, растущих в условиях достаточной аэрации, восстановительные эквиваленты передаются к кислороду преимущественно через кофермент Q, цитохром *b*<sub>556</sub> и цитохром *o*. При ограниченном снабжении кислородом клетки используют в качестве переносчиков электронов менахинон или убихинон и цитохромы *b*<sub>558</sub> 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 в межмембранное пространство. Первый участок локализован в начале дыхательной цепи и связан с функционированием НАДН-дегидрогеназы.

Второй определяется способностью убихинона переносить водород. Последний локализован в конце дыхательной цепи и связан с активностью цитохромоксидазы. Если роль донора водорода выполняет ФАДН<sub>2</sub>, то возможны только два пункта фосфорилирования, так как при этом выпадает участок дыхательной цепи, где располагается НАДН-дегидрогеназа (рисунок 15).

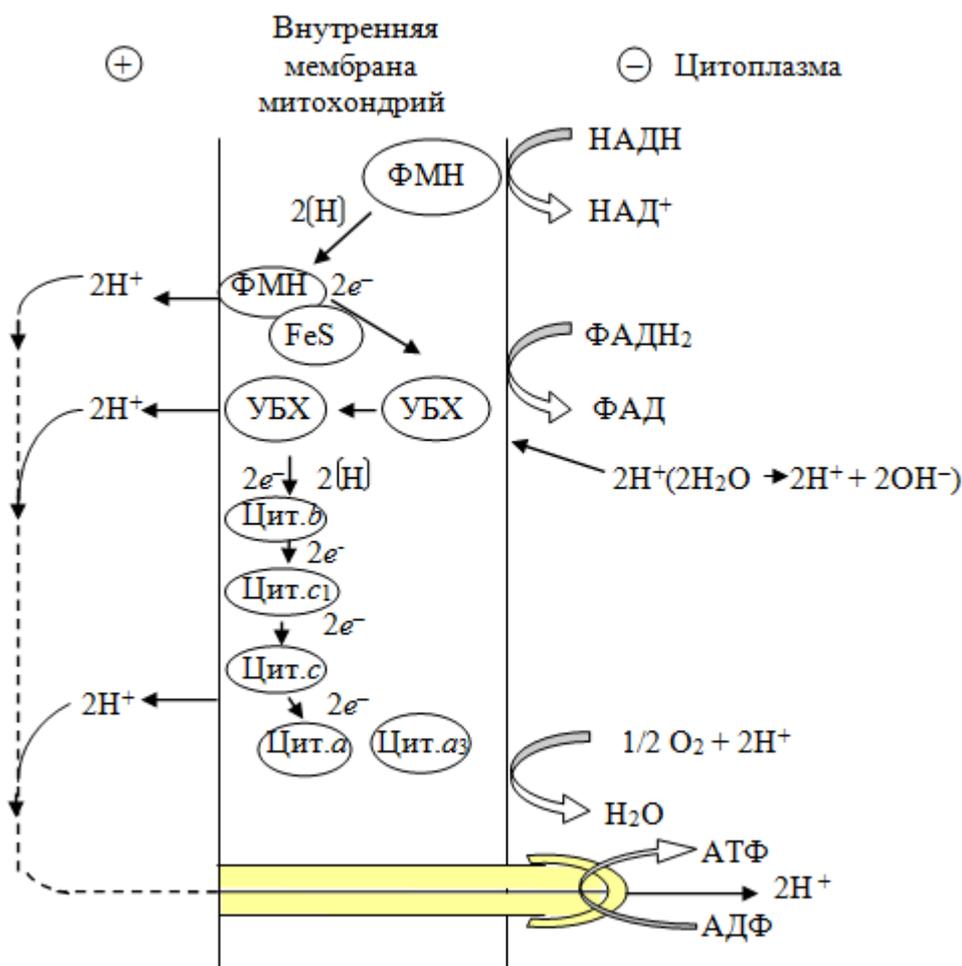


Рисунок 15 – Функциональная организация компонентов дыхательной цепи митохондрий дрожжей:  
УБХ – убихинон

Как видно из рисунка 15, связывание протонов происходит на внутренней стороне мембраны, а их освобождение – на наружной. Так как внутренняя мембрана митохондрий и цитоплазматическая мембрана бактерий непроницаемы для ионов, в том числе и для H<sup>+</sup>, и OH<sup>-</sup>, то создается трансмембранный электрохимический, или протонный градиент между наружной и внутренней их сторонами. Протоны могут обратно поступать через мембрану только в определенных местах. В некоторых из них располагаются специфические белки – АТФ-синтазы. АТФ-синтаза – многокомпонентный белковый комплекс, состоящий из гидрофильной головки (5 субъединиц, представленных в различных количественных соотношениях), обращенной в

цитоплазму, ножки и основания (3 субъединицы), погруженного в мембрану. В процессе переноса протонов через мембрану АТФ-синтаза катализирует присоединение фосфата к АДФ с отщеплением воды, в результате образуется АТФ. Однако, в настоящее время пока в деталях не ясно, каким образом энергия трансмембранного электрохимического протонного потенциала используется в реакциях фосфорилирования.

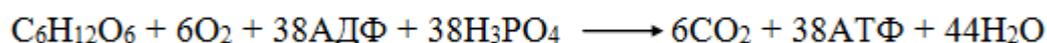
Установлено, что синтез молекулы АТФ связан с переносом двух протонов через комплекс АТФ-синтазы. Так как при окислении НАДН молекулярным кислородом выделяется шесть протонов, то, следовательно, максимальный выход АТФ в этом процессе составляют три молекулы. При окислении ФАДН<sub>2</sub>, возможны два пункта фосфорилирования.

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

- в процессе гликолиза образуется 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 ФАДН<sub>2</sub> и двух молекул АТФ.

В итоге образуются четыре молекулы АТФ, 10 молекул НАДН, две молекулы ФАДН<sub>2</sub>. Установлено, что при окислении одной молекулы НАДН максимально образуются три молекулы АТФ, при окислении одной молекулы ФАДН<sub>2</sub> – две молекулы АТФ. Следовательно, при окислении 10 молекул НАДН выход составляет 30 молекул АТФ, а двух молекул ФАДН<sub>2</sub> – 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 16, 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 ФАДН<sub>2</sub> – одна молекула АТФ.

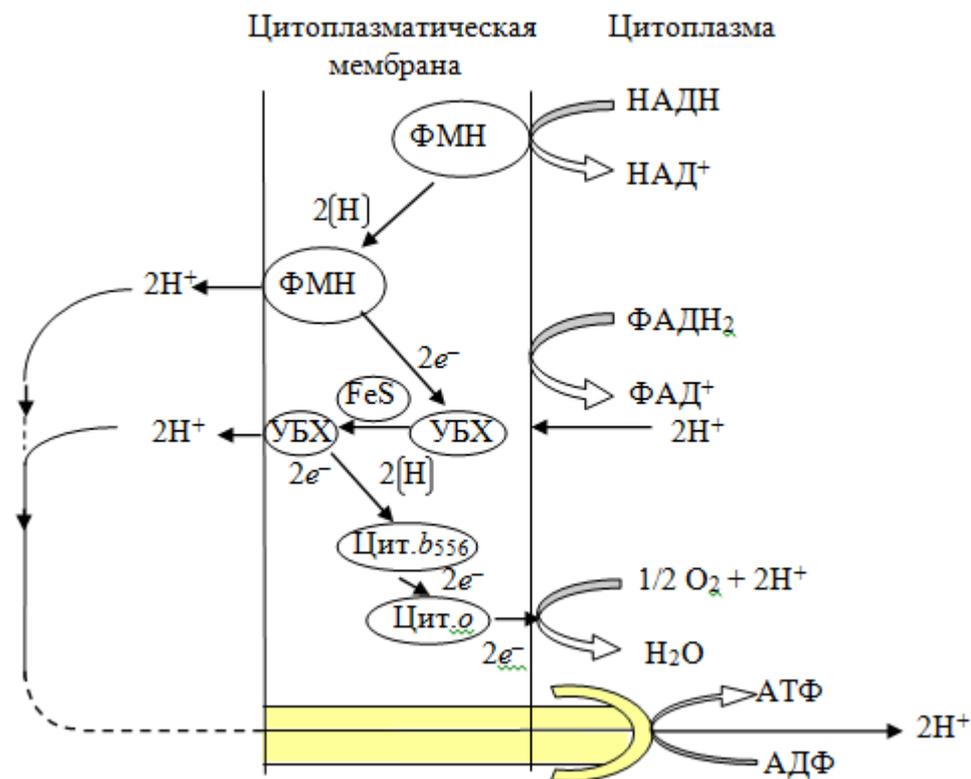


Рисунок 16 – Функциональная организация компонентов дыхательной цепи бактерий *E. coli*

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 ФАДН<sub>2</sub> 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.

### 1.3.1.2. Процессы анаэробного дыхания

При анаэробном дыхании конечным акцептором электронов в электронтранспортной цепи являются неорганические или органические соединения. Например, если конечным акцептором электронов является  $SO_4^{2-}$ , то процесс называют **сульфатным дыханием**, а бактерии – **сульфатвосстанавливающими** или **сульфатредуцирующими**. При использовании в качестве акцептора электронов элементарной серы ( $S^0$ ) анаэробное дыхание называется **серным**. В том случае, если конечным

акцептором электронов служит  $\text{NO}_3^-$  или  $\text{NO}_2^-$ , то процесс называется **нитратным дыханием** или **денитрификацией**, а бактерии, осуществляющие этот процесс, – **денитрифицирующими**. В качестве конечного акцептора электронов может выступать  $\text{CO}_2$ , процесс соответственно называют **карбонатным дыханием (метаногенез)**, а бактерии – **метаногенными (метанобразующими)**. Одним из немногих примеров, когда конечным акцептором служит органическое вещество, является **фумаратное дыхание**.

У бактерий в процессе анаэробного дыхания работают укороченные электронтранспортные, или дыхательные, цепи. Они не содержат всех переносчиков, характерных для дыхательных цепей, функционирующих в аэробных условиях. Кроме того, в дыхательных цепях анаэробов цитохромоксидаза заменена соответствующими редуктазами. У строгих анаэробов не функционирует цикл Кребса или же он разорван и выполняет только биосинтетические, но не энергетические функции. Основное количество молекул АТФ при анаэробном дыхании синтезируется в процессе мембранного фосфорилирования.

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

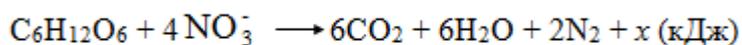
Выход АТФ при анаэробном дыхании меньше, чем при аэробном, но больше, чем при брожении.

Рассмотрим примеры некоторых основных типов анаэробного дыхания.

### **Нитратное дыхание, или денитрификация**

Как уже упоминалось, конечными акцепторами электронов при нитратном дыхании являются нитраты ( $\text{NO}_3^-$ ) или нитриты ( $\text{NO}_2^-$ ). Результатом нитратного дыхания является восстановление  $\text{NO}_3^-$  или  $\text{NO}_2^-$  до газообразных продуктов ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  или  $\text{N}_2$ ). Следует отметить, что к денитрификации (как, впрочем, и некоторым другим процессам азотного цикла) способны только бактерии, у эукариот эти реакции не происходят.

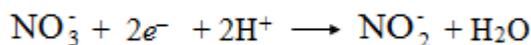
Суммарную реакцию нитратного дыхания, где окисляемым субстратом является глюкоза, а конечным акцептором электронов – нитраты, можно записать следующим образом:



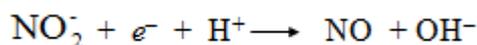
Таким образом, в процессе денитрификации происходит полное окисление органических субстратов до  $\text{CO}_2$  и воды.

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:

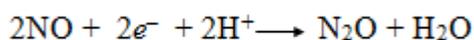


**Второй этап:** восстановление нитрита до оксида азота, катализируют нитритредуктазы:

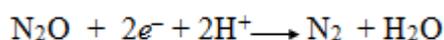


Нитрат- и нитритредуктазы очень чувствительны к молекулярному кислороду, который ингибирует их активность, а также репрессировывает синтез. Соответственно данные реакции (восстановление нитрата до нитрита и восстановление нитрита до оксида азота) могут протекать только в том случае, когда кислород полностью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

**Третий этап:** восстановление оксида азота до закиси азота (гемиоксида азота), катализируют редуктазы оксида азота:



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



У денитрифицирующих бактерий, которые являются факультативными анаэробами, функционирует полная электронтранспортная цепь при аэробном дыхании, при наличии  $\text{O}_2$  в среде, и укороченная – при анаэробном дыхании, когда  $\text{O}_2$  отсутствует. Электронтранспортные цепи бактерий-денитрификаторов в анаэробных условиях содержат все основные типы связанных с мембранами переносчиков: флавопротеины, хиноны, цитохромы *b* и *c*. Цитохромоксидазы в этих условиях не синтезируются, а их функции выполняют редуктазы (нитратредуктазы, нитритредуктазы, редуктазы оксида и закиси азота). Установлено, что нитратредуктазы денитрифицирующих бактерий связаны с дыхательной цепью на уровне цитохрома *b*, а нитритредуктазы и редуктазы оксида и закиси азота на уровне цитохрома *c*. Процесс полной денитрификации, когда происходит восстановление  $\text{NO}_3^-$  до  $\text{N}_2$ , транспорт электронов в дыхательной цепи можно представить следующим образом (рисунок 17).

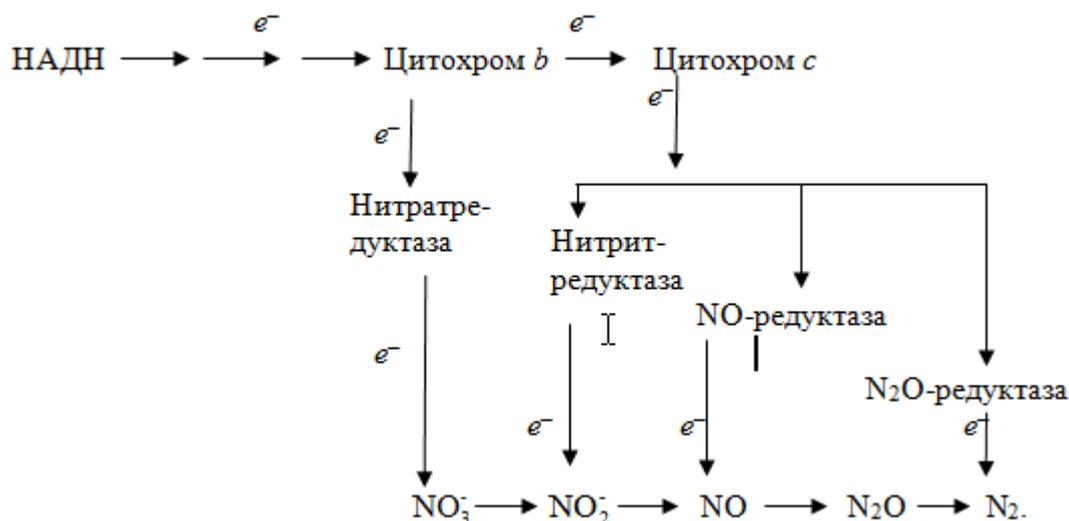


Рисунок 17 – Транспорт электронов в процессе денитрификации

Количество синтезируемых молекул АТФ зависит от строения дыхательной цепи, наличия и свойств соответствующих редуказ. При «полной» денитрификации энергии запасается больше, чем при «усеченной», когда осуществляются только отдельные этапы этого процесса. Схематично нитратное дыхание при окислении глюкозы можно представить следующим образом (рисунок 18).

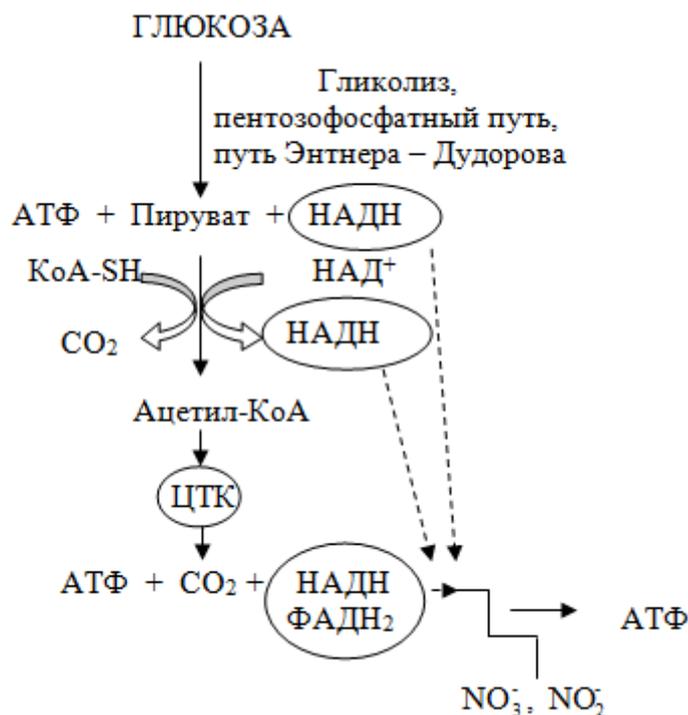


Рисунок 18 – Схема нитратного дыхания

Денитрифицирующие бактерии 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*, *Hyphomicrobium* и *Thauera*, а также некоторые представители грамположительных бактерий рода *Bacillus*.

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

### **Сульфатное дыхание, или диссимиляционная сульфатредукция**

Это процесс окисления в анаэробных условиях субстрата (органических соединений или молекулярного водорода), при котором в качестве конечного акцептора электронов выступает сульфат ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), в результате чего происходит его восстановление до  $\text{H}_2\text{S}$ . Бактерии, осуществляющие этот процесс, получили название сульфатвосстанавливающих или сульфатредуцирующих.

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

В качестве источника углерода и энергии сульфатвосстанавливающие прокариоты используют, главным образом, органические кислоты, в первую очередь пируват и лактат. Некоторые виды могут потреблять также сукцинат, фумарат, малат. Обнаружена способность использовать жирные кислоты, содержащие от 1 до 12 – 18 атомов углерода, такие как формиат, ацетат, пропионат, бутират. Отдельные сульфатвосстанавливающие бактерии могут использовать спирты (этанол, пропанол, бутанол), некоторые сахара, циклические и  $\text{C}_1$ -соединения, холин.

У видов *Desulfonema limicola* и *Desulfosarcina variabilis* обнаружена способность к хемолитоавтотрофии. Причем эти бактерии используют в

качестве источника углерода –  $\text{CO}_2$ , в качестве источника энергии – молекулярный водород, а в качестве конечного акцептора электронов –  $\text{SO}_4^{2-}$ .

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 бактерий, является сульфатное дыхание.

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

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

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

В качестве компонентов дыхательной цепи у сульфатвосстанавливающих бактерий идентифицированы флавопротеины, FeS-белки (ферредоксин, рубредоксин), хиноны (типа менахинона), цитохромы *b* и *c*. Особенностью дыхательной цепи многих сульфатвосстанавливающих бактерий является высокое содержание цитохрома  $c_3$ . Точная локализация компонентов, их последовательность в дыхательной цепи пока достоверно не установлены. Однако установлено, что окисление, в частности  $\text{H}_2$ , происходит на наружной стороне мембраны, а реакции восстановления  $\text{SO}_4^{2-}$  – на внутренней. Перенос электронов по дыхательной цепи сопровождается возникновением электрохимического протонного градиента с последующим генерированием энергии в молекулах АТФ.

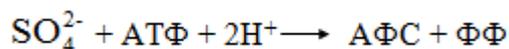
Последний этап, заключающийся в акцептировании сульфатом электронов с помощью нескольких редуктаз, называется ***собственно диссимиляционной сульфатредукцией***.

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:

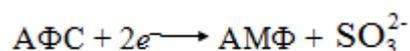
- диссимиляционное восстановление сульфата присуще только узкому кругу высокоспециализированных прокариотических организмов;
- активность процессов диссимиляционной сульфатредукции намного выше, чем ассимиляционной, следствием чего является накопление в среде больших количеств  $\text{H}_2\text{S}$ ;
- механизмы обоих процессов различны.

Рассмотрим химизм диссимиляционной сульфатредукции.

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

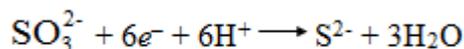


В результате этой реакции образуется аденозинфосфосульфат (АФС) и пирофосфат (ФФ), последний расщепляется пирофосфатазой. Аденозинфосфосульфат с помощью аденозинфосфосульфатредуктазы восстанавливается до сульфита, что сопровождается образованием АМФ (аденозинмонофосфата):

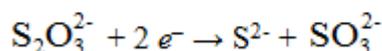
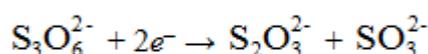
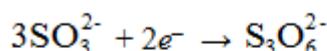


Восстановление сульфита ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) до сульфида ( $\text{S}^{2-}$ ) отличается у разных видов бактерий:

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

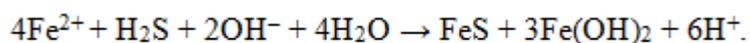


- в случае второго механизма происходит последовательное трехступенчатое восстановление сульфита с образованием промежуточных продуктов, таких как тритионат и тиосульфат, при участии сульфит-, тритионат- и тиосульфатредуктазы:



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

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



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 ( $\text{S}^0$ ) в результате чего происходит ее восстановление до сероводорода. Органические вещества при серном дыхании окисляются полностью до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

Бактерии, осуществляющие серное дыхание, не способны восстанавливать сульфаты и не так широко распространены в природе, как сульфатвосстанавливающие бактерии. Лучше описаны из восстанавливающих 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  $\text{H}_2\text{S}$  до серы и фиксируют  $\text{CO}_2$  (рисунок 19). В такой синтрофной ассоциации происходит обмен донорами электронов и источниками углерода между двумя видами бактерий.

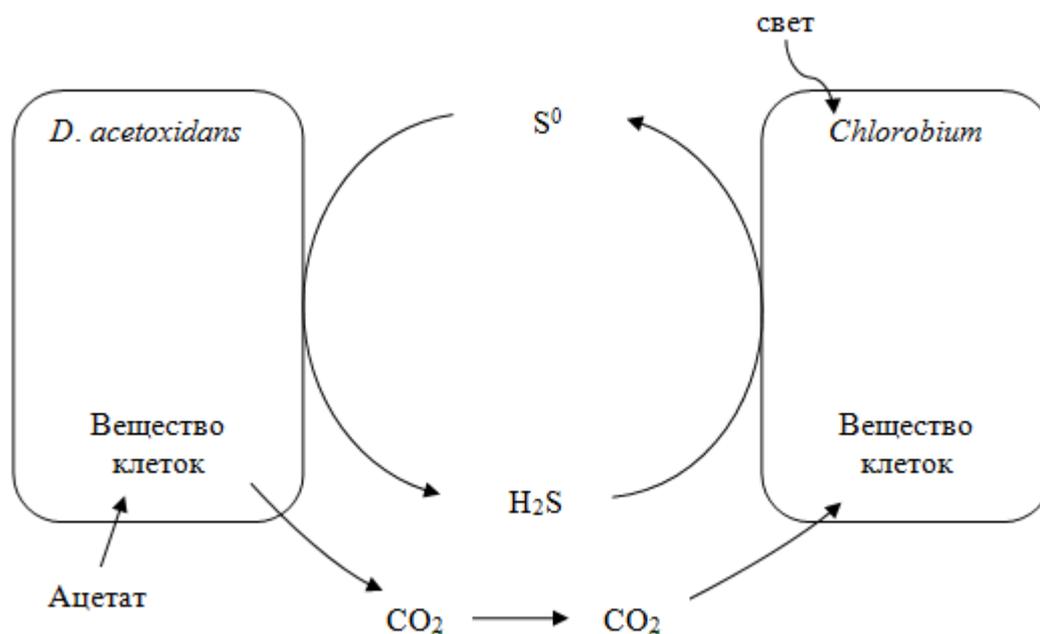


Рисунок 19 – Синтрофные взаимоотношения между *D. acetoxidans* и бактериями рода *Chlorobium*

### Карбонатное дыхание (метаногенез)

Карбонатное дыхание – процесс анаэробного окисления молекулярного водорода, а также других неорганических и органических веществ с использованием в качестве конечного акцептора электронов молекул CO<sub>2</sub>, в котором главным продуктом является метан (метаногенез). Бактерии, осуществляющие этот процесс, называются метаногенными.

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

В настоящее время известно около 50 видов метаногенных прокариот, которые объединены в 17 родов (*Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina* и др.).

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

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

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

Цитоплазматическая мембрана этих прокариот содержит липиды, представленные простыми эфирами глицерина и терпеноидных спиртов.

Сложных эфиров, состоящих из глицерина и жирных кислот, у них не обнаружено.

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

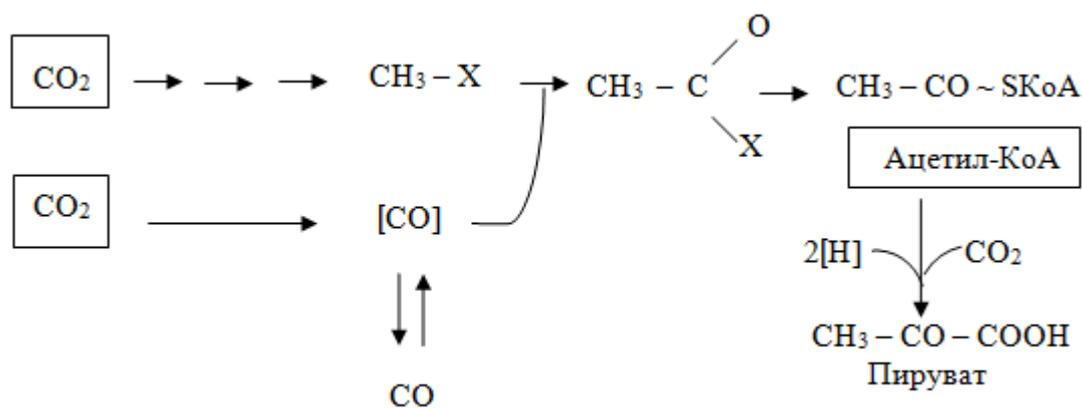
На основании этих, а также других отличительных признаков и в соответствии с современной филогенетической классификацией метаногенные микроорганизмы относят к археям.

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

Источниками азота для метаногенных архей являются аммонийный азот или некоторые аминокислоты. Источниками серы могут служить сульфаты, сульфиды или серосодержащие аминокислоты.

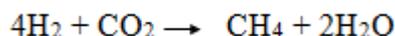
В качестве источников углерода для биосинтетических целей метаногенные археи используют узкий круг соединений. Около половины изученных видов не нуждаются для роста в каких-либо органических соединениях. Они способны расти на синтетических средах, содержащих молекулярный водород и  $\text{CO}_2$ . При этом  $\text{CO}_2$  служит не только для акцептирования электронов при окислении  $\text{H}_2$ , но и единственным источником углерода. У таких автотрофных штаммов ассимиляция  $\text{CO}_2$  происходит без участия фермента рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы – ключевого фермента цикла Кальвина. Представители этой группы бактерий ассимилируют молекулы  $\text{CO}_2$  с помощью реакций нециклического восстановительного ацетил-КоА пути, получившего такое название, поскольку его ключевым метаболитом является ацетил-КоА.

В процессе восстановительного ацетил-КоА пути синтез ацетил-КоА осуществляется из двух молекул  $\text{CO}_2$ . Одна молекула  $\text{CO}_2$  с помощью фермента СО-дегидрогеназы восстанавливается до карбонильной группы (СО), вторая молекула  $\text{CO}_2$  – до метильной группы, связанной с тетрагидроптеринном. 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:

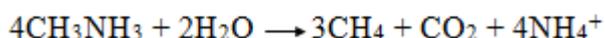
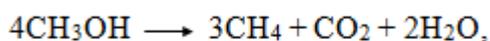
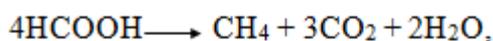


Пируват далее идет на синтез клеточных веществ.

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  $\text{CO}_2$ :



Кроме  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$ , многие метаногенные археи могут использовать для получения энергии формат, метанол, 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 коферментов и простетических групп соединения, найденные только у представителей этой группы: фактор  $\text{F}_{420}$  (производное 5-деазафлавина, назван по максимуму флуоресценции в окисленной форме при 420 нм), кофермент М (2-меркаптоэтанолсульфат), тетрагидрометаноптерин, метанофуран, фактор  $\text{F}_{430}$ , фактор  $\text{F}_\text{в}$ , 5-гидроксибензимидазол-гидроксикобамид.

При участии фактора  $\text{F}_{420}$ , а также гидрогеназы осуществляется одновременный перенос двух электронов от  $\text{H}_2$  в реакции, катализируемые редуктазами. Редуктазы связаны с переносчиками дыхательной цепи. При этом образуется ряд промежуточных продуктов (рисунок 20):

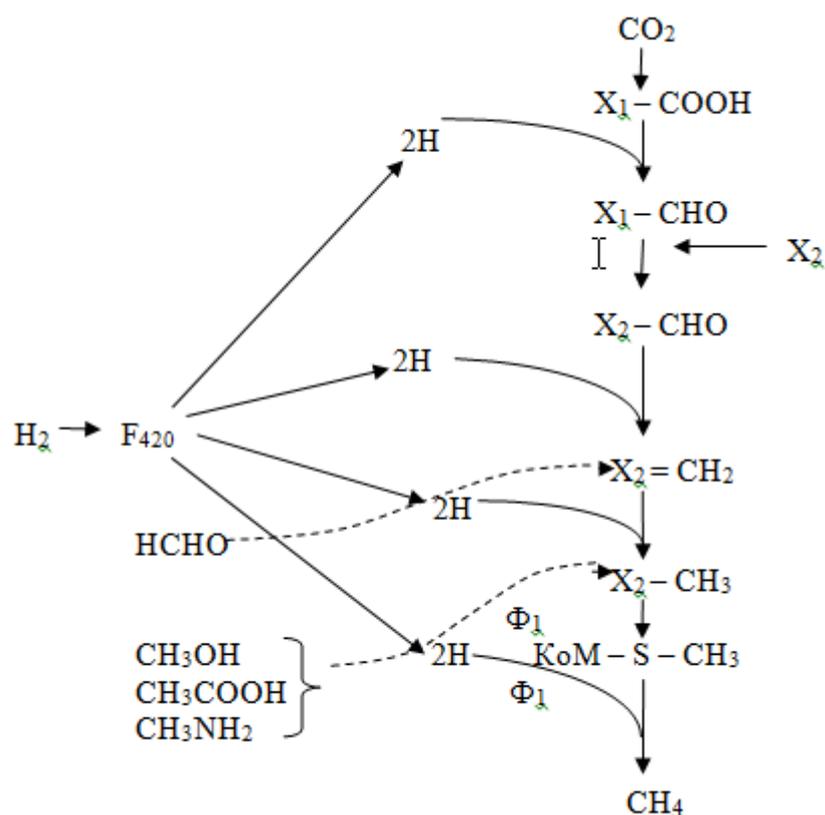


Рисунок 20 – Схема восстановления CO<sub>2</sub> до CH<sub>4</sub> метаногенами:  
 X<sub>1</sub> – COOH – карбоксипроизводное; X<sub>1</sub> – CHO – формилпроизводное;  
 X<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub> – метиленипроизводное; X<sub>2</sub> – CH<sub>3</sub> – метилпроизводное;  
 Φ<sub>1</sub> – метилредуктазная система; КоМ – S – CH<sub>3</sub> – метилкофермент М

Из рисунка 20 видно, что восстановление CO<sub>2</sub> до CH<sub>4</sub> требует переноса 8 электронов (или 8 атомов водорода), что осуществляется с помощью нескольких редуктаз, т. е. процесс проходит ступенчато. Образующиеся при этом промежуточные продукты остаются связанными с переносчиками в дыхательной цепи неизвестной природы. К настоящему времени идентифицирован только один переносчик – кофермент М (КоМ), участвующий на заключительной стадии образования метана. Этот переносчик присоединяет к себе метильную группу, образующуюся в результате ступенчатого восстановления CO<sub>2</sub>. Затем с помощью соответствующей редуктазы происходит освобождение молекулы метана.

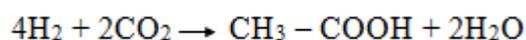
При восстановлении CO<sub>2</sub> до метана запасается энергия в форме электрохимического протонного потенциала. Фосфорилирование на субстратном уровне у метаногенных микроорганизмов отсутствует. Количество образуемой энергии непосредственно зависит от изменяющихся в природных условиях концентраций молекулярного водорода. При концентрации H<sub>2</sub> равной 10<sup>5</sup> паскаль (Па) – оптимальных условиях – количество свободной энергии, высвобождающейся в этом процессе, является достаточным для синтеза 1 моль АТФ/моль CH<sub>4</sub>. Однако в природных местообитаниях метаногенов концентрация H<sub>2</sub> несравнимо ниже (1–10 Па) и поэтому энергии образуется

меньше. Такая выраженная зависимость выхода энергии от концентрации  $H_2$  связана с тем, что процесс метаногенеза характеризуется высоким потреблением водорода – 4 моль  $H_2$ /моль  $CH_4$ .

Обычными местами обитания метаногенных архей является анаэробная зона водоемов, богатых органическими соединениями, иловые отложения озер и рек, болота, заболоченные почвы, осадочные слои морей и океанов. Метаногенные археи – типичные обитатели пищеварительного тракта животных и человека, важный компонент микробиоты рубца жвачных животных.

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.

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**. Это строго анаэробные бактерии, которые составляют чрезвычайно гетерогенную в таксономическом отношении группу грамположительных микроорганизмов. Они входят в состав родов *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Butyrobacterium*, *Syntrophococcus*, *Sporomusa*, *Eubacterium*. Они относятся к факультативным хемолитоавтотрофам. В присутствии органики способны переключаться на хемогетеротрофный метаболизм, сбраживая углеводы и другие субстраты с образованием уксусной кислоты.

Ацетогенные бактерии обнаруживаются в иле пресноводных и морских водоемов, а также в местах, где осуществляется метаногенез. Образую большие количества уксусной кислоты, они подкисляют среду обитания.

#### **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 ( $Fe^{3+}$ ), манганаты ( $Mn^{4+}$ ), 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 **железоредактирующие прокариоты** представители родов *Shewanella*, *Geobacter*, *Geospirillum*, *Geovibrio* и некоторые гипертермофильные археи.

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  $Mn^{4+}$ .

Прокариоты способны использовать в анаэробных условиях также соединения селена, восстанавливая селенаты ( $SeO_4^{2-}$ ) до селенитов ( $SeO_3^{2-}$ ) и далее до металла  $Se^0$  (**селенатредуцирующие прокариоты**). 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 единственно возможным для какой-либо определенной таксономической группы бактерий. Во всех известных в настоящее время случаях бактерии, способные осуществлять фумаратное дыхание – хемоорганотрофы, которые обладают также способностью к брожению. Таким образом, использование фумарата в качестве

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

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

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

Кроме фумарата некоторые бактерии 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 денитрифицирующими, сульфатредуцирующими, метаногенными прокариотами поверхностно-активные вещества алкилбензолсульфонаты и гетероциклические соединения (индол, хинолин, производные пиридина, фурана, никотиновой кислоты), в процессе которого происходит их биodeградация.

### **1.3.1.3. Процессы брожения**

По своей биологической сути брожение – это анаэробный окислительно-восстановительный процесс, в котором АТФ синтезируется путем субстратного фосфорилирования при использовании в качестве источника энергии органических соединений. При брожении продукты расщепления одного органического субстрата могут одновременно служить и донорами, и акцепторами электронов. Сбраживаться микроорганизмами могут углеводы,

спирты, органические кислоты, аминокислоты, пурины, пиримидины и другие органические соединения.

При сбраживании органических соединений образуются различные органические кислоты (молочная, масляная, муравьиная, пропионовая, уксусная, янтарная), спирты (этиловый, бутиловый, пропиловый), ацетон,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  и др. Обычно в процессе брожения образуется несколько продуктов. В зависимости от того, какие продукты преобладают или являются особенно характерными, различают спиртовое, молочнокислое, муравьинокислое, маслянокислое, ацетонобутиловое, пропионовокислое и другие типы брожения.

Брожение имеет большое значение для процессов круговорота биогенных элементов, прежде всего, углерода и водорода. Оно осуществляется везде, где происходит анаэробное разложение органического материала: в почве, морских и пресноводных донных осадках, в активном иле, а также пищеварительном тракте и других анаэробных участках организмов животных и человека.

Брожение является одним из самых древних и примитивных способов запасания энергии, который, как считают ученые, возник на нашей планете еще в те времена, когда на ней отсутствовал молекулярный кислород.

### **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 тиаминпирофосфата, в результате чего образуются ацетальдегид и  $\text{CO}_2$ . Образовавшийся ацетальдегид выступает конечным акцептором водорода. Он при помощи алкогольдегидрогеназы восстанавливается до этанола (рисунок 21).

Суммарная реакция процесса спиртового брожения выражается следующим уравнением:

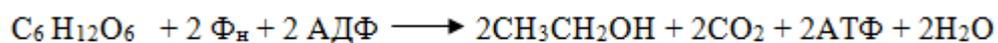




Рисунок 21 – Схема спиртового брожения у дрожжей

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 фосфофруктокиназы 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*, *Zyotomonas mobilis*, *Zyotomonas 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  $\text{CO}_2$  по гликолитическому пути с участием пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы. Кроме этанола и  $\text{CO}_2$  в небольших количествах образуются и побочные продукты: ацетат и молекулярный водород (*S. ventriculi*) и лактат (*E. amylovora*). У бактерий *Zyotomonas mobilis*, используемых в Мексике для получения национального спиртового напитка «пульке», катаболизм глюкозы до пировиноградной кислоты идет по пути

Энтнера-Дудорова. Дальнейшее превращение пирувата происходит с участием пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы. Выход продуктов брожения – по 2 молекулы этанола и  $\text{CO}_2$  на 1 молекулу сброженной 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 сброженной 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 суслу, приготовленного из проросших зерен ячменя, специальными пивными дрожжами – в основе пивоварения.

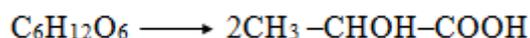
### Молочнокислое брожение

Различают три типа брожения, вызываемого молочнокислыми бактериями:

- гомоферментативное молочнокислое брожение;
- гетероферментативное молочнокислое брожение;
- бифидоброжение, осуществляемое бифидобактериями.

При гомоферментативном молочнокислом брожении образуется 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 как при спиртовом брожении, а под действием лактатдегидрогеназы восстанавливается до молочной кислоты. Конечным акцептором водорода выступает пировиноградная кислота (рисунок 22).

Гомоферментативное молочнокислое брожение идет по следующему уравнению:



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

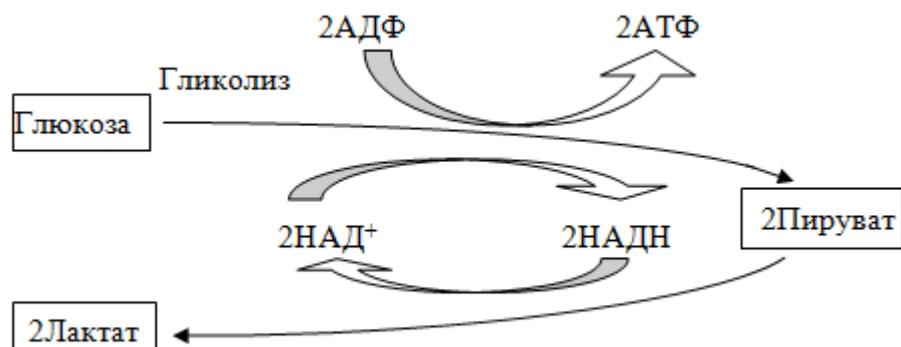
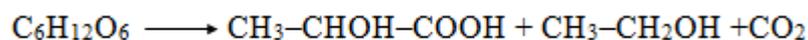


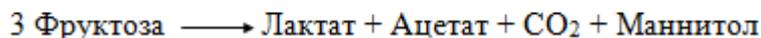
Рисунок 22 – Схема гомоферментативного молочнокислого брожения

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 пирувиноградная кислота и ацетальдегид. Гетероферментативное молочнокислое брожение осуществляется согласно уравнению:

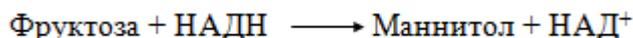


Некоторые другие гетероферментативные молочнокислые бактерии приводят к образованию также ацетата.

При сбраживании фруктозы гетероферментативными молочнокислыми бактериями образуются лактат, ацетат,  $CO_2$  и маннитол:

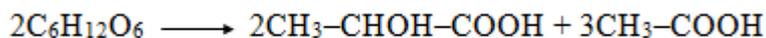


Фруктоза при этом служит акцептором избыточных восстановительных эквивалентов:



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

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



Катаболизм углеводов в этом случае происходит по пентозофосфатному пути или по пути Энтнера-Дудорова. Возбудителями бифидоброжения 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.

### **Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение**

Маслянокислое брожение проходит в строго анаэробных условиях и осуществляют его многие облигатно-анаэробные бактерии рода *Clostridium*, но типичными представителями являются *C. butylicum* и *C. pasteurianum*. В основе маслянокислого брожения, осуществляемого этими бактериями, лежит сбраживание углеводов по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты, которая далее подвергается декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА. Реакция катализируется ферментом пируват:ферредоксин-оксидоредуктазой и является ключевой в маслянокислом брожении. Основным продуктом брожения – масляная кислота образуется в результате конденсации двух молекул ацетил-КоА. Превращения ацетил-КоА в масляную кислоту сопряжены 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 в процессе субстратного фосфорилирования. Это третья молекула АТФ, которая синтезируется при маслянокислом брожении (две другие молекулы АТФ образуются при расщеплении глюкозы по гликолитическому пути) (рисунок 23).

Определение энергетического выхода маслянокислого брожения и установление его уравнения затруднено из-за лабильности процесса, состоящего из двух основных ответвлений, одного – окислительного, ведущего к образованию ацетата и АТФ, другого – восстановительного, функция которого – акцептирование водорода, образующегося в процессе гликолиза. Количественное соотношение между обоими ответвлениями зависит от многих внешних факторов (состав среды, стадия роста бактерий и др.). Расчеты показали, что в целом на 1 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.

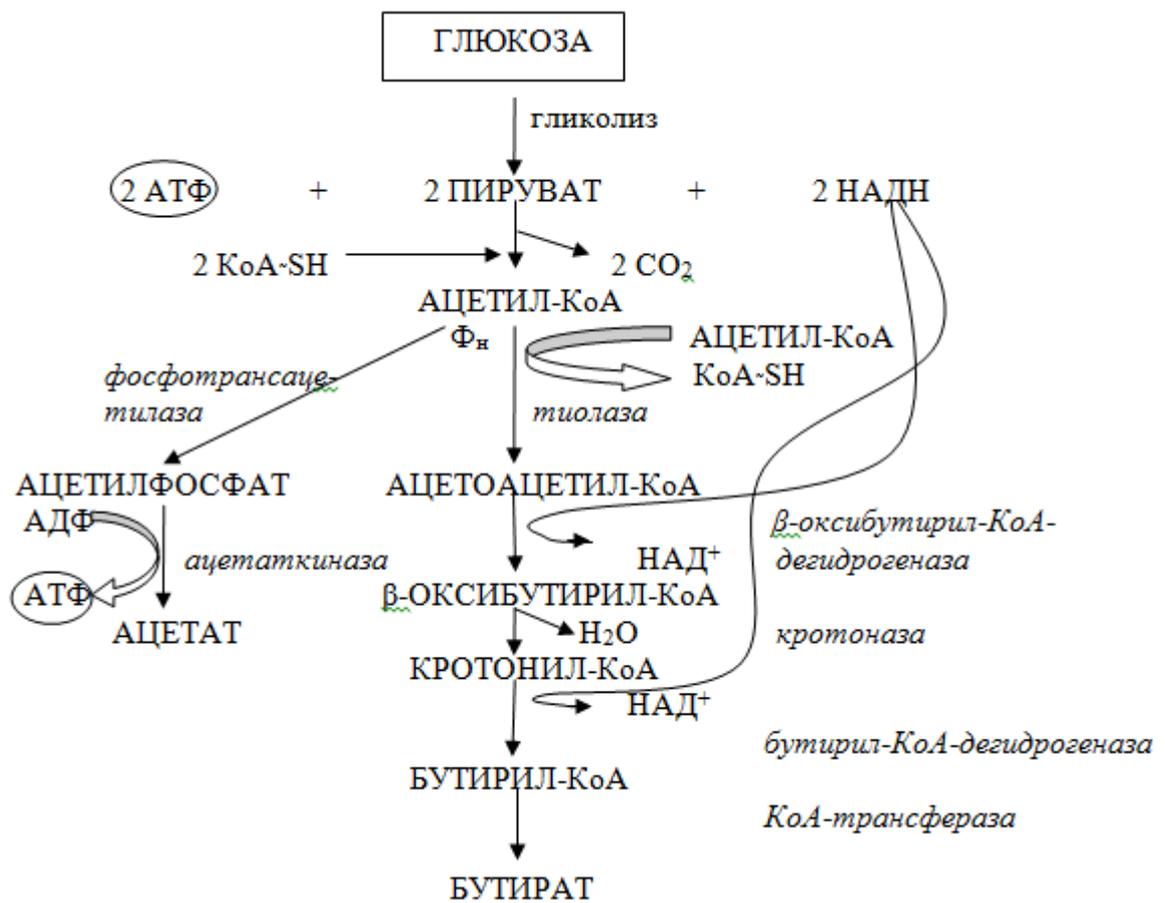


Рисунок 23 – Схема маслянокислого брожения у *Clostridium butylicum*

Некоторые клостридии (*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 24).

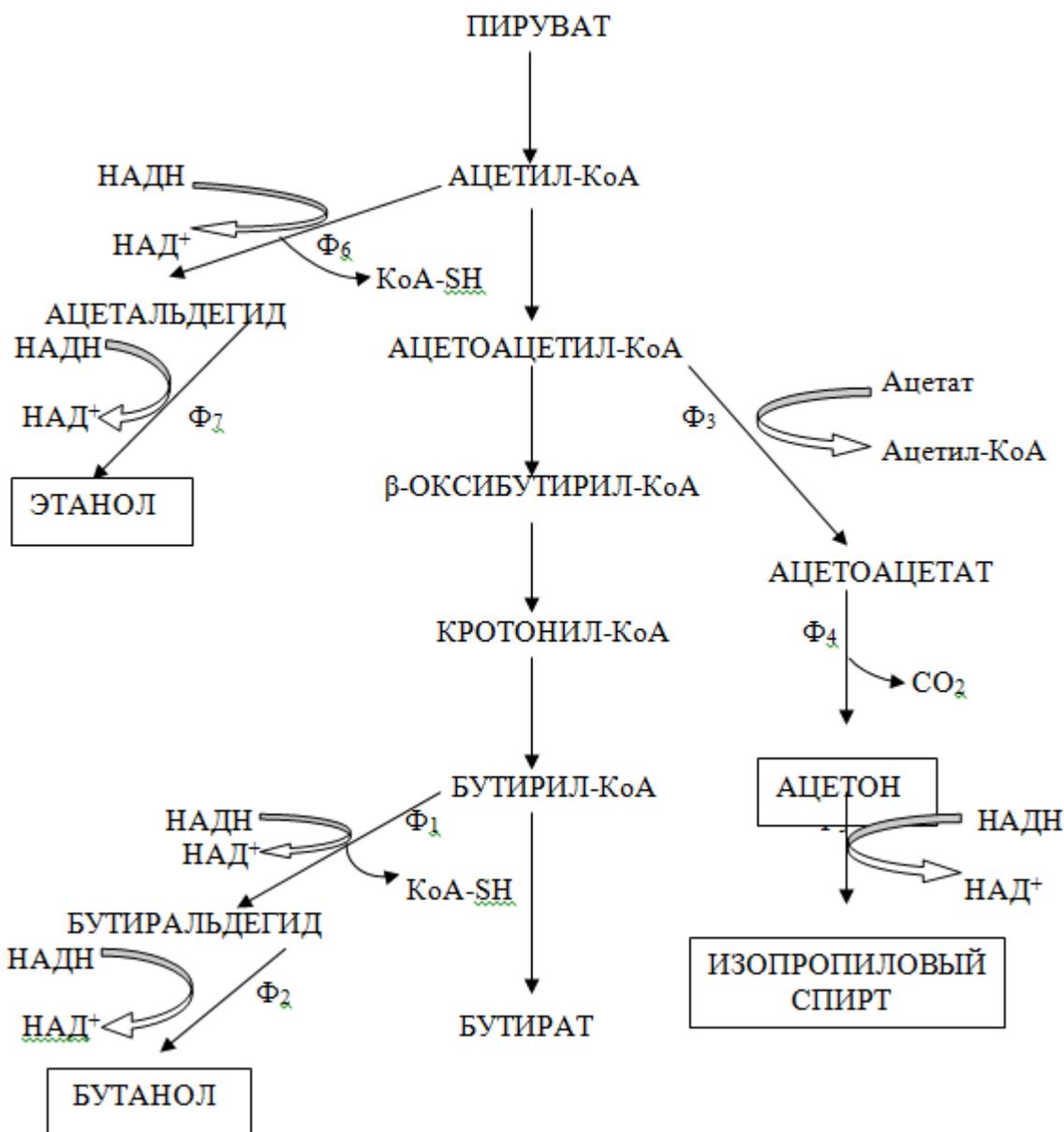


Рисунок 24 – Образование нейтральных продуктов при ацетонобутилоом брожении:

- $\Phi_1$  – бутиральдегиддегидрогеназа;  $\Phi_2$  – бутанолдегидрогеназа;
- $\Phi_3$  – КоА-трансфераза;  $\Phi_4$  – ацетоацетатдекарбоксилаза;
- $\Phi_5$  – изопропанолдегидрогеназа;  $\Phi_6$  – ацетальдегиддегидрогеназа;
- $\Phi_7$  – 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.

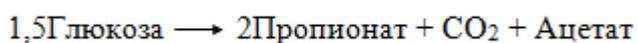
Двухфазность ацетонобутилового брожения связана с рН среды. Когда кислотность среды в результате накопления органических кислот возрастает до рН 4,5 и более, происходит интенсивное образование нейтральных продуктов, что предупреждает дальнейшее подкисление среды, неблагоприятное для бактерий.

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.

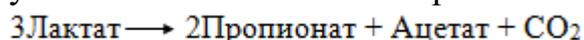
Маслянокислые бактерии нередко причиняют вред, вызывая порчу продуктов – прогоркание масла, сметаны, квашеных овощей, силоса, а также при недостаточной стерилизации – порчу консервированных грибных и мясных продуктов. Кроме того, многие клостридии патогенны и вызывают заболевания человека и животных.

### **Пропионовокислое брожение**

Пропионовокислые бактерии относятся к грамположительным не спорообразующим, неподвижным, факультативным анаэробам или аэротолерантным. В слабоаэрируемых условиях пропионовокислые бактерии могут осуществлять аэробное дыхание, в анаэробных – брожение. Основным продуктом, образующимся при пропионовокислом брожении, является пропионовая кислота. Кроме нее, синтезируются уксусная кислота и  $\text{CO}_2$ . Пропионовокислые бактерии расщепляют углеводы по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты, которая подвергается дальнейшим превращениям с образованием пропионовой кислоты, уксусной кислоты и  $\text{CO}_2$ :



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



Существуют два метаболических пути образования пропионовой кислоты у пропионовокислых бактерий:

- акрилатный путь, в котором лактат в ходе ряда последовательных реакций восстанавливается до пропионата;
- сукцинат-пропионатный путь, в котором лактат превращается в пропионат через стадии образования пирувата и сукцината.

Акрилатный путь присущ, по-видимому, только нескольким видам микроорганизмов (*Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*) (рисунок 25).

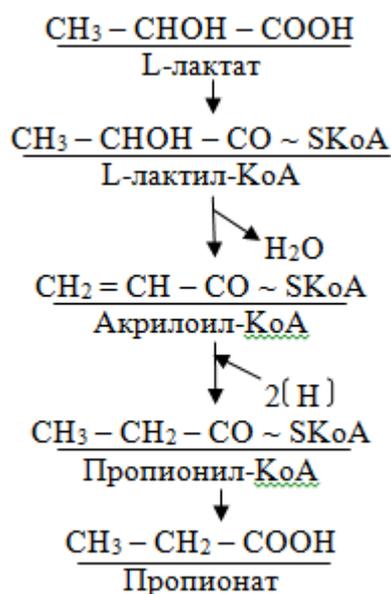


Рисунок 25 – Акрилатный путь пропионовокислого брожения

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-KoA, который в результате пока еще не изученных детально реакций превращается в акрилоил-KoA. В свою очередь акрилоил-KoA восстанавливается до пропионил-KoA с дальнейшим образованием пропионата

Кроме пропионата, при акрилатном типе брожения образуются также ацетат и CO<sub>2</sub>. Выход АТФ составляет одну молекулу на три молекулы потребленного лактата.

Сукцинат-пропионатный функционирует у большинства микроорганизмов, образующих пропионат. Сукцинат при 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-KoA путем, потому что при нем образуется характерный промежуточный продукт – метилмалонил-KoA (рисунок 26).

Исходным соединением при функционировании этого типа брожения является лактат, который окисляется до ПВК. На следующем этапе происходит карбоксилирование ПВК с участием фермента метилмалонил-KoA-

карбокситрансферазы и комплекса  $\text{CO}_2 \sim$  биотин. Синтезируемый в реакции оксалоацетат восстанавливается до сукцината с образованием промежуточных продуктов малата и фумарата. На этапе превращения фумарата в сукцинат происходит окислительное фосфорилирование, в результате чего образуется молекула АДФ. Затем сукцинат при участии фермента КоА-трансферазы присоединяется к КоА и активируется, образуя сукцинил-КоА. Последний под действием метилмалонил-КоА-мута-зы и при участии кофермента  $\text{B}_{12}$  превращается в метилмалонил-КоА, после декарбоксилирования которого образуется пропионил-КоА. Молекула  $\text{CO}_2$  связывается с метилмалонил-КоА-карбокситрансферазой, что вновь приводит к образованию комплекса  $\text{CO}_2 \sim$  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  $\text{CO}_2$  переносятся с последующего продукта на предшествующий, не освобождаясь. Следует отметить, что в этом процессе участвуют три кофактора (биотин, КоА и кофермент  $\text{B}_{12}$ ).

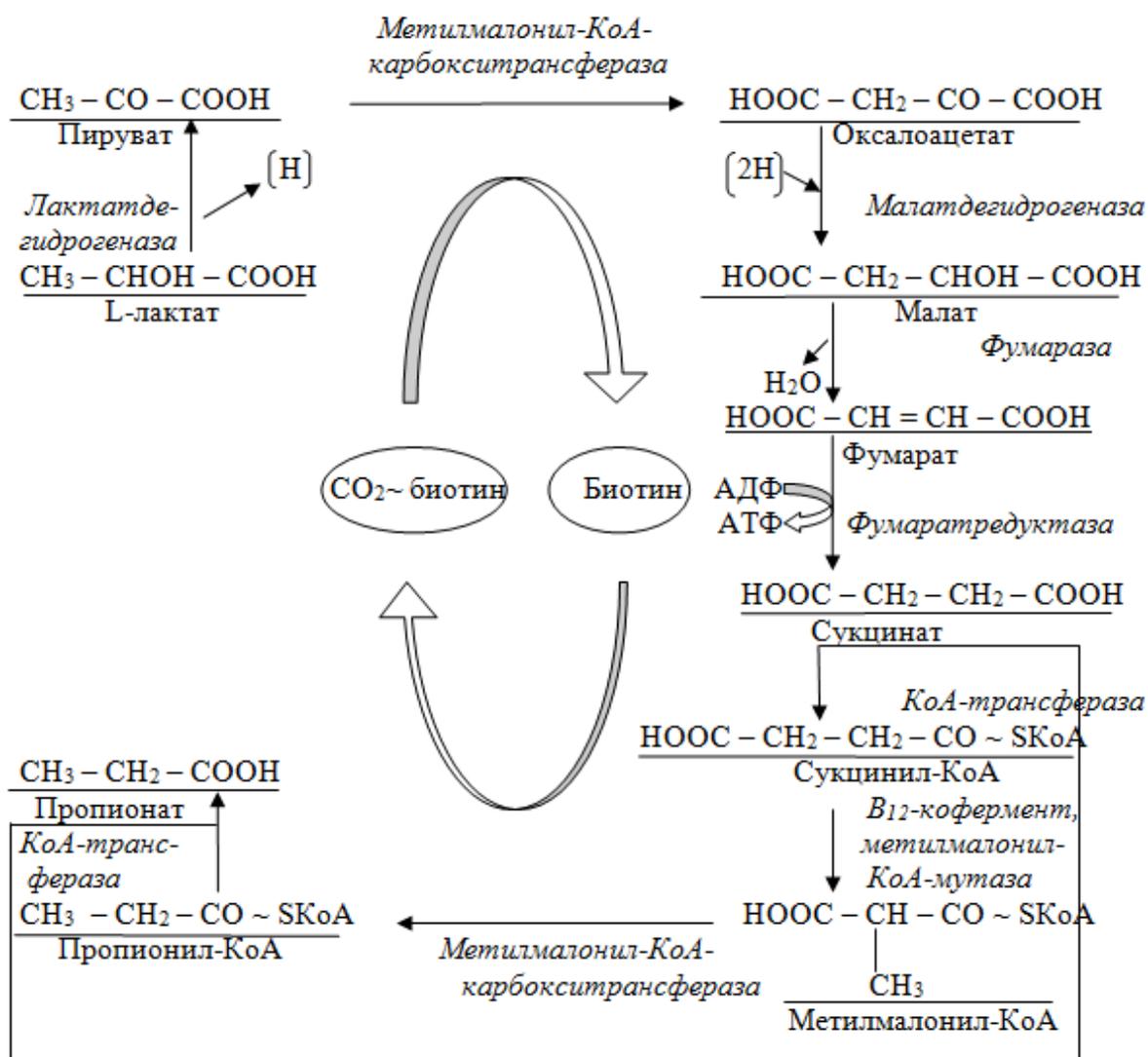


Рисунок 26 – Метилмалонил-КоА путь образования пропионовой кислоты бактериями

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 В<sub>12</sub>, их также используют для его промышленного получения. Кроме того, пропионовокислые бактерии используют для получения заквасок для хлебопечения, заквасок для силосования кормов. Пропионовую кислоту микробного происхождения используют в качестве фунгицида для сохранения зерна при хранении.

Пропионовокислые бактерии обитают на коже людей, в рубце и кишечнике жвачных животных, в почве (*Propionibacterium pronionicus*).

### **Брожение смешанного типа, или муравьинокислое брожение**

Этот вид брожения характерен в основном для энтеробактерий, входящих в порядок *Enterobacteriales*. К их числу относят *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Erwinia amylovora*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis*, *Pectobacterium carotovorum* 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, СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub>. Брожение получило название муравьинокислого, потому что характерным, хотя и не главным продуктом брожения, является муравьиная кислота. Так как наряду с муравьиной кислотой выделяются и другие продукты, 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 глюкозата 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* и др., при котором образуются главным образом кислоты (молочная, уксусная, янтарная, муравьиная). Кроме органических кислот, выделяются газообразные продукты СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub> (в соотношении 1:1), образуется этанол и совсем не синтезируется 2,3-бутандиол (рисунки 27).

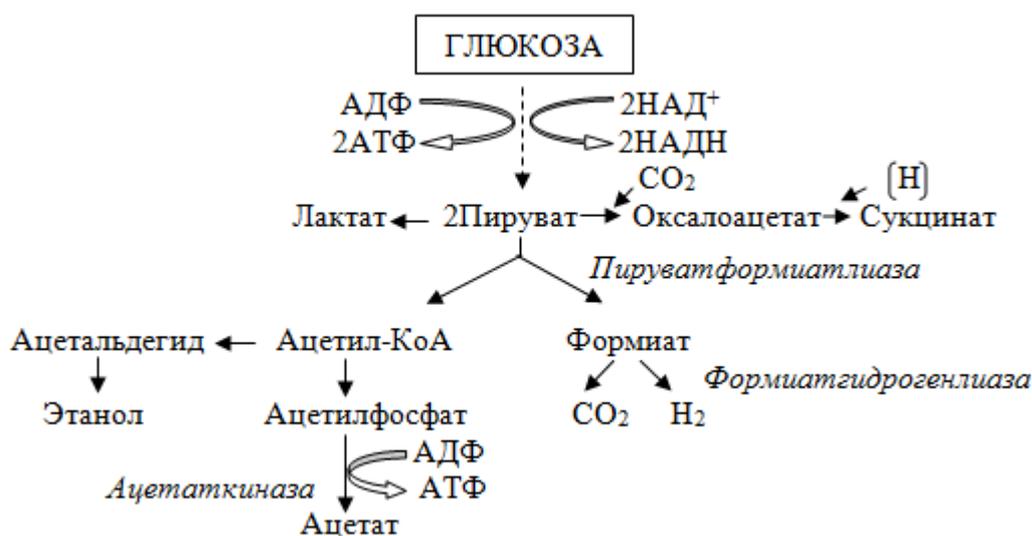


Рисунок 27 – Брожение смешанного типа, характерное для бактерий родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia* и др.

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 осуществляется также в клетках некоторых видов бактерий родов *Aeromonas*, *Beneckea* и *Photobacterium*.

2. Брожение, характерное для бактерий родов *Enterobacter*, *Serratia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Erwinia* и др. При таком брожении органических кислот синтезируется значительно меньше, чем в брожении первого типа, однако больше образуется  $\text{CO}_2$  и этанола. Кроме того, основным продуктом такого брожения является 2,3-бутандиол и соответственно этот тип брожения называют иначе **бутандиоловым** (рисунок 28).

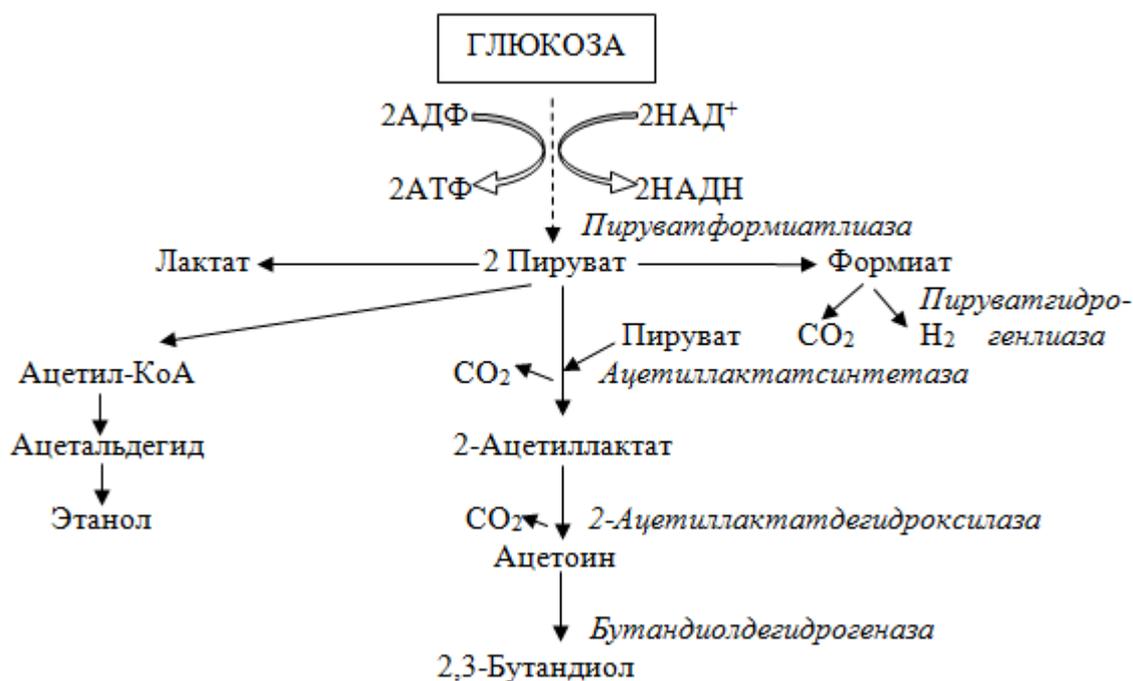


Рисунок 28 – Бутандиоловое брожение, характерное для бактерий родов *Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Pectobacterium* и др.

Ацетоин образуется из двух молекул пирувата. Процесс его образования включает двукратное декарбонирование и поэтому в бутандиоловом брожении  $\text{CO}_2$  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 для многих бактерий рода *Bacillus*, *Aeromonas*, *Beucleria* 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

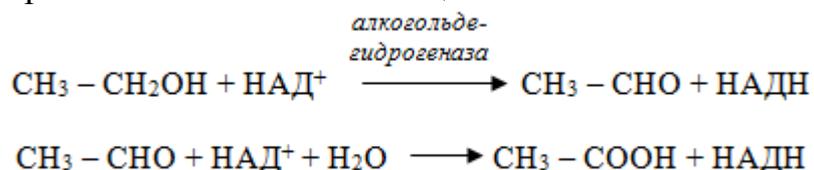
Большинство аэробных микроорганизмов окисляет органические вещества в процессе дыхания до  $\text{CO}_2$  и воды. Поскольку в молекуле  $\text{CO}_2$  достигается высшая степень окисления углерода, то говорят о полном окислении органических веществ. Однако некоторые бактерии и грибы даже простые органические 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.

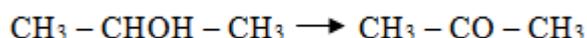
Неполное окисление органических веществ осуществляют облигатно аэробные микроорганизмы. Они могут рассматриваться как специализированная группа микроорганизмов, быстро растущих за счет частичного окисления того или иного органического субстрата, который временно накапливается в среде их обитания в большом 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 бесспорные палочки с перитрихально (род *Acetobacter*) или полярно (род *Gluconobacter*) расположенными 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: сначала образуется ацетальдегид, который затем окисляется в ацетат



Вторичные спирты окисляются до кетонов. Например, изопропиловый спирт окисляется в ацетон:



Глюконат окисляется в 5-оксоглюконат, глицерол – в дигидроксиацетон.

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

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  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . 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 электронтранспортированного (мембранного) фосфорилирования, т. е. электроны от окисляемых субстратов поступают в дыхательную цепь и далее через систему переносчиков передаются на  $\text{O}_2$ , служащий конечным акцептором электронов. Электронный транспорт приводит к генерированию электрохимического трансмембранного градиента ионов водорода ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ), 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) передаются на  $\text{НАД}^+$  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<sub>2</sub>.

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 представители порядка *Mucorales* (*Rhizopus nodosus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. nigricans*) и другие фикомицеты (*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, муравьиновую и уксусную кислоты, а также этанол. Для получения максимального выхода молочной кислоты необходимо присутствие O<sub>2</sub>. Поскольку грибы не нуждаются в сложных питательных средах и в качестве источника азота могут использовать мочевины, получать молочную кислоту в особо чистом виде с помощью грибов проще, чем использовать молочнокислое брожение, осуществляемое лактобациллами.

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

**Глюконовую кислоту** образуют многие аспергиллы и пенициллы. Это продукт ферментативного окисления глюкозы глюкозооксидазой, выделяемой грибами в питательную среду.

**Щавелевую кислоту** выделяют многие грибы. Ее образованию способствует щелочная реакция среды.

Продуцентом **лимонной кислоты** являются, в первую очередь, грибы вида *Aspergillus brasiliensis* (ранее *Aspergillus niger*). Этот гриб превосходно растет на средах с начальными значениями рН от 2,5 до 3,5 и выделяет при этом большие количества лимонной кислоты. С повышением рН появляется сначала глюконовая кислота, а затем щавелевая. Низкое начальное значение рН 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.

**Итаконовую кислоту** образуют лишь немногие штаммы *Aspergillus itaconicus* и *A. terreus*. Этот процесс также происходит при рН среды около 2,0.

#### **1.3.1.4. Разложение микроорганизмами природных высокополимерных органических соединений**

Большинство потенциальных субстратов для роста и развития микроорганизмов представляют собой нерастворимые природные органические полимеры, такие как целлюлоза, гемицеллюлоза, пектиновые вещества, хитин, хитозан, глюканы, лигнин. Способы их разложения различными микроорганизмами основаны на ряде общих принципов:

- деградация биополимеров осуществляется при совместном участии различных микроорганизмов, синтезирующих те или иные необходимые экзоферменты, относящиеся в большинстве случаев к гидролитическим;
- начальное расщепление биополимеров под действием экзоферментов – это стадия, лимитирующая скорость их использования и тем самым рост микроорганизмов;
- последующий метаболизм растворимых продуктов гидролиза биополимеров состоит из двух этапов – окислительного и восстановительного.

Рассмотрим механизмы использования микроорганизмами наиболее распространенных биополимеров – основных питательных субстратов для бактерий.

##### **Разложение целлюлозы**

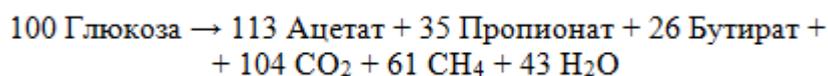
**Целлюлоза** – основной полисахарид растительных клеток, входящий в состав клеточных стенок. Из всех органических субстратов целлюлоза присутствует в природе в наибольшем количестве. Молекула целлюлозы представляет собой линейный гомополисахарид, состоящий примерно от 100 до 10 000 остатков глюкозы, соединенных  $\beta$ -1,4-гликозидными связями, которые обеспечивают ее высокую прочность. В полимерной цепи целлюлозы каждый остаток глюкозы повернут относительно соседнего на  $180^\circ$ ; такую повторяющуюся пару остатков целлюлозы называют целлобиозой.

Целлюлозные цепи, связанные между собой многочисленными межмолекулярными водородными связями, формируют ригидные и нерастворимые в воде фибриллы. Фибриллы содержат как высокоупорядоченные участки (плотно упакованные цепочки макромолекул), которые называются кристаллическими, так и аморфные, рыхлые (некристаллические) участки. Некристаллические участки фибрилл целлюлозы подвергаются воздействию гидролитических ферментов микроорганизмов, тогда как кристаллические участки высокоустойчивы к их действию.

Разложение целлюлозы осуществляют различные представители бактерий, грибов и простейших. Все эти микроорганизмы называются **целлюлозолитическими**. К целлюлозолитическим грибам относятся представители родов *Fusarium*, *Chaetomium* и *Neocallimastix*, а также виды *Trichoderma viride*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Myrothecium verrucaria*. Разложение целлюлозы осуществляют простейшие родов *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Entodinium*. К целлюлозолитическим бактериям относятся как аэробные, так и анаэробные виды. Аэробное расщепление целлюлозы осуществляют представители родов *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Polyangium*, *Sporangium*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Cellulomonas*, *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Microbispora*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Thermomonospora*. В анаэробных условиях целлюлозу расщепляют представители родов *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Fibrobacter*, *Thermoanaerobacter* и *Ruminococcus*. Следует отметить, что только немногие из перечисленных микроорганизмов синтезируют полный набор ферментов, необходимых для эффективного разложения целлюлозы. Большинство целлюлозолитических организмов способны продуцировать только некоторые ферменты, участвующие в этом процессе, и, вероятно, используют целлюлозу в ассоциации с другими микроорганизмами.

Разложение целлюлозы с помощью микроорганизмов проходит в несколько этапов. Ферментная система, осуществляющая разложение целлюлозы до глюкозы, носит название **целлюлазного комплекса**. В его состав входят по меньшей мере три фермента: эндо- $\beta$ -1,4-глюканаза, экзо- $\beta$ -1,4-глюканаза и  $\beta$ -глюкозидаза. Процесс расщепления целлюлозы протекает следующим образом: под действием фермента эндо- $\beta$ -1,4-глюканазы происходит разрыв различных  $\beta$ -1,4-гликозидных связей внутри макромолекулы с образованием больших фрагментов со свободными концами. Затем под влиянием экзо- $\beta$ -1,4-глюканазы от концов образованных фрагментов отщепляются дисахариды целлобиоза.  $\beta$ -глюкозидаза осуществляет гидролиз целлобиозы с образованием 2 молекул глюкозы. При **аэробном разложении целлюлозы** глюкоза далее окисляется в основном до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Могут также накапливаться в небольших количествах органические кислоты. При **анаэробном распаде целлюлозы** первоначальный продукт ее гидролиза – глюкоза подвергается сбраживанию, в результате чего образуются различные органические кислоты (уксусная, молочная, муравьиная, масляная, янтарная), этанол,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ . Состав продуктов брожения отличается у разных видов микроорганизмов. Примером анаэробного сбраживания целлюлозы являются

микробиологические процессы, которые осуществляются в рубце жвачных животных. Рубец жвачных – это своеобразная бродильная камера; благодаря его функции животное, лишенное собственных ферментов целлюлаз и гемицеллюлаз, может эффективно усваивать растительный материал. Рубец можно также рассматривать как аналог полностью анаэробного ферментера с полунепрерывным потоком. Молекулярный кислород может проникать в рубец в следовых количествах с пищей, но после этого он немедленно потребляется. В рубце содержится большое количество микроорганизмов. В состав микробиоты рубца входят строго анаэробные бактерии ( $10^{10} - 10^{11}$  клеток/г) и анаэробные инфузории, относящиеся к родам *Diplodinium* и *Entodinium* ( $10^4 - 10^6$  клеток/г). В разложении полимеров в некоторой степени частично участвуют анаэробные грибы ( $10^2 - 10^4$  зооспор/г). Среди прокариот рубца идентифицировано более 200 видов, принадлежащих к целлюлозолитическим, пектолитическим, молочнокислым, маслянокислым, пропионовокислым и метаногенным бактериям. Общий состав микробиоты рубца довольно стабилен и разнообразен; ни один вид микроорганизмов не составляет более 3 % общей численности микробных клеток. В рубце созданы идеальные условия для роста и развития микроорганизмов: во-первых, они обеспечены питательной средой, которая в избытке 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 % сухого веса) клетчатки примерно за двое суток. Микроорганизмы рубца расщепляют целлюлозу и другие сложные углеводы, присутствующие в поглощенном животном корме, образуя жирные кислоты и газы. 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,  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$ . Следует отметить, что метан не является прямым продуктом разложения целлюлозы: он имеет вторичное происхождение и образуется из жирных кислот,  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ . Образующиеся жирные кислоты всасываются через слизистую оболочку рубца, поступают в кровотоки и, циркулируя с кровью, достигают различных тканей тела, где они 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, благодаря этому, становятся более тугоплавкими и имеют более низкую температуру плавления. Жиры же жвачных млекопитающих содержат ненасыщенные жирные кислоты с более короткой углеродной цепью, поступающие с растительным кормом, и не гидрируются. Микробная популяция рубца быстро растет, и клетки микроорганизмов переходят из рубца вместе с непереваренным растительным материалом в следующие отделы пищеварительного тракта животного. В самом рубце пищеварительные ферменты не образуются, но в других отделах выделяются протеазы, которые разрушают и переваривают микробные клетки, поступающие из рубца. Образующиеся при этом азотистые соединения и витамины используются животным. По этой причине потребности в соединениях азота у жвачных животных реализуются значительно проще, чем у остальных групп млекопитающих. Они могут существовать, используя в качестве источника азота мочевины или аммиак, которые у большинства млекопитающих являются продуктами выделения.

Таким образом, рубец жвачных животных можно рассматривать в качестве примера взаимовыгодного (мутуалистического) симбиоза или системы активной кооперации между хозяином и микроорганизмами.

Ферменты целлюлазы, продуцируемые целлюлозолитическими микроорганизмами, используются для модификации целлюлозы путем частичного гидролиза. Их применяют для обработки соломы, используемой в качестве субстрата при выращивании грибов, для осветления фруктовых и овощных соков, в пивоварении, при производстве текстиля, получении бумажной пульпы и очистке сточных вод в целлюлозной промышленности.

### Разложение гемицеллюлоз

**Гемицеллюлозы** представляют собой второй после целлюлозы наиболее важный источник углеводов в природе. Они входят в состав растительных клеточных стенок. По химическому строению это слаборазветвленные гомо- или гетерополимеры из остатков ксилозы, маннозы, глюкозы и галактозы (все в D-форме), соединенных  $\beta$ -гликозидными связями ( $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,6,  $\beta$ -1,3 и др.); их цепи содержат заместители различной природы (ацетиловые или метиловые эфиры, уроновые кислоты, другие пентозы). Гемицеллюлозы различного происхождения различаются по типам связей между остатками сахаров и степени ветвления. Наиболее распространены среди гемицеллюлоз **ксиланы**, **маннаны** и **галактаны**, содержащие в качестве основных мономеров D-ксилозу, D-маннозу и D-галактозу соответственно. Мономеры в них соединены  $\beta$ -1,4-гликозидной связью. Ксилан можно рассматривать как аналог целлюлозы (ксилан отличается тем, что в нем  $\beta$ -D-ксилоза вместо  $\text{CH}_2\text{-OH}$ -группы в положении 6 содержит водородный атом), но с меньшей степенью полимеризации и наличием ветвления. Кроме ксилозы, ксилан содержит остатки арабинозы, глюкозы, галактозы и глюкуроновой кислоты.

Ксиланы и другие гемицеллюлозы сравнительно легко гидролизуются, поэтому способность к использованию гемицеллюлоз широко распространена

среди микроорганизмов. Для полного гидролиза гемицеллюлоз требуется набор различных ферментов. Например, в расщеплении ксилана принимают участие эндо- $\beta$ -1,4-ксилаза, гидролизующая основную цепь, и  $\beta$ -ксилозидаза (экзогликозидаза), последовательно отщепляющая остатки D-ксилозы от нередуцирующего конца цепи. Активность гемицеллюлозного комплекса определяют по скорости накопления редуцирующих сахаров (ксилозы или ксилобиозы). Установлено, что у бактерий, использующих преимущественно ксиланы (например, у видов рода *Clostridium*) ксиланаза синтезируется конститутивно; у других микроорганизмов ее синтез индуцируют ксиланы.

Гемицеллюлозы активно разлагаются грибами, аэробными и анаэробными бактериями. В этом процессе участвует значительно большее количество видов микроорганизмов, чем в разложении целлюлозы. К микроорганизмам, обладающим гемицеллюлозоразлагающими свойствами, относятся бактерии родов *Clostridium*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Vibrio*, *Streptomyces*; грибы родов *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fomes*, *Polyporus* и др. Гемицеллюлозы в кислых почвах обычно разлагают грибы, в нейтральных и щелочных – бациллы, бактерии рода *Sporocytophaga* и ряд других бактерий.

### **Разложение крахмала и других глюканов**

**Крахмал** является основным запасным веществом растений и представляет собой полимер  $\alpha$ -D-глюкозы. Растительный крахмал состоит из двух глюканов – амилозы и амилопектина. **Амилоза** – это полимер в виде длинной неразветвленной цепи, в которой остатки D-глюкозы соединены  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями. Цепи амилозы спирально закручены и могут содержать от нескольких сотен до нескольких тысяч остатков глюкозы. **Амилопектин** состоит из амилозных фрагментов, связанных  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями. Цепи амилопектина сильно разветвлены. Амилоза и амилопектин способны связывать йод, при этом амилоза окрашивается в синий цвет, а амилопектин – в красно-фиолетовый или коричневый. Глюкан **гликоген** состоит из более разветвленных цепей и при добавлении йода окрашивается в коричневый цвет. **Поллулан** – линейный полимер из остатков мальтотриозы, соединенных  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями. Поллулан синтезируется дрожжеподобным грибом *Aureobasidium pollulans*. Глюканы **циклодекстрины** – циклические полисахариды, состоящие из 6, 7 или 8 остатков глюкозы, соединенных  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями. У них C4-атом «последнего» остатка глюкозы связан с C1-атомом «первого» остатка глюкозы, поэтому редуцирующего конца не остается.

Крахмал и другие глюканы разлагают ферменты **амилазы**. Они расщепляют их  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-гликозидные связи с образованием смеси водорастворимых сахаров, от глюкозы до мальтодекстринов, содержащих в среднем десять остатков глюкозы. В соответствии с субстратной специфичностью и расположением атакуемой связи в молекуле полисахарида амилазы делятся на эндоамилазы и экзоамилазы. **Эндоамилазы** расщепляют гликозидную связь внутри молекулы полисахарида. К ним относятся  $\alpha$ -амилаза, пуллуланаза и циклодекстрингликозилтрансферазы. При их действии на

молекулы глюкоканов образуются мальтоолигосахариды. Циклодекстрингликозилтрансферазы, помимо  $\alpha$ -амилазной активности, обладают способностью замыкать в кольцо короткоцепочечные (из 6-8 остатков глюкозы) полисахариды (рисунок 29).

К *экзоамилазам* относятся  $\beta$ -амилаза, амилоглюкозидазы и глюкозидазы. Эти ферменты расщепляют  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи на нередуцирующем конце цепи, не нарушая при этом общей целостности полимерной структуры полисахарида. Гидролиз под действие  $\beta$ -амилазы приводит к образованию дисахарида мальтозы. Амилоглюкозидазы последовательно отщепляют от полисахаридной цепи по одному остатку глюкозы. Глюкозидазы гидролизуют короткоцепочечные декстрины, например мальтозу, с образованием глюкозы.

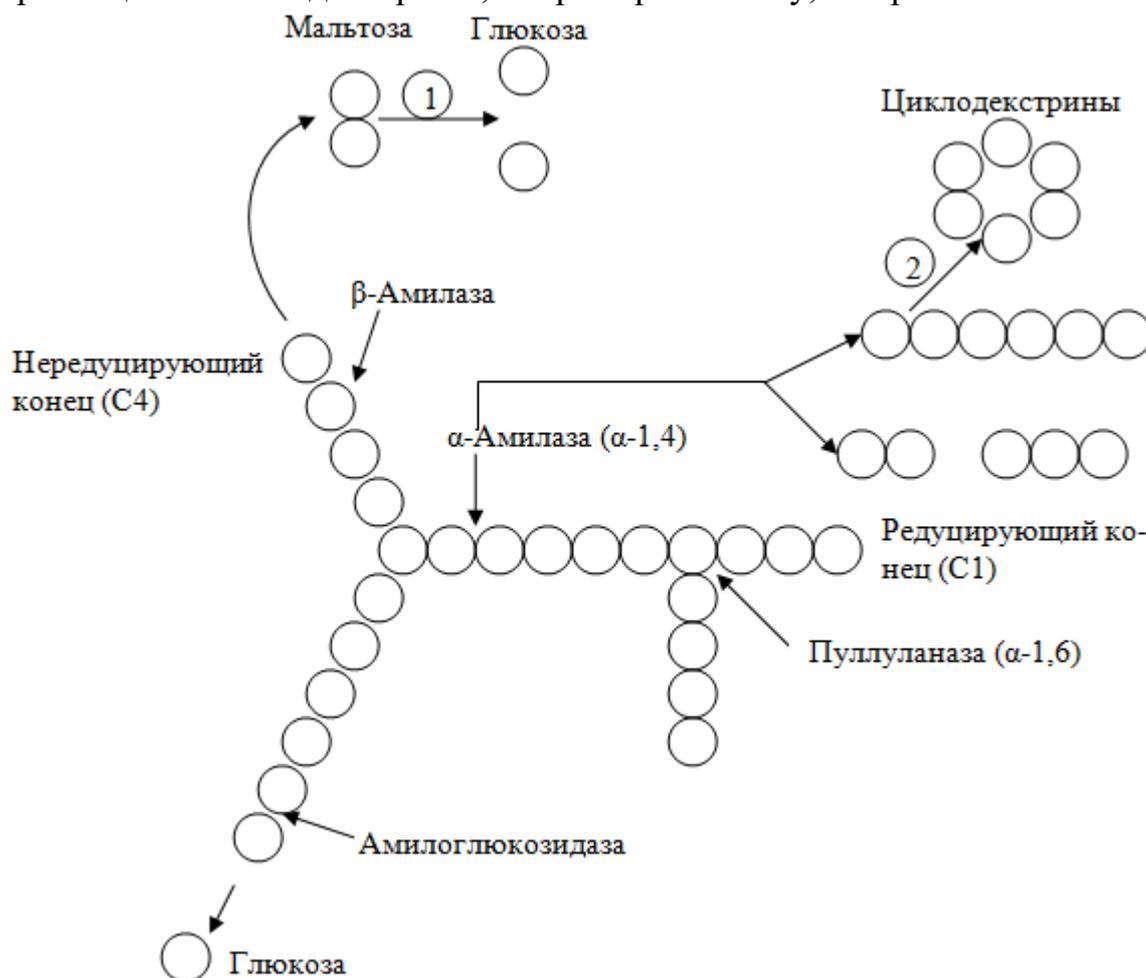


Рисунок 29 – Разложение крахмала:  
1 – глюкозидаза; 2 – циклодекстрингликозилтрансфераза

Некоторые растения синтезируют кроме глюкоканов или вместо них *фруктаны*, или *леваны* – гомополисахариды, состоящие из остатков D-фруктозы. Они гидролизуются при участии фермента  $\alpha$ -фруктаныазы.

Способность к расщеплению крахмала и других глюкоканов при помощи амилолитических ферментов широко распространена у микроорганизмов. К типичным микроорганизмам, разлагающим глюкоканы, относятся бактерии родов *Bacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Pyrococcus*,

*Streptomyces*, *Thermotoga*, *Thermus*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermoanaerobacter* и грибы рода *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. brasiliensis*, *A. wentii*).

Амилолитические ферменты, продуцируемые микроорганизмами, используются для получения из крахмала мальтозы, глюкозы, глюкозо-мальтозного сиропа, декстринов и циклодекстринов. Особую ценность представляют термостабильные амилолитические ферменты, выделенные из термофильных микроорганизмов, так как они длительно сохраняют активность при температуре до 100 °С.

### Разложение лигнина

**Лигнин** является одним из главных компонентов растительных тканей и по степени распространенности считается одним из основных природных высокополимерных органических соединений. По химической структуре это ароматический полимер, мономерными единицами которого являются фенилпропаноиды (п-кумаровый, кониферилловый и синаповый спирты, соединенные разнообразными связями). Доля отдельных фенилпропаноидных мономеров в составе лигнина зависит от типа растений (хвойные, лиственные или травянистые). Лигнин находится в растительной клеточной стенке, окружая микрофибриллы целлюлозы и гемицеллюлозы и формируя матрикс, определяющий характерные свойства древесины. Это растительное вещество наиболее медленно подвергается биологическому разложению. Поэтому он служит главным источником медленно распадающегося органического вещества почвы, в особенности гуминовых кислот, важных для плодородия почв. Разрушение лигнина осуществляют, в первую очередь, мицелиальные грибы – возбудители белой гнили. К этим грибам относится, например, базидиомицет *Phanerochaete chrysosporium*. Он разрушает лигнин с образованием почти белой легкометаболизируемой массы, состоящей из целлюлозы и гемицеллюлозы. Большинство представителей этой группы грибов сапрофиты, но некоторые (например, *Armillaria mellea*) известны как фитопатогенные. Бактерии менее эффективно разлагают лигнин, но могут переводить его в водорастворимое состояние. Это свойство обнаружено у представителей родов *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Actinomodura*, *Thermomonospora* и *Xanthomonas*.

Разложение лигнина происходит при участии ферментов пероксидаз **лигниназ**, которые катализируют восстановление пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) с образованием в качестве промежуточных продуктов высокорекреационноспособных кислородных радикалов. Таким образом, пероксид водорода служит косубстратом-окислителем в реакции разложения лигнина. У возбудителей белой гнили в этом процессе участвуют гемсодержащие лигнинпероксидазы, марганецзависимые пероксидазы и медьсодержащие лакказы – семейства ферментов, осуществляющих кислородзависимую деградацию лигнина. Как правило, они представлены множеством функционально сходных изоферментов. Все они катализируют реакции окисления с переносом одного электрона и образованием свободных радикалов, стимулирующих неферментативную деградацию лигнина.

## Разложение пектиновых веществ

**Пектиновые вещества** входят в состав срединных пластинок, образующихся между стенками соседних растительных клеток. Их также содержат первичные и вторичные клеточные стенки растений. Пектиновые вещества – сложные полисахариды, полигалактурониды. Это неразветвленные полимеры, состоящие из остатков D-галактуроновых кислот, соединенных  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями. Существуют три типа пектиновых веществ: **протопектин** – водонерастворимая составная часть клеточной стенки; **пектин** – водорастворимый полимер галактуроновой кислоты, содержащий метилэфирные связи; **пектиновая кислота** – водорастворимый полимер галактуроновой кислоты, свободный от метилэфирных связей.

Микроорганизмы синтезируют следующие ферменты, катализирующие распад пектиновых веществ:

- **протопектиназу**, осуществляющую разложение протопектина с образованием растворимого пектина;
- **пектинэстеразу**, гидролизующую метилэфирную связь пектина с образованием пектиновой кислоты и метилового спирта;
- **пектиназу** (полигалактуроназу), разрушающую связи между отдельными составляющими галактуроновой кислоты, пектина или пектиновой кислоты с образованием свободной D-галактуроновой кислоты.

Способность расщеплять пектиновые вещества присуща многим грибам и бактериям. Из бактерий высокой пектолитической активностью обладают представители рода *Bacillus* (*B. macerans*, *B. polymyxa*), рода *Clostridium* (*C. pectinovorum*, *C. felsineum*, *C. pectinolyticum*, *C. flavum*, *C. corallinum* и др.), рода *Pectobacterium* (*P. carotovorum*, *P. atrosepticum* и др.). Пектиновые вещества разлагаются под влиянием фитопатогенных грибов *Botrytis cinerea* и *Fusarium oxysporum*. Следует отметить, что численность пектолитических микроорганизмов в почве чрезвычайно велика ( $10^5$  клеток на 1 г почвы).

Микроорганизмы, разлагающие пектиновые вещества, играют важную роль при мочке льна, конопли, джута, канатника, кенафа и других лубоволокнистых растений. Цель этого процесса – отделение пучков целлюлозных волокон от остальных растительных тканей, которые склеены пектиновыми веществами. Пектолитические ферменты, кроме того, используются для различных технических целей (например, для осветления фруктовых и овощных соков).

## Разложение хитина и хитозана

**Хитин** – гомополимер, состоящий из остатков N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных  $\beta$ -1,4-гликозидной связью. Стабильность структуры хитина обеспечивается многочисленными водородными связями между боковыми N-ацетильными группами. В качестве опорного вещества хитин широко распространен в животном и растительном мире. Из хитина состоит наружный скелет многих беспозвоночных животных (ракообразных, насекомых и простейших). В огромном количестве хитин присутствует в почве, где его образуют членистоногие, простейшие и грибы, у которых он является

основным компонентом клеточной стенки. Непрерывно хитин образуется в морской среде как компонент зоопланктонных организмов. Таким образом, хитин является вторым или третьим наиболее распространенным источником углеводов в природе.

**Хитозан** – деацетилированная форма хитина, образуемая под действием деацетилазы у некоторых дрожжей и мицелиальных грибов. Процесс деацетилирования хитина в лабораторных условиях осуществляют с помощью концентрированных щелочей при повышенных температурах. При реакции деацетилирования происходит не только отщепление от хитина ацетильной группировки, но и разрыв его гликозидных связей. Таким образом, хитозан представляет собой водорастворимый, полидисперсный по молекулярной массе полимер D-глюкозамина.

Расщепление хитина в природе осуществляют хитинолитические микроорганизмы (бактерии и грибы), которые широко распространены в почве, донных осадках водоемов, кишечнике животных. Способностью использовать хитин обладают как аэробные, так и анаэробные бактерии, например представители родов *Cytophaga*, *Chromobacterium*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Photobacterium*, *Bacillus*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter* и др. Среди грибов способностью разлагать хитин обладают виды рода *Aspergillus* и *Mortierella*. Установлено, что в 1 г почвы содержится до  $10^6$  клеток микроорганизмов, использующих хитин.

Расщепление хитина микроорганизмами осуществляется с помощью ферментов **хитиназ** и **N-ацетилглюкозаминидаз**. Механизм деградации хитина следующий (рисунок 30).

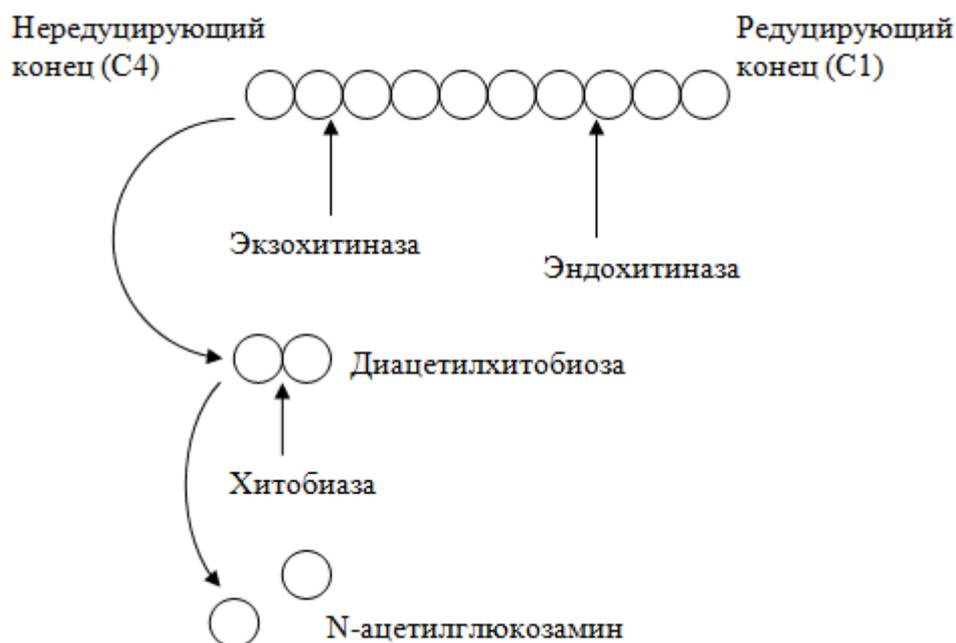


Рисунок 30 – Расщепление хитина хитинолитическими ферментами

Фермент экзохитиназа отщепляет диацетилхитобиозный остаток от нередуцирующего конца цепи. Эндохитиназа расщепляет случайным образом

гликозидные связи внутри цепи. Конечными продуктами эндохитиназной активности являются диацетилхитобиоза и триацетилхитобиоза. Далее  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидаза (хитобиаза) гидролизует диацетилхитобиозу с образованием N-ацетилглюкозамина. Известен также механизм деградации хитина путем предварительного деацетилирования с образованием хитозана. Под действием **хитозаназы** хитозан гидролизует до хитобиозы, которую глюкозаминидаза расщепляет на две молекулы глюкозамина.

Ферменты микроорганизмов хитиназы и хитозаназы используются в биотехнологии для переработки хитинсодержащих отходов и в научных исследованиях для получения протопластов грибов.

### 1.3.1.5. Использование белков микроорганизмами

Белки являются важным источником питательных субстратов для микроорганизмов. В разложении белков участвуют многочисленные бактерии и грибы. Подобно другим высокомолекулярным соединениям, белки сначала расщепляются протеолитическими экзоферментами протеазами. Продукты гидролиза – полипептиды, олигопептиды, аминокислоты – транспортируются в клетку специальными транспортными системами. В клетке полипептиды и олигопептиды гидролизуются внутриклеточными протеазами до аминокислот. Нерастворимые в воде структурные белки кератин, эластин и коллаген высокоустойчивы к протеолизу. Еще более эта устойчивость повышается в результате связывания белков с полифенолами. Чувствительность к протеолитическим ферментам повышается после денатурации таких белков.

Микроорганизмы синтезируют множество различных протеолитических ферментов. Их тип и количество зависят от вида микроорганизма и условий культивирования. В зависимости от того, какие пептидные связи протеазы расщепляют, их делят на эндопептидазы и экзопептидазы. **Эндопептидазы** расщепляют пептидные связи внутри полипептидной молекулы, **экзопептидазы** отщепляют аминокислотные остатки от С- или N-конца полипептидной цепи (рисунок 31)

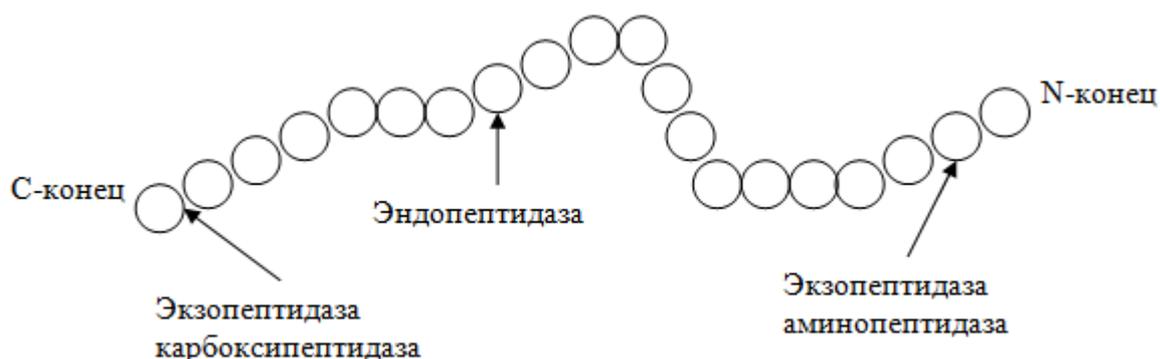


Рисунок 31 – Расщепление полипептидной цепи протеазами

Протеазы, продуцируемые микроорганизмами, находят широкое применение в медицине, а также различных отраслях промышленности и

поэтому их производят в больших количествах. Это обусловлено рядом факторов:

- микроорганизмы способны синтезировать различные по свойствам протеазы, отличающиеся по активности в широком диапазоне температуры (от 4 до 110 °С) и значений рН (от 0,1М НСl до 0,1М NaOH), а также устойчивые к действию мочевины в концентрации 8М;

- для культивирования протеолитических микроорганизмов применяют в качестве субстратов дешевое сырье;

- созданы высокопродуктивные штаммы микроорганизмов, синтезирующие протеазы в количестве до 10 и более г/л;

- с помощью мутагенеза и отбора, а также методов генетической инженерии можно значительно увеличить протеолитическую активность микробов-продуцентов и улучшить их свойства в отношении синтезируемого фермента;

- микробные протеазы широко применимы в пищевой промышленности, например, для свертывания молока, для выделки кожи, в химических технологиях, в качестве добавки к стиральным порошкам, а также при получении гормональных лекарственных препаратов.

Аминокислоты, образующиеся при расщеплении белков могут использоваться микробными клетками для синтеза собственных белков, либо подвергаются превращениям (декарбоксилированию, дезаминированию, трансаминированию) и после этого вовлекаются в промежуточный метаболизм (рисунок 32).

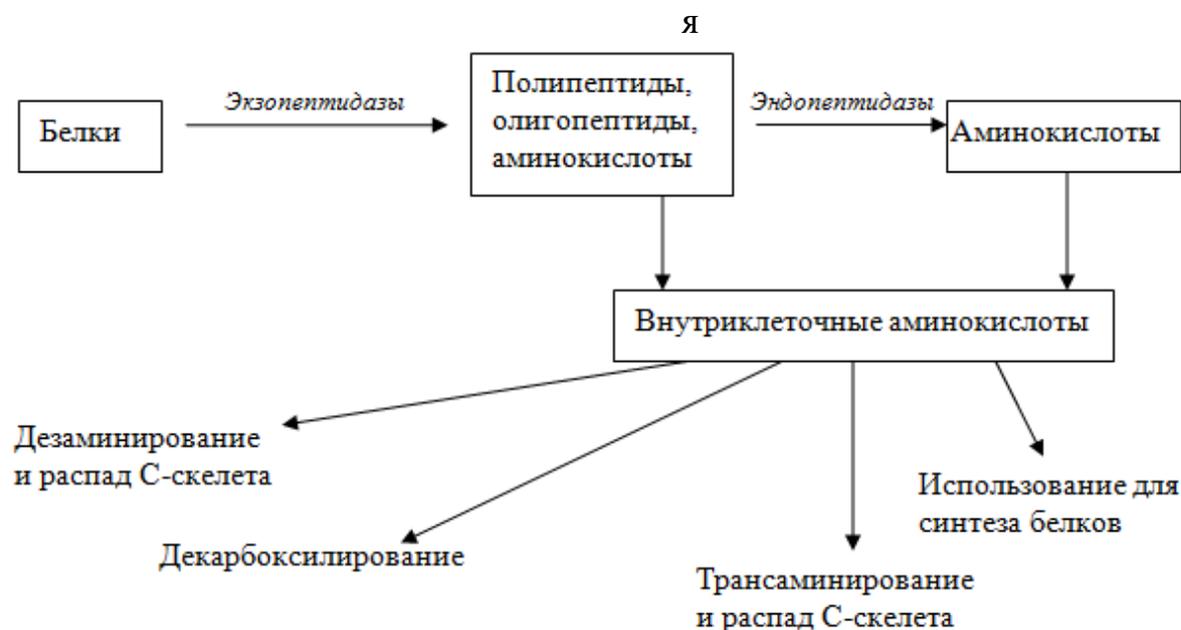
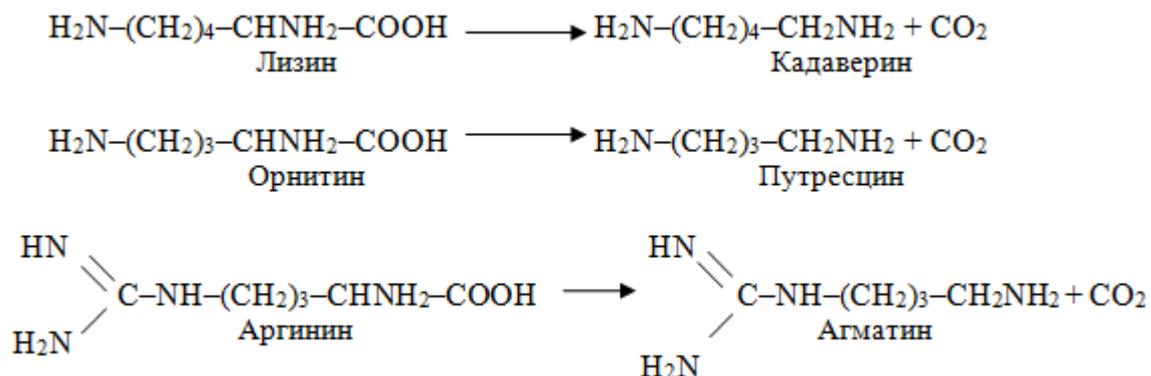


Рисунок 32 – Расщепление белков до аминокислот и пути из дальнейшего превращения

## Аэробное расщепление аминокислот

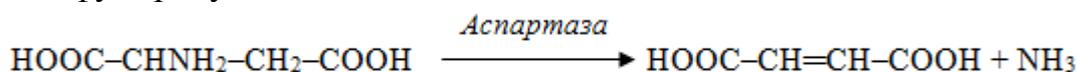
При аэробном метаболизировании аминокислот чаще всего происходит их декарбоксилирование или дезаминирование. Ферменты декарбоксилазы синтезируются в основном в кислой среде. В результате **декарбоксилирования аминокислот** образуются  $\text{CO}_2$  и первичные амины, окисляемые далее до соответствующих жирных кислот. Из первичных аминов наиболее известны кадаверин, путресцин и агматин (ранее их называли трупными ядами); они образуются соответственно из лизина, орнитина и аргинина.



Дезаминирование – это отщепление аммиака от аминокислоты. Различают окислительное дезаминирование и дезаминирование, приводящее к образованию ненасыщенных соединений.

**Окислительное дезаминирование** осуществляют различные ферменты дегидрогеназы. Это наиболее распространенный тип расщепления аминокислот. Дегидрогеназы аминокислот катализируют эндергонические реакции окисления с участием  $\text{НАД}^+$ , например окисление аланина до пирувата +  $\text{NH}_3$  (аланиндегидрогеназа) или глутамата до 2-оксоглутарата +  $\text{NH}_3$  (глутаматдегидрогеназа).

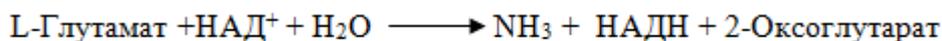
Примером **дезаминирования, приводящего к образованию ненасыщенного соединения**, является дезаминирование аспарагиновой кислоты в фумаровую:



Окисление аминокислот может осуществляться также **путем трансаминирования**. Оно включает 2 этапа. На первом этапе  $\alpha$ -аминогруппа донорной аминокислоты переносится трансаминазами на 2-оксоглутарат или пируват с образованием соответствующей 2-оксокислоты:



Продукт реакции – глутамат или аланин – подвергается окислительному дезаминированию, при котором используется 2-оксокислота в качестве акцептора аминогруппы:



В итоге аминокислота окисляется с образованием 2-оксокислоты и  $\text{NH}_3$ :



Следует отметить, что окислительное расщепление аминокислот осуществляется по-разному. В качестве типичного примера рассмотрим путь расщепления лейцина (рисунок 33). Сначала L-лейцин в результате трансаминирования превращается в 2-оксокислоту (2-оксоизокапро-новую кислоту), которая подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием изовалерил-КоА. Далее дегидрирование приводит к образованию 3-метилкротонил-КоА. В результате биотинзависимого карбоксилирования и последующего присоединения воды образуется 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА, который расщепляется на ацетоацетат и ацетил-КоА, вовлекаемые в промежуточный обмен.

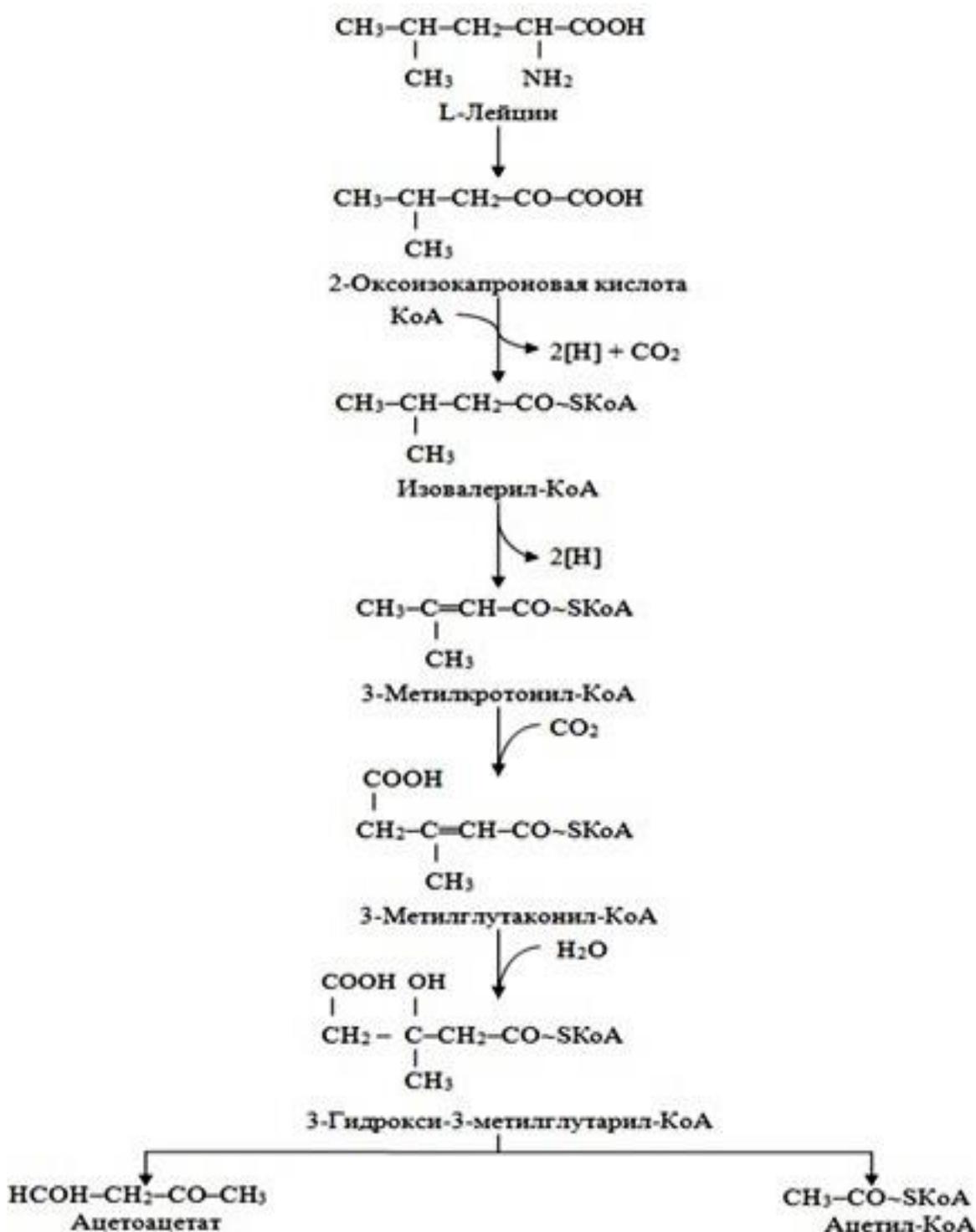
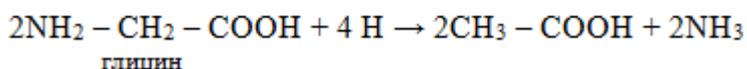
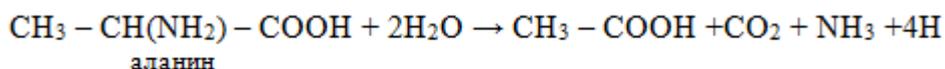


Рисунок 33 – Путь расщепления лейцина

### Сбраживание аминокислот микроорганизмами

Входящие в состав белков 20 аминокислот имеют в среднем ту же степень восстановления, что и углеводы. Поэтому они могут также служить субстратами окислительно-восстановительных процессов брожения. Анаэробные микроорганизмы, способные сбраживать аминокислоты, были открыты в 1930-х гг. Стехиометрию сбраживания аминокислот микроорганизмами впервые описал Л. Стикленд (Stickland) в 1934 г. Он показал, что многие клостридии сбраживают преимущественно смесь

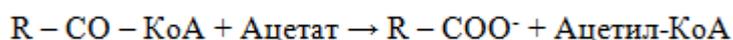
аминокислот. Они получают большую часть необходимой им энергии в результате реакций сопряженного окисления и восстановления двух соответствующих аминокислот. Такое сопряженное сбраживание аминокислот носит название *реакции Стикленда*. Для реакции Стикленда характерно, что одна аминокислота, взятая в отдельности, практически не расщепляется, тогда как соответствующая пара аминокислот сбраживается очень быстро: один из членов этой пары используется в качестве донора электронов, а другой – в качестве акцептора электронов. Например, в паре аланин-глицин: аланин окисляется, а глицин восстанавливается:



Такой тип брожения присущ пептолитическим клостридиям, таким как *C. sporogenes*, *C. histolyticum*, *C. botulinum*, *C. sticklandii* и др.

Позже, в 1940-х гг. Г. Баркер (Barker) с сотрудниками выделил клостридии и родственные им неспорообразующие анаэробные бактерии, способные осуществлять брожение в присутствии только одной аминокислоты. Так, *Clostridium propionicum* в качестве единственного субстрата брожения использует аланин; недавно выделенный вид *Eubacterium acidaminophilum* – глицин. Как показывает анализ 16S-рРНК, почти все микроорганизмы, способные сбраживать аминокислоты, относятся к клостридиям и родственным им бактериям.

Процесс сбраживания аминокислот состоит из ряда анаэробных окислительно-восстановительных реакций. В процессе брожения участвуют две молекулы аминокислот, из которых одна окисляется, другая восстанавливается. Эта пара может состоять из молекул различных аминокислот или одной и той же аминокислоты. И в окислительной, и в восстановительной ветвях процесса брожения могут участвовать следующие аминокислоты: аланин, цистеин, глицин, метионин, лейцин, фенилаланин, серин, треонин, триптофан, тирозин. Изолейцин и валин используются исключительно как доноры электронов, пролин – только как акцептор электронов. Окислительная ветвь всегда сопряжена с субстратным фосфорилированием, обеспечивающим рост бактерий. Как правило, вначале образуется ацил-КоА, который при участии КоА-трансферазы превращается в ацетил-КоА. Далее при участии ацетилтрансферазы и ацетаткиназы синтезируется АТФ.



В реакциях восстановительной ветви брожения АТФ не образуется. Исключение составляют сбраживание глицина, при котором субстратное фосфорилирование сопряжено с реакциями восстановления, и сбраживание аспартата, превращаемого в фумарат – потенциальный акцептор электронов при анаэробном дыхании. Общая схема сбраживания аминокислот представлена на рисунке 34.

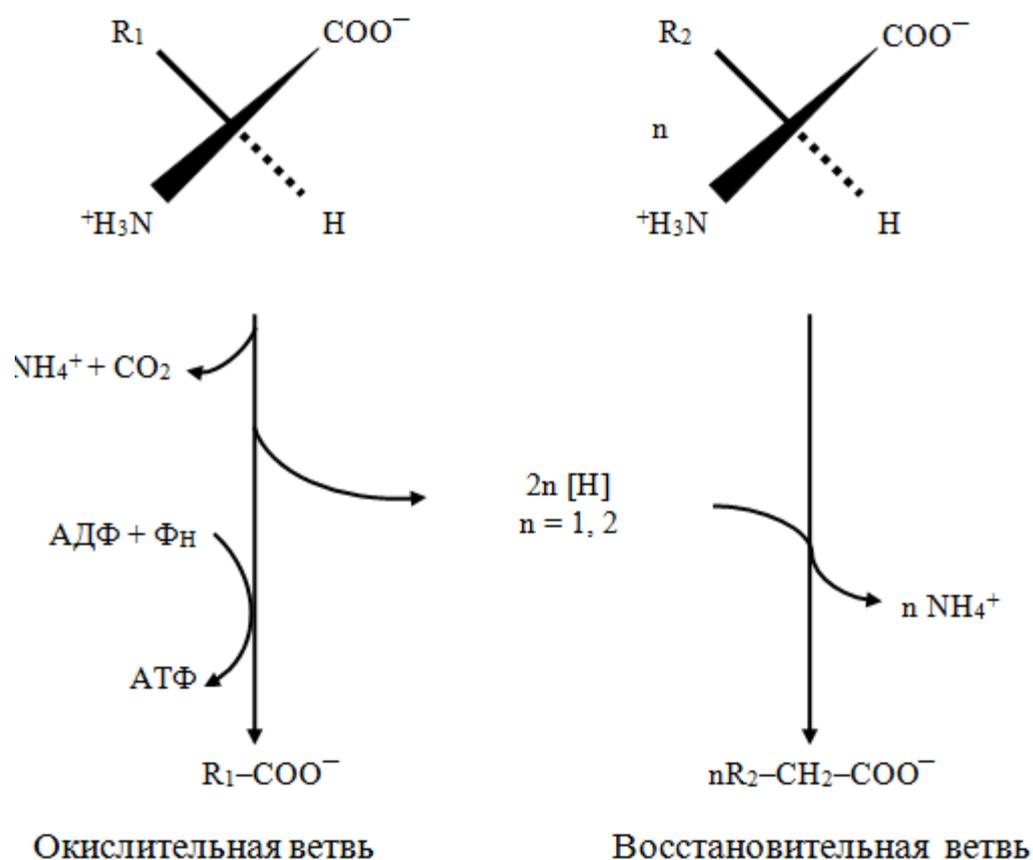


Рисунок 34 – Общая схема сбраживания аминокислот

В результате сбраживания аминокислот образуется аммиак,  $CO_2$ ,  $H_2$ , спирты и короткоцепочечные жирные кислоты. Последние (короткоцепочечные жирные кислоты) являются продуктами восстановительной ветви брожения и часто имеют тот же углеродный скелет, что и исходные аминокислоты. Например, лейцин восстанавливается до 4-метилвалериановой кислоты, триптофан – до индолпропионата.

При смешанном сбраживании аминокислот могут образовываться пахучие соединения, которые в небольших концентрациях придают продуктам (сырам, винам) приятный аромат. Но интенсивные процессы сбраживания аминокислот пептолитическими клостридиями сопровождаются очень неприятным запахом, что характерно при газовой гангрене, вызываемой бактериями *Clostridium septicum*, *C. perfringens*, *C. histolyticum* и др.

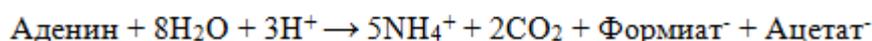
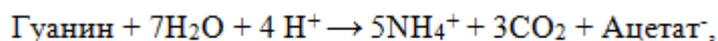
### 1.3.1.6. Использование микроорганизмами азотистых оснований

Пуриновые и пиримидиновые основания высвобождаются при разложении ДНК, РНК и нуклеотидов с помощью ферментов рибонуклеаз и дезоксирибонуклеаз. Их способны использовать многие аэробные и анаэробные микроорганизмы.

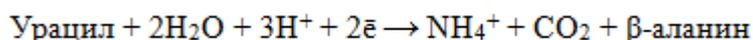
## Анаэробное разложение (сбраживание) азотистых оснований

**Пуриновые основания** сбраживают анаэробные бактерии *Clostridium acidurici*, *C. purinolyticum*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. Эти микроорганизмы настолько «специализировались» на сбраживании данных соединений, что не могут расти ни на каком другом субстрате.

Сбраживание пуриновых оснований начинается с их превращения в ксантин (рисунок 35), который далее разлагается с образованием аммиака, диоксида углерода, формиата и ацетата. Суммарные реакции сбраживания пуринов выглядят следующим образом:



**Пиримидиновые основания** сбраживают только некоторые виды бактерий, например, *Clostridium uracilium*, *C. oroticum* и *C. barkeri*. Хорошо изучены лишь процессы восстановления урацила. Показано, что при росте на среде сложного состава бактерии *C. uracilium* восстанавливают урацил до дигидроурацила, который далее гидролизуеться с образованием  $\text{CO}_2$ , аммиака и  $\beta$ -аланина:



Далее в результате простого  $\beta$ -элиминирования  $\beta$ -аланин превращается в  $\beta$ -аланин-КоА, а затем в акрилоил-КоА, который через образование пропионил-КоА восстанавливается в пропионовую кислоту.

Таким образом, способностью сбраживать азотистые основания обладает небольшая группа клостридий и родственных им организмов. Катаболизм всех пуриновых оснований начинается с их превращения в ксантин, который далее разлагается с образованием аммиака, диоксида углерода, формиата и ацетата. Механизм разложения пиримидиновых оснований исследован только для урацила. Это основание расщепляется с образованием  $\beta$ -аланина и аспартата соответственно.

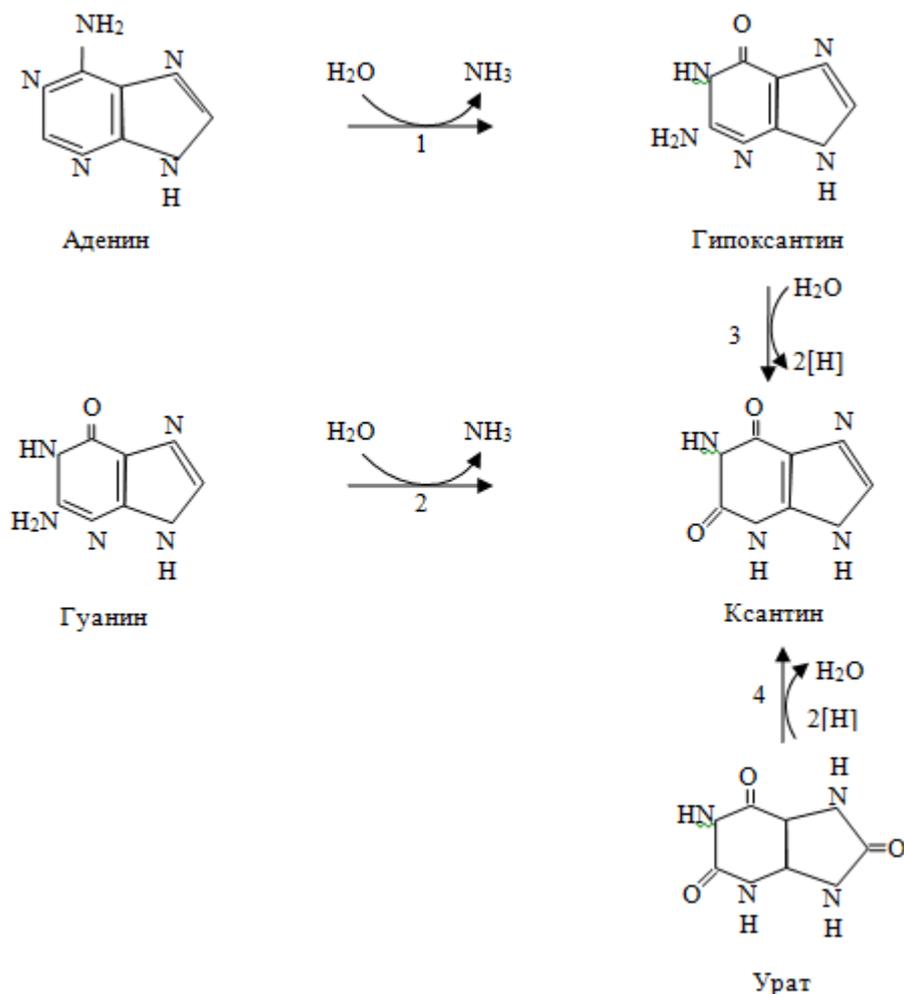


Рисунок 35 – Превращение аденина, гуанина и урата в ксантин:  
 1 – адениндезаминаза; 2 – гуаниндезаминаза; 3 – ксантинооксидаза;  
 4 – ксантиндегидрогеназа

### Аэробное окисление азотистых оснований

**Пуриновые основания** в аэробных условиях окисляются до глиоксилата и мочевины (рисунок 36). На первой стадии разложения аденин и гуанин превращаются в ксантин, который ксантинооксидаза окисляет до мочевой кислоты. Далее мочевая кислота окисляется до аллантиина, после чего происходит его гидролиз с образованием аллантииновой кислоты.

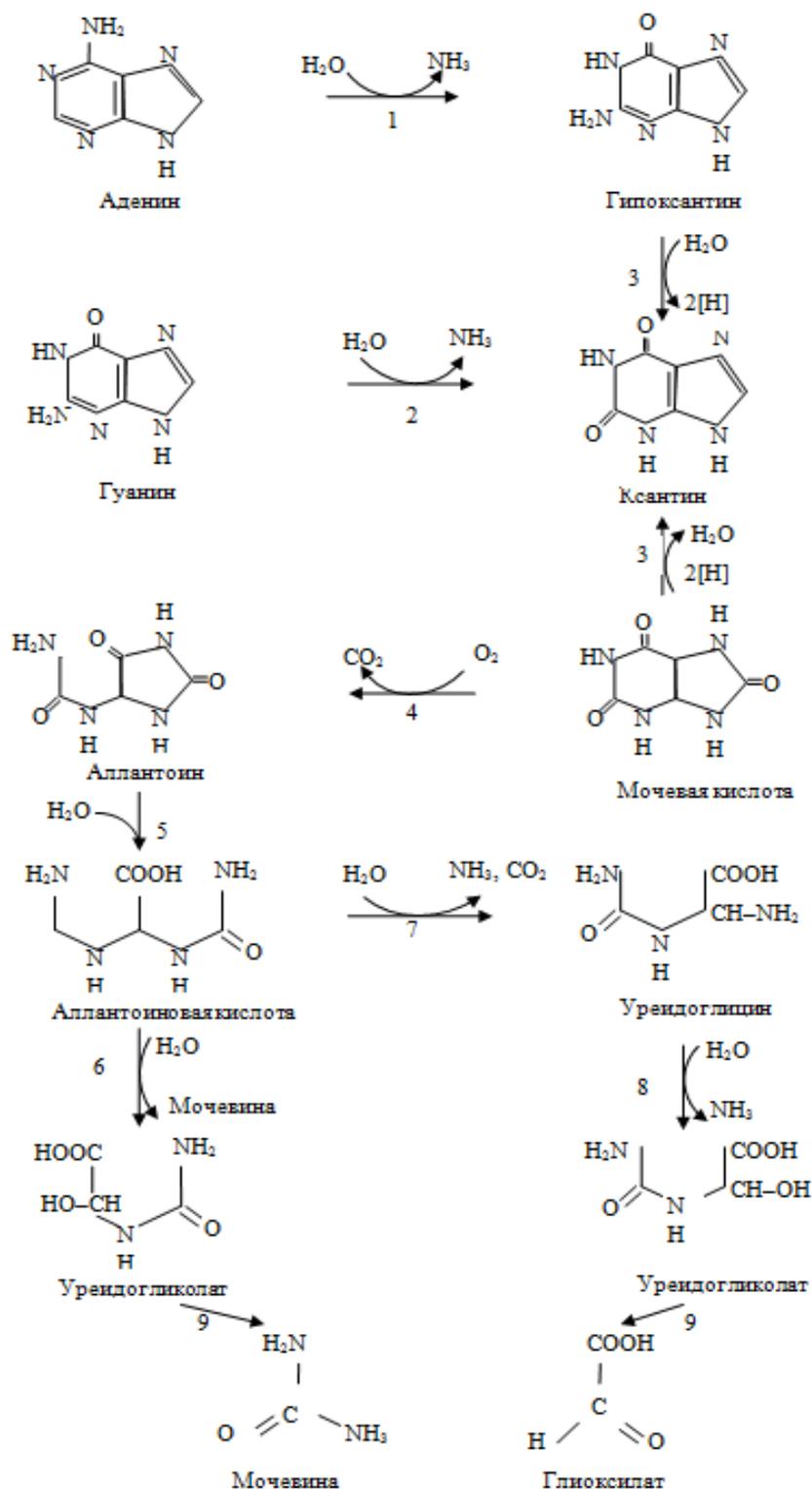
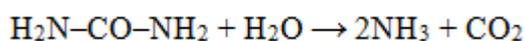


Рисунок 36 – Аэробное разложение пуриновых оснований:

- 1 – адениндезаминаза; 2 – гуаниндезаминаза; 3 – ксантиноксидаза;  
 4 – уриказа; 5 – аллантоиназа; 6 – аллантоиказа; 7 – амидогидролаза аллантоиновой кислоты; 8 – аминоксидролаза уреидоглицина;  
 9 – уреидогликолаза

Аллантоиновая кислота разными путями у различных микроорганизмов разлагается на глицин и мочевину. Далее глицин превращается в глиоксилат, а мочевина под действием никельсодержащей уреазы гидролизуется до  $CO_2$  и аммиака:



В аэробных условиях **пиримидиновые основания** окисляются с образованием  $\beta$ -аланина. Разложение **цитозина** начинается с его дезаминирования до урацила, который через 5,6-дигидроурацил и уреидопропионат превращается в  $\beta$ -аланин (рисунок 37).  $\beta$ -аланин подвергается окислительному дезаминированию с образованием малонового полуальдегида, который далее окисляется до малонил-КоА. **Тимин** разлагается с образованием промежуточного продукта  $\beta$ -аминоизобутират, который окисляется далее до метилмалоновой кислоты. Метилмалоновая кислота через образование метилмалонил-КоА превращается в сукцинат.

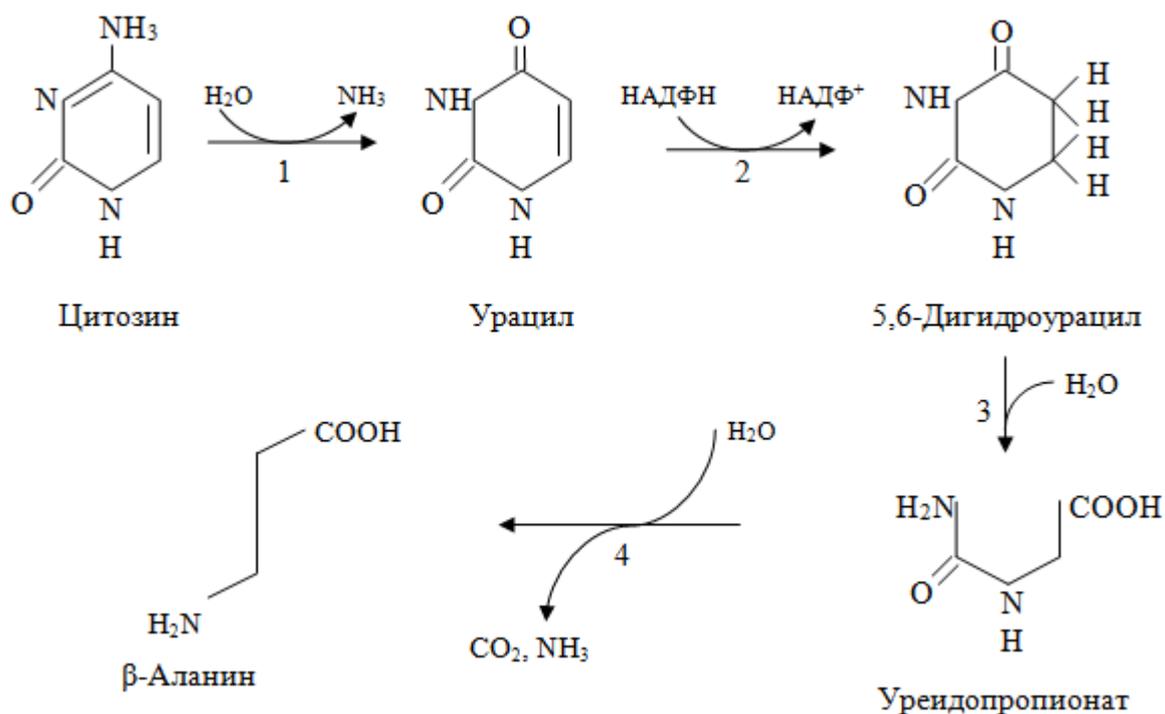
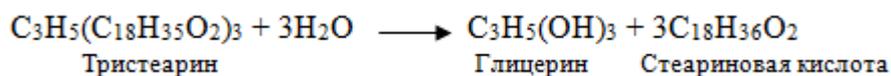


Рисунок 37 – Аэробное разложение пиримидиновых оснований (цитозина и урацила):

1 – цитозиндеаминаза; 2 – 5, 6-дигидроурацилдегидрогеназа;  
3 – 5, 6-дигидроурацилгидролаза; 4 –  $\beta$ -уреидопропионаза

### 1.3.1.7. Окисление липидов и фосфолипидов микроорганизмами

Липиды и фосфолипиды способны окисляться многими бактериями и некоторыми грибами, но они не могут поглощаться клетками этих микроорганизмов, и поэтому сначала подвергаются воздействию экзоферментов гидролаз. Липиды расщепляются ферментами липазами с образованием жирных кислот и глицерина. Например, гидролиз тристеарина приводит к образованию стеариновой кислоты и глицерина:



Гидролиз фосфолипидов осуществляется фосфолипазами или лецитиназами. Они расщепляют фосфолипиды типа фосфатидилхолина и лецитина.

Образовавшиеся в процессе гидролиза липидов и фосфолипидов жирные кислоты и глицерин подвергаются расщеплению, что сопровождается образованием молекул АТФ.

Глицерин при участии специфической фосфофазы сначала фосфорилируется, затем окисляется через фосфоглицериновую кислоту до фосфоглицеринового альдегида. Последний превращается гликолитическим путем в пировиноградную кислоту, которая далее вовлекается в ЦТК.

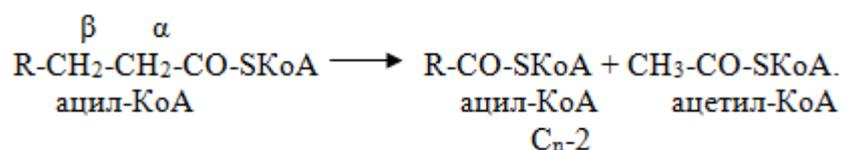
Расщепление образовавшихся при гидролизе жирных кислот происходит также сложным путем. Сначала жирные кислоты активируются коэнзимом А, и при участии АТФ образуется ацильное производное жирной кислоты (ацил-КоА) и пиррофосфат (фермент, катализирующий реакцию ацил-КоА-синтаза):



Пиррофосфат далее гидролизуется пиррофосфатазой:



Дальнейшее превращение ацил-КоА состоит из ряда β-окислений. При β-окислении разрывается связь между α- и β-углеродными атомами в молекуле жирной кислоты:



Таким образом, в результате β-окисления жирной кислоты происходит образование ацетил-КоА и жирной кислоты на два атома углерода меньше, чем исходный субстрат. Образовавшаяся жирная кислота подвергается таким же превращениям, как и исходная, укорачиваясь при каждом β-окислении на два углеродных атома. В конечном итоге вся углеродная цепочка жирной кислоты расщепляется на двууглеродные фрагменты ацетил-КоА. Так происходит с насыщенными жирными кислотами с четным числом углеродных атомов. Если насыщенная кислота содержит нечетное количество углеродных атомов, то процесс заканчивается образованием соответствующего количества молекул ацетил-КоА и одной молекулы пропионил-КоА, которая карбоксилируется с образованием метилмалонил-КоА, далее подвергаемого изомеризации в сукцинил-КоА. Ацетил-КоА включается в ЦТК и окисляется до H<sub>2</sub>O и CO<sub>2</sub>. Расщепление ненасыщенных жирных кислот также осуществляется путем β-окисления, но предварительно они превращаются ферментативным путем в соединения, которые атакуются ферментами β-окисления.

Энергия, высвобождаемая при расщеплении жирных кислот, становится доступной для микроорганизма вследствие последующих превращений ацетил-КоА, НАДН и ФАДН<sub>2</sub>. Установлено, что при полном расщеплении высокомолярной жирной кислоты, например, пальмитиновой, образуется 136 молекул АТФ.

Липиды и фосфолипиды окисляются многими аэробными и анаэробными бактериями и грибами. Наиболее активно осуществляют этот процесс бактерии *Pseudomonas fluorescens*, *P. pyocyanea*, *Serratia marcescens*, *Bacillus mycoides*, *B. mesentericus*, *B. stearothermophilus*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *Achromobacter lipoliticum* и др. В разложении липидов и фосфолипидов принимают также участие мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и дрожжи родов *Candida*, *Torula*.

### **1.3.1.8. Разложение углеводов микроорганизмами**

Углеводороды относят к группе химически стойких органических веществ. Однако, несмотря на это, некоторые микроорганизмы способны использовать их как единственный органический субстрат.

Углеводороды входят в состав восков, смол, нефти, болотных газов, нефтяных попутных газов, природного газа и других органических веществ. Широко распространены в природе насыщенные ациклические углеводороды – алканы (предельные углеводороды) и ароматические, или бензоидные углеводороды (арены).

#### **Разложение алканов (парафинов) микроорганизмами**

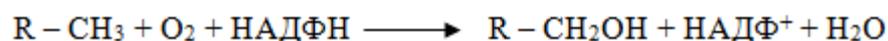
Различают газообразные, жидкие и твердые алканы. Алканы с малым числом углеродных атомов (C<sub>1</sub> – C<sub>4</sub>) находятся в газообразном состоянии, со средним числом атомов углерода (C<sub>5</sub> – C<sub>15</sub>) – в жидком состоянии и с большим числом атомов углерода (C<sub>16</sub> и более) – в твердом состоянии. Газообразные алканы используются многими бактериями в качестве источника энергии. Бактерии, окисляющие метан (метилотрофы), будут рассмотрены ниже (см. разд. 3.13). К окислению этана, пропана, бутана и углеводородов, содержащих до 8 атомов углерода, способно большее число видов бактерий, чем к окислению метана. Большинство видов бактерий, окисляющих эти углеводороды, принадлежат к родам *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* и *Nocardia*.

Многие виды бактерий способны использовать в качестве источника энергии алканы с более длинной углеродной цепью (C<sub>10</sub> – C<sub>18</sub>). Разложение таких длинноцепочечных алканов происходит, как правило, в аэробных условиях.

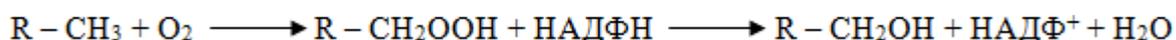
Аэробное разложение длинноцепочечных алканов осуществляют многие грамположительные бактерии с высоким содержанием ГЦ-пар в ДНК (представители родов *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter*), отдельные штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, а также грибов из родов *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* и дрожжей из рода

*Candida*. Для разложения этих алканов требуется их активация с помощью ферментов оксигеназ по одному из трех путей.

1. Наиболее распространен путь с участием монооксигеназы, окисляющей концевой атом n-алкана с образованием первичного спирта:



2. Диоксигеназы также атакуют концевой атом n-алкана с образованием гидропероксида, который далее восстанавливается до первичного спирта:



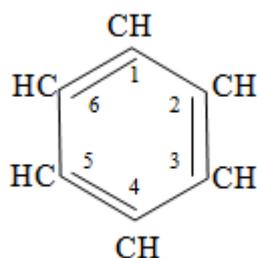
3. В редких случаях монооксигеназа осуществляет субтермальное окисление алкана, т. е. по C<sub>2</sub>-атому с образованием вторичного спирта (R - CHOH - R').

Эти реакции гидроксирования и последующие реакции окисления алканов происходят, как правило, в мембране. Последующий метаболизм образовавшихся спиртов происходит различными путями. Чаще всего первичные спирты окисляются до жирных кислот. Вторичные спирты окисляются до кетонов, которые далее превращаются в ацетат и первичный спирт. Спирт окисляется до жирной кислоты, которая претерпевает β-окисление с образованием ацетил-КоА, включающегося в ЦТК.

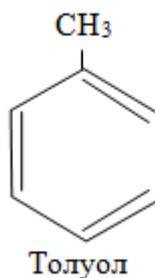
Ранее считалось, что в отсутствие молекулярного кислорода разложение алканов не осуществляется. Однако, в настоящее время выделены сульфатредуцирующие и нитратредуцирующие (денитрифицирующие) прокариоты, которые способны медленно метаболизировать длинноцепочечные алканы в анаэробных условиях и использовать их в качестве единственных органических субстратов. В этих условиях метаболизм алканов начинается либо с удлинения цепи путем присоединения C<sub>1</sub>-фрагмента, либо окисления концевой метильной группы до карбоксильной с использованием воды в качестве источника кислорода. Далее образующиеся жирные кислоты окисляются путем β-окисления. Ненасыщенные алканы гидролизуются по двойной связи путем присоединения воды с образованием вторичных спиртов.

### **Разложение ароматических углеводородов (аренов) микроорганизмами**

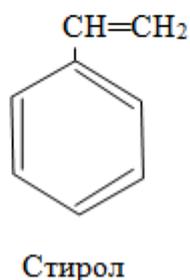
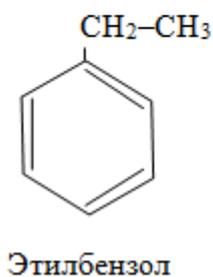
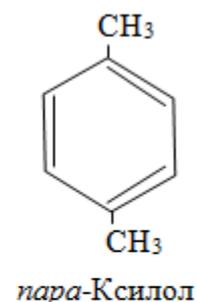
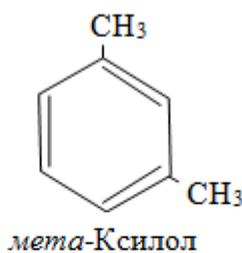
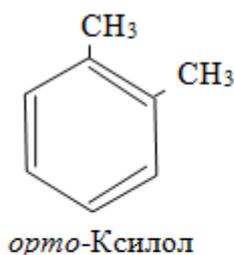
Ароматические углеводороды содержат в молекуле бензольное ароматическое кольцо C<sub>6</sub>. Примером простейшего ароматического углеводорода является бензол:



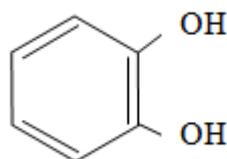
При замене атомов водорода в молекуле бензола получают его производные с одним заместителем, например:



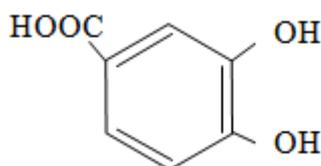
с двумя и более заместителями, например:



Большинство ароматических углеводородов расщепляется бактериями сначала до *катехола* или *прокатеховой кислоты*. Как правило, ароматические углеводороды, имеющие заместители по первому и второму С-атомам (например, салициловая кислота) превращаются в катехол:

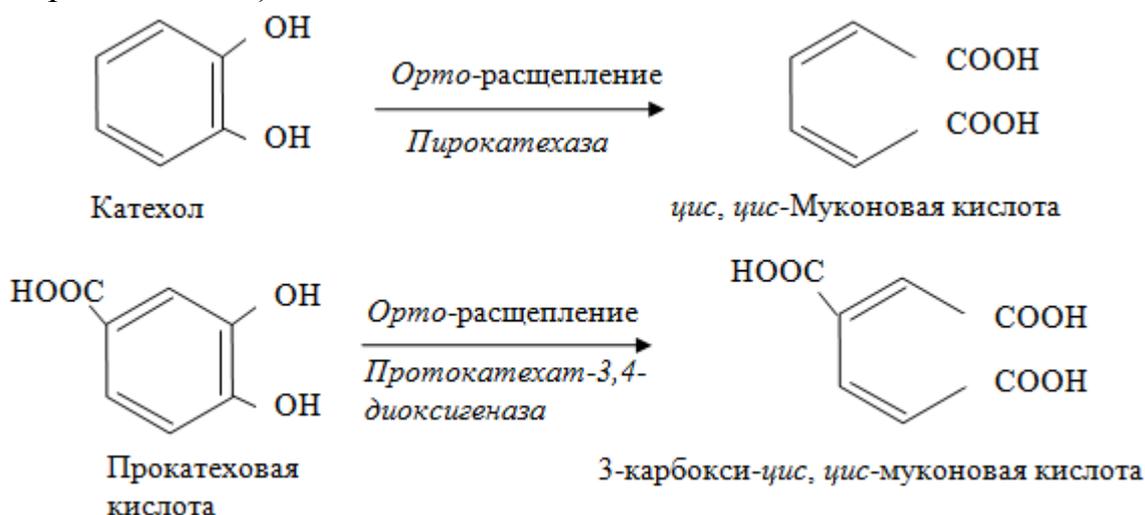


Многие незамещенные ароматические углеводороды (такие как бензол и нафталин) разлагаются через образование 1,2-дифенольных соединений также до катехола. Ароматические углеводороды, несущие заместители в положении 1,3 или 1,4 (например, 3-гидроксибензоат и 4-гидроксибензоат), а также полузамещенные ароматические соединения метаболизируются через образование прокатеховой кислоты:



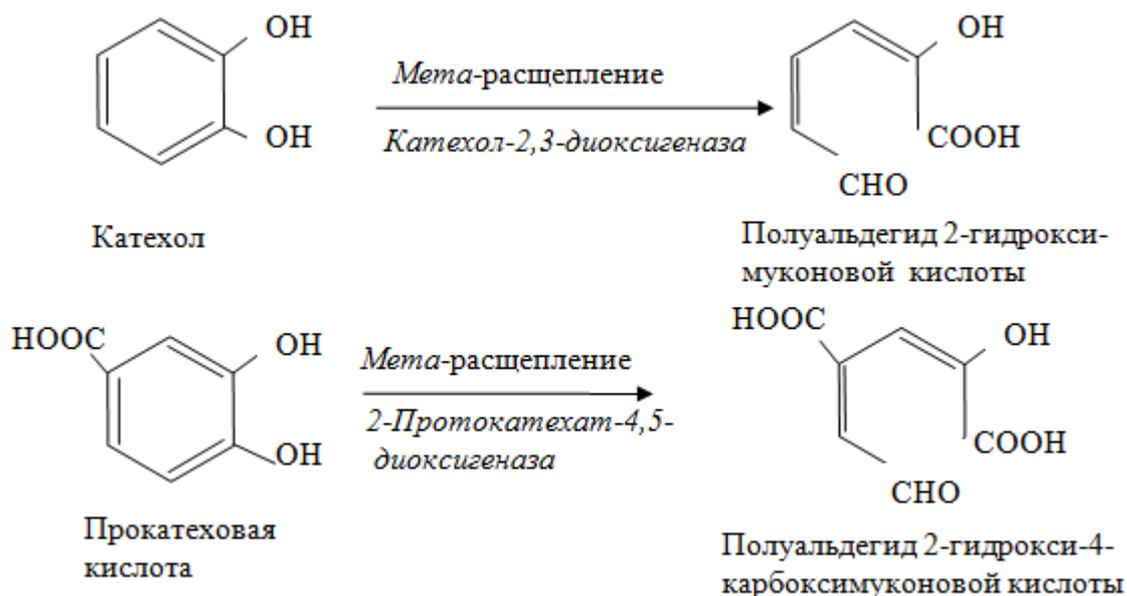
Реакции расщепления ароматических углеводов до катехола или прокатеховой кислоты катализируют ферменты оксигеназы. Они сводятся к введению гидроксильных групп в ароматическое кольцо и часто к отщеплению заместителей. Гидроксильными группами могут замещаться атомы хлора, нитрогруппы и сульфогруппы. **Оксигеназы** представляют собой оксидоредуктазы, включающие в молекулу субстрата атом(-ы) кислорода из O<sub>2</sub>. Оксигеназы, катализирующие присоединение одного атома кислорода, называются монооксигеназами, катализирующие присоединение двух атомов – диоксигеназами.

Следующим этапом расщепления ароматических углеводов является расщепление образованных молекул катехола и прокатеховой кислоты под действием диоксигеназ двух типов. Одни диоксигеназы разрывают ароматическое кольцо между двумя гидроксильными атомами углерода (*орто*-расщепление):



Далее образовавшиеся при *орто*-расщеплении катехола и прокатеховой кислоты промежуточные продукты – *цис, цис*-муконовая кислота и 3-карбокци-*цис, цис*-муконовая кислота – в ходе дальнейшего катаболизма проходят через этап общего для них обоих продукта – 3-оксо дипиновой кислоты. Последняя активируется КоА-трансферазой и расщепляется с образованием сукцинил-КоА и ацетил-КоА, которые подвергаются дальнейшим превращениям в ходе промежуточного метаболизма.

В более редких случаях диоксигеназы (второго типа) расщепляют ароматическое кольцо не между гидроксильными атомами углерода (как при *орто*-расщеплении), а между гидроксильным и негидроксильным атомами углерода (*мета*-расщепление):



Образованные полуальдегиды затем превращаются в пируват, ацетальдегид, оксалоацетат, фумарат, ацетоацетат, сукцинат или иные вещества, вовлекаемые в промежуточный метаболизм.

В настоящее время имеются сведения о том, что разложение ациклических и ароматических углеводов бактериями контролируется генами, локализованными в плаزمидах, которые называются плазмидами биодеградации, или D-плазмидами. Плазмиды данного типа широко распространены у бактерий рода *Pseudomonas*. В последнее время они обнаружены в клетках других почвенных и водных бактерий, таких как бактерии родов *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus* и др.

Микроорганизмы, способные окислять углеводороды, широко распространены в почвах и водах. Они приобрели большое практическое значение, в первую очередь, для биологической очистки почв и водоемов от загрязнений нефтью и продуктами ее переработки. Нефть представляет собой сложную смесь, состоящую в основном из ациклических и ароматических углеводородов. Утилизировать нефть и продукты ее переработки в качестве источников углерода и энергии способны представители родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Caulobacter* и др. С участием микроорганизмов осуществляется восстановление исходного статуса (биоремедиация) загрязненных территорий. Кроме того, выращивая на нефтяных отходах дрожжи рода *Candida*, получают из непищевого сырья дешевый белково-витаминный концентрат для подкормки сельскохозяйственных животных.

### 1.3.1.9. Разложение ксенобиотиков микроорганизмами

**Ксенобиотики** (от греч. *xenos* – чужой, *bios* – жизнь) – чужеродные для организмов соединения. К ним относятся различные синтетические полимеры, красители, пестициды, гербициды, фунгициды, фармацевтические препараты, препараты бытовой химии, отходы производств и т. д. В широком смысле к

ним могут быть отнесены и вещества природного происхождения, но полученные в сверхколичествах и перемещенные в несвойственные им места (например, нефть). Многие ксенобиотики чрезвычайно токсичны и проявляют мутагенную, канцерогенную и аллергенную активности. Ксенобиотики различаются по химической природе и характеризуются высокой стабильностью и устойчивостью в окружающей среде.

Деградация ксенобиотиков микроорганизмами может происходить различными путями, хотя скорость их разложения чаще всего крайне низка.

В *аэробных условиях* первой стадией биодеградации ксенобиотиков может быть *гидроксилирование*. Введение в молекулу гидроксильной группы приводит к поляризации и лучшей растворимости ксенобиотика в воде, что делает его более доступным для последующего разрушения. Эти реакции катализируются ферментами гидролазами или оксидазами смешанных функций. Еще одним способом деградации ксенобиотиков является реакция *N-деалкилирования*. Она осуществляется с помощью различных оксидаз на ранних этапах разрушения алкилзамещенных соединений. В деградации ксенобиотиков принимают участие и *реакции окислительного метаболизма*, такие, как декарбоксилирование,  $\beta$ -окисление, гидролиз эфирных связей, образование эпоксидов и сульфоксидов, окислительное расщепление ароматического и гетероциклических колец.

О разрушении ксенобиотиков в *анаэробных условиях* мало известно, но установлено, что начальные этапы их биоразрушения осуществляются через реакции *восстановительной трансформации* – преобразование нитрогруппы в аминогруппу, восстановительное дегалогенирование, насыщение двойных и тройных связей, восстановление альдегидов и кетонов в соответствующие спирты, превращение сульфоксида в сульфид.

И в аэробном, и в анаэробном метаболизме ксенобиотиков важное место занимают реакции *гидролиза*, в которых молекула ксенобиотика расщепляется при присоединении воды. Под действием соответствующих эстераз, фосфатаз и лиаз гидролизуются эфирные, фосфоэфирные или амидные связи. Гидролитическое дегалогенирование может происходить путем замещения атома галогена в молекуле на гидроксильную группу из воды.

Микроорганизмы также участвуют в трансформации ксенобиотиков путем присоединения к ним алкильных (метильных) и ацильных (формильных и ацетильных) групп. Продукты, образующиеся при такой трансформации ксенобиотиков, часто обладают иной токсичностью, чем исходные вещества.

Следует отметить, что микроорганизмы могут использовать ксенобиотики в качестве источников углерода и энергии или трансформировать их с целью детоксикации. При использовании ксенобиотиков для получения энергии и углерода участвуют ферменты, задействованные в основных метаболических путях. При этом происходит более глубокое разрушение ксенобиотика вплоть до его полной минерализации. В детоксикации могут участвовать ферменты периферического метаболизма.

Некоторые трудноразлагаемые вещества расщепляются микроорганизмами только совместно с хорошо утилизируемыми субстратами. В данном случае

способность к трансформации ксенобиотика обуславливается наличием доступного источника энергии для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов, так как сам ксенобиотик не может использоваться ими в этих целях. Это явление получило название **кометаболизма** или **соокисления**.

Поскольку каждая группа ксенобиотиков имеет в своем составе соединения самой разнообразной химической структуры, процесс биodeградации ксенобиотиков складывается из нескольких путей, осуществляемых определенными группами микроорганизмов и направленных на конкретный класс химических веществ.

Пути преобразования отдельных классов ксенобиотиков изучены в разной степени. Установлено, что биodeградация поверхностно-активных веществ алкилбензолсульфонатов (служат основой синтетических моющих средств, смачивателей, эмульгаторов и др.), имеющих в алкильной цепи от одного до трех атомов углерода, начинается с сульфонатной группы, а у соединений с большим числом углеродных атомов – с боковой цепи. В аэробных условиях эти вещества разлагаются бактериями и грибами, осуществляющими расщепление ароматических углеводов и других соединений этого типа. В анаэробных условиях биodeградацию алкилбензолсульфонатов могут осуществлять бактерии с бродильным типом метаболизма. Кроме того, эти соединения могут использоваться бактериями в качестве акцепторов электронов при анаэробном дыхании. Процессы анаэробной деградации алкилбензолсульфонатов протекают с большей эффективностью в ассоциации, состоящей из бактерий родов *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina*.

В биodeградации сложных ароматических и гетероциклических соединений (красителей, фармацевтических препаратов) в аэробных условиях у разных микроорганизмов участвуют специфические ферменты. Например, у бактерий рода *Pseudomonas* разрыв индольного кольца катализирует фермент диоксигеназа. Грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Helminthosporium* для окисления гетероциклических соединений используют активные пероксидазы. Бактерии актиномицеты рода *Streptomyces* расщепляют полициклические соединения с помощью ферментов лигниназ.

Большое количество различных ксенобиотиков способен разрушать в аэробных условиях базидиомицет *Phanerochaete chrysosporium*, вызывающий гниение древесины. Среди них один из наиболее известных инсектицидов – дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). ДДТ нарушает синтез хитина и отличается высокой эффективностью в борьбе с насекомыми, однако главным его недостатком является повышенная устойчивость к биodeградации. Кроме ДДТ гриб *Phanerochaete chrysosporium* разрушает бензопирен, полихлорированные бифенилы, линдан, кристаллвиолет, различные азокрасители. За начальные стадии биodeградации в этом случае отвечают ферменты лигниназы и Mn-пероксидазы гриба.

Гетероциклические соединения – индол, хинолин, производные пиридина, фурана, никотиновой кислоты – полностью катаболизируются сообществами

денитрифицирующих, сульфатредуцирующих бактерий и метаногенных архей в процессе анаэробных дыханий. Сначала эти соединения анаэробно окисляются, а затем происходит разрыв кольца, причем легче разрушаются азот- и кислородсодержащие гетероциклические соединения, чем серосодержащие вещества.

Полимерные соединения, синтетические ткани и пластики способны разрушать в аэробных условиях грибы, синтезирующие высокоактивные внеклеточные гидролазы. Мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* расщепляют некоторые синтетические полимеры с помощью ферментов фосфатаз. Полимерные материалы, содержащие амидные и эфирные связи (например, капрон, нейлон, поролон), подвергаются воздействию микробными протеиназами. Первичная колонизация пластиков происходит в результате разрастания колоний грибов на поверхности, проникновения мицелия в толщу материала через микротрещины, а затем начинается активное воздействие ферментов и синтезируемых кислот на отдельные компоненты пластиков.

Повышенной стойкостью к разрушению плесневыми грибами и бактериями обладают полиэтилен, полипропилен, полистирол, жесткий поливинилхлорид, полиамид, полиэтилентерефталат – полимерные смолы. Менее стойки поливинилацетат, поливиниловый спирт, хлорсульфированный полиэтилен. Пластификаторы, входящие в состав пластиков, более подвержены биодegradации, так как являются смесью эфиров фталевой и адипиновой кислот. Основными микроорганизмами, осуществляющими биодegradацию перечисленных полимерных соединений в аэробных условиях являются микроскопические грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium*, а также бактерии родов *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Arthrobacter*. Опубликованы данные, что в дegradации высокомолекулярных полиэтиленов и нейлонов принимают участие грибы, вызывающие «белую гниль» (*Phanerochaete chrysosporium* и *Trametes versicolor*). С помощью ферментов лигниназ они разлагают эти полимеры до растворимых олигомеров в условиях лимитации по углероду и азоту.

Экспериментально доказано, что гены, ответственные за биодegradацию многих ксенобиотиков, локализованы в конъюгативных D-плазмидах, способных с высокой эффективностью переноситься внутри и между бактериальными популяциями. В настоящее время генетические системы биодegradации некоторых ксенобиотиков изучены достаточно хорошо, в частности, системы дegradации пестицидов, таких, как 2,4-дихлорфеноксиацетат, 2-метил-4-хлорфеноксиацетат, 2-хлорбензоат и др. Перспективным и многообещающим направлением генетических исследований в области биодegradации является конструирование штаммов микроорганизмов, содержащих новые катаболические пути дegradации трудноразлагаемых ксенобиотиков. Проведение таких исследований важно в связи с тем, что на способности микроорганизмов к разложению ксенобиотиков основан процесс **биоремедиации** – устранения загрязняющих агентов из

окружающей среды посредством ферментативной активности микроорганизмов.

### 1.3.1.10. Окисление неорганических соединений микроорганизмами

Окисление неорганических соединений способны осуществлять хемолитотрофные прокариоты. Такой способ жизни встречается только у прокариот. Его открыл русский микробиолог С. Н. Виноградский.

Хемолитотрофы могут использовать довольно широкий круг неорганических соединений в качестве источников энергии. На основании специфичности хемолитотрофов в отношении субстратов их можно разделить на пять основных групп:

- **нитрифицирующие прокариоты** используют в качестве источника энергии восстановленные неорганические соединения азота;
- **прокариоты, окисляющие соединения серы (серные прокариоты)**, используют в качестве источника энергии  $\text{H}_2\text{S}$ , элементарную серу ( $\text{S}^0$ ) или ее частично восстановленные окислы;
- **металлоокисляющие прокариоты** окисляют восстановленное железо или марганец;
- **водородные прокариоты** используют в качестве источника энергии молекулярный водород;
- **карбоксидопроекароты (карбокситрофные прокариоты)** используют окись углерода в качестве единственного источника углерода и энергии.

Для большинства этих прокариот характерно использование в процессе окисления неорганических веществ в качестве конечного акцептора электронов молекулярного кислорода.

К хемолитотрофам можно отнести сульфатвосстанавливающие (сульфатредуцирующие) прокариоты и метаногенные археи. **Сульфатвосстанавливающие** прокариоты могут получать энергию путем окисления в анаэробных условиях молекулярного водорода, используя в качестве конечного акцептора электронов сульфат ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). **Метаногенные** археи могут использовать  $\text{CO}_2$  в качестве конечного акцептора электронов при окислении молекулярного водорода.

Для многих хемолитотрофов при окислении неорганических веществ единственным или основным источником углерода является  $\text{CO}_2$ . Такие прокариоты называются **облигатными хемолитоавтотрофами**. Эта узкоспециализированная группа прокариот. Однако в настоящее время известны роды нитрифицирующих, водородных и бесцветных серых прокариот, включающие **факультативно хемолитоавтотрофные** виды и **хемолитогетеротрофные** виды. Факультативно хемолитоавтотрофные прокариоты обладают более широкими метаболическими возможностями и способны расти как автотрофно, так и гетеротрофно. Их иногда называют **миксотрофами**, поскольку в определенных условиях они используют смесь субстратов, и осуществляемый ими тип питания получил название **миксотрофии**. Обычно миксотрофия имеет место при низких концентрациях

неорганических и органических субстратов в среде, тогда как при высоких концентрациях субстратов может наблюдаться диауксия – последовательное использование двух субстратов. *Хемолитогетеротрофы* могут использовать восстановленные неорганические соединения как дополнительный источник энергии, но не способны фиксировать CO<sub>2</sub>, т.е. при любых условиях нуждаются в органическом источнике углерода.

### Процесс нитрификации

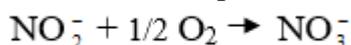
Нитрификация – окисление восстановленных соединений азота (аммиак, азотистая кислота, гидроксилламин и другие неорганические соединения азота).

Процесс нитрификации осуществляют нитрифицирующие прокариоты, которые в соответствии с филогенетической классификацией входят в классы *Beta-*, *Gamma-* и *Epsilonproteobacteria*, а также в класс *Nitrospira* филума (типа) *Nitrospirae*.

В природе процесс нитрификации проходит в две фазы, за каждую из них ответственны свои возбудители. Первую фазу – окисление солей аммония до солей азотистой кислоты – осуществляют нитрозобактерии, к которым относятся представители родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira* и *Nitrosovibrio*:



Вторую фазу – окисление нитритов в нитраты – осуществляют нитробактерии из родов *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*:



Нитрифицирующие прокариоты – грамотрицательные микроорганизмы, различающиеся формой и размером клеток. В эту группу входят бактерии с палочковидной, сферической, спиралевидной, грушевидной формой клеток. Все нитрифицирующие бактерии, кроме представителей рода *Nitrobacter*, размножаются бинарным делением. Бактерии, принадлежащие к роду *Nitrobacter*, размножаются почкованием. Среди нитрифицирующих бактерий есть подвижные (с полярным или перитрихальным жгутикованием) и неподвижные формы.

Все нитрифицирующие бактерии – облигатные аэробы; большинство – облигатные автотрофы, рост которых ингибируется органическими соединениями в концентрациях, обычных для гетеротрофных прокариот. Ассимиляция CO<sub>2</sub> осуществляется в цикле Кальвина.

Оптимальные условия для роста нитрифицирующих бактерий – температура 25 – 30 °С при pH 7,5 – 8,0.

Процесс нитрификации происходит в цитоплазматической мембране. Ему предшествует поглощение амиака и перенос его через цитоплазматическую мембрану с помощью медьсодержащей транслоказы.

Окисление аммиака в нитрит осуществляется в несколько этапов. На первом этапе аммиак окисляется до гидроксилламина с помощью монооксигеназы. Этот фермент катализирует присоединение к молекуле аммиака

одного атома кислорода; второй атом кислорода взаимодействует с НАДН, что приводит к образованию  $\text{H}_2\text{O}$ :



Этот этап окисления является эндергоническим, так как здесь происходит потребление энергии.

Далее гидроксилламин с помощью гидроксилламиноксидоредуктазы окисляется до нитрита:



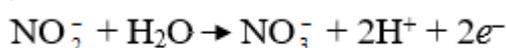
В качестве промежуточного продукта предполагается образование нитроксила:



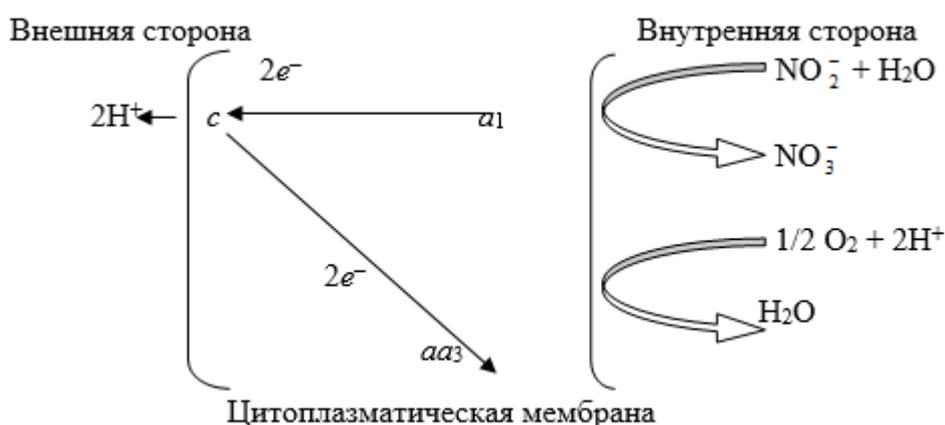
Электроны от  $\text{NH}_2\text{OH}$  поступают в дыхательную цепь на уровне цитохрома *c* и далее на терминальную оксидазу и на конечный акцептор – молекулярный кислород.

Транспорт электронов по электронтранспортной цепи, расположенной в цитоплазматической мембране, сопровождается переносом двух протонов через мембрану. Это приводит к созданию протонного градиента и в конечном итоге к синтезу молекул АТФ (в этом процессе участвует фермент АТФ-синтаза).

Вторая фаза нитрификации – окисление нитрита до нитрата – катализируется молибденсодержащей нитритоксидазой. Это происходит по следующему уравнению:



Электроны поступают на цитохром *a*<sub>1</sub> и через цитохром *c* – на терминальную оксидазу *aa*<sub>3</sub>, где акцептируются молекулярным кислородом. При этом происходит перенос через мембрану двух протонов, что приводит к синтезу АТФ. Схематически вторую фазу нитрификации можно представить следующим образом:



Таким образом, суммарно процесс окисления аммиака можно представить в следующем виде:



Энергетически выгодными являются только стадии окисления гидроксилламина в нитрит и нитрита в нитрат, так как в результате происходит образование молекул АТФ.

В 2015 г. были обнаружены бактерии рода *Nitrospira*, которые осуществляют полный процесс нитрификации, т. е. было показано, что один микроорганизм проводит обе стадии процесса, названного *комамокс* (*comammox – complete ammonia oxidation*). Полная нитрификация – это энергетически выгодный процесс, а комамокс-бактерии широко распространены в различных природных местообитаниях.

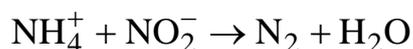
Каким же образом у нитрифицирующих прокариот происходит образование восстановителя НАДН, который необходим для ассимиляции CO<sub>2</sub> в цикле Кальвина?

Поскольку субстраты (аммиак, нитриты), которые окисляют нитрифицирующие прокариоты, обладают сильно положительным окислительно-восстановительным потенциалом, который для пары NH<sub>4</sub><sup>+</sup> / NH<sub>2</sub>OH составляет +899 мВ, для пары NO<sub>2</sub><sup>-</sup> / NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – +420 мВ, а окислительно-восстановительный потенциал НАД / НАДН имеет отрицательную величину -320 мВ, то окисление NH<sub>4</sub><sup>+</sup> или NO<sub>2</sub><sup>-</sup> по термодинамическим причинам не может быть прямо связано с восстановлением НАД. Образование НАДН в таком случае происходит за счет функционирования обратного транспорта электронов, который имеется у нитрифицирующих прокариот наряду с прямым транспортом по дыхательной цепи. Обратный транспорт электронов сопровождается затратой энергии.

Схематически перенос электронов у нитрифицирующих прокариот можно представить следующим образом:



Ранее считалось, что нитрификация – это сугубо аэробный процесс. Однако было показано, что в анаэробных реакторах, осуществляющих очистку стоков от соединений азота, аммоний окисляется в присутствии нитрита в соответствии с реакцией:



Этот процесс получил название **анаммокс** (*anammox – anaerobic ammonia oxidation*). Анаэробное окисление аммония осуществляют бактерии-планктомицеты. Анаммокс-бактерии – медленно растущие микроорганизмы. В природных местообитаниях они конкурируют с денитрификаторами. В присутствии большого количества органических соединений доминируют денитрификаторы, но по мере исчезновения органических доноров начинают преобладать анаммокс-бактерии, являющиеся хемолитотрофами.

Нитрифицирующие прокариоты обнаружены в водоемах разного типа (озера, моря, океаны) и в почвах, где они, как правило, развиваются совместно с бактериями, жизнедеятельность которых приводит к образованию исходного субстрата нитрификации – аммиака.

Процесс нитрификации, являясь важным звеном в круговороте азота в природе, имеет как положительные, так и отрицательные стороны. Переведение азота из аммонийной формы в нитратную способствует обеднению почвы азотом, так как нитраты как весьма растворимые соединения легко вымываются из почвы. В то же время известно, что нитраты – это хорошо используемый растениями источник азота. Кроме того, связанное с нитрификацией подкисление почвы улучшает растворимость и, следовательно, доступность некоторых жизненно необходимых элементов, в первую очередь фосфора и железа.

Нитрифицирующие прокариоты косвенно участвуют в разрушении разного рода сооружений, для которых строительным материалом служат известь и цемент (т. е. различных зданий, автострад и т. д.). Это связано с тем, что нитрифицирующие прокариоты окисляют аммиак, присутствующий в атмосфере или выделяющийся из фекалий животных, до азотной кислоты.

### **Окисление восстановленных неорганических соединений серы**

Способность окислять восстановленные соединения серы обнаружена у многих прокариот. Это фототрофы, осуществляющие бескислородный фотосинтез, некоторые типичные гетеротрофные бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и др. В эту группу входят и хемолитотрофные прокариоты такие как тионовые прокариоты и бесцветные серные прокариоты.

К **тионовым прокариотам** относятся микроорганизмы родов: *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus*, *Sulfolobus* и *Acidianus*. Это одноклеточные организмы разной морфологии (палочковидные, близкие к сферическим, вибриоидные, спиралевидные) и размеров (от 0,2 – 0,3 до 3 – 4 мкм), неподвижные или подвижные (жгутикование полярное), бесспорные. Размножаются бинарным делением или почкованием. Все известные тионовые прокариоты, за исключением представителей родов *Sulfolobus* и *Acidianus* имеют клеточную стенку грамотрицательного типа. Клеточная стенка прокариот родов *Sulfolobus* и *Acidianus* не содержит муреина, а построена из белково-липидного комплекса и поэтому их в настоящее время относят к археям.

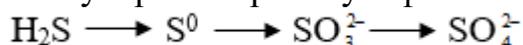
Тионовые прокариоты способны окислять с получением энергии, помимо молекулярной серы, многие ее восстановленные соединения: сероводород

(H<sub>2</sub>S), тиосульфат (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), сульфит (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), тритионат (S<sub>3</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>), тетратионат (S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>), тиоцианат (CNS<sup>-</sup>), диметилсульфид (CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub>), диметилдисульфид (CH<sub>3</sub>SSCH<sub>3</sub>), а также сульфиды тяжелых металлов. Там, где в качестве промежуточного продукта образуется S<sup>0</sup>, она всегда откладывается вне клетки.

Полное ферментативное окисление тионовыми прокариотами молекулярной серы и различных ее восстановительных соединений приводит к образованию сульфата (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>).

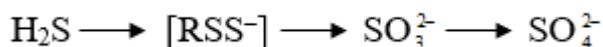
Рассмотрим как происходит окисление тионовыми прокариотами сероводорода и молекулярной серы.

**Окисление H<sub>2</sub>S** до сульфата сопровождается потерей восьми электронов, поступающих в дыхательную цепь, при этом в качестве промежуточных продуктов образуется молекулярная сера и сульфит:

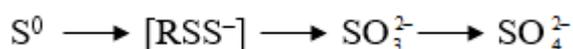


Перенос электронов сопровождается переносом протонов. Возникает электрохимический протонный градиент, разрядка которого с помощью АТФ-синтазы приводит к синтезу АТФ.

Согласно другой точке зрения, в качестве первого продукта ферментативного окисления H<sub>2</sub>S образуется связанный с мембраной сульфид-сульфгидрильный комплекс [RSS<sup>-</sup>], окисляющийся далее через сульфит до сульфата. Молекулярная сера в этом случае не является прямым продуктом окисления H<sub>2</sub>S. В этом случае окисление H<sub>2</sub>S до SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> может быть представлено следующим образом:



Если же происходит **окисление молекулярной серы**, то предполагают такие превращения:



На этапе окисления сульфита до сульфата образуется промежуточное соединение аденозинфосфосульфат (АФС):



которое в результате субстратного фосфорилирования превращается в сульфат. При этом также образуется молекула аденозиндифосфата (АДФ), в которой запасается высвобождающаяся энергия:



Далее с помощью аденилаткиназы из АДФ синтезируется АТФ.

Основное же количество энергии тионовые прокариоты получают в результате переноса образующихся при окислении восстановленной серы электронов, поступающих в дыхательную цепь, вероятнее всего, на уровне цитохрома *c*.

В большинстве случаев конечным акцептором электронов служит молекулярный кислород, т. е. они являются аэробами и энергия у них образуется в процессе аэробного дыхания. Некоторые тионовые прокариоты являются факультативными анаэробами; они могут использовать в качестве

конечного акцептора электронов не только  $O_2$ , но и нитраты, восстанавливая их до  $N_2$ . Описаны тиобациллы, которые способны расти в анаэробных условиях на средах, содержащих органические соединения, но на минеральных средах их рост возможен только в аэробных условиях.

Большинство тионовых прокариот относится к облигатным хемолитоавтотрофам. Все компоненты клетки они способны строить из  $CO_2$ , ассимилируя его в цикле Кальвина. Для таких тионовых прокариот  $CO_2$  служит основным источником углерода, а окисление неорганических восстановленных соединений серы – единственным источником энергии.

Некоторые тионовые прокариоты могут расти как в хемолитоавтотрофных, так и в хемоорганогетеротрофных условиях, используя в последнем случае в качестве источника углерода и энергии ряд органических соединений (углеводы, кислоты, спирты, аминокислоты). Описаны тионовые прокариоты, которые могут расти, используя в качестве источника углерода только органические вещества, а энергию получать за счет окисления восстановленных соединений серы, т. е. являются хемолитогетеротрофами.

У тионовых прокариот функционирует система обратного переноса электронов для синтеза НАДН (так же, как и у нитрифицирующих прокариот).

Тионовые прокариоты широко распространены в природе благодаря своей приспособленности к условиям обитания. Среди них встречаются выраженные, или облигатные, ацидофилы. Например, бактерии *Thiobacillus thiooxidans* способны расти в кислой среде с рН приблизительно 0,6; оптимальным рН для их развития является область 2 – 4, при рН 7,0 этот организм расти не может. Бактерии *Thiobacillus denitrificans*, наоборот, развиваются в нейтральной и щелочной среде. Большинство тиобацилл относится к мезофилам с оптимальной температурой роста около 30 °С. В последнее время описаны термофильные штаммы, растущие при 60 – 70 °С.

**Бесцветные серные прокариоты** относятся к классу *Alphaproteobacteria* и на основании морфологических признаков делятся на одноклеточные и нитчатые организмы.

Одноклеточные бесцветные серопроекариоты в свою очередь можно разделить на две подгруппы:

- бактерии с крупными клетками (роды *Achromatium*, *Thiovulum* и др.);
- бактерии с мелкими клетками (роды *Thiospira*, *Thiobacterium* и др.).

Среди представителей этих бактерий можно обнаружить виды со сферическими, овальными, спиралевидными или слегка изогнутыми клетками, как подвижными, так и неподвижными.

Нитчатые организмы представлены неподвижными (*Thiothrix*) или способными к скользящему движению (*Beggiatoa* и *Thioploca*) формами.

Единственным общим признаком бесцветных серных прокариот является способность откладывать серу в виде капель в периплазматическом пространстве клеток.

Из бесцветных серных прокариот достаточно хорошо изучены виды нитчатых скользящих бактерий рода *Beggiatoa*. Большинство описанных к настоящему времени видов *Beggiatoa* – это хемолитогетеротрофные бактерии

или хемоорганотрофы, не использующие энергию окисления сульфидов. Однако немногочисленные морские виды *Beggiatoa* способны расти хемолитоавтотрофно, получая энергию при окислении сульфидов и фиксируя  $\text{CO}_2$  в цикле Кальвина. В лабораторных условиях эти микроорганизмы удается культивировать на агаризованной среде с градиентом сульфидов и кислорода, где они растут в виде тонкого слоя на границе раздела зон сульфид/кислород. Обычное природное местообитание бактерий рода *Beggiatoa* – граница раздела сульфидной и кислородной зон у поверхности донных отложений. Благодаря скользящему движению их нити могут перемещаться вслед сдвигам этой границы в ходе суточного и приливного циклов.

В то же время показано, что нитчатые бесцветные серобактерии рода *Thiothrix* растут только хемолитоавтотрофно с использованием тиосульфатов, сероуглерода и некоторых производных тиофена.

Гигантские нитчатые серные бактерии рода *Thioploca*, образующие плотные маты в осадочных отложениях на морском дне, обнаружены вдоль побережья Чили. Эти бактерии формируют нити длиной до 7 см, состоящие из клеток диаметром 15 – 40 мкм и длиной до 60 мкм. Нити образуют тяжи размерами 1,5x100 – 150 мм, покрытые чехлом из слизистого полимерного вещества. Получаемый в процессе сульфатредукции в донных осадках сульфид эффективно окисляется бактериями рода *Thioploca* до сульфата. В этом процессе в качестве конечных акцепторов электронов используются нитраты, а не молекулярный кислород, так как они с избытком присутствуют в омывающей маты морской воде, а количество  $\text{O}_2$  в придонном слое недостаточно.

Серные прокариоты широко распространены в природе. Они обитают в морских и пресных водах, содержащих  $\text{O}_2$ , в аэробных слоях почв разного типа. Представителей этой группы можно встретить в кислых горячих серных источниках, кислых шахтных водах, в водоемах со щелочной средой и высокой концентрацией хлорида натрия, зонах глубоководных гидротерм. Кроме свободно живущих прокариот, окисляющих восстановленные неорганические соединения серы, существуют и симбиотические. Они обнаружены в зонах глубоководных гидротерм. В этих условиях серные прокариоты образуют симбиоз с трубчатыми червями, моллюсками и другими беспозвоночными животными, причем если моллюски, например, питаются на обильно образующейся бактериальной биомассе, то полутораметровые трубчатые черви потребляют непосредственно сульфид, который затем используют серные прокариоты, обитающие внутри клеток их тела. Симбиотические серные прокариоты широко распространены и в других экосистемах, например, как симбионты мелких моллюсков, морских ежей и других беспозвоночных животных, обитающих на границе кислородной и бескислородной зон в иле литералей. Симбиозы этих прокариот с беспозвоночными животными обнаружены и в мангровых и травяных соленых болотах, у мест просачивания нефти, в районах сброса сточных вод. Число видов беспозвоночных, в которых найдены такие эндосимбионты, достаточно велико, и список этот постоянно растет.

Окисление восстановленных соединений серы до сульфатов, осуществляемое серными прокариотами, приводит к подкислению окружающей среды. При подкислении почвы некоторые соединения, например, фосфаты, переходят в растворимую форму, что делает их доступным для растений. Окисление нерастворимых сульфидных минералов сопровождается переводом металлов в растворимую форму и это облегчает их добычу. Однако наряду с положительными последствиями активности серных прокариот наблюдаются и отрицательные, вызывающие экологические проблемы и экономический вред. К ним можно отнести сильное закисление почв, содержащих нерастворимые сульфиды и серу. Например, на территориях, отвоеванных у моря, окисление серными прокариотами присутствующего в такой почве пирита ( $\text{FeS}_2$ ) может привести к снижению в ней pH до 1, т. е. сделать ее непригодной для сельскохозяйственного использования. Другой пример – это окисление серы в составе бетона, из которого изготавливают канализационные трубы. Образующаяся при этом серная кислота растворяет входящие в состав бетона карбонаты, вызывая интенсивное разрушение канализационных систем.

В настоящее время серные прокариоты нашли практическое применение. Они используются при очистке сточных вод и выщелачивании сульфидных руд. Из них состоит в основном бактериальная популяция активного ила, освобождающего сточные воды от сульфидов путем превращения их в сульфаты.

Прокариоты, способные окислять восстановленные соединения серы принимают участие в глобальном цикле серы. Сероводород образуется в природе повсеместно в процессе сульфатредукции и аммонификации и при достижении аэробной зоны окисляется серными прокариотами. Таким образом, прокариоты, окисляющие неорганические восстановленные соединения серы, являются бактериальным газовым фильтром для сероводорода, не позволяющим ему в значительных количествах поступать в атмосферу.

### **Окисление ионов металлов**

Этот процесс осуществляют металлоокисляющие прокариоты. Наиболее изучены прокариоты, использующие энергию окисления ионов железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Большой вклад в их исследование внесли С.Н. Виноградский и М. Бейеринк.

Железопрокариоты с энергетическим метаболизмом хемолитотрофного типа делят на две группы: ацидофильные и микроаэрофильные, растущие при нейтральном pH (нейтрофильные).

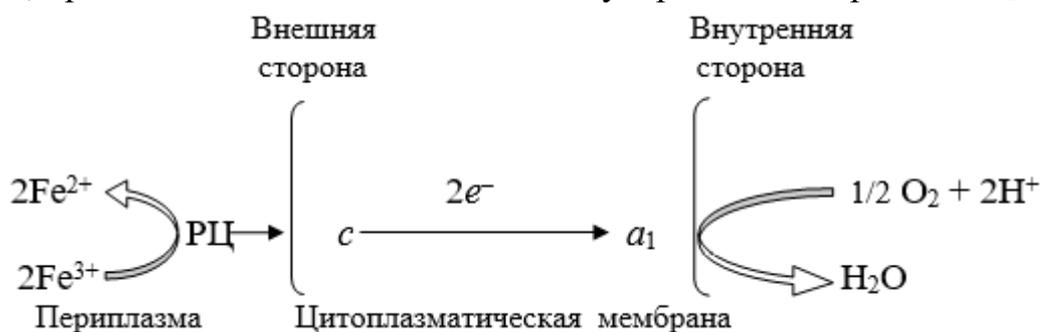
Основными представителями *ацидофильных железопрокариот* являются бактерии видов *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Leptospirillum ferruginea*. Железобактерии вида *Acidithiobacillus ferrooxidans* – грамотрицательные, бесспорные, палочковидные с полярным жгутикованием бактерии. Они способны окислять не только  $\text{Fe}^{2+}$ , но и элементарную серу, селен и уран. Облигатно ацидофильные бактерии *Leptospirillum ferruginea* в отличие от бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans* способны окислять только ионы железа.

Бактерии *Leptospirillum ferruginea* и большинство изученных штаммов бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans* являются облигатными хемолитоавтотрофами. К автотрофии за счет окисления железа способны также термофильные археи вида *Sulfolobus acidocaldarius*. Некоторые штаммы бактерий *A.ferrooxidans* способны расти на средах с органическими соединениями и являются факультативными хемолитоавтотрофами. Кроме того, среди ацидофильных прокариот имеются термофильные археи (*Acidianus brierleyi*, *Metallosphaera sedula*, *Sulfolobus solfataricus* и др.), получающие энергию в результате окисления ионов железа и нуждающиеся для роста в органических соединениях, т. е. осуществляющие метаболизм хемолитогетеротрофного типа.

Механизм окисления  $Fe^{2+}$  подробно исследован у бактерий *A. ferrooxidans*. Окисление железа в клетках этих бактерий, приводящее к получению энергии, происходит по уравнению:



Бактерии вида *A ferrooxidans* способны окислять не только  $Fe^{2+}$ , но и восстановленные соединения серы. Дыхательная цепь этих бактерий содержит все типы переносчиков, но участок, связанный с получением энергии, очень короткий. Окисление  $Fe^{2+}$  происходит на внешней стороне цитоплазматической мембраны; в цитоплазму через мембрану железо не проникает. Электроны с  $Fe^{2+}$  акцептируются особым медьсодержащим растворимым белком — **рустицианином** (РЦ), локализованным в периплазматическом пространстве. Затем с рустицианина они передаются на цитохром *c*, локализованный на внешней стороне цитоплазматической мембраны, а с него на цитохром *a*<sub>1</sub>, расположенный на внутренней стороне мембраны. Перенос электронов с цитохрома *a*<sub>1</sub> на  $1/2 O_2$ , сопровождающийся поглощением из цитоплазмы двух протонов, приводит к восстановлению молекулярного кислорода до  $H_2O$ :



Особенностью дыхательной цепи бактерий *A ferrooxidans* является отсутствие переноса через мембрану протонов, происходит перенос только электронов. Градиент  $H^+$  по обе стороны цитоплазматической мембраны у *A. ferrooxidans* поддерживается как за счет поглощения протонов из цитоплазмы, так и в результате низкого рН внешней среды, в которой обитают эти бактерии. Синтез АТФ происходит за счет движения  $H^+$  из внешней среды в цитоплазму с помощью АТФ-синтазы. Движущей силой служит в основном разность рН снаружи и внутри клетки. Для синтеза одной молекулы АТФ необходимо окислить как минимум два иона  $Fe^{2+}$ . Образование восстановителя происходит

в результате энергозависимого обратного переноса электронов. В целом для фиксации одной молекулы  $\text{CO}_2$  в цикле Кальвина необходимо окислить более 22 ионов  $\text{Fe}^{2+}$ .

Ацидофильные железобактерии широко распространены в природе и могут существовать в различных условиях: в подземных водах сульфидных месторождений, кислых водах железистых источников, кислых озерах с высоким содержанием закисного железа и др. Они в большом количестве обнаруживаются в сульфидных минералах, таких как пирит и сульфиды других металлов. При доступе кислорода и воды они сильно подкисляют среду обитания, что часто наблюдается, например, в угольных шахтах. Если кислые шахтные воды попадают в грунтовые воды, имеющие нейтральный pH, происходит выпадение в осадок основных сульфатов  $\text{Fe}^{3+}$ -ярозитов, которые снижают плодородие почвы и вызывают засорение дренажных труб. Закисление почвы при этом приводит к гибели многих живых организмов.

Ацидофильные железобактерии находят практическое применение – на их использовании основаны методы бактериального выщелачивания меди, марганца, урана, золота и других драгоценных и редких металлов из бедных руд.

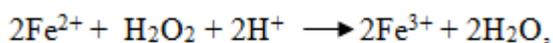
Наиболее известными представителями **нейтрофильных железобактериот** являются бактерии вида *Gallionella ferruginea* и виды рода *Leptotrix*. Они участвуют в образовании ржавых осадков (охры) в болотах и заболоченных почвах с нейтральной и слабощелочной реакцией среды. Стебельковые бактерии *Gallionella ferruginea* имеют клеточную стенку грамотрицательного типа и палочковидную форму. Обитая в железистых водах, они образуют коллоидный гидроксид железа (ферригидрит), из которого формируют стебельки разной длины. На концах стебельков располагаются клетки. Они относятся к типичным хемолитотрофам, так как используют энергию аэробного окисления  $\text{Fe}^{2+}$  для фиксации  $\text{CO}_2$  в цикле Кальвина. Нитчатые, имеющие трубковидный чехол бактерии рода *Leptotrix* окисляют  $\text{Fe}^{2+}$  с образованием вокруг нитей в большом количестве хлопьев и налетов оксидов железа ( $\text{Fe}^{3+}$ ). В массовом количестве нейтрофильные железобактерии находятся в дренажных трубах и железосодержащих ручьях. В системах водоснабжения образуют отложения, служащие причиной загрязнения питьевой воды и засорения коммуникаций.

Выделены микроорганизмы, способные окислять другие металлы. Например, автотрофное окисление сурьмы осуществляют бактерии вида *Stibiobacter senarmontii*, селена и урана – бактерии вида *Acidithiobacillus ferrooxidans* и др. Окисление ряда металлов с переменной валентностью ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Mo}^{4+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Au}^0$  и т. д.) показано для некоторых накопительных культур микроорганизмов.

Микроорганизмы, способные окислять металлы с переменной валентностью и восстановленные соединения серы, находят практическое применение в биогидрометаллургии для выщелачивания металлов из бедных руд. Суть технологии выщелачивания состоит в том, что через измельченную руду пропускают воду, содержащую металлоокисляющие прокарисы, собирают

содержащий сульфаты раствор, концентрируют его и осаждают металлы. Для этой цели используют природные микробные сообщества, состоящие из представителей родов бактерий *Acidithiobacillus* (*A. ferrooxidans* и *A. thiooxidans*), *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* и архей родов *Sulfolobus*, *Ferroplasma*, *Metallosphaera* и *Acidianus*. Микробиологические процессы используют при получении меди, урана, марганца, а также для освобождения олова и золота из нерастворимых сульфидных минералов, содержащих мышьяк.

Кроме охарактеризованных металлоксидающих прокариот, у которых окисление металлов связано с получением энергии, существуют микроорганизмы, использующие эти процессы для детоксикации пероксида водорода, который может образовываться в их клетках при окислении органических веществ. Окисление железа у таких прокариот протекает в капсулах, чехлах, слизистых выделениях, на поверхности клеточной стенки, где концентрируются все компоненты реакции: восстановленные формы железа или марганца, пероксид водорода, каталаза в соответствии с уравнениями:

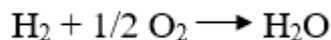


Магниточувствительные бактерии откладывают сульфид железа в магнитосомах, обеспечивая магнитотаксис.

Однако следует отметить, что ни в одном из приведенных примеров окисление железа и марганца не связано с получением энергии, в отличие от ранее рассмотренных представителей ацидофильных и нейтрофильных хемолитотрофных прокариот.

### Окисление молекулярного водорода

Этот процесс осуществляют водородные прокариоты. К водородным относятся прокариоты, способные получать энергию путем окисления молекулярного водорода с участием  $\text{O}_2$ , а все вещества клетки строить из углерода  $\text{CO}_2$ . Это хемолитоавтотрофы, растущие при окислении  $\text{H}_2$  в аэробных условиях:



Помимо окисления, для получения энергии молекулярный водород используется в конструктивном метаболизме. Соотношение между потреблением растущей культурой водородных бактерий  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$  и  $\text{CO}_2$  и синтезом вещества клеток  $[\text{CH}_2\text{O}]$  соответствует следующему уравнению:



Из уравнения видно, что на пять молекул  $\text{H}_2$ , окисленного в процессе дыхания до молекул  $\text{H}_2\text{O}$ , приходится одна молекула  $\text{H}_2$ , затрачиваемого на синтез биомассы.

Водородные микроорганизмы, окисляющие  $\text{H}_2$  в присутствии  $\text{O}_2$ , весьма гетерогенная с таксономической точки зрения группа. Она включает преимущественно грамотрицательные бактерии (протеобактерии), среди

которых наиболее распространены представители рода *Alcaligenes* (*A. eutrophus*, *A. paradoxus*) и *Pseudomonas* (*P. facilis*, *P. saccharophila*, *P. carboxidovorans*, *P. carboxidoflava* и др.). Среди грамотрицательных бактерий окислять водород в аэробных условиях способны также представители родов *Aquaspirillum*, *Xanthobacter*, *Hydrogenobacter*, *Hydrogenophaga*, *Paracoccus*, *Derxia*, *Rhizobium*, среди грамположительных – *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus* и др. Окислять водород могут и археи вида *Aquifex pyrophilus*.

Водородные прокариоты – факультативные хемолитоавтотрофы, использующие в качестве источника углерода и энергии также разнообразные органические соединения. Ассимиляция  $\text{CO}_2$  у большинства водородных прокариот происходит в цикле Кальвина. Исключение из этого правила составляют прокариоты видов *Hydrogenobacter thermophilus*, *Aquifex pyrophilus*, которые ассимилируют  $\text{CO}_2$  через восстановительный цикл трикарбоновых кислот. Водородные прокариоты, растущие на органических соединениях, имеют тот же метаболический аппарат, что и хемоорганогетеротрофные прокариоты. Метаболизм органических соединений у разных представителей этой группы осуществляется с помощью гликолитического, окислительного пентозофосфатного и Энтнера – Дудорова путей, а также цикла Кребса и глиоксилатного шунта.

Все водородные прокариоты способны потреблять аммиак, многие представители – мочевины, нитраты, нитриты, разные аминокислоты и азотистые основания. Некоторые штаммы способны к фиксации молекулярного азота.

Большинство водородных прокариот относится к облигатным аэробам. Однако среди них преобладают виды, тяготеющие к низким концентрациям  $\text{O}_2$  в среде. Особенно чувствительны к  $\text{O}_2$  водородные прокариоты, растущие хемолитоавтотрофно, а также в условиях фиксации молекулярного азота. Это объясняется инактивирующим действием молекулярного кислорода на гидрогеназу и нитрогеназу – ключевые ферменты метаболизма  $\text{H}_2$  и фиксации  $\text{N}_2$ .

Водородные прокариоты, как правило, мезофилы с температурным оптимумом для роста 30 – 35 °С. Некоторые виды – термофилы, растущие при температуре 50 °С и даже 70 °С. Нейтрофилы с оптимальным рН для роста 6,5 – 7,5.

Окисление водорода связано с наличием гидрогеназ, которые в клетке могут находиться в растворимом или связанном с мембранами состоянии. Большинство водородных прокариот содержит только одну форму фермента – мембраносвязанную. Однако есть виды, имеющие обе формы или только водорастворимую (цитоплазматическую) гидрогеназу.

Оба типа гидрогеназ детально исследованы у бактерий вида *Alcaligenes eutrophus*. Мембраносвязанный фермент состоит из большой (67 кД) и малой (35 кД) субъединиц, связанных с мембраной через цитохром b-подобный якорный белок. Большая субъединица фермента содержит Ni-Fe-активный центр. Малая субъединица содержит несколько FeS-кластеров, через которые

электроны, полученные при окислении водорода в Ni-Fe-активном центре, передаются на цитохром *b* и далее в дыхательную цепь. Водорастворимая гидрогеназа также относится к классу Ni-Fe-гидрогеназ. Она состоит из двух функциональных димерных частей – гидрогеназы и НАДН-оксидоредуктазы (диафоразы). Гидрогеназная часть высокоомологична мембраносвязанной гидрогеназе, диафоразный комплекс – НАДН: убихинон-редуктазе дыхательных цепей. Установлено, что гены, ответственные за синтез обеих гидрогеназ, локализованы в конъюгативной мегаплазмиде (450 т. п. н.) и это создает возможность их горизонтального переноса в микробных сообществах. Таким межвидовым переносом генов может частично объясняться широкое распространение способности окислять водород среди микроорганизмов.

Если водородные прокариоты содержат обе формы гидрогеназ, то функции между ними четко разделены. Мембраносвязанная гидрогеназа, катализирующая реакцию поглощения  $H_2$ , передает электроны в дыхательную цепь на уровне цитохрома *b* и, таким образом, имеет непосредственное отношение к энергетическим процессам. Водорастворимая гидрогеназа переносит электроны на молекулы  $НАД^+$ , которые участвуют далее в различных биосинтетических реакциях. Показано, что у прокариот, обладающих гидрогеназами обоих типов, выход биомассы при окислении водорода выше, чем у микроорганизмов, содержащих только мембраносвязанный фермент.

Водородные прокариоты, содержащие только мембраносвязанную гидрогеназу, восстанавливают  $НАД^+$  путем обратного транспорта электронов с затратой энергии.

Если же водородные прокариоты содержат только водорастворимую гидрогеназу, то она выполняет обе функции: часть восстановительных эквивалентов с НАДН поступает в дыхательную цепь, другая расходуется по каналам конструктивного метаболизма.

Таким образом, из всех хемолитоавтотрофных прокариот только водородные прокариоты с помощью растворимой гидрогеназы могут осуществлять непосредственное восстановление  $НАД^+$  окислением неорганического субстрата. У всех остальных групп НАДН образуется с использованием механизма обратного транспорта электронов.

Водородные прокариоты играют незаменимую роль в природе, участвуя в круговороте водорода. Они также рассматриваются как перспективные объекты биотехнологии, поскольку способны на дешевых минеральных субстратах с высокой эффективностью образовывать биомассу, а также синтезировать органические кислоты, аминокислоты, витамины, ферменты и др. Белки водородных прокариот полноценны по аминокислотному составу, легко усваиваются животными и могут использоваться в качестве кормовых белков. Представители бактерий рода *Alcaligenes*, кроме того, способны синтезировать из  $H_2$  и  $CO_2$  и накапливать в клетках большие количества поли- $\beta$ -гидроксибутирата – пластичного природного полимера.

## Окисление оксида углерода

Этот процесс осуществляют карбоксидопрокариоты. Это аэробные прокариоты, способные расти, используя оксид углерода (СО) в качестве единственного источника углерода и энергии. Такое свойство характерно для некоторых представителей родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Azomonas*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Hydrogenophaga* и др.

Карбоксидопрокариоты – факультативные хемолитоавтотрофы, так как они могут расти автотрофно, ассимилируя СО<sub>2</sub> в цикле Кальвина, а также использовать в качестве единственного источника углерода и энергии различные органические соединения.

При выращивании на среде с СО<sub>2</sub> в качестве единственного источника углерода многие карбоксидопрокариоты могут получать энергию окисляя молекулярный водород. В большинстве случаев рост таких прокариот на среде с СО<sub>2</sub> + Н<sub>2</sub> происходит активнее, чем на среде с СО. Поэтому карбоксидопрокариоты рассматривают как особую физиологическую подгруппу водородных прокариот.

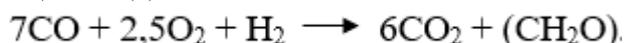
Некоторые виды карбоксидопрокариот (в частности, некоторые виды бактерий рода *Rhizobium*) способны окислять СО, используя в качестве альтернативных акцепторов электронов нитраты, и осуществлять денитрификацию.

Для карбоксидопрокариот вида *Hydrogenophaga pseudoflava* установлен миксотрофный рост с использованием Н<sub>2</sub> или СО как доноров электронов и пирувата в качестве органического субстрата.

Окисление СО карбоксидопрокариотами осуществляется в соответствии с уравнением:



СО<sub>2</sub> далее ассимилируется в цикле Кальвина. Суммарное уравнение окисления СО и синтеза клеточной биомассы карбоксидопрокариот можно представить в следующем виде:



где (СН<sub>2</sub>О) – символ биомассы.

Окисление СО карбоксидопрокариотами осуществляется с помощью специфического фермента – СО-дегидрогеназы. Этот фермент хорошо изучен у типичного представителя карбоксидобактерий *Pseudomonas carboxydovorans*. СО-дегидрогеназа имеет молекулярную массу 230 – 300 кД и содержит в качестве кофактора молибденсодержащий птерин (бактоптерин). СО-дегидрогеназа бактерий *P. carboxydovorans*, локализованная внутри цитоплазматической мембраны, передает электроны от СО в дыхательную цепь на уровне цитохрома *b*. Поскольку СО инактивирует обычные цитохромоксидазы, при его окислении используется особая, не чувствительная к СО цитохромоксидаза, на которую электроны передаются через цитохром *b*<sub>563</sub>. Перенос двух электронов от СО на цитохромоксидазу сопровождается транслокацией через цитоплазматическую мембрану четырех протонов. Образование НАДН происходит путем обратного переноса электронов. При

окислении карбоксиобактериями  $H_2$  используется энергетически более эффективная ветвь дыхательной цепи: электроны с участием цитохрома с передаются на цитохромоксидазу типа *a*. При этом перенос двух электронов сопровождается переносом через мембрану шести протонов.

Карбоксидопротокарियोты приносят существенную пользу, улучшая экологическую ситуацию благодаря своей способности очищать атмосферу от токсичного оксида углерода, который в больших количествах присутствует в составе выхлопных газов, выбросах многих промышленных предприятий, извержениях вулканов, а также появляется в природе при горении лесов.

### **Использование микроорганизмами одноуглеродных соединений**

Микроорганизмы способны использовать в качестве источника углерода и энергии одноуглеродные, или  $C_1$ -соединения. К таким веществам относятся метан ( $CH_4$ ), метанол ( $CH_3OH$ ), формальдегид ( $HCHO$ ), формиат ( $HCOOH$ ), метиламин ( $CH_3NH_2$ ), хлорметан ( $CH_3Cl$ ), цианид калия ( $KCN$ ) и др. В большинстве этих соединений углерод представлен в виде метильной группы, поэтому микроорганизмы, использующие их, и получили название метилотрофов.

Метилотрофные микроорганизмы распространены повсеместно, это связано с тем, что практически везде в природе имеются  $C_1$ -соединения. Например, ежегодно в атмосферу поступает  $10^{15}$  г метана (из болот, прудов, органического ила, промышленных отходов, недр земли, из желудков жвачных животных и др.). Однако в атмосфере он не накапливается, его используют метаноокисляющие бактерии. Метан, кроме того, подвергается фотоокислению с образованием метанола. В природе обнаруживаются также формальдегид, формиат, формамид, цианиды и их соли,  $CO$ , метиламины, что также определяет места распространения метилотрофов.

Метилотрофные микроорганизмы составляют таксономически неоднородную, не связанную родством группу и включают грамположительные, грамотрицательные бактерии и дрожжи.

По способности использовать  $C_1$  и другие углеродные соединения метилотрофные бактерии делятся на две основные группы: облигатные и факультативные. Облигатные метилотрофы способны расти только на одноуглеродных субстратах. Группа факультативных метилотрофов включает бактерии, которые наряду с одноуглеродными могут использовать и некоторые полиуглеродные соединения.

Облигатные метилотрофные бактерии входят в состав родов: *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Methylophaga*, *Methylovorus* и *Methylobacterium*. Это в основном грамотрицательные зубактерии с разной морфологией и размерами клеток, подвижные и неподвижные. Облигатные аэробы. Тип метаболизма – дыхательный. Каталазо- и оксидазоположительные. При росте на метаноле имеют сложную систему внутрицитоплазматических мембран двух типов: мембраны первого типа представлены стопками плотно упакованных везикулярных дисков, распределенных во всей цитоплазме; мембраны второго

типа имеют вид ламелл, расположенных по периферии клетки. Отличительные признаки родов облигатных метилотрофных бактерий приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Отличительные признаки облигатных метилотрофных бактерий

Признаки	Роды		
	<i>Methylococcus</i> <i>Methylomonas</i>	<i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i>	<i>Methylovorus</i> <i>Methylobacillus</i> <i>Methylophilus</i> <i>Methylophaga</i> <i>Methylobacterium</i>
Упаковка внутрицитоплазматических мембран	Первый тип	Второй тип	Первый тип
Цикл трикарбоновых кислот	Неполный (не содержат $\alpha$ -кетоглутарат-дегидрогеназы)	Полный	Неполный (не содержат $\alpha$ -кетоглутарат-дегидрогеназы)
Покоящиеся формы	Цисты	Экзоспоры	Не имеют
Основной путь ассимиляции $C_1$ -соединений	Рибулозомонофосфатный путь	Сериновый путь	Восстановительный пентозофосфатный путь (цикл Кальвина)
Длина углеродной цепи жирных кислот	16 углеродных остатков	18 углеродных остатков	16 углеродных остатков

К факультативным метилотрофам относятся некоторые представители родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Nocardia*, *Hyphomicrobium*, *Brevibacterium* и др. Это различные по морфологии, окраске по Граму, подвижные или неподвижные бактерии, единственным общим признаком которых является способность расти на  $C_1$ -соединениях.

Использование метилотрофами  $C_1$ -соединений в конструктивном и энергетическом метаболизме привело к формированию у них специфических путей их ассимиляции и окисления.

Процесс полного окисления метана может быть представлен в виде следующей схемы (рисунок 38).

Формальдегид у метилотрофных бактерий является ключевым метаболитом, на уровне которого расходятся конструктивные и энергетические пути. Часть формальдегида превращается в вещества клетки по специфическим для метилотрофов ассимиляционным циклическим путям (рибулозомонофосфатному, сериновому и восстановительному пентозофосфатному), большая часть окисляется через формиат до  $CO_2$ , что приводит к образованию АТФ.

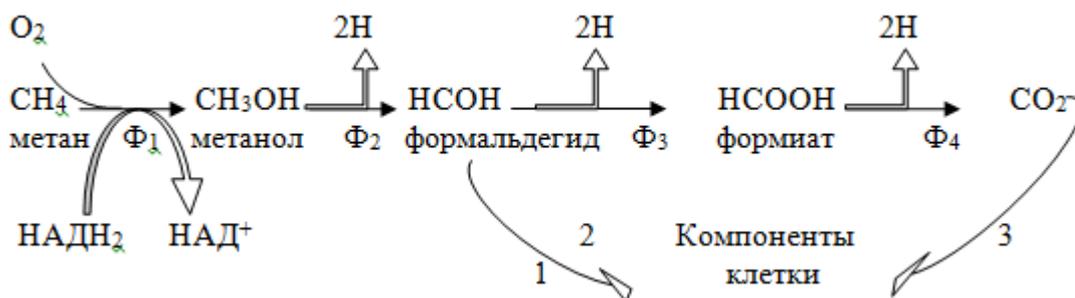


Рисунок 38 – Окисление метана и связь энергетического и конструктивного метаболизма у метилотрофов:

$\Phi_1$  – метанмонооксигеназа;  $\Phi_2$  – метанолдегидрогеназа;  $\Phi_3$  – формальдегиддегидрогеназа;  $\Phi_4$  – формиатдегидрогеназа.

Ассимиляционные циклы: 1 – рибулозомонофосфатный, 2 – сериновый, 3 – восстановительный пентозофосфатный

Как уже отмечалось, у метилотрофов функционируют три циклических пути ассимиляции  $C_1$ -соединений, ответственных за превращение их в вещества клетки: восстановительный пентозофосфатный, рибулозомонофосфатный и сериновый. Восстановительный пентозофосфатный цикл (цикл Кальвина) (см. рисунок 52) у метилотрофных бактерий не имеет широкого распространения и обнаружен только у представителей, способных расти автотрофно, а также у использующих формиат. В этом цикле происходит ассимиляция  $CO_2$ , полученного при окислении  $C_1$ -соединений. В рибулозомонофосфатном (гексулозофосфатном) и сериновом циклах осуществляется непосредственное включение формальдегида, образующегося при окислении разных  $C_1$ -соединений. Эти циклические пути ассимиляции формальдегида названы по первому продукту, который синтезируется в них. В рибуломонофосфатном цикле (рисунок 39) в результате акцептирования формальдегида молекулой рибулозо-5-фосфата образуется гексулозо-6-фосфат, который затем изомеризуется во фруктозо-6-фосфат. Ферменты гексулозофосфатсинтаза и фосфогексулозоизомераза, катализирующие эти реакции, специфичны для этого цикла ассимиляции  $C_1$ -соединений. Далее молекулы фруктозо-6-фосфата подвергаются фосфорилированию с образованием фруктозо-1,6-дифосфата, который альдолаза расщепляет на две молекулы фосфотриозы: фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) и фосфодиоксиацетон.

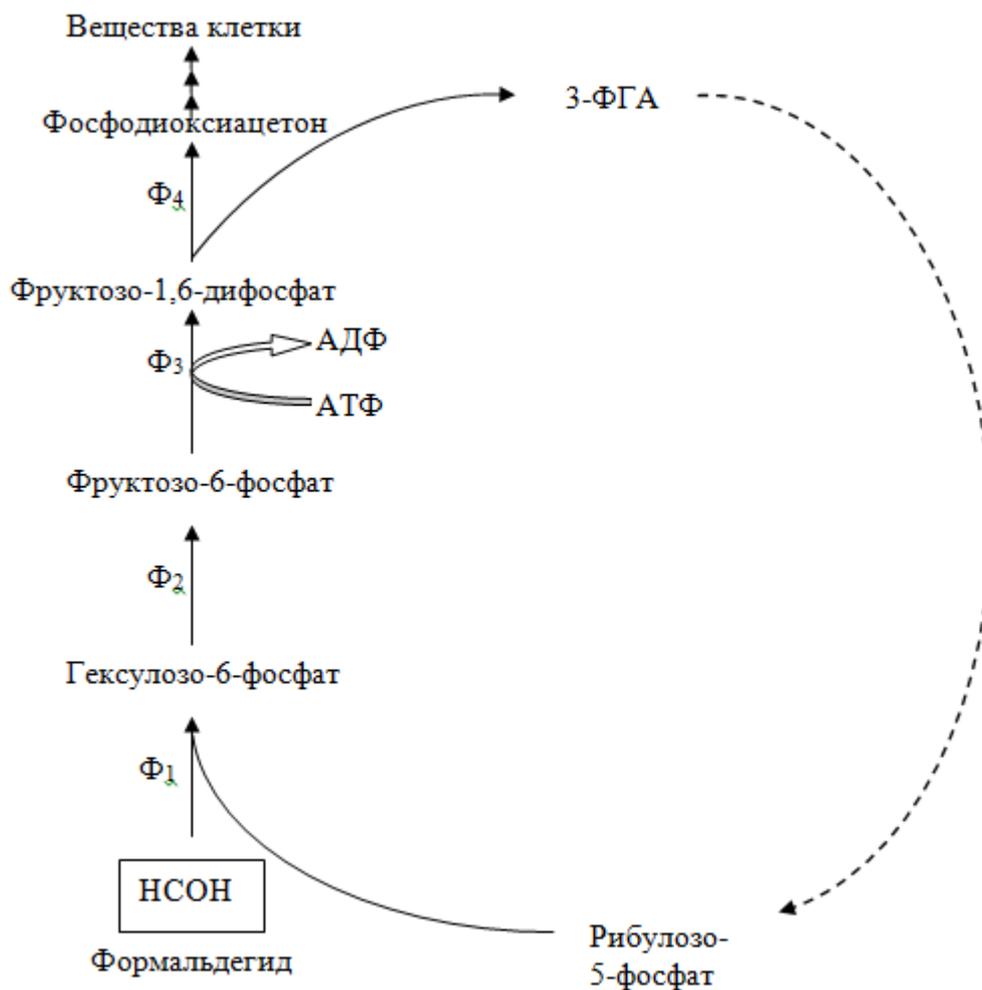


Рисунок 39 – Рибулозомонофосфатный цикл ассимиляции формальдегида метилотрофами:

$\Phi_1$  – гексулозофосфатсинтаза;  $\Phi_2$  – фосфогексулоизомераза;  $\Phi_3$  – фосфофруктокиназа;  $\Phi_4$  – фруктозодифосфатальдотлаза; прерывистой линией обозначены реакции регенерации рибулозо-5-фосфата

Фосфодиоксиацетон используется в реакциях биосинтеза, а фосфоглицериновый альдегид – для регенерации рибулозо-5-фосфата, акцептора формальдегида. Реакции регенерации молекул рибулозо-5-фосфата аналогичны таковым цикла Кальвина (см. рисунок 52).

Ключевой реакцией серинового пути фиксации формальдегида является его конденсация с глицином в присутствии тетрагидрофолиевой кислоты, приводящая к образованию серина (рисунок 40).

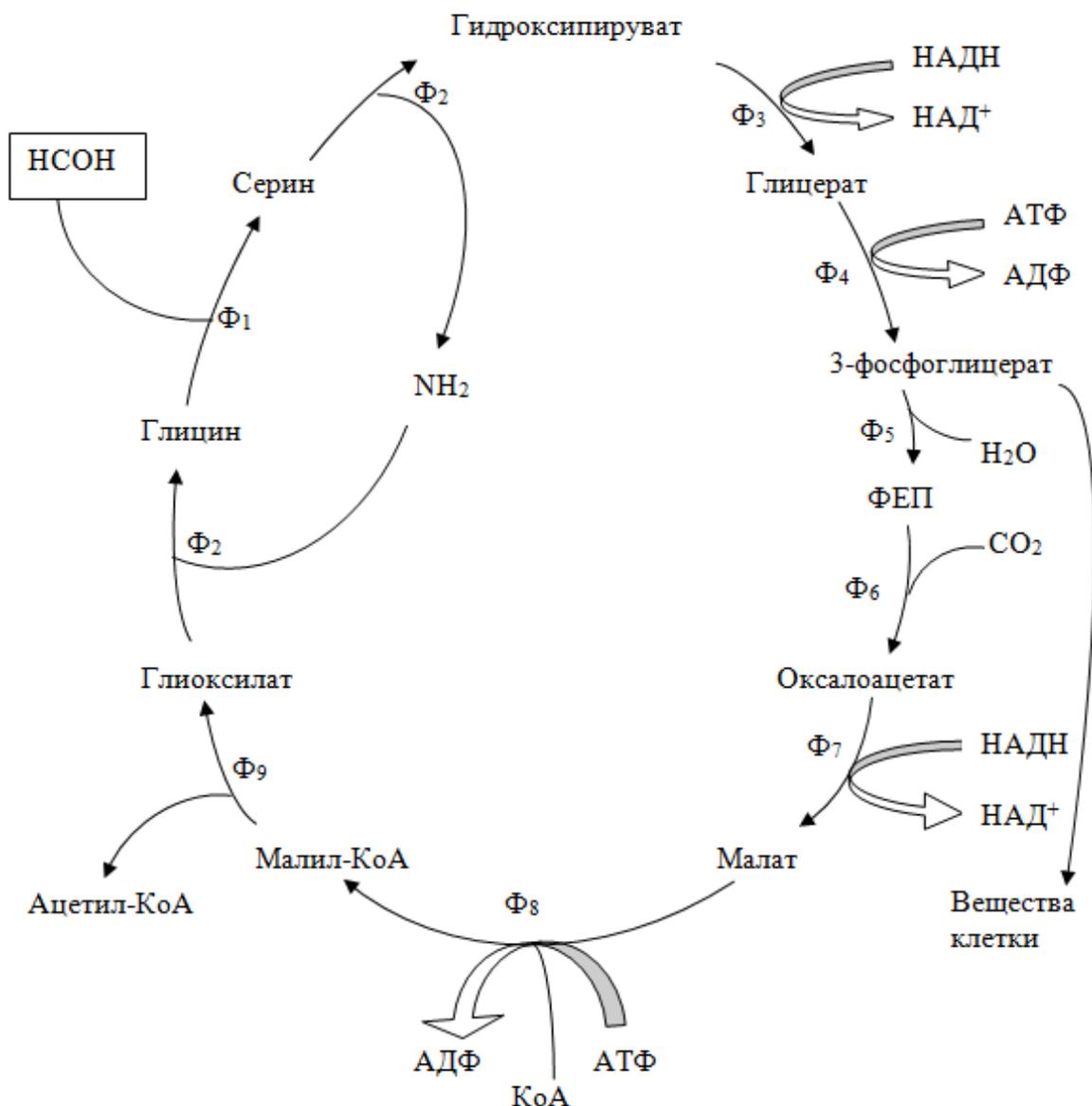


Рисунок 40 – Сериновый цикл ассимиляции формальдегида метилотрофами:  
 $\Phi_1$  – серингидроксиметилаза;  $\Phi_2$  – трансаминаза, превращающая серин в гидроксипируват и глиоксилат в глицин;  $\Phi_3$  – гидроксипируватредуктаза;  $\Phi_4$  – глицераткиназа;  
 $\Phi_5$  – фосфоглицераткиназа и енолаза;  $\Phi_6$  – ФЕП-карбоксилаза;  $\Phi_7$  – малатдегидрогеназа;  
 $\Phi_8$  – малил-КоА-синтаза;  $\Phi_9$  – малил-КоА-лиаза

Серин далее в реакции трансаминирования превращается в гидроксипируват, последовательное восстановление и фосфорилирование которого приводит к образованию 3-фосфоглицерата. Затем одна часть молекул 3-фосфоглицерата идет на синтез вещества клетки, другая превращается в фосфоенолпируват (ФЕП). Последний карбоксилируется путем включения второй одноуглеродной группы из  $\text{CO}_2$  с образованием оксалоацетата. Оксалоацетат восстанавливается до малата, который при участии малил-КоА-синтазы и АТФ превращается в малил-КоА. Малил-КоА расщепляется малил-КоА-лиазой на глиоксилат и молекулу ацетил-КоА – конечный продукт серинового пути, в котором один из углеродных атомов ацетильного остатка

происходит из  $\text{CO}_2$ , а другой из формальдегида. Глиоксилат вступает в реакцию переаминирования с серином, которая обеспечивает регенерацию глицина, и цикл замыкается.

В окислительном метаболизме  $\text{C}_1$ -соединений у метилотрофов участвуют следующие переносчики дыхательной цепи: флавопротеины, хиноны, цитохромы типа *a*, *b*, *c*, *o*. Количество энергии, выделяющейся при окислении  $\text{C}_1$ -соединений соответствующими дегидрогеназами, определяется местом поступления электронов в дыхательную цепь. При окислении метанола в формальдегид метанолдегидрогеназой электроны поступают в дыхательную цепь на уровне цитохрома *c*. Это приводит к синтезу одной молекулы АТФ. На какие переносчики дыхательной цепи передаются электроны от формальдегида и формиата пока неизвестно.

К метилотрофии способны и некоторые эукариотические микроорганизмы. В 1969 г. японскими учеными были открыты метилотрофные дрожжи. В природных условиях они обитают в садовых почвах и осуществляют жизнедеятельность, используя метанол, образующийся при гидролизе пектина. В настоящее время установлено, что к метилотрофии способны 18 видов рода *Candida* (наиболее изученный – *C. methylica*), девять видов рода *Hansenula* (*H. polymorpha*, *H. capsulata*, *H. minuta* и др.), шесть видов рода *Pichia* (*P. pinus*, *P. pastoris* и др.), а также *Saccharomyces* sp., *Rhodotorula* sp., *Sporobolomyces roseus* и *S. gratalis*. Из мицелиальных грибов метилотрофами являются *Trichoderma lignorum*, *Gliocladium deliquescens*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium* sp., способные к росту на средах с метанолом.

При росте на среде с метанолом у дрожжей обнаруживается много пероксисом, заполняющих цитоплазму, а все органеллы сдвинуты к одному из полюсов клетки. **Пероксисома** – это покрытая трехслойной белковой оболочкой структура, содержащая два фермента – алкогольоксидазу и каталазу. В пероксисомах из метанола образуется формальдегид и пероксид водорода, расщепляющийся каталазой. Часть формальдегида ассимилируется в пероксисоме, а часть переносится из пероксисомы в цитоплазму, где связывается с восстановленным глутатионом и затем последовательно окисляется до  $\text{CO}_2$ .

Метилотрофные микроорганизмы находят широкое практическое применение и являются перспективными объектами биотехнологии. Биомасса метилотрофов характеризуется достаточно высоким содержанием белка и незаменимых аминокислот, например, содержание лизина достигает 5,8 % сухой массы. Перевариваемость бактериальной биомассы составляет 85–98 %, поэтому ее можно использовать в качестве кормовой добавки.

Промышленное значение имеет также биотрансформация метилотрофами органических веществ. Имобилизованные бактерии, клеточные экстракты или очищенные ферменты окисления  $\text{C}_1$ -соединений катализируют неспецифическое окисление ряда соединений: ароматических, алициклических и гетероциклических углеводов, фенолов, спиртов с длинной углеродной цепью. При биотрансформации получают продукты, имеющие потенциальное

промышленное значение, например из пропилена пропиленоксид, который является субстратом для синтетических полимеров.

Метилотрофы являются продуцентами аминокислоты серина, витамина В<sub>12</sub>, убихинонов Q<sub>8</sub>, Q<sub>9</sub>, Q<sub>10</sub>, метаксина, поли-β-гидроксибутирата и внеклеточных полисахаридов. Например, выход полисахаридов составляет более 30 % по отношению к массе субстрата. При определенных условиях выращивания до 66 % биомассы метилотрофных бактерий составляет поли-β-гидроксибутират – полимер, имеющий промышленное значение как заменитель пластмасс, но подверженный биодеградации.

Перспективно также использование метилотрофных бактерий в качестве биокатализаторов для обнаружения выбросов метана в угольных шахтах, для очистки сточных вод от метилсодержащих соединений. Наконец, метилотрофы могут служить хорошей основой для создания генно-инженерных штаммов – продуцентов эукариотических белков медицинского и ветеринарного назначения. Показано, что уровень экспрессии некоторых генов (например, интерферонов) в метилотрофных бактериях выше, чем в бактериях *E. coli*.

#### **1.3.1.11. Использование микроорганизмами солнечной энергии**

Физиологическая группа фотосинтезирующих прокариотических организмов представлена пурпурными и зелеными бактериями, большой группой цианобактерий и гелиобактериями. В эту группу могут быть включены и экстремально галофильные археи, для которых солнечный свет служит дополнительным источником энергии при недостатке O<sub>2</sub>.

Преобразование световой энергии в энергию химических связей может осуществляться при фотосинтезе трех типов:

- с помощью бактериохлорофиллов без выделения молекулярного кислорода (бескислородный, или аноксигенный, фотосинтез). Этот тип фотосинтеза осуществляют пурпурные и зеленые бактерии, гелиобактерии;

- с помощью хлорофиллов, с выделением молекулярного кислорода (кислородный, или кислородный, фотосинтез). Кислородный фотосинтез, связанный со способностью использовать в качестве донора электронов молекулы воды, присущ большой группе цианобактерий;

- с помощью белка бактериородопсина, ковалентно связанного с каротиноидом ретиналем («бесхлорофилльный фотосинтез»). Этот процесс не сопровождается выделением молекулярного кислорода. Он характерен для экстремально галофильных архей.

Способность организмов существовать за счет энергии света в первую очередь связана с наличием у них специфических пигментов.

Набор пигментов специфичен и постоянен для определенных групп фотосинтезирующих прокариот. Соотношения же между отдельными типами пигментов колеблются в зависимости от вида и условий культивирования. В целом фотосинтетические пигменты прокариот обеспечивают поглощение света с длиной волны 300 – 1100 нм. Все фотосинтетические пигменты относятся к двум химическим классам соединений: 1) пигменты, в основе которых лежит тетрапиррольная структура (хлорофиллы, фикобилины); 2) пигменты, основу которых составляют полиизопреноидные цепи (каротиноиды).

У фотосинтезирующих прокариот известно более десяти видов хлорофиллов. Хлорофиллы прокариот, осуществляющих бескислородный фотосинтез (пурпурные и зеленые бактерии, гелиобактерии), получили общее название **бактериохлорофиллов**. В настоящее время идентифицировано шесть основных видов бактериохлорофиллов: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* и *g*. Клетки пурпурных бактерий в зависимости от вида содержат только одну форму бактериохлорофилла – либо *a*, либо *b*. Клетки зеленых бактерий всегда содержат два типа бактериохлорофилла – основной и минорный. В зависимости от вида бактерий основным может быть бактериохлорофилл *c*, *d* или *e*. Роль основного бактериохлорофилла заключается в поглощении света. Минорным пигментом у всех зеленых бактерий является бактериохлорофилл *a*; он входит в состав фотохимических реакционных центров. Необычный бактериохлорофилл *g* с максимумом поглощения 790 нм обнаружен у облигатных анаэробных фотосинтезирующих гелиобактерий. Прокариоты, фотосинтез которых сопровождается выделением молекулярного кислорода (цианобактерии и прохлорофиты), содержат хлорофиллы, характерные для фотосинтезирующих эукариотических организмов. У цианобактерий – это хлорофилл *a* или хлорофиллы *a* и *b*.

К фотосинтетическим пигментам относятся и фикобилины – красные и синие пигменты, содержащиеся только у одной группы прокариот – цианобактерий. Структурные формулы фикобилинов (фикоцианобилина и фикоэритробилина) представлены на рисунке 41.

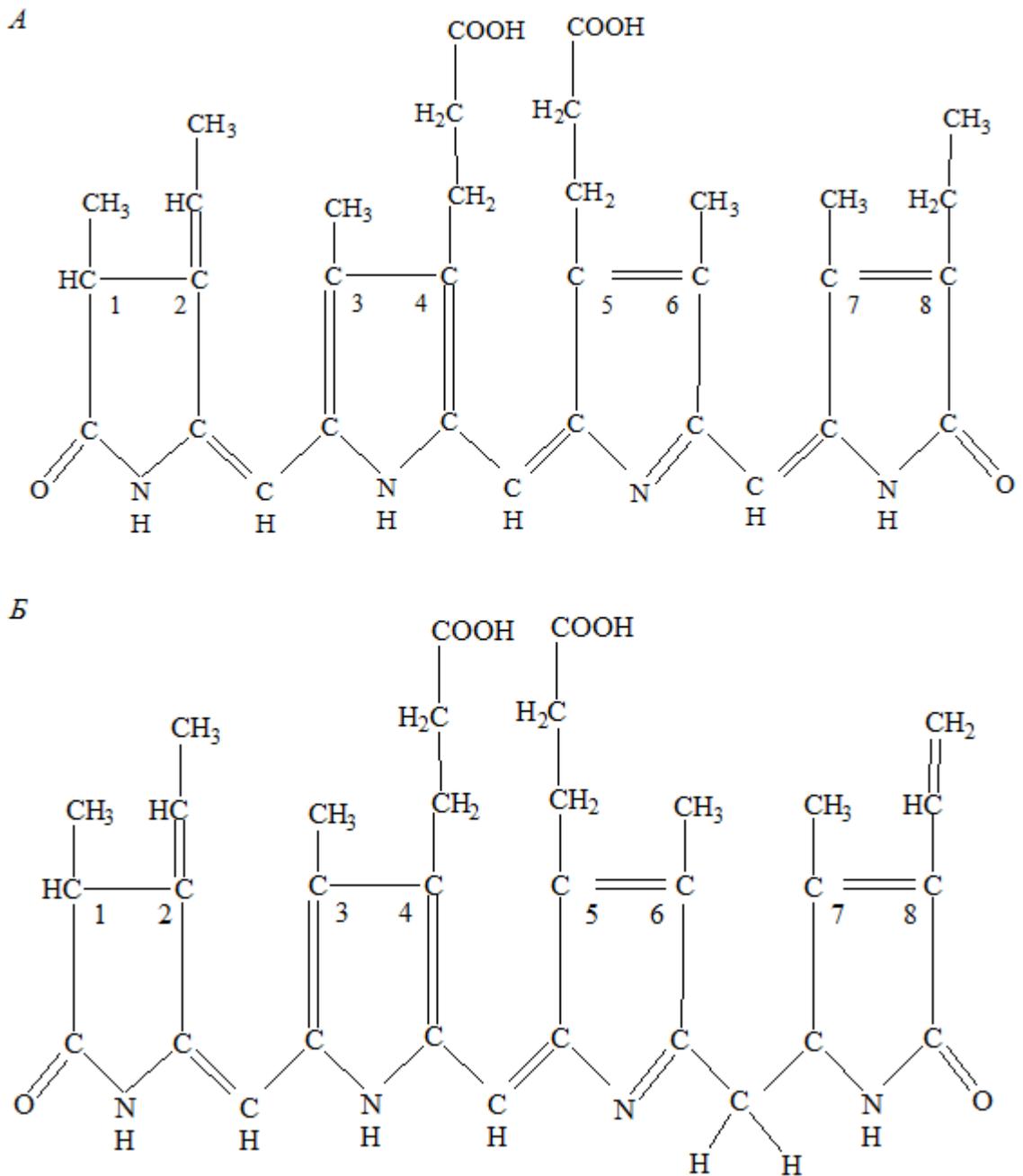


Рисунок 41– Фикобилины цианобактерий:

А – фикоцианобилин (фикоцианин); Б – фикоэритробилин (фикоэритрин)

К фикобилинам относится и аллофикоцианин. Он назван так потому, что его сначала принимали за одну из форм фикоцианина. Фикобилины поглощают свет в широком диапазоне длин волн (450 – 700 нм) и разделяются по спектрам поглощения на три класса. Два голубых пигмента аллофикоцианин и фикоцианин, максимумы поглощения которых находятся в области относительно больших длин волн, встречаются у всех цианобактерий. У некоторых представителей этих групп имеется и красный пигмент фикоэритрин, поглощающий в более коротковолновой области спектра. Фикобилины связаны ковалентной связью с белком, поэтому в клетках цианобактерий находятся в виде молекул – фикобилипротеинов.

Фикобилипротеины находятся в особых гранулах, называемых **фикобилисомами**, которые расположены на внешней поверхности тилакоидов. Энергия поглощаемого этими пигментами света с очень высокой эффективностью переносится в содержащие хлорофилл фотохимические реакционные центры, расположенные в тилакоидах. Эти три класса фикобилинов, различающихся по спектрам поглощения, составляют цепь переноса энергии в фикобилисомах (рисунок 42).

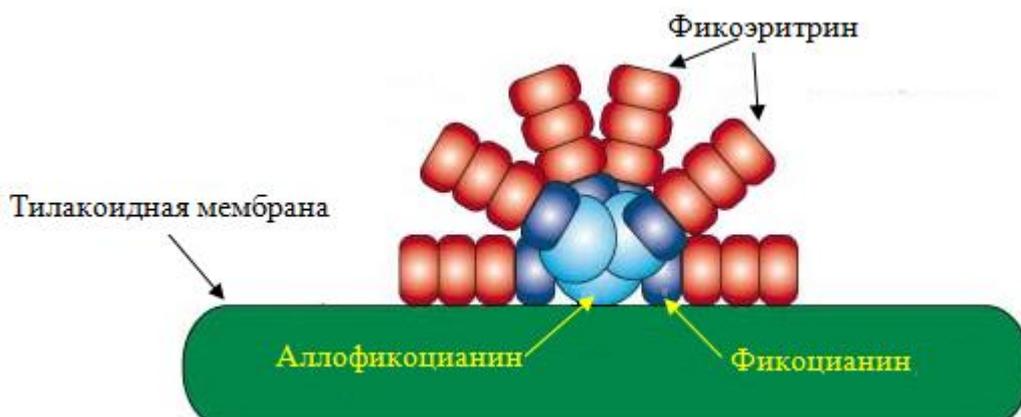


Рисунок 42 – Схематическое изображение части тилакоида с прикрепленной фикобилисомой

К вспомогательным фотосинтетическим пигментам, которые содержат все прокариоты, относятся каротиноиды. Большинство из них построено на основе конденсации восьми изопреноидных остатков. У некоторых каротиноидов полиизопреноидная цепь открыта и не содержит циклических группировок. Такие каротиноиды называются **алифатическими**. У большинства каротиноидов на одном или обоих концах цепи расположено по ароматическому (**арильные**) или  $\beta$ -ионовому (**алициклические**) кольцу. Выделяют также каротиноиды, не содержащие в молекуле кислорода, и кислородсодержащие, которые называются **ксантофиллами**.

Состав каротиноидов фотосинтезирующих прокариот весьма разнообразен. Наряду с пигментами, одинаковыми у разных групп, для каждой из них обнаружены уникальные каротиноиды или их наборы. Наиболее разнообразен состав каротиноидных пигментов у пурпурных бактерий, из клеток которых выделено свыше 50 типов каротиноидов. В клетках большинства пурпурных бактерий содержатся только алифатические каротиноиды, многие из которых принадлежат к группе ксантофиллов. Зеленые бактерии по составу каротиноидов отличаются от пурпурных. Основные каротиноиды зеленых бактерий – арильные, содержащие одно или два ароматических кольца.

Каротиноидные пигменты поглощают свет в синем и зеленом участках спектра, т. е. в области длин волн 400 – 550 нм. Как и хлорофиллы, эти пигменты локализованы в мембранах и связаны с мембранными белками без образования ковалентных связей. Функции каротиноидов фотосинтезирующих прокариот многообразны. В качестве вспомогательных фотосинтетических

пигментов каротиноиды поглощают кванты света в коротковолновой области спектра, которые затем передаются на хлорофилл. Для некоторых галофильных бактерий показана способность ретиналя в комплексе с бактериородопсином осуществлять особый бесхлорофилльный тип фотосинтеза. Известно участие каротиноидов в осуществлении реакций фототаксиса, а также в защите клетки от токсических эффектов синглетного (атомарного) кислорода.

Рассмотрим структурную организацию фотосинтетического аппарата прокариот.

У каждой из основных групп прокариот фотосинтетический аппарат организован по-разному. Это определяется тем, какие пигменты входят в его состав, какие вещества являются переносчиками электронов и где локализованы фотохимические реакционные центры.

Фотосинтетический аппарат состоит из трех основных компонентов:

- светособирающих пигментов, поглощающих энергию света и передающих ее в реакционные центры;
- фотохимических реакционных центров, где происходит трансформация электромагнитной формы энергии в химическую;
- фотосинтетических электронтранспортных систем, обеспечивающих перенос электронов, сопряженный с запасанием энергии в молекулах АТФ.

Два первых компонента фотосинтетического аппарата состоят из пигментов (таблица 5). Фотосинтетические электронтранспортные системы у разных групп бактерий содержат свои специфические переносчики и будут рассмотрены ниже.

Таблица 5 – Функции различных пигментов в фотосинтезе

Пигменты		Пурпурные бактерии	Зеленые бактерии	Гелиобактерии	Цианобактерии
Светособирающие	Хлорфиллы	Бактериохлорофилл <i>a</i> или <i>b</i>	Бактериохлорофиллы <i>a + c</i> , <i>a + d</i> , <i>a + e</i>	бактериохлорофилл <i>g</i>	Хлорофилл <i>a</i> или <i>a + b</i>
	Фикобилипротеины	Нет	Нет	Нет	Фикоцианин, аллофикоцианин, фикоэритрин
	Основные каротиноиды	Алифатические и арильные	Арильные и алициклические	Единственный алифатический: нейроспорин	Алициклические
Хлорофиллы, входящие в состав реакционного центра		Бактериохлорофилл <i>a</i> или <i>b</i>	Бактериохлорофилл <i>a</i>	Бактериохлорофилл <i>g</i>	Хлорофилл <i>a</i>

Фотосинтезирующие прокариоты отличаются друг от друга и по расположению в клетке компонентов фотосинтетического аппарата. Два компонента этого аппарата – фотохимические реакционные центры и фотосинтетические электронтранспортные системы – у всех фототрофных

бактерий локализованы в цитоплазматической мембране и ее производных (тилакоидах). Локализация же светособирающих пигментов в разных группах фотосинтезирующих прокариот различна. У пурпурных бактерий и гелиобактерий светособирающие пигменты в виде комплексов с белками интегрированы в мембранах. В клетках зеленых бактерий основная масса светособирающих пигментов находится в хлоросомах, у цианобактерий – в фикобилисомах.

### **Фотосинтез у прокариот**

Под *фотосинтезом* понимают происходящее в клетках фототрофных организмов преобразование световой энергии в биохимически доступную энергию (АТФ) и восстановительные эквиваленты в форме НАДФН, а также связанный с этими процессами синтез клеточных компонентов.

Фотосинтез начинается с поглощения квантов света молекулами хлорофилла, бактериохлорофилла и другими пигментами. Молекула пигмента, воспринявшая квант света, переходит в возбужденное состояние, которое длится очень недолго ( $\leq 10^{-9}$  с) и заканчивается возвращением ее к исходному, стабильному уровню. Этот переход сопровождается либо передачей возбужденного состояния другой молекуле пигмента, либо потерей сообщенной энергии в виде тепла, флуоресценции или фосфоресценции. Если энергия электронных возбужденных состояний передается по комплексу пигментов, то некоторое ее количество может достигать фотохимических реакционных центров, где происходит превращение световой энергии в химическую.

Молекулы хлорофилла или бактериохлорофилла (первичные доноры электронов) фотохимического реакционного центра тесно сопряжены с молекулами первичного акцептора электронов, и поэтому возбужденная молекула хлорофилла или бактериохлорофилла может отдавать им электрон. Отдав электрон, молекула хлорофилла или бактериохлорофилла приобретает способность акцептировать электрон. Чтобы предотвратить возвращение электрона на молекулу первичного донора, вторичный акцептор принимает электрон от первичного акцептора и стабилизирует таким способом разделение зарядов. Реакции обратимого окисления-восстановления хлорофилла под воздействием света происходят в фотосинтетическом реакционном центре и являются «первичными» химическими реакциями фотосинтеза.

Электрон со вторичного акцептора поступает в фотосинтетическую электронтранспортную цепь и по ее переносчикам может возвращаться на хлорофилл или бактериохлорофилл фотохимического реакционного центра. Последними переносчиками фотосинтетической электронтранспортной цепи, т. е. непосредственными донорами, с которых электроны поступают на хлорофилл или бактериохлорофилл реакционного центра, у фотосинтезирующих организмов в большинстве случаев служат цитохромы типа *c*. Возвращение электрона на хлорофилл фотохимического реакционного центра – темновой процесс. Электрон перемещается по цепи переносчиков в

соответствии с электрохимическим градиентом. Такой транспорт электронов получил название *циклического*.

Кроме циклического транспорта электронов у фотосинтезирующих прокариот существует нециклический путь переноса электронов. При этом электрон, «оторванный» от молекулы хлорофилла реакционного центра (первичного донора), по электронтранспортной цепи, состоящей из переносчиков электронов, не возвращается к молекуле хлорофилла реакционного центра, а передается на такие центральные метаболиты клетки, как НАДФ<sup>+</sup> или окисленный ферредоксин. Таким образом электрон, покинувший молекулу хлорофилла, выводится из «системы». Возникает однонаправленный незамкнутый электронный поток, получивший название *нециклического* пути переноса электронов.

Показано, что у пурпурных и зеленых нитчатых бактерий функционирует только циклический светозависимый поток электронов. У остальных групп фотосинтезирующих прокариот фотоиндуцируется как циклический, так и нециклический перенос электронов.

Поток электронов по цепи переносчиков при фотосинтезе на определенных этапах сопряжен с направленным перемещением протонов через мембрану, что приводит к созданию протонного градиента, который при участии фермента АТФ-синтазы используется для синтеза молекул АТФ.

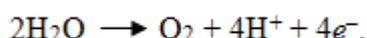
Фосфорилирование, сопряженное с циклическим потоком электронов, получило название *циклического фотофосфорилирования*. Соответственно *нециклическим фотофосфорилированием* называют синтез АТФ, сопряженный с нециклическим электронным транспортом.

Рассмотрим, как происходит кислородный и анакислородный фотосинтез.

**Кислородный фотосинтез** характерен для цианобактерий. При кислородном фотосинтезе работают две пигментные системы, включающиеся последовательно. Пигментную систему цианобактерий, возбуждаемую более длинноволновым светом ( $\lambda < 730$  нм), называют фотосистемой I. Она содержит хлорофилл (хл  $a_1$ ) (P<sub>700</sub>) – первичный донор электронов в первой фотореакции. Световая энергия, поглощаемая светособирающими пигментами фотосистемы I, передается в реакционный центр и переводит в возбужденное состояние хл  $a_1$ . Далее хл  $a_1$  отдает один электрон, при этом он окисляется и превращается в хл  $a_1^+$ . Вторичным акцептором отданного электрона служит железосерный белок. Он обладает еще более отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом и в свою очередь способен отдавать электрон ферредоксину, а с восстановленного ферредоксина восстановительный эквивалент может передаваться на НАДФ<sup>+</sup> или другие акцепторы. Наряду с этим возможен и циклический перенос электронов, при котором электрон от железосодержащего белка передается на пластохинон, цитохромы и пластоцианин обратно к хлорофиллу  $a_1^+$  реакционного центра.

Реакционный центр фотосистемы II содержит хлорофилл  $a_2$  (хл  $a_2$ ) (P<sub>680</sub><sup>\*</sup>), который служит первичным донором электронов во второй фотосистеме. Получив энергию, поглощенную светособирающими пигментами фотосистемы II, хлорофилл  $a_2$  переходит в возбужденное состояние. Электрон принимает

молекула первичного акцептора феофитина  $a$ , а затем он передается на молекулу пластохинона, который при этом восстанавливается до семихинона. Донором электронов для фотосистемы II служит вода. «Дырка», образовавшаяся в хл  $a_2^+$  в результате потери электрона, заполняется одним из электронов, освобождающихся в результате образования  $O_2$  при разложении  $H_2O$ :



Разложение воды происходит при участии ионов марганца.

Две описанные выше пигментные системы связаны между собой электронтранспортной цепью, важным звеном которой является пластохинон, который находится в большом избытке и выполняет функцию накопителя (депо) электронов. Этот накопитель может связывать не менее 10 электронов. Окисление пластохинона осуществляет фотосистема I, т. е. электроны «накопителя» расходуются на заполнение «дырок» в хл  $a_1^+$ . От пластохинона электроны передаются последовательно железосерному белку, комплексу  $b_6/f$ , затем пластоцианину и, наконец, хлорофиллу  $a_1^+$ . Таким образом, пластохинон выполняет важную функцию накопления и дальнейшей передачи электронов, поступающих из нескольких электронтранспортных цепей. Схематически пространственную ориентацию электронтранспортной системы внутри тилакоидной мембраны можно изобразить следующим образом (рисунок 43).

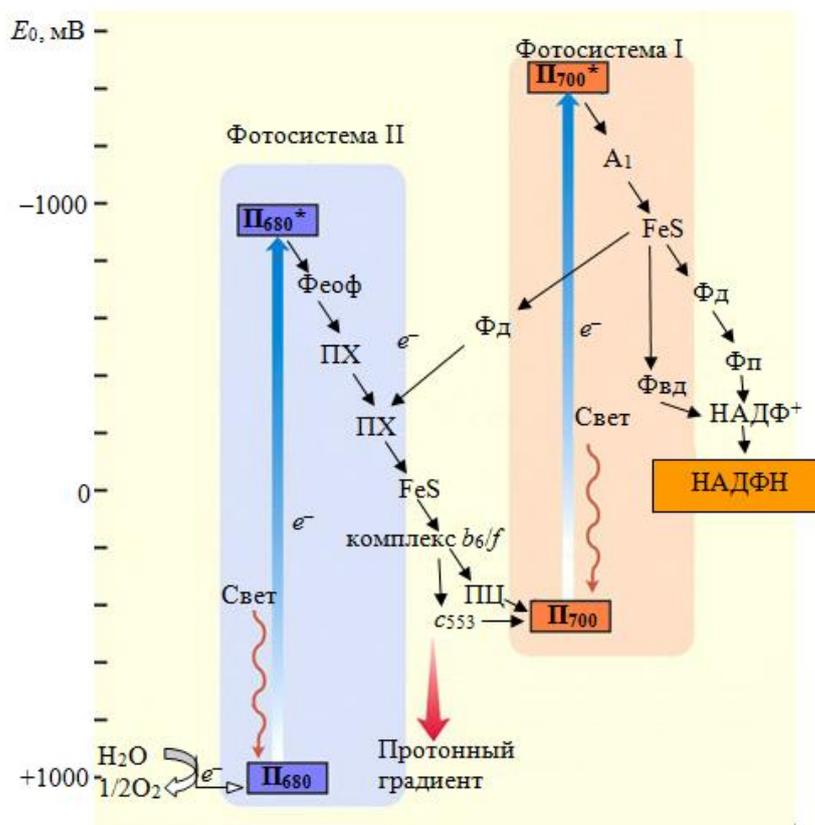


Рисунок 43 – Организация фотосинтетического аппарата у цианобактерий: феоф – феофитин; FeS – железосеросодержащий белок; Фд – ферредоксин; Фвд – флаводоксин; Фп – флавопротеин; ПХ – пластохинон; ПЦ – пластоцианин;  $c_{553}$ ,  $b_6, f$  – цитохромы;  $P_{700}^*$  – хл  $a_1$  реакционного центра;  $P_{680}^*$  – хл  $a_2$  реакционного центра;  $A_1$  – первичный акцептор электрона

Таким образом, две фотосистемы вместе со связывающей их электронтранспортной цепью обеспечивают направленный поток электронов от воды (с внутренней стороны тилакоидной мембраны) к НАДФ<sup>+</sup> (с внешней стороны). В результате происходит восстановление НАДФ<sup>+</sup> и образование заряда на мембране. Иными словами, световые реакции выступают в роли протонного насоса, который работает за счет энергии света и создает положительный заряд внутри тилакоида, мембрана аккумулирует энергию в форме протонного градиента, и эта энергия используется для синтеза АТФ.

**Аноксигенный фотосинтез** характерен для пурпурных и зеленых бактерий, гелиобактерий, в клетках которых содержатся пигменты для функционирования только одной фотосистемы, а в процессе фотосинтеза кислород не выделяется, хотя фотореакции у них различаются.

Рассмотрим фотореакции у пурпурных и зеленых нитчатых бактерий (рисунок 44).

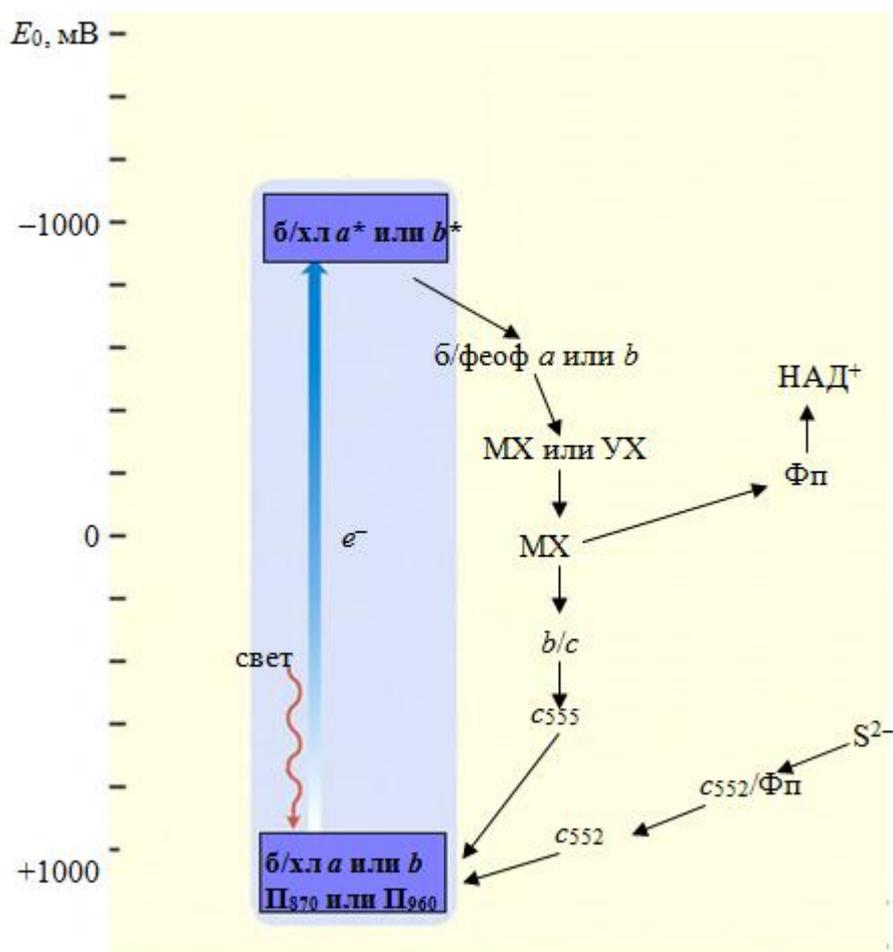


Рисунок 44 – Организация фотосинтетического аппарата у пурпурных бактерий:

б/хл – бактериохлорофилл; б/феоф – бактериофеофитин;  
 Фп – флавопротеин; МХ – менахинон; УХ – убихинон;  
 b, c, c552, c555 – цитохромы

Энергия, поглощенная светособирающими пигментами (бактериохлорофиллом и каротиноидами) передается бактериохлорофиллу фотохимического реакционного центра. Первичным акцептором электронов служит бактериофеофитин *a* или *b*. Далее электроны возвращаются с участием ряда переносчиков электронтранспортной цепи на молекулы бактериохлорофилла фотореакционного центра. В результате такого циклического транспорта электронов синтезируется энергия, аккумулируемая в молекулах АТФ. Восстановленные формы переносчиков восстановительных эквивалентов (НАДН или НАДФН) образуются в результате обратного транспорта электронов (переноса против электрохимического градиента) по электронтранспортной цепи за счет энергии, генерируемой в процессе циклического транспорта электронов

Это темновой процесс, донорами электронов которого являются экзогенные вещества ( $H_2S$ , тиосульфат, молекулярный водород, органические соединения).

Таким образом, у пурпурных и зеленых нитчатых бактерий имеется циклический транспорт электронов, в процессе которого образуется АТФ, и обратный транспорт электронов, при котором синтезируются восстановленные формы переносчиков восстановительных эквивалентов НАДН или НАДФН.

У зеленых серобактерий и гелиобактерий в результате фотохимической реакции одного типа индуцируется как циклический транспорт электронов, приводящий к образованию АТФ, так и нециклический, при котором образуется восстановитель (рисунок 45).

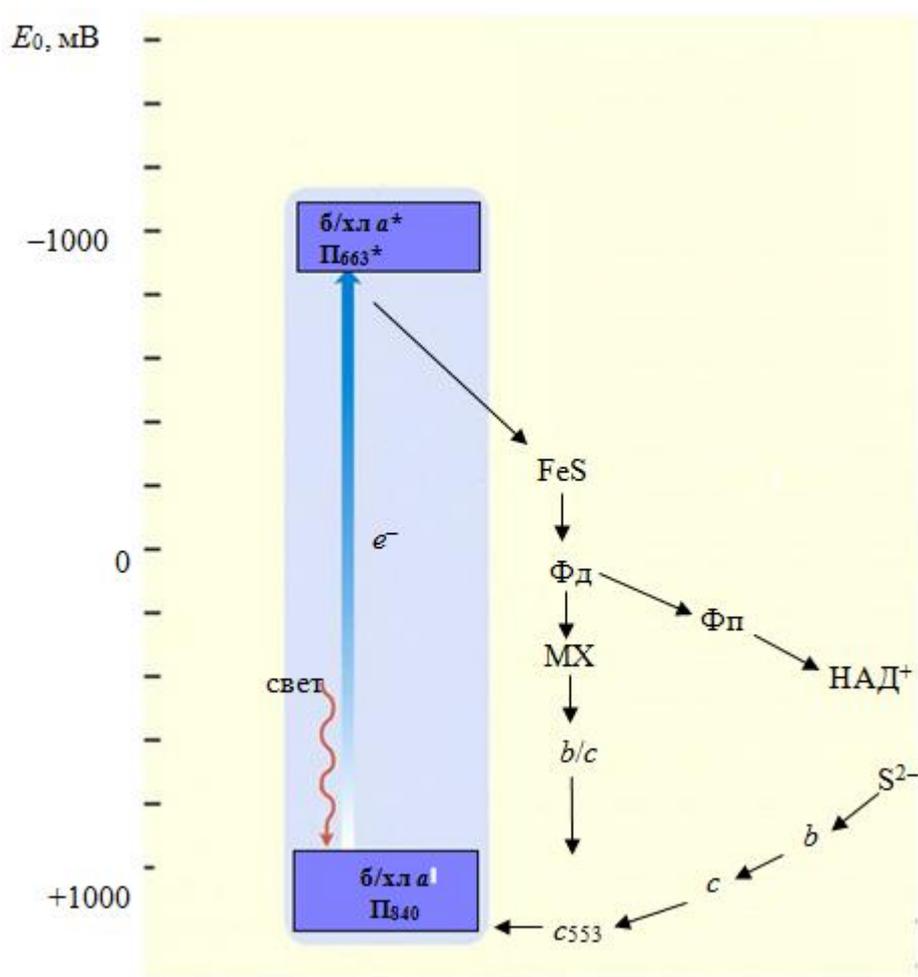


Рисунок 45 – Организация фотосинтетического аппарата у зеленых серобактерий:

б/хл – бактериохлорофилл; FeS – железосеросодержащий белок; Фд – ферредоксин; Фп – флавопротеин; МХ – менахинон;  
*b, c, c<sub>553</sub>* – цитохромы

Таким образом, в процессе фотохимических реакций у различных представителей фототрофных бактерий, осуществляющих кислородный и анакислородный фотосинтез, образуются молекулы АТФ и восстановленные формы переносчиков восстановительных эквивалентов НАДН или НАДФН. Эти первые стабильные продукты фотосинтеза используются в конструктивном метаболизме бактерий для ассимиляции углекислого газа (фотоавтотрофы) и других соединений (фотогетеротрофы).

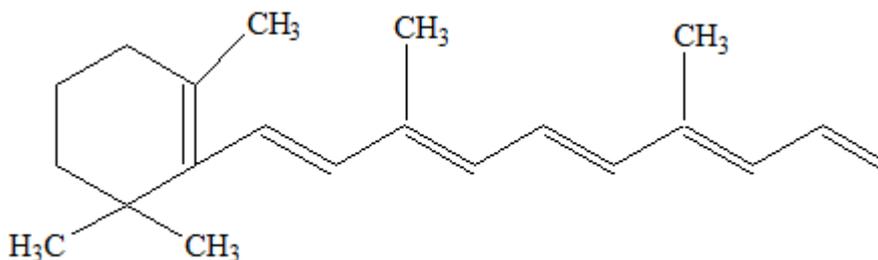
«**Бесхлорофильный фотосинтез**» способны осуществлять экстремально галофильные археи.

В группу *экстремально галофильных архей* входят прокариоты с разной морфологией клеток. Например, к роду *Halococcus* относятся грамвариабельные неподвижные кокки, к роду *Halobacterium* – грамположительные подвижные палочки с полярно расположенными жгутиками. Грамположительные археи рода *Haloarcula* имеют форму плоских квадратных пластинок и коробочковидных клеток. К этой группе относятся

также представители родов *Natronobacterium* и *Natronococcus*, которые являются к тому же алкалофилами, растущими только при pH 9–11.

Экстремально галофильные археи распространены там, где есть подходящие для этого условия: высокое содержание NaCl и других необходимых ионов, т. е. в природных соленых водоемах, в бассейнах для выпаривания соли, в белковых материалах, консервируемых с помощью соли (рыба, мясо, шкуры). Они могут расти в насыщенном растворе NaCl (около 30 %). Нижний предел концентрации соли для роста большинства видов составляет 12–15 %; оптимальное содержание – между 20 и 26 %. Высоки потребности экстремально галофильных архей и в других ионах – ионах  $Mg^{2+}$  и  $K^+$ . Установлено, что ионы  $Na^+$  необходимы для поддержания клеточной стабильности. Они взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами клеточной стенки архей и придают ей необходимую жесткость. Ионы  $K^+$  (наряду с другими ионами) необходимы для поддержания ионного равновесия внутри и снаружи клетки, стабилизации ферментов, мембран и других клеточных структур.

При недостатке в среде молекулярного кислорода в цитоплазматической мембране экстремально галофильных архей индуцируется синтез хромопротеина – бактериородопсина, белка, соединенного ковалентной связью с каротиноидом ретиналем:



Хромопротеин откладывается в виде отдельных пурпурных областей (бляшек) красного цвета на цитоплазматической мембране. Цвет бляшек обусловлен высоким содержанием каротиноидов. При выращивании клеток на свету в условиях недостатка  $O_2$  пурпурные участки могут составлять до 50 % поверхности мембраны. В них содержатся 20 – 25 % липидов и только один белок – бактериородопсин.

Экстремальные галофилы имеют сложные пищевые потребности. Для роста большинства видов в состав сред должны входить дрожжевой экстракт, пептон, гидролизат казеина, набор витаминов. Основным источником энергии и углерода служат аминокислоты и углеводы. Метаболизм глюкозы осуществляется по модифицированному пути Энтнера – Дудорова (рисунок 46). Этот путь отличается у экстремально галофильных архей тем, что глюкоза без фосфорилирования окисляется в глюконовую кислоту. Последняя превращается в 2-кето-3-дезоксиглюконовую кислоту, которая расщепляется на два  $C_3$ -фрагмента: пировиноградную кислоту и глицериновый альдегид. Из глицеринового альдегида в результате нескольких ферментативных реакций

также образуется пировиноградная кислота. Дальнейшее ее окисление происходит в замкнутом цикле Кребса.

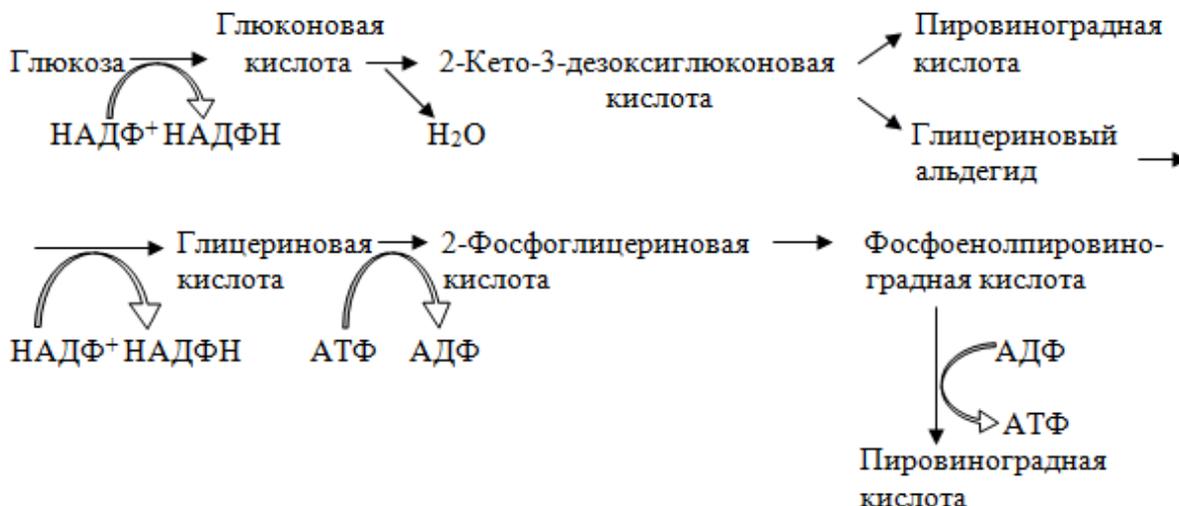


Рисунок 46 – Схема модифицированного пути Энтнера – Дудорова

Основной способ получения энергии экстремальными галофилами – аэробное дыхание. В цитоплазматической мембране обнаружены цитохромы *b* и *c*, а также цитохромоксидаза *o*. В анаэробных условиях в темноте источником энергии может служить анаэробное дыхание с использованием  $\text{NO}_3^-$  в качестве конечного акцептора электронов, а также процесс сбраживания аргинина и цитруллина. Свет служит дополнительным источником энергии, аппарат для использования которого подключается при недостатке  $\text{O}_2$ . Использование световой энергии для создания трансмембранного градиента протонов происходит с участием бактериородопсина и не связано с переносом электронов по цепи переносчиков. Этот хромопротеин имеет молекулярную массу 26 кД и содержит полипептидную цепь, построенную из 248 аминокислотных остатков и на 75 % состоящую из  $\alpha$ -спиральных участков. Последние образуют семь тяжей, ориентированных перпендикулярно плоскости мембраны. Ретиналь расположен параллельно плоскости мембраны и, следовательно, перпендикулярно белковым тяжам (рисунок 47).

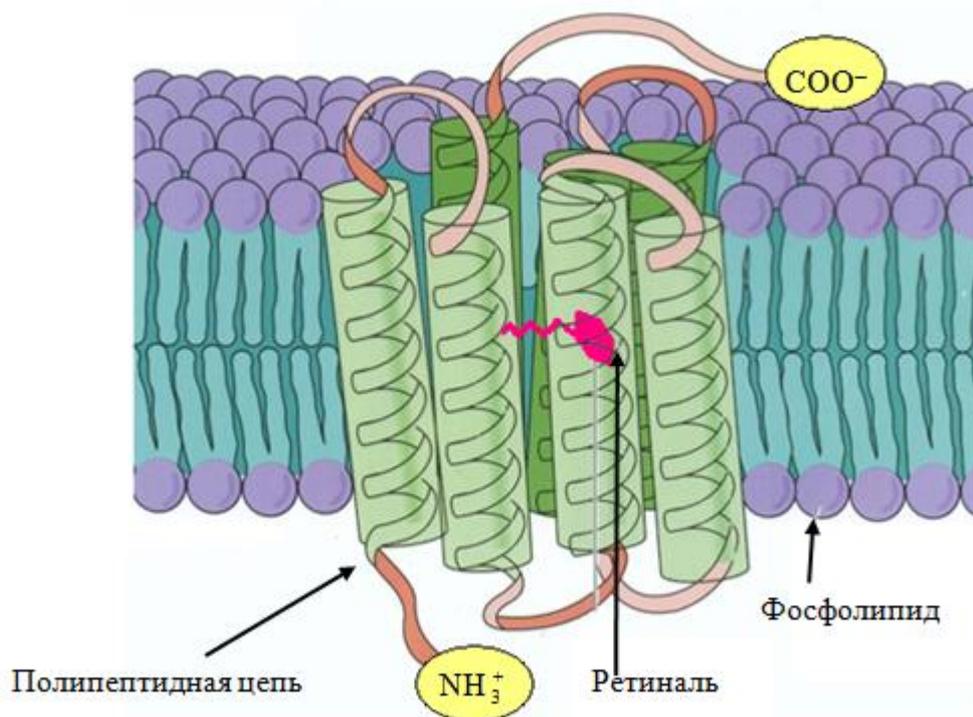
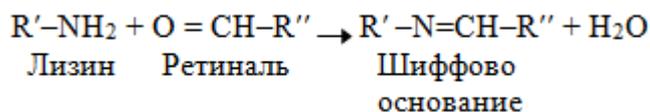
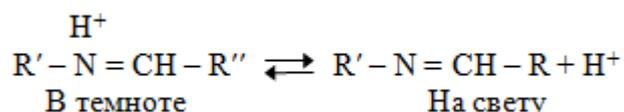


Рисунок 47 – Организация бактериородопсина в пурпурной мембране

Связь между ретиналем и полипептидной цепью осуществляется через Шиффово основание, образованное в результате взаимодействия альдегидной группы ретиналя с  $\epsilon$ -аминогруппой 216 остатка лизина:



Шиффово основание в темноте находится в протонированной форме. Поглощение кванта света бактериородопсином вызывает изменение конформации ретиналя и приводит к отщеплению  $H^+$  от Шиффова основания:



Протон, отделившийся на свету от Шиффова основания, переходит во внеклеточное пространство, а  $H^+$ , протонирующий Шиффово основание, поглощается из цитоплазмы. Таким образом, под действием света бактериородопсин «перебрасывает» протоны с одной стороны мембраны на другую.

В результате работы циклического механизма, получившего название **бактериородопсиновой протонной помпы**, при освещении по разные стороны мембраны возникает градиент концентрации  $H^+$ , достигающий 200 мВ (рисунок 48). Разрядка протонного градиента с помощью  $H^+$ -АТФ-синтазы приводит к синтезу АТФ. Таким образом, бактериородопсин – простейший из известных генераторов протонного градиента.

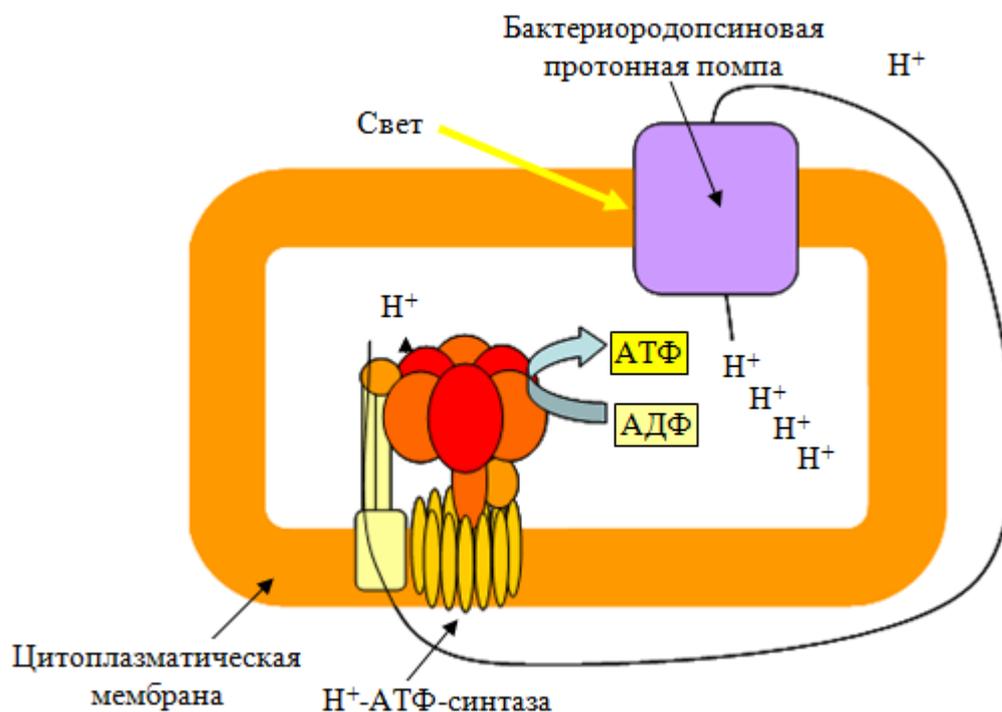


Рисунок 48 – Схема работы бактериородопсиновой протонной помпы

Вопрос о происхождении «бесхлорофильного фотосинтеза», обнаруженного у экстремально галофильных архей, неясен. Большинство исследователей считают, что этот тип фотосинтеза – сформированное в «кислородную эпоху» приспособление к существованию в условиях недостатка O<sub>2</sub>. В то же время нельзя полностью исключить возможность сохранения древней формы фотосинтеза, основанного на светозависимых превращениях каротиноидных пигментов.

### 1.3.2. Конструктивный метаболизм микроорганизмов

Установлено, что у бактерий *E. coli*, растущих в аэробных условиях на среде с глюкозой, около 50 % глюкозы окисляется до CO<sub>2</sub>. При этом образуются молекулы АТФ, в которых аккумулируется энергия. Остальные 50 % глюкозы используются в конструктивном метаболизме 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 биополимеров: белков, полисахаридов, липидов, РНК, ДНК. В частности, 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 дезоксирибо-нуклеотидов, в случае белков – аминокислот и т. д. (рисунок 49).

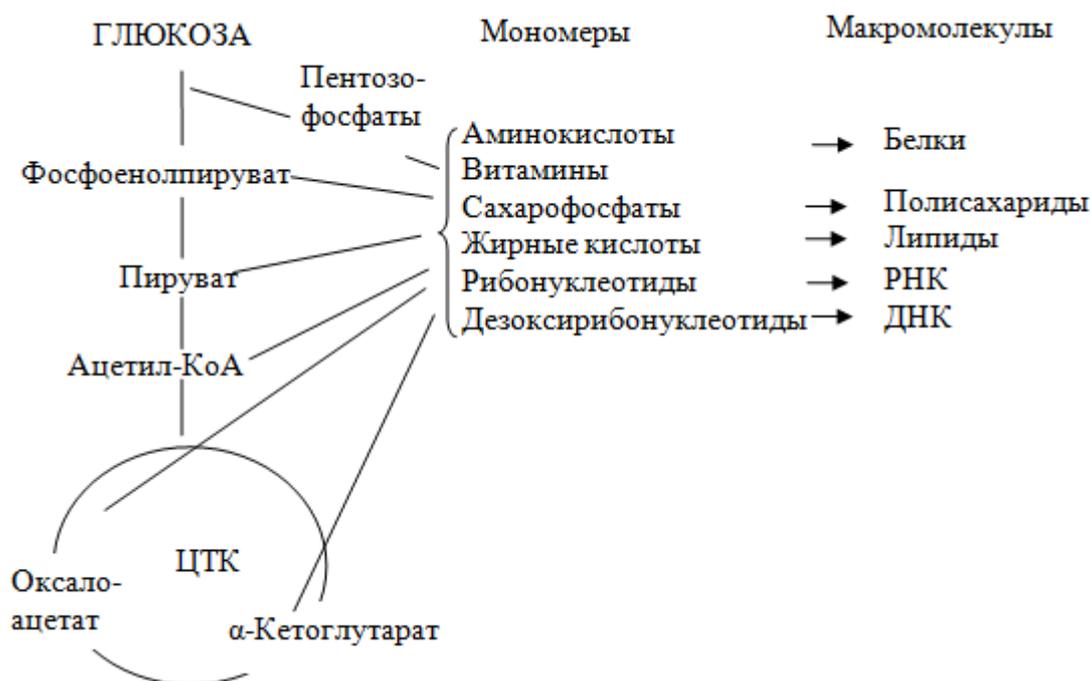


Рисунок 49 – Общая схема путей биосинтеза клеточного материала из глюкозы

Мономеры синтезируются из промежуточных метаболитов (амфиболитов), которые образуются при катаболизме глюкозы. Такими промежуточными метаболитами являются пентозофосфаты, фосфоенолпируват, пируват, ацетил-КоА, оксалоацетат,  $\alpha$ -кетоглутарат и др. Они являются исходным материалом для синтеза всех необходимых клетке аминокислот, сахарофосфатов, жирных кислот, рибо- и дезоксирибонуклеотидов, из которых образуются белки, полисахариды, липиды, РНК и ДНК.

### 1.3.2.1. Биосинтез аминокислот

Большинство бактерий способно синтезировать все аминокислоты, входящие в состав клеточных белков.

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 6).

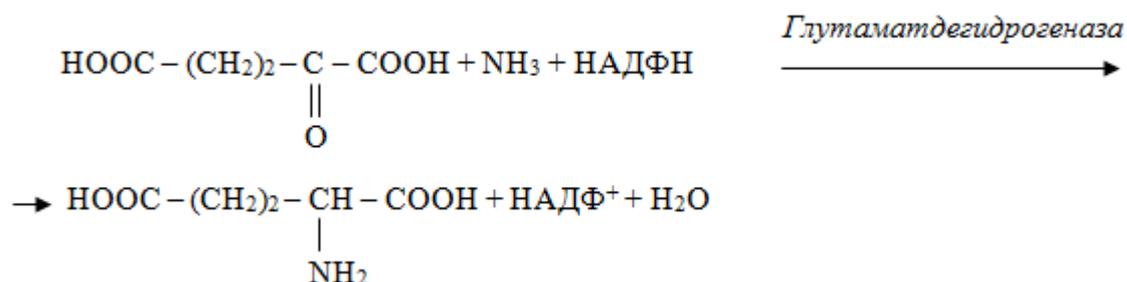
Таблица 6. Предшественники для биосинтеза аминокислот

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

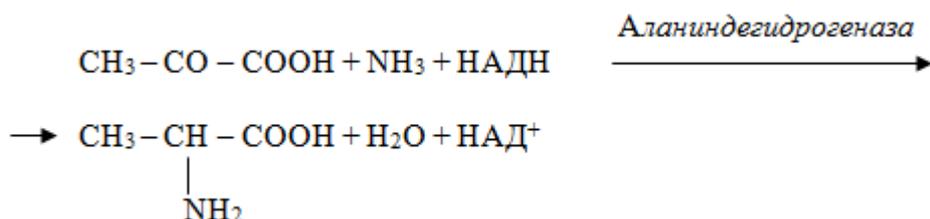
Как видно из таблицы 6, щавелевоуксусная кислота представляет собой отправную точку для синтеза шести аминокислот,  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота является предшественником четырех, а пировиноградная и 3-фосфоглицериновая – трех аминокислот.

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.

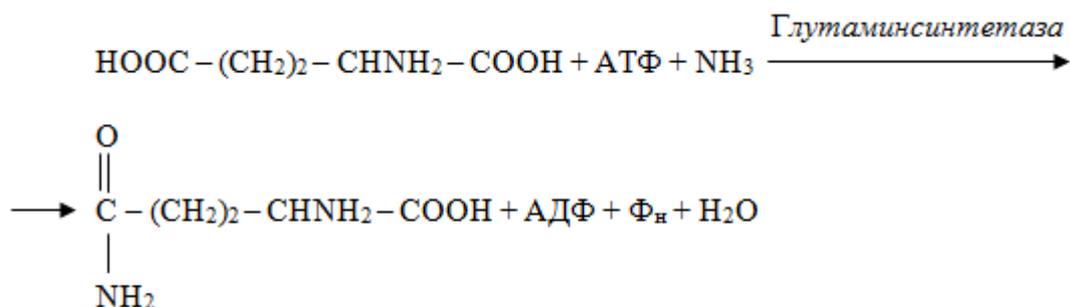
Биосинтез аминокислот происходит различными путями. Наиболее простой способ – *восстановительное аминирование кетокислот аммиаком*. Например, при взаимодействии  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты с аммиаком при участии фермента глутаматдегидрогеназы образуется глутаминовая кислота:



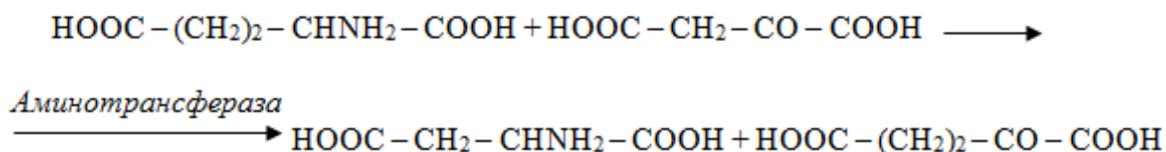
При участии фермента аланиндегидрогеназы пировиноградная кислота взаимодействует с аммиаком с образованием аланина:



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



Большинство же аминокислот получает аминогруппу от одной из первичных аминокислот в результате **трансаминирования**, или **переаминирования**. Из свободных аминокислот в цитоплазме бактерий количественно преобладает глутаминовая кислота. Она служит донором аминогрупп при биосинтезе многих аминокислот. Так, глутаминовая кислота, взаимодействуя со щавелевоуксусной кислотой при участии фермента аминотрансферазы, обеспечивает образование аспарагиновой кислоты. Отдав аминогруппу, глутаминовая кислота превращается в  $\alpha$ -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 50).

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-дезоксид-арабино-гептулозо-7-фосфатсинтаза (ДАГФ-синтаза), катализирующая реакцию конденсации эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата с образованием 3-дезоксид-арабиногептулозо-7-фосфата (ДАГФ). После этого в реакцию вступает 3-дегидрохинатсинтаза (ДГХ-синтаза), 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<sup>+</sup>-зависимую реакцию, обеспечивающую превращение 3-дегидрошикимата в шикимат. Фосфорилирование шикимата в шикимат-3-фосфат осуществляет фермент шикиматкиназа. После этого 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфатсинтаза (ЕПШФ-синтаза) катализирует реакцию конденсации шикимат-3-фосфата и фосфоенолпирувата, в результате чего образуется 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфат. Хоризматсинтаза обеспечивает синтез хоризмата из 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфата.

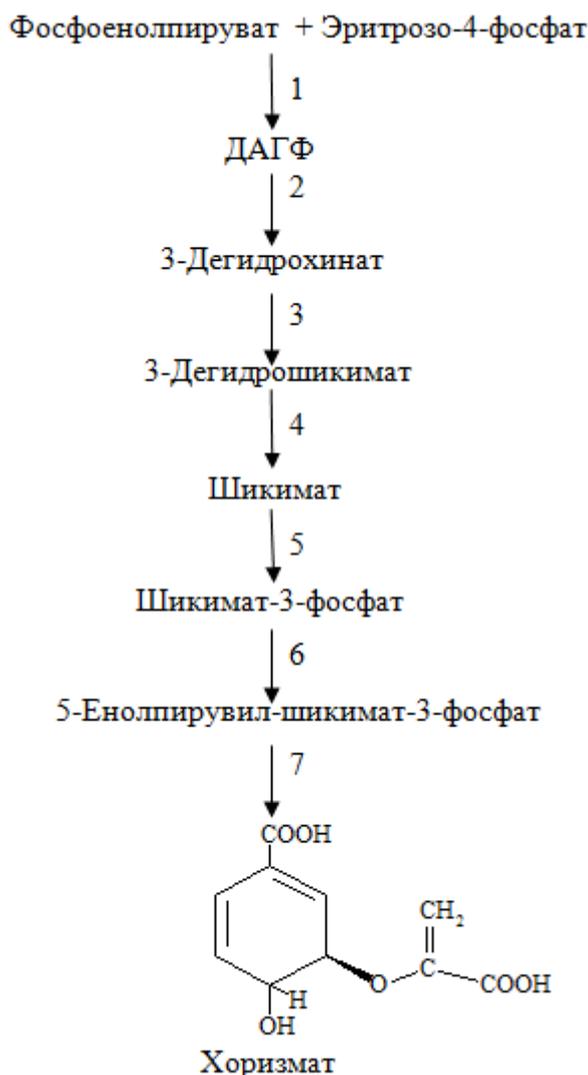


Рисунок 50 – Шикиматный путь синтеза ароматических соединений.  
 Цифрами обозначены ферменты: 1 – ДАГФ-синтаза; 2 – ДГХ-синтаза; 3 – ДГХ-дегидратаза; 4 – шикиматдегидрогеназа; 5 – шикиматкиназа; 6 – ЕПШФ-синтаза; 7 – хоризматсинтаза

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 51), убихинонов, менахинонов, фолиевой кислоты, сидерофоров катехольного типа, некоторых антибиотиков, а также ряда пигментов.

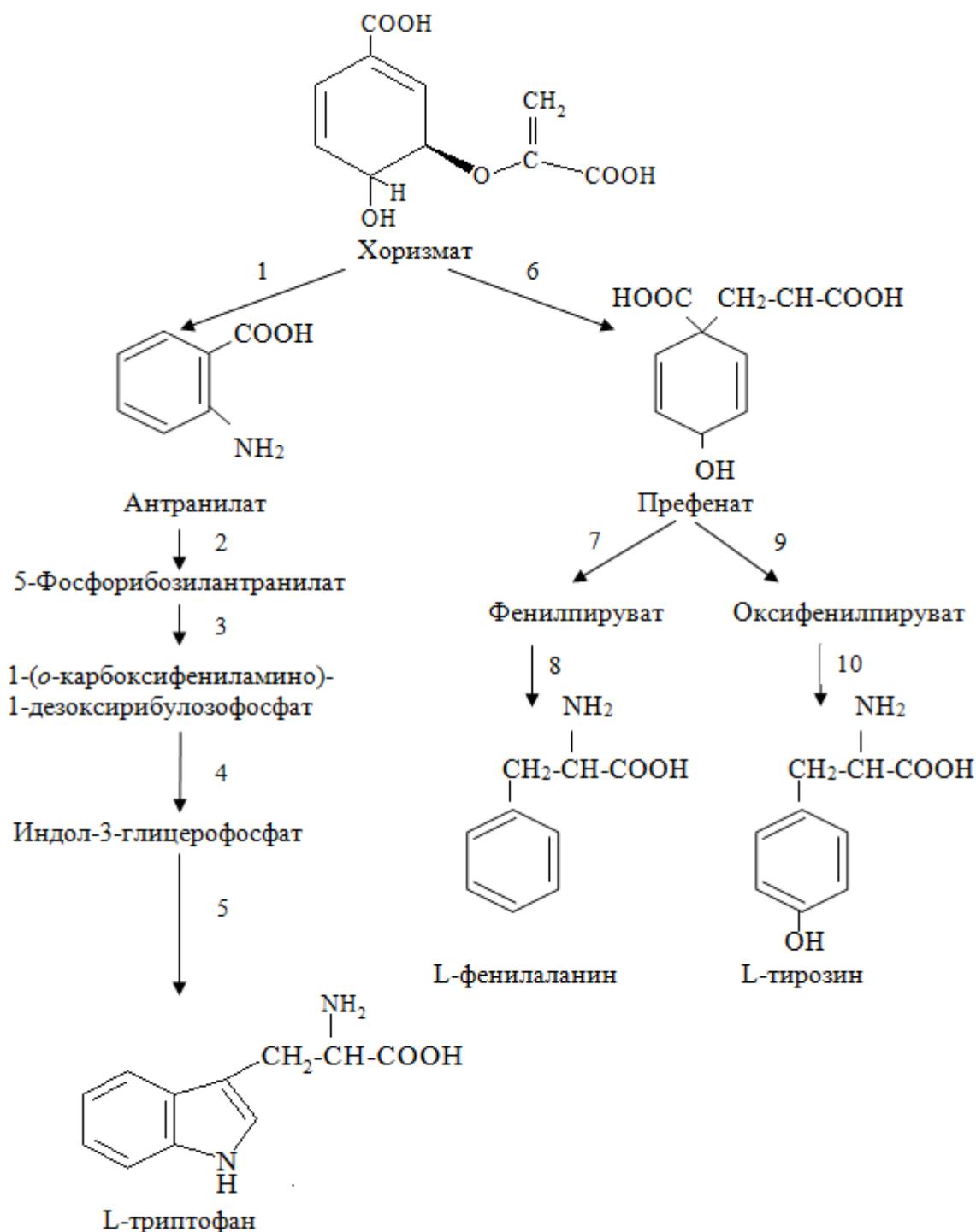


Рисунок 51 – Биосинтез ароматических аминокислот из хоризмата.

Цифрами обозначены ферменты: 1 – антранилатсинтаза; 2 – антранилат-5-фосфорибозилтрансфераза; 3 – N-5-фосфорибозилантранилатизомераза; 4 – индол-3-глицерофосфатсинтаза; 5 – триптофансинтаза; 6 – хоризматмутаза; 7 – префенатдегидратаза; 8 – фенилпируватаминотрансфераза; 9 – префенатдегидрогеназа; 10 – тирозинаминотрансфераза.

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

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/тиро-зинаминотрансферазой. Заключительный этап синтеза фенилаланина и тирозина обеспечивается соответствующей аминотрансферазой.

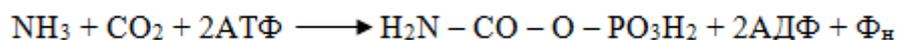
В заключение следует отметить, что некоторые гетеротрофные прокариоты, такие, например, как молочнокислые бактерии, не способны синтезировать все аминокислоты, необходимые для их жизнедеятельности, поэтому их рост возможен только на сложных по составу питательных средах, содержащих ряд продуктов природного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

### 1.3.2.2. Биосинтез нуклеотидов

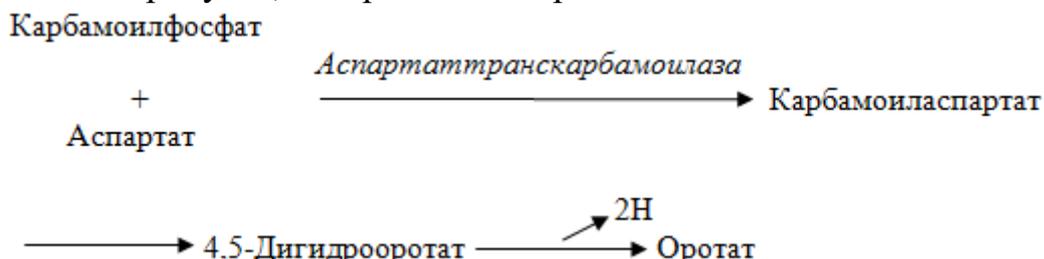
Нуклеотиды являются исходным материалом для биосинтеза нуклеиновых кислот. Кроме того, нуклеотиды входят в состав многих коферментов и участвуют в активации и переносе аминокислот, углеводов, компонентов клеточной стенки и липидов. Нуклеотиды – сложные соединения, состоящие из азотистых оснований (это производные пурина – аденин, гуанин и пиримидина – цитозин, тимин), пентоз (рибоза и дезоксирибоза) и остатка фосфорной кислоты.

Большинство микроорганизмов способно синтезировать нуклеотиды из низкомолекулярных соединений. Если же нуклеотиды есть в питательной среде или они образуются при распаде нуклеиновых кислот, то клетка их не синтезирует, а использует в готовом виде.

**Синтез пиримидиновых нуклеотидов.** Предшественниками для синтеза пиримидиновых оснований служат карбамоилфосфат и аспарат. Карбамоилфосфат синтезируется из аммиака и углекислого газа:



Фермент аспартаттранскарбамоилаза конденсирует эти соединения с образованием карбамоиласпартата. Карбамоиласпартат подвергается циклизации с образованием 4,5-дигидрооротата. Затем в результате дегидрирования этого соединения происходит образование оротата – первого промежуточного продукта, содержащего пиримидиновое кольцо.

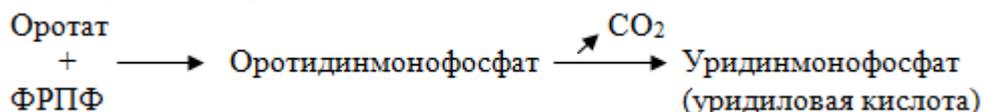


Прежде чем превратиться в одно из пиримидиновых оснований, оротат связывается с рибозо-5-фосфатом, который является исходным соединением для образования пентозного компонента нуклеотидов. Как известно, рибозо-5-фосфат может синтезироваться двумя путями:

- окислительным – из глюкозо-6-фосфата через окислительный пентозофосфатный путь;
- неокислительным – из фруктозо-6-фосфата и 3-фосфоглицеринового альдегида в результате реакций, катализируемых трансальдолазой и транскетолазой.

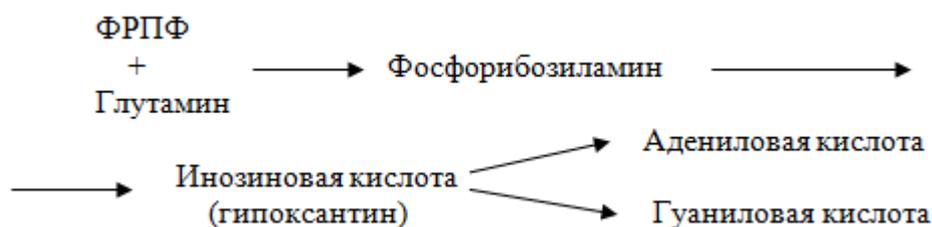
Для синтеза нуклеотидов рибозо-5-фосфат используется в высокоэнергетической форме – в виде фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ).

Фосфорибозилпирофосфат взаимодействует с оротатом, в результате образуется оротидинмонофосфат, который декарбоксилируется в уридинмонофосфат или уридиловую кислоту:



Из уридиловой кислоты путем аминирования образуется цитидиловая кислота (нуклеотид, содержащий азотистое основание цитозин), путем метилирования – тимидиловая кислота (нуклеотид, содержащий азотистое основание тимин).

**Синтез пуриновых нуклеотидов.** Начальной стадией синтеза пуриновых нуклеотидов является взаимодействие ФРПФ с глутамином с образованием фосфорибозиламина, который через ряд последовательных ферментативных реакций превращается в инозиновую кислоту (пуриновый нуклеотид гипоксантин). Из инозиновой кислоты путем химических модификаций пуринового кольца синтезируются адениловая и гуаниловая кислоты.

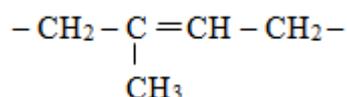


При синтезе дезоксирибонуклеотидов происходит восстановление рибозы до дезоксирибозы. Это происходит на стадии рибонуклеотидов, т.е. синтезируются рибонуклеотиды, а затем происходит восстановление их до дезоксирибонуклеотидов.

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

### 1.3.2.3. Биосинтез липидов

Липиды в клетках микроорганизмов представлены химическими соединениями различной природы. Это триглицериды, жирные кислоты, фосфолипиды, гликолипиды, воска. 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 микроорганизмов липиды входят в состав клеточных мембран и клеточных стенок, служат запасными веществами, являются компонентами пигментных систем и цепей электронного транспорта. Ниже мы рассмотрим синтез жирных кислот и фосфолипидов, которые являются у большинства микроорганизмов универсальным компонентом клеточных мембран.

Наиболее универсальные липидные компоненты бактерий – жирные кислоты и фосфолипиды.

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

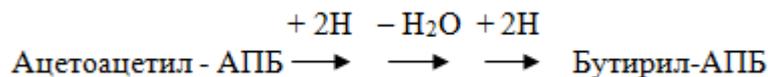
На первом этапе происходит перенос ацетильной группы от ацетил-КоА на молекулу особого белка, называемого ацилпереносящим белком (АПБ):



Ацетил-АПБ выполняет функцию затравки, к которой присоединяется C<sub>2</sub>-фрагмент. Донором C<sub>2</sub>-фрагмента служит молекула малонил-АПБ, синтезирующаяся также из ацетил-КоА. В результате присоединения C<sub>2</sub>-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:

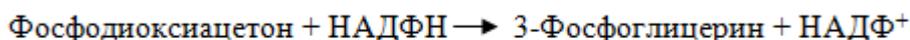


В результате конденсации бутирил-АПБ с новой молекулой малонил-АПБ и последующего восстановления продукта реакции образуется молекула С<sub>6</sub>-жирной кислоты (капроил-АПБ). Последовательное наращивание С<sub>2</sub>-остатков приводит к синтезу жирных кислот, содержащих обычно 16–18 углеродных атомов.

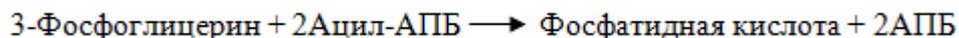
Жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов образуются в результате начальной конденсации пропионил-АПБ и малонил-АПБ.

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 фосфодиоксиацетон (один из промежуточных продуктов гликолитического пути). Фосфодиоксиацетон восстанавливается с образованием 3-фосфоглицерина:



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



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

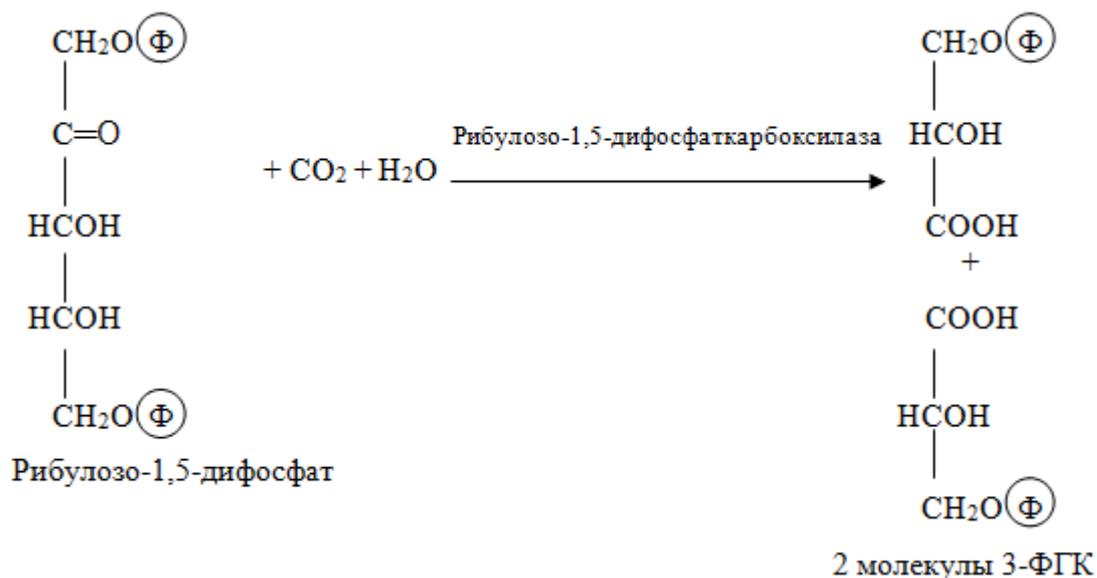
#### 1.3.2.4. Биосинтез углеводов

Если микроорганизмы – автотрофы, то исходным веществом для синтеза углеводов является СО<sub>2</sub>. 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 пентозофосфатного пути. Но для цикла Кальвина характерны два специфических фермента, не участвующие в других метаболических путях, – фосфорибулокиназа, и рибулозо-1,5-дифосфаткарбо-ксилаза.

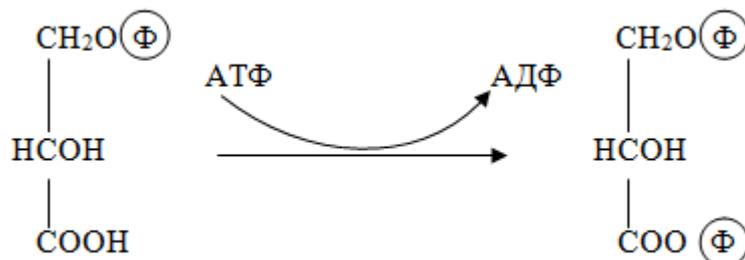
Цикл Кальвина можно разделить на три фазы: фиксация СО<sub>2</sub> (реакция карбоксилирования), восстановление фиксированного СО<sub>2</sub> (реакция восстановления) и регенерация акцептора СО<sub>2</sub>.

**Фиксация СО<sub>2</sub>** осуществляется с участием фермента рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы, катализирующего присоединение СО<sub>2</sub> к рибулозо-1,5-

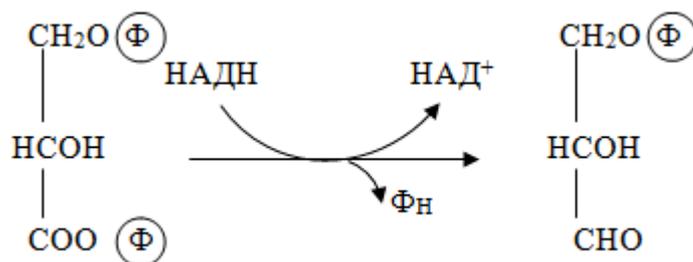
дифосфату с образованием двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты (3-ФГК):



В двух последующих реакциях карбоксильная группа 3-ФГК восстанавливается до альдегидной группы – **восстановление фиксированного CO<sub>2</sub>**. В процессе первой реакции под действием фермента 3-фосфоглицераткиназы за счет АТФ 3-ФГК превращается в 1,3-ФГК:

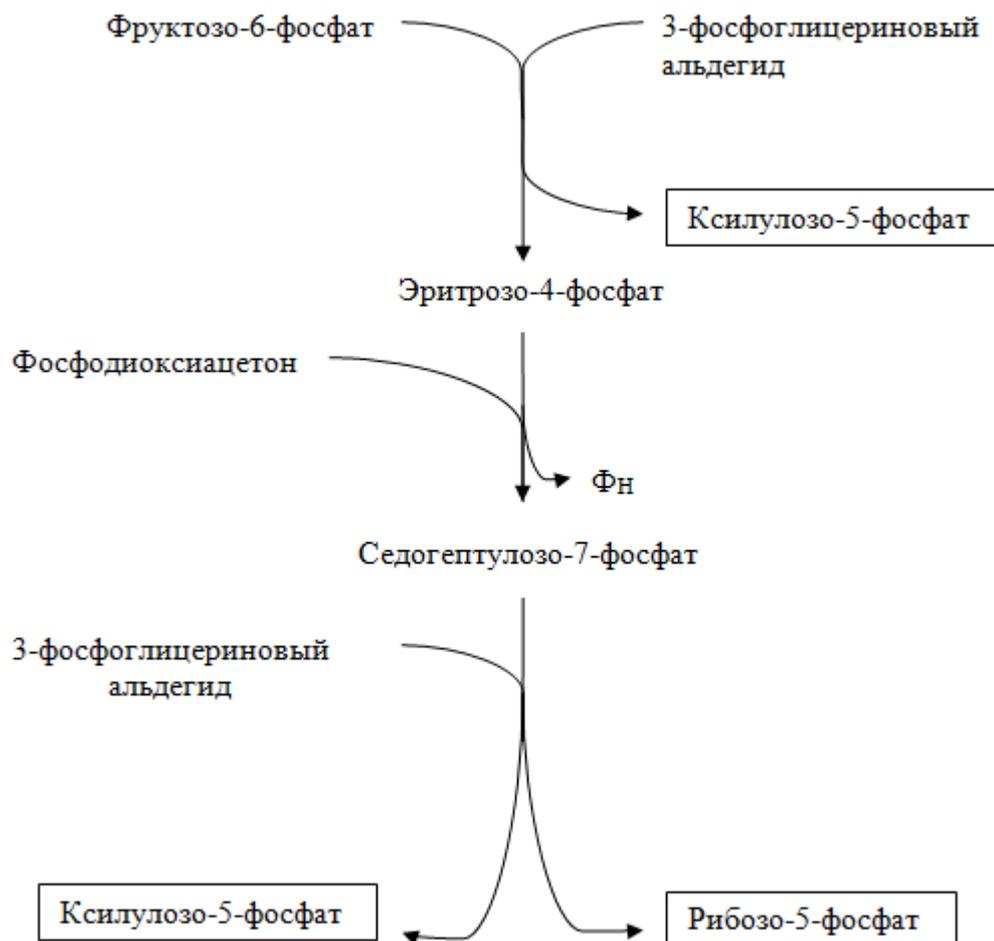


Далее 1,3-ФГК при участии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы за счет НАДН восстанавливается до 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА):

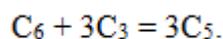


Часть образовавшегося 3-ФГА последовательно при участии триозофосфатизомеразы, фруктозо-1,6-дифосфатальдолазы и 1,6-фосфофруктозофосфатазы сначала превращается во фруктозо-6-фосфат и далее в реакциях, катализируемых ферментами глюкозофосфатизомеразой и глюкозо-6-фосфатазой, превращается в глюкозу. Однако, если бы 3-ФГА использовался только для биосинтетических процессов, то фиксация CO<sub>2</sub> вскоре прекратилась бы из-за недостатка рибулозо-1,5-дифосфата – акцепторов CO<sub>2</sub>. Поэтому для

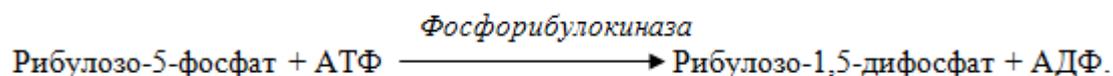
**регенерации акцептора CO<sub>2</sub>** одна молекула фруктозо-6-фосфата и три молекулы триозофосфатов (две молекулы 3-ФГА и одна молекула фосфодиоксиацетона) взаимодействуют друг с другом при участии ферментов транскетолазы, трансальдолазы (ферменты окислительного пентозофосфатного пути) и альдолазы (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 превращаются в рибулозо-5-фосфат под действием фосфопентозоэпимеразы и фосфопентозоизомеразы соответственно. Затем рибулозо-5-фосфат фосфорилируется вторым ферментом, участвующим только в цикле Кальвина, – фосфорibuлокиназой, и таким образом регенерируется акцептор CO<sub>2</sub> – рибулозо-1,5-дифосфат:



Полностью цикл Кальвина представлен на рисунке 52.

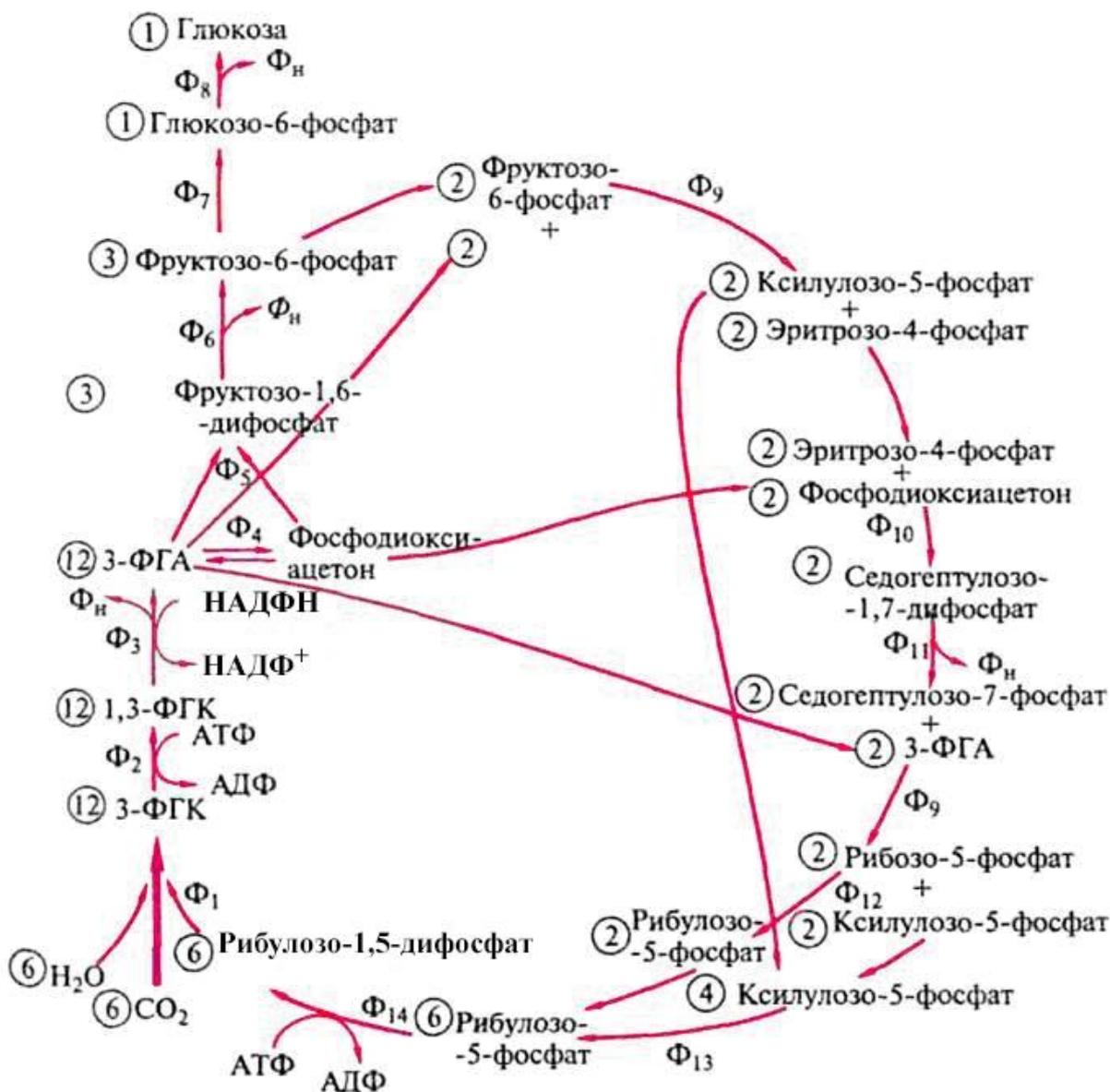
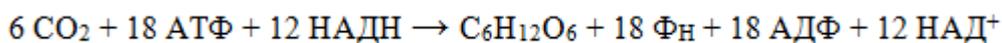


Рисунок 52 – Цикл Кальвина:

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

Суммарное уравнение восстановительного пентозофосфатного цикла можно изобразить следующим образом:

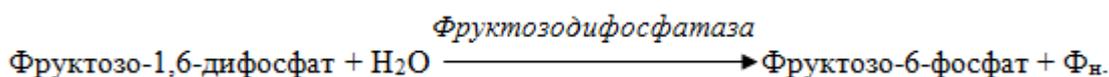


У бактерий-гетеротрофов на среде с неуглеводными предшественниками (например, аминокислотами, глицерином, молочной кислотой) синтез углеводов осуществляется с использованием реакций гликолитического пути, идущих в обратном направлении. Этот процесс называется *глюконеогенезом*. Но некоторые ферментативные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

(реакции, катализируемые гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой). Поэтому в клетках гетеротрофных прокариот, способных использовать двух- и трехуглеродные соединения, сформировались специальные ферментативные реакции, позволяющие обходить необратимые реакции гликолитического пути. Одной из таких обходных реакций у бактерий *E. coli* и других бактерий является превращение пирувата в фосфоенолпируват (ФЕП) под действием фосфоенолпируватсинтетазы:



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.

### 1.3.2.5. Биосинтез пептидогликана

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-ацетил-мурамовой кислоты (N-АцМур), соединенными  $\beta$ -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 (D-Глу), мезо-диаминопимелиновая кислота (*m*-ДАП) или L-лизин (L-Лиз) и D-аланин (D-Ала) (рисунок 53).

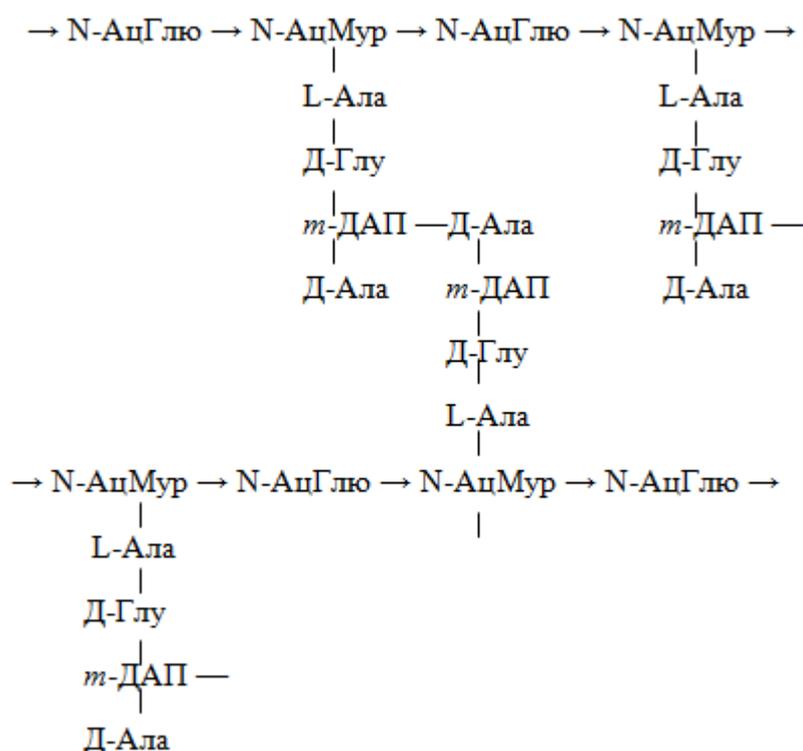


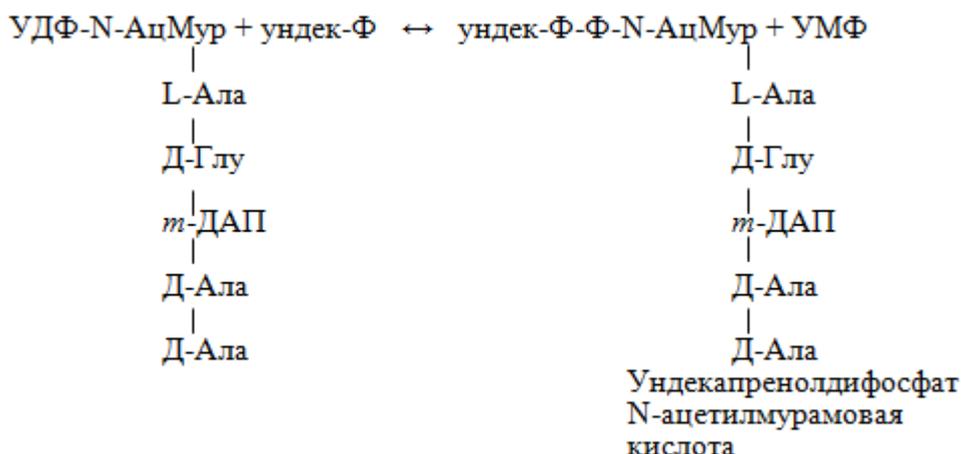
Рисунок 53 – Структура муреина

Синтез пептидогликана клеточной стенки бактерий включает биосинтез в цитоплазме активированных предшественников, их полимеризацию и перенос через цитоплазматическую мембрану. Поскольку для сборки пептидогликана снаружи цитоплазматической мембраны 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 – **ундекапrenoлфосфат**.

Синтез мономерных компонентов пептидогликана муреина N-ацетил-глюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты начинается с аминирования фруктозо-6-фосфата у С2-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-ацетилглюкозаминем и фосфоенолпируватом с последующим восстановлением остатка фосфоенолпирувата до остатка молочной кислоты. Далее к карбоксильной группе остатка молочной кислоты УДФ-N-ацетилмурамовой кислоты с помощью амидной связи происходит последовательное присоединение аминокислотных остатков: L-аланина, D-глутаминовой кислоты, мезо-диамино-пимелиновой кислоты или L-лизина и, наконец, двух остатков D-аланина. Последние два остатка D-аланина присоединяются вместе

в виде Д-аланил-Д-аланина, образуемого из L-аланина, в реакциях, катализируемых аланинрацемазой и АТФ-зависимой Д-аланин-Д-аланинлигазой. Образование каждой амидной связи сопряжено с гидролизом АТФ для активации растущей цепи. В итоге синтезируется второй строительный блок для синтеза пептидогликана – УДФ-N-ацетилмурамовая кислота с присоединенным пентапептидом.

Связывание образованного комплекса УДФ-N-ацетилмурамовой кислоты с пентапептидом и УДФ-N-ацетилглюкозамина происходит на втором этапе синтеза пептидогликана на цитоплазматической мембране. Для осуществления этого гидрофильная молекула УДФ-N-ацетилмурамовой кислоты с пентапептидом сначала должна быть превращена в липофильную, что достигается путем замены уридиндифосфата (УДФ) кофактором ундекапренолфосфатом (ундек-Ф) в  $Mg^{2+}$ -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 дисахарид-пентапептид, связанных с ундекапренолдифосфатом, в пептидогликановый скелет и образование пептидных связей. Эта поперечная сшивка осуществляется путем транспептидирования с участием фермента трансамидазы. При этом расщепляется связь между двумя остатками Д-аланина и освободившаяся карбоксильная группа связывается с аминогруппой мезо-диаминопимелиновой кислоты или L-лизина второго олигопептида, а концевой Д-аланин освобождается. При встраивании освобождается также ундекапренолдифосфат; он подвергается гидролизу и получающийся ундекапренолмонофосфат используется в следующем цикле.

Архебактерии отличаются по строению клеточной стенки от эубактерий, кроме того, ее состав различен у разных групп архебактерий. Для некоторых метаногенных бактерий 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-талозоминауровую кислоту;
- в процессе синтеза псевдомуреина происходит образование УДФ-дисахарида, в котором УДФ-N-ацетилглюкозамин соединен с N-ацетилталозоминауровой кислотой  $\beta$ -3,1-, а не  $\beta$ -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-глута-матом) 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.

#### 1.4. Фиксация молекулярного азота (азотфиксация, diaзотрофия) микроорганизмами

Фиксация молекулярного азота ( $N_2$ ) – это биологический восстановительный процесс. Первым его продуктом является аммиак, который затем включается в азотистые соединения, доступные для использования другими организмами. Азотфиксация играет большую роль в круговороте азота в природе, в обогащении почвы и водоемов связанным азотом. Единственными организмами, способными осуществлять этот процесс, являются бактерии, которые называются **азотфиксирующими**, или **дiazотрофами**, так как они могут использовать как  $N_2$ , так и связанные формы азота. Азотфиксация обнаружена у представителей разных групп бактерий, включая аэробные, анаэробные и фототрофные бактерии.

Азотфиксирующие бактерии подразделяют на три группы: симбиотические, свободноживущие и ассоциативные.

**Симбиотические азотфиксаторы** усваивают молекулярный азот, только находясь в симбиозе с растением. Особо важное значение имеет симбиоз между клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* и бобовыми растениями. К симбиотическим азотфиксаторам относятся также бактерии рода *Bradyrhizobium* (симбиоз с люпином, соей, вигной, машем, арахисом и т. д.), бактерии рода *Azorhizobium* (симбиоз с бобовыми растениями). Бактерии родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Azorhizobium* входят в  $\alpha$ -подгруппу протеобактерий и формируют корневые и стеблевые (*Azorhizobium*) клубеньки у бобовых растений. Актиномицеты рода *Frankia* также обитают в качестве эндосимбионтов в клубеньках, которые образуются на корнях небобовых растений, как древесных и кустарниковых, так и травянистых, среди которых ольха, облепиха, стланник, казуарина, восковница, лох, шефердия, куропаточья трава и др. Некоторые симбиотические азотфиксаторы, относящиеся к роду *Klebsiella*, образуют клубеньки на листьях кустарников *Pavetta* и *Psychotria*. Цианобактерии *Anabaena azollae* образуют симбиотическую ассоциацию с водным папоротником *Azolla* (цианобактерии находятся в листовых полостях

папоротника), внося большой вклад в азотфиксацию на рисовых плантациях, где этот папоротник растет на поверхности покрывающей почву воды. Цианобактерии рода *Nostoc* вступают в симбиоз с мхами-печеночниками и тропическим растением *Gunnera macrophylla*. Кроме того, симбиотические цианобактерии присутствуют в лишайниках, представляющих собой ассоциацию этих прокариот с грибами. Благодаря тому, что цианобактерии осуществляют азотфиксацию и имеют фотоавтотрофный тип метаболизма, нуждаясь для роста только в  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  и минеральных солях, лишайники первыми заселяют неорганические среды, например каменистые поверхности, создавая условия для развития других организмов.

К **свободноживущим азотфиксаторам** относятся некоторые виды бактерий рода *Clostridium* (*C. pasteurianum*, *C. butylicum*, *C. acetobutylicum*, *C. felsineum*, *C. pectovorum* и др.), бактерии родов *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*, большинство аноксигенных фототрофных бактерий, многие цианобактерии, факультативные анаэробы (*Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus polymyxa*), хемолитоавтотрофные бактерии (*Xanthobacter autotrophicus*, *Alcaligenes latus*), метилотрофные (бактерии родов *Methylomonas*, *Methylobacterium* и *Methylococcus*), сульфатредуцирующие (бактерии родов *Desulfotomaculum* и *Desulfovibrio*) и метаногенные археи.

**Ассоциативные азотфиксаторы** – бактерии, обитающие в ризоплане (на поверхности корней), ризосфере (в почве, окружающей корни) и филлосфере (на листьях, стеблях) растений, т. е. живущие в ассоциации с высшими растениями. К активным азотфиксаторам, развивающимся в ризосфере и ризоплане различных растений, относятся бактерии азоспириллы (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans* и др.), *Klebsiella planticola*, *Herbaspirillum seropedicae*, представители рода *Pseudomonas* и др. Бактерии, обитающие в филлосфере, называются **эпифитными**, среди которых имеются азотфиксаторы, например *Pantoea agglomerans*.

Реакцию восстановления молекулярного азота до аммиака катализирует фермент **нитрогеназа**. Синтез нитрогеназы детерминируют *nif*-гены (от англ. *nitrogen fixation*), которые находятся в хромосоме (*Klebsiella*, *Bradyrhizobium*) или мегаплазмиде (*Rhizobium*). Кроме *nif*-генов в азотфиксации участвуют продукты *fix*-генов.

Известны три типа ферментов нитрогеназ. Наиболее распространенный тип содержит молибден, в других типах этого фермента вместо молибдена присутствует ванадий или железо. Некоторые азотфиксирующие бактерии в зависимости от наличия в среде молибдена или ванадия способны синтезировать два или даже три (*Azotobacter spp.*) типа нитрогеназ. Все типы нитрогеназ состоят из двух белковых компонентов. Компонент 1 – это собственно нитрогеназа, или MoFe-белок (динитрогеназа, или молибдоферредоксин); компонент 2 – это редуктаза динитрогеназы, или Fe-белок (FeS-белок, или азоферредоксин). MoFe-белок (мол. масса примерно 240 кДа) состоит из четырех субъединиц двух типов, т.е. представляет собой  $\alpha_2\beta_2$ -тетрамер. Этот тетрамерный белок связан с MoFe-кофактором, выполняющим роль каталитического сайта восстановления  $\text{N}_2$ . Fe-белок – гомодимер,

состоящий из двух идентичных субъединиц,  $\alpha_2$  – димер (мол. масса примерно 60 кДа), соединенных через  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -центр. Fe-белок принимает электроны от восстановленного ферредоксина или флаводоксина и передает их на MoFe-белок в АТФ-зависимой реакции.

Фермент нитрогеназа высокочувствителен к молекулярному кислороду – он инактивируется на воздухе и в аэробных условиях его синтез прекращается. Таким образом, фиксация азота представляет собой строго анаэробный процесс. Поэтому чувствительность нитрогеназы к  $\text{O}_2$  не затрудняет осуществление азотфиксации у строгих анаэробов, но является лимитирующим фактором в случае аэробов и факультативных анаэробов. Тем не менее эти бактерии способны осуществлять азотфиксацию при низком содержании молекулярного кислорода в среде благодаря наличию у них специальных защитных механизмов.

У некоторых аэробных почвенных бактерий, таких как бактерии рода *Azotobacter*, защитный в отношении нитрогеназы эффект оказывает потребление ими с высокой скоростью молекулярного кислорода из среды, т.е. действует так называемая **дыхательная защита**, которая обеспечивается высокоактивной и разветвленной дыхательной цепью. При фиксации азота у этих бактерий действуют те ветви этой цепи, которые имеют только один участок сопряжения с фосфорилированием, но при этом эффективно восстанавливают  $\text{O}_2$  до воды. У азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* при высокой концентрации кислорода индуцируется синтез терминальной цитохром- $\alpha$ -оксидазы, которая обладает низким сродством к  $\text{O}_2$ , но высокой скоростью его потребления. Благодаря высокой скорости переноса в этой цепи электронов на кислород происходит его быстрое удаление из среды, предотвращающее инактивацию нитрогеназы. В других условиях (в среде присутствует связанный азот) эти бактерии используют альтернативную ветвь дыхательной цепи, три участка сопряжения с фосфорилированием.

У факультативных фототрофов защиту нитрогеназы при низкой концентрации  $\text{O}_2$  обеспечивает особый белок. Предполагают, что он связывается с нитрогеназой, и это вызывает изменение ее конформации, сопровождаемое потерей активности, но вместе с тем приобретением устойчивости к кислороду, – эффект, названный **конформационной защитой**. Это связывание носит обратимый характер, и при исчерпании молекулярного кислорода нитрогеназа возвращается в активное состояние.

У некоторых бактерий защиту нитрогеназы от молекулярного кислорода обеспечивает **морфологическая адаптация**. Типичным примером ее является образование у нитчатых цианобактерий специализированных клеток **гетероцист**, основная функция которых состоит в фиксации молекулярного азота. Гетероцисты образуются при недостатке в среде связанного азота. Зрелые гетероцисты крупнее вегетативных клеток, поверх клеточной стенки вегетативной клетки они окружены тремя дополнительными утолщенными покровами: внутренний пластинчатый гликолипидный слой, гомогенный промежуточный полисахаридный слой и наружный волокнистый полисахаридный слой. Гликолипидный и полисахаридный слои оболочки

гетероцисты – это барьеры, препятствующие диффузии газов внутрь гетероцисты. Гликолипидный слой утолщается когда возрастает парциальное давление  $O_2$ . В зрелых гетероцистах функционирует только фотосистема I. Компоненты фотосистемы II, выделяющей  $O_2$ , утрачиваются в процессе дифференцировки гетероцист. Гетероцисты не способны фиксировать  $CO_2$ , так как в них отсутствует фермент рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза. На поздней стадии дифференцировки гетероцист появляется нитрогеназная активность. Обмен метаболитами между гетероцистой и соседними вегетативными клетками осуществляется через микроплазмодесмы – мелкие поровые каналы в перегородке, отделяющей гетероцисту от вегетативной клетки.

Другой механизм морфологической адаптации, препятствующий доступу молекулярного кислорода к клеткам, – это продукция большого количества слизи (например, у бактерий рода *Azotobacter*). У симбиотических азотфиксирующих бактерий морфологическая адаптация реализуется путем образования корневых или стеблевых клубеньков у растений. В этих образованиях находятся азотфиксирующие бактерии в виде бактериоидов (разветвленных, булавовидных клеток). Для защиты нитрогеназы от молекулярного кислорода в клубеньках синтезируется пигмент *леггемоглобин*, который обладает высоким сродством к кислороду. Благодаря связыванию избытка кислорода леггемоглобином бактериоиды снабжаются им в количестве, достаточном для роста клеток и получения энергии, не препятствуя при этом фиксации азота.

У многих азотфиксирующих бактерий защиту от молекулярного кислорода обеспечивает *поведенческая адаптация*. Примером такой адаптации является агрегация клеток бактерий или образование тесных ассоциаций азотфиксаторов с аэробными гетеротрофами. Для подвижных азотфиксаторов эффективным способом защиты служит *отрицательный аэротаксис*, позволяющий бактериям избегать области среды с повышенным содержанием кислорода.

### **Биохимия азотфиксации**

Для фиксации молекулярного азота необходимы восстановительная сила и энергия. Энергия затрачивается на преодоление высокого активационного барьера для разрыва первой из трех чрезвычайно устойчивых при нормальной температуре связей в молекуле  $N\equiv N$ . В условиях промышленного синтеза  $NH_3$  из  $H_2$  и  $N_2$  (реакция Харбера-Боша) этот барьер преодолевается под действием высокой температуры и высокого давления в присутствии металлсодержащих катализаторов. Затраты АТФ и восстановителя при биологической фиксации азота настолько велики, что скорость роста бактерий и экономический коэффициент с использованием  $N_2$  в качестве источника азота значительно ниже, чем в присутствии  $NH_3$ .

Восстановитель и молекулы АТФ синтезируются в процессе брожения, дыхания или фотосинтеза. Восстановителем в нитрогеназной реакции служит восстановленный ферредоксин (в условиях дефицита железа он заменяется

флаводоксином). Восстановление ферредоксина может происходить различными путями (рисунок 54). У окисленных фототрофных цианобактерий ферредоксин восстанавливается фотосистемой I на свету и пируват:ферредоксиноксидоредуктазой в темноте. У анаэробных хемотрофов он восстанавливается ферредоксин-зависимыми оксидоредуктазами, такими как пируват:ферредоксиноксидоредуктаза, гидрогеназа и формиатдегидрогеназа.

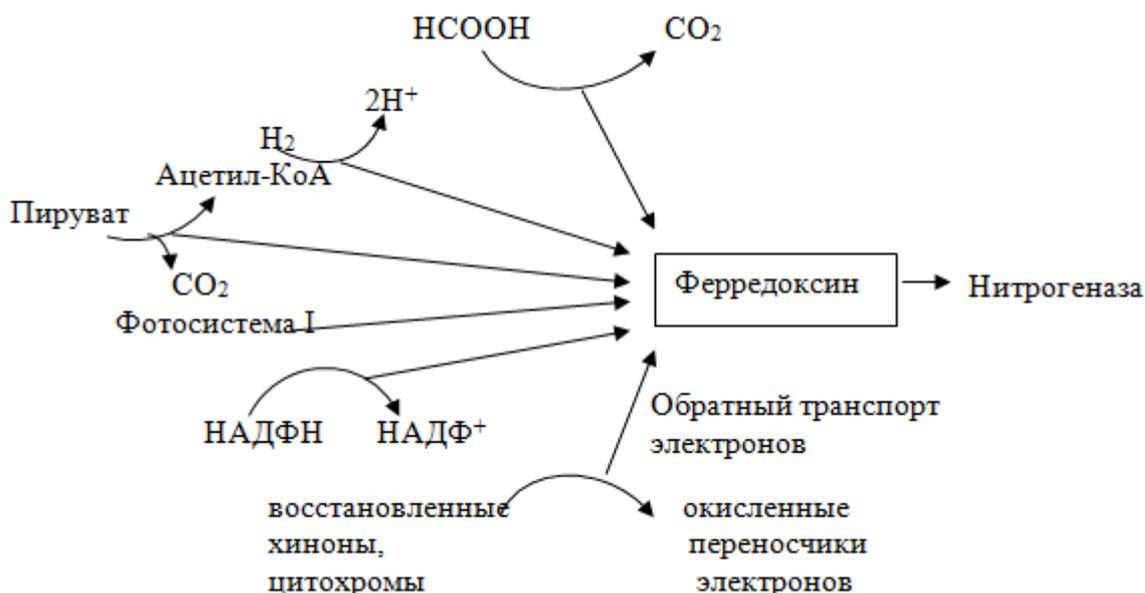
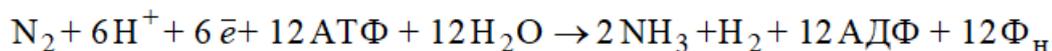


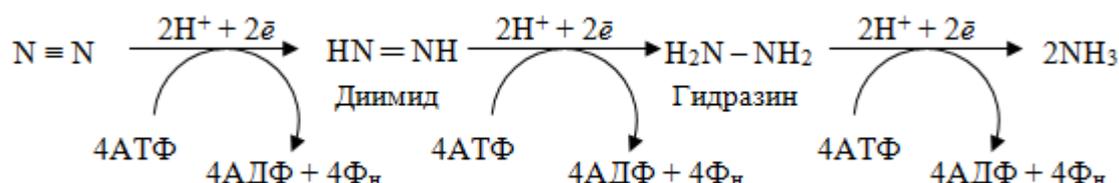
Рисунок 54 – Реакции восстановления ферредоксина как источника водорода для нитрогеназной реакции

У аэробных хемотрофов и анаэробных фототрофов восстановление ферредоксина происходит при участии НАДФН и ферредоксин:НАДФ<sup>+</sup>-оксидоредуктаз. У аэробных хемолитоавтотрофов ферредоксин восстанавливается путем энергезависимого обратного переноса на него электронов от НАДФН.

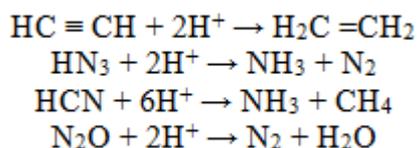
Восстановление одной молекулы N<sub>2</sub> до двух молекул NH<sub>3</sub> описывается следующим уравнением:



Данный процесс осуществляется в три последовательные стадии. Вначале N<sub>2</sub> превращается в диимид (HN = NH), затем в гидразин (H<sub>2</sub>N – NH<sub>2</sub>) и, наконец, в NH<sub>3</sub>:



Нитрогеназная система катализирует АТФ-зависимое восстановление не только молекулярного азота, но и ацетилена ( $\text{HC} \equiv \text{CH}$ ), азида, закиси азота, цианидов, нитритов, изонитрилов и протонов.



Общая схема фиксации азота приведена на рисунке 55.

Для измерения нитрогеназной активности используют реакцию восстановления ацетилена до этилена, потому что этилен можно легко определить с помощью газовой хроматографии. Применение этого удобного метода позволило значительно ускорить изучение азотфиксации. Для измерения азотфиксации применяют также радиоизотопный метод, определяя включение  $^{15}\text{N}$  из  $^{15}\text{N}_2$  в клетки бактерий с помощью масс-спектропии. Кроме этих методов, в качестве подхода для выявления способности к азотфиксации можно рассматривать применение генных зондов к консервативным участкам генов, ответственных за синтез нитрогеназы. Однако следует учитывать, что отрицательный результат в этом случае может быть следствием использования неподходящего зонда, тогда как положительный результат необходимо подтверждать с помощью других критериев. Вместе с тем существенным преимуществом данного подхода является то, что он позволяет выявлять гены нитрогеназы у организмов, не осуществляющих во многих условиях экспрессии.

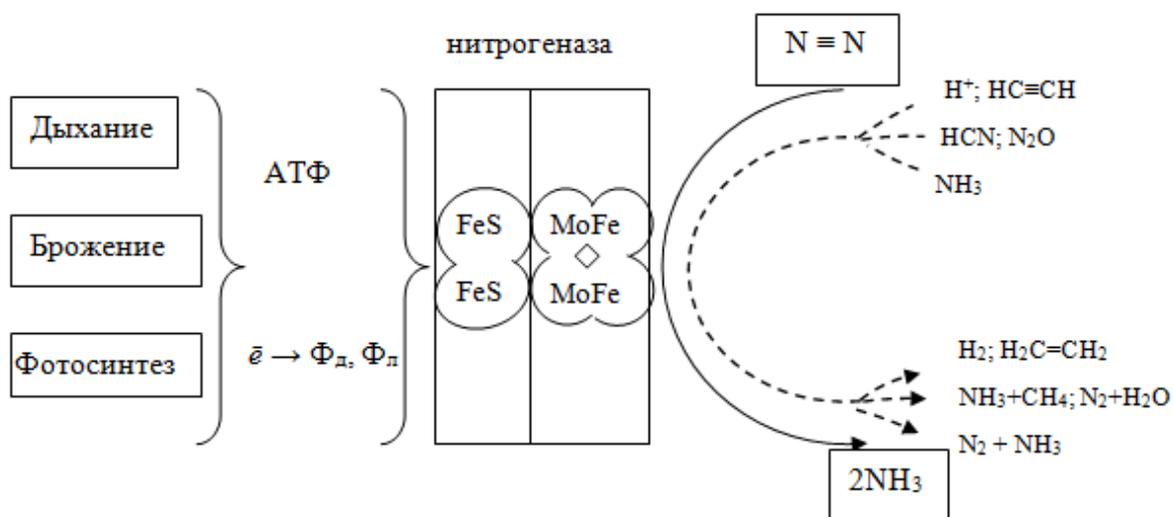


Рисунок 55 – Общая схема фиксации азота:

$\Phi_n$  – ферредоксин;  $\Phi_l$  – флаводоксин

## 1.5. Билюминесценция у бактерий

Способностью к билюминесценции обладают многие организмы – бактерии, грибы (*Armillaria mellea*, *Panus stipticus* и др.), водоросли, насекомые, моллюски и рыбы. Ферменты, субстраты и механизмы реакций, которыми обусловлено свечение этих организмов, существенно различаются, но во всех случаях реакция, приводящая к эмиссии света, требует участия  $O_2$ . Светящиеся бактерии встречаются в морских, пресноводных и наземных экосистемах. Они могут быть свободноживущими сапротрофами или симбионтами, обитающими в пищеварительном тракте и светящихся органах костистых рыб и кальмаров.

Светящиеся бактерии легко выделить из морской и солоноватой воды. На мясе и рыбе они образуют естественные накопительные культуры, особенно при низких температурах. Если морскую рыбу в неглубокой посуде наполовину залить соленой водой и оставить на несколько дней в холодильнике при 4 – 6 °С, то на поверхности рыбы появятся колонии светящихся бактерий, которые можно выделить и получить в чистой культуре.

Большинство светящихся бактерий относится к родам *Photobacterium* и *Vibrio*. Это грамотрицательные, факультативно анаэробные, хемоорганотрофные, передвигающиеся с помощью перитрихально или полярно расположенных жгутиков. Морские светящиеся бактерии являются галофилами; если поместить их в гипотеническую среду, они быстро лизируются.

В анаэробных условиях большинство светящихся бактерий осуществляют брожение смешанного типа, при котором образуются муравьиная, молочная, уксусная и янтарная кислоты, этанол,  $CO_2$  и ацетон.

Рост светящихся бактерий и их билюминесценция в сильной степени зависят от состава среды, в которой они находятся. Свечение наблюдается только в присутствии молекулярного кислорода, поэтому светящиеся бактерии еще в конце XIX века использовались как чувствительные индикаторы для выявления фотосинтетического образования кислорода у зеленых и красных водорослей в опытах со светом разной длины волны.

Интенсивность люминесценции у большинства светящихся бактерий четко зависит от плотности клеток в культуре: свечение густых культур может в 1000 раз превышать свечение разбавленных культур в расчете на одну клетку. Исследование этого эффекта у симбиотических бактерий *Vibrio fischeri* показало, что регуляция свечения, зависящая от плотности клеток (эффект «кворум-сенсинг»), происходит на уровне транскрипции. Клетки бактерий *V. fischeri* конститутивно синтезируют и выделяют в среду небольшое количество сигнального соединения – аутоиндуктора. Он накапливается в среде, по-видимому, пропорционально скорости роста и плотности бактерий. При высокой плотности клеток достигается пороговая концентрация аутоиндуктора, в которой он способен индуцировать люминесценцию. Легко проникающий через клеточную мембрану аутоиндуктор связывается в клетках с белком – регулятором транскрипции Lux R, который активирует экспрессию генов *lux CDABEGH*, ответственных за люминесценцию. У симбиотических светящихся



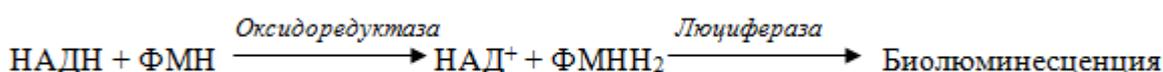
ферментного комплекса. Интенсивность свечения зависит от концентрации АТФ и НАДФН, потребляемых в реакции.

В последние годы получают все большее распространение методы исследований, основанные на биолюминесценции, в которых в качестве тест-объектов используют бактериальные суспензии, экстракты светящихся бактерий, изолированный фермент люциферазу.

Прежде всего, измерение биолюминесценции бактерий можно использовать для определения низких концентраций кислорода, так как при отсутствии кислорода светящиеся бактерии не способны к эмиссии света. Она усиливается пропорционально концентрации кислорода в среде в интервале концентраций  $O_2$  от  $2 \cdot 10^{-8}$  до  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л.

Можно использовать светящиеся бактерии и в качестве живых организмов, на которых изучают действие различных токсических веществ. Светящиеся бактерии чувствительны к примесям токсических веществ в воде, и измерение биолюминесценции можно использовать для определения загрязнения воды токсическими соединениями, например ионами тяжелых металлов. Свечение бактерий можно использовать для предварительной оценки эффективности новых антибиотиков.

Но наиболее перспективно применение очищенных препаратов бактериальной люциферазы. Фермент, очищенный от примесей низкомолекулярных соединений, обладает способностью к излучению света лишь в присутствии всех трех субстратов: кислорода, ФМНН<sub>2</sub> и длинноцепочечного альдегида (с длиной цепи не менее восьми углеродных атомов). Добавив к изолированной бактериальной люциферазе ФМНН<sub>2</sub>, можно получить высокочувствительную систему для определения алифатических альдегидов. К их числу принадлежат, в частности, половые гормоны насекомых, феромоны, которые обнаруживаются в количестве  $10^{-14}$  моля, что позволяет изучать метаболизм этих веществ у одной особи. В медицине найдет также широкое применение анализ содержания ФМН и ФАД, основанный на биолюминесцентном определении ФМНН<sub>2</sub>, образующегося при их предварительном восстановлении. Наиболее перспективными для использования в биохимических и клинических лабораториях являются препараты, состоящие из двух ферментов: бактериальной люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы. Например, к комплексу реактивов для анализа биолюминесценции (КРАБ), производимом в России, содержатся люцифераза и оксидоредуктаза, выделенные из биомассы светящихся бактерий. Добавив к препарату в присутствии С<sub>15</sub>-альдегида НАДН, можно получить высокочувствительный реактив для определения ФМН (без его предварительного восстановления):



Наоборот, если добавить к смеси люциферазы и оксидоредуктазы альдегид и ФМН, то такая смесь может использоваться как биолюминесцентная тест-

система для количественного определения НАДН в биологических материалах (схема реакции такая же).

Таким образом, в настоящее время началось достаточно активное использование методов, основанных на биоллюминесценции, в биохимических и клинических исследованиях. Создаются серийные приборы биоллюминометры, выпускаются наборы реактивов для анализов, многие люциферазы получают методами генной инженерии.

## 1.6. Регуляция метаболизма у прокариот

Клетка бактерий *E. coli* содержит около  $10^7$  молекул белка. С другой стороны, в ДНК этих бактерий зашифрована информация о структуре примерно 3000 разных белков. Если бы все 3000 бактериальных генов работали одинаково эффективно, т. е. все типы клеточных белков синтезировались в одинаковом количестве, то каждая клетка бактерий *E. coli* содержала бы около 3000 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 500 000 молекул на клетку. Это свидетельствует о том, что в клетке *E. coli* различные белки синтезируются не в одинаковых количествах, т. е. не все гены клетки в одно и то же время экспрессируются одинаково эффективно. Следовательно, существуют механизмы, обеспечивающие регуляцию биохимической активности бактериальной клетки.

В начале прошлого века было выяснено, что ферментативные свойства микроорганизмов зависят от того, на какой среде они были выращены, т. е. клетки можно «тренировать» или «воспитывать». Если некоторые штаммы дрожжей выращивать в среде с лактозой, то они утилизируют ее за счет наличия 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 30-х гг. прошлого столетия Х. Карстром, изучив образование ряда ферментов углеводного метаболизма у бактерий, разделил их на два класса: **адаптивные ферменты**, которые образуются только в присутствии своего субстрата в среде, и **конститутивные ферменты**, образующиеся независимо от состава среды.

Одним из ферментов бактерий *E. coli*, отнесенных к классу адаптивных является β-галактозидаза. Этот фермент катализирует реакцию гидролиза своего естественного субстрата лактозы, а также других β-галактозидов. Было 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  $\beta$ -галактозидазы у *E. coli* занимался Ж. Моно в 50-х гг. прошлого столетия. В результате он переименовал феномен адаптации в «**индукцию ферментов**», а вещества, в присутствии которых в клетках образовывались соответствующие ферменты (например, лактоза), были названы **индукторами**. Ферменты, синтезируемые в присутствии индукторов, получили название индуцибельных. Следовательно, в настоящее время различают конститутивные и индуцибельные ферменты.

Существуют 2 способа регуляции метаболизма у бактерий:

- 1) **на уровне активности ферментов**, или регуляция активности ферментов;
- 2) **на уровне генов**, или регуляция синтеза ферментов.

### 1.6.1. Регуляция активности ферментов

Наиболее быстрым и тонким механизмом регуляции активности ферментов является регуляция, которой подвергаются аллостерические ферменты. **Аллостерические ферменты** – белки с высокой молекулярной массой, состоящие в большинстве случаев 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 56).

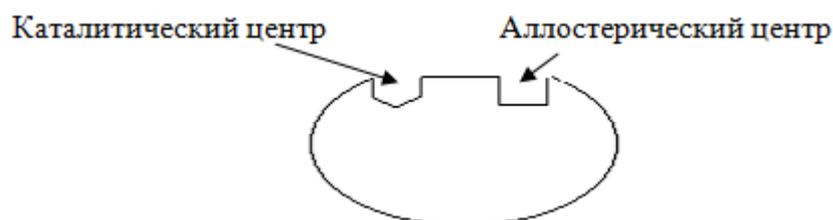
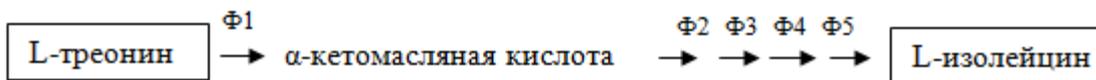


Рисунок 56 – Субъединица аллостерического фермента

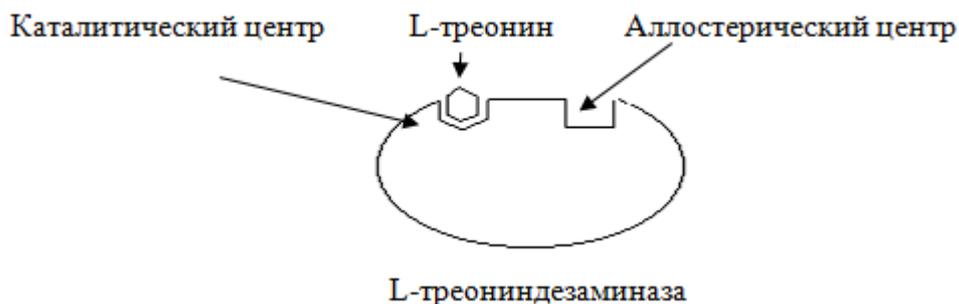
Эффекторами могут быть конечные продукты данного метаболического пути, субстраты ферментов, а также некоторые конечные продукты родственных метаболических путей. Если действие эффектора приводит к понижению каталитической активности фермента, такой эффектор называется отрицательным, или ингибитором. 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 или ключевого фермента неразветвленного биосинтетического пути. Если конечный продукт накапливается в избытке, он подавляет активность первого фермента. Этот

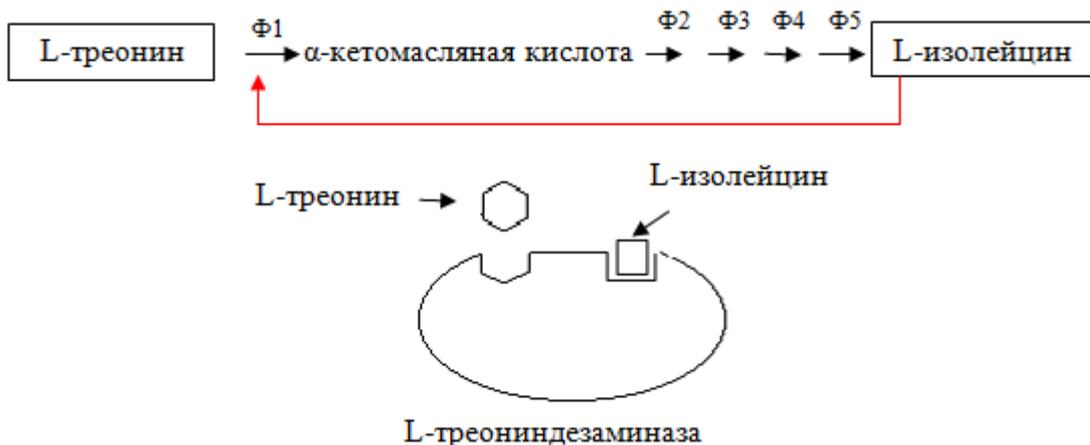
процесс называется **ретроингибированием**, или ингибированием по принципу обратной связи. Примером такого типа регулирования является ингибирование биосинтеза изолейцина. Превращение L-треонина в L-изолейцин включает пять ферментативных реакций:



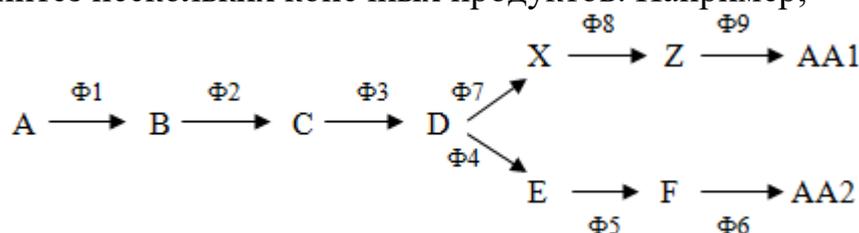
Первый фермент на пути синтеза L-изолейцина L-треонинде-заминаза является аллостерическим и ингибируется только L-изолейцином. На поверхности молекулы L-треониндезаминазы имеется два вида участков: каталитический – для связывания субстрата (L-треонина) и регуляторный – для связывания эффектора (L-изолейцина):



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



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

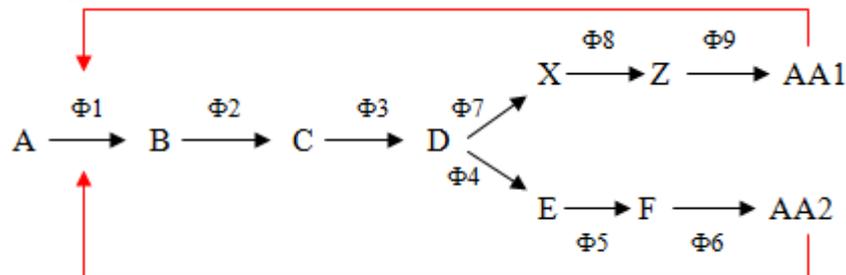


В этом случае на поверхности молекулы фермента (Φ1), катализирующего первый этап биосинтетического пути, имеются различные аллостерические центры, с каждым из которых связывается один из конечных продуктов,

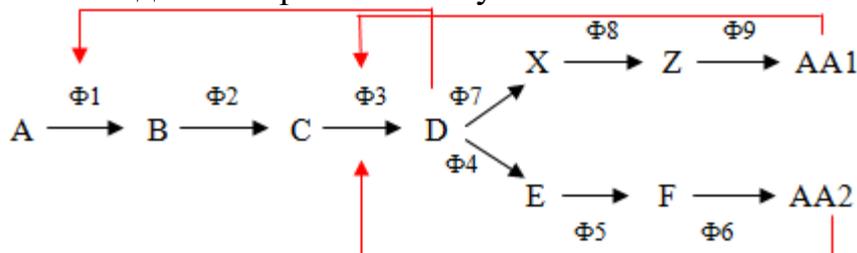
выполняющих функцию эффектора. Ингибирование активности этого фермента может происходить двояко:

- **мультивалентное ингибирование** – необходимо связывание с аллостерическими центрами всех конечных продуктов. Каждый конечный продукт (эффектор) по отдельности, связавшись со «своим» аллостерическим центром, не меняет активности фермента.

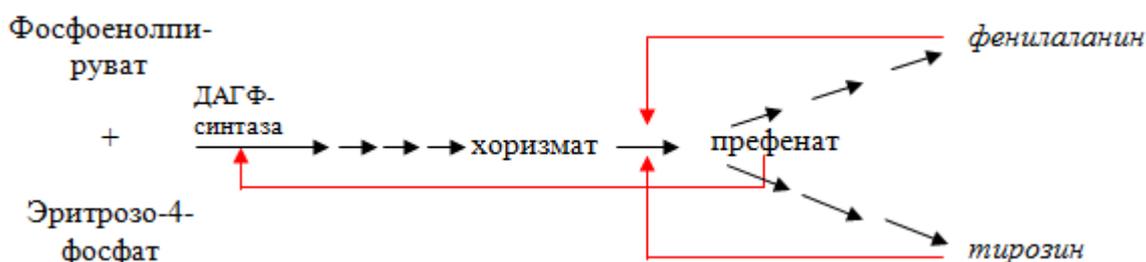
- **кумулятивное, или аддитивное ингибирование** – присоединение к ферменту одного конечного продукта частично снижает его активность, с присоединением каждого последующего конечного продукта эффект ингибирования нарастает:



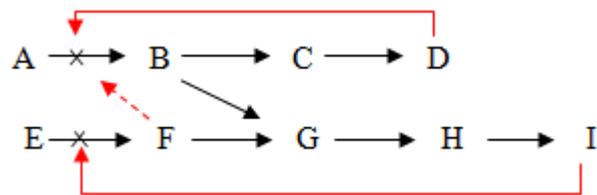
В некоторых разветвленных биосинтетических путях ингибирование первого фермента осуществляется не конечными продуктами каждой из ветвей, а промежуточным продуктом, образующимся непосредственно перед разветвлением. Накопление его в свою очередь контролируется конечными продуктами. Такой вид ингибирования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



Примером такого ретроингибирования является ингибирование фермента 3-дезоксид-D-арабиногептулозо-7-фосфатсинтазы (ДАГФ-синтазы) у бактерий *B. subtilis* префенатом:



Существуют разветвленные метаболические пути, в которых регуляция осуществляется таким образом, что одновременно существуют и активация и ингибирование:



Метаболит В является общим для двух путей синтеза конечных продуктов D и I. При накоплении вещества D оно ингибирует аллостерический фермент, который катализирует превращение А в В ( $A \rightarrow B$ ), но вещество F является активатором этой же реакции. Вещество D поэтому продолжает синтезироваться. Количество вещества В после активации становится достаточным для синтеза продукта I. Затем, когда синтез продукта I будет завершен, он блокирует реакцию  $E \rightarrow F$ . Концентрация продукта F падает и поэтому активность фермента реакции  $A \rightarrow B$  снижается. Такой двойной контроль обеспечивает необходимое количество продукта В, которое создает условия для синтеза двух конечных продуктов D и I.

В настоящее время в селекции микроорганизмов – продуцентов аминокислот и других биологически активных продуктов используются методы получения мутантов, нечувствительных к ретроингибированию. Такие мутанты все время синтезируют нужный конечный продукт.

Кроме ретроингибирования 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 глутаминсинтетазы, катализирующего превращение у бактерий глутамата в глутамин в реакции восстановительного аминирования. Аминогруппа глутамина с помощью фермента глутаматсинтетазы может быть перенесена на 2-оксоглутарат. Таким образом, глутаминсинтетаза и глутаматсинтетаза 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 этих ионов в среде, в которой культивируются бактерии, происходит подавление синтеза фермента глутаминсинтетазы и снижение активности имеющегося фермента в клетках. Снижение активности фермента глутаминсинтетазы 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 глутаминсинтетазы снижается. В результате этого синтез глутамина прекращается. При удалении из среды ионов аммония в клетках бактерий создается недостаток глутамина и фермент глутаминсинтетаза снова становится активным в результате отщепления групп адениловой кислоты (АМФ) под действием деаденилирующей системы.

## 1.6.2. 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  $\beta$ -галактозидазы у бактерий *E. coli*. Если бактерии *E. coli* выращивать в среде с глюкозой, то  $\beta$ -галактозидаза не синтезируется. Если клетки перенести в среду с лактозой, то содержание фермента  $\beta$ -галактозидазы, участвующего в расщеплении лактозы на глюкозу и галактозу, увеличивается в 1000 раз. Такая активация транскрипции называется **индукцией**. Одновременно с  $\beta$ -галактозидазой индуцируется синтез еще двух ферментов:  $\beta$ -галактозидпермеазы, обеспечивающей транспорт лактозы внутрь клетки через цитоплазматическую мембрану, и  $\beta$ -галактозидтрансацилазы, которая ацетирует 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 57).

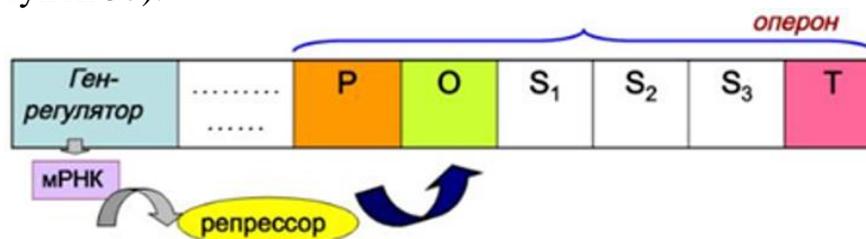


Рисунок 57 – Схематическое изображение лактозного оперона бактерий *E. coli*:  
P – промотор; O – оператор; S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> – структурные гены; T – терминатор

Lac-оперон состоит из кодирующей области, представленной тремя структурными генами, ответственными за синтез ферментов:  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидпермеазы и  $\beta$ -галактозидтрансацилазы; а также из промоторно-операторной области. Оператор представляет собой небольшой участок ДНК, граничащий с первым структурным геном. С оператором может связываться белок-репрессор, блокируя инициацию (начало) транскрипции. Промотор – это небольшой участок ДНК перед оператором. Он служит местом связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы (транскриптазы) и от него начинается транскрипция ДНК. 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 индуцибельные и репрессибельные. *Индукцибельные опероны* ответственны за катаболизм лактозы, арабинозы, галактозы и других углеводов. Рассмотрим работу индуцибельного оперона на примере Lac-оперона (рисунок 58).

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  $\beta$ -галактозидпермеазы внутрь клетки и с помощью фермента  $\beta$ -галактозидазы превращается в аллолактозу, которая действует как внутренний индуктор. Ферменты  $\beta$ -галактозидпермеаза и  $\beta$ -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.

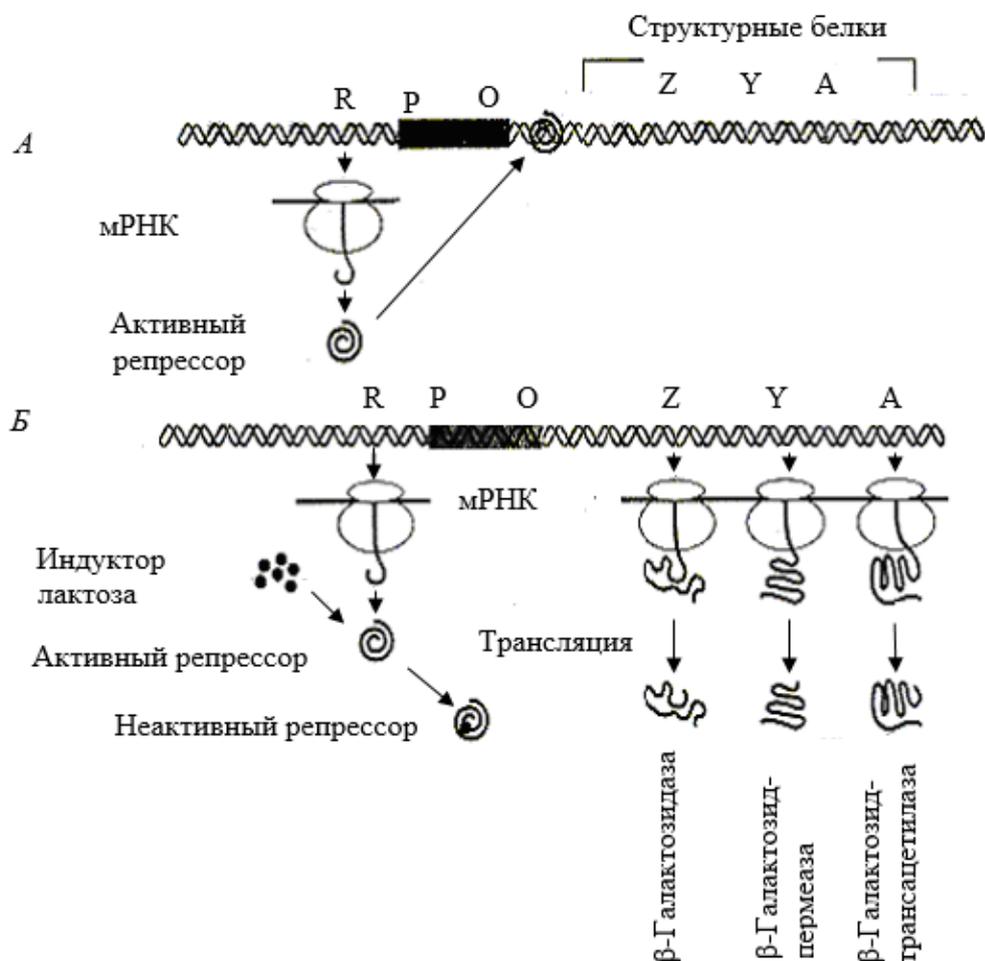


Рисунок 58 – Работа лактозного оперона бактерий *E. coli*:  
 А – без лактозы; Б – с лактозой

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 САР (*catabolite activator protein*). Однако БАК может связаться с промотором только в том случае, если в клетке в достаточно высокой концентрации присутствует циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), т. е. БАК связывается с промотором только в комплексе с цАМФ. Если в клетке цАМФ отсутствует, то БАК не способен взаимодействовать с промотором. Это было установлено с использованием феномена **диауксического роста** (или диауксии) – при наличии в среде глюкозы и лактозы клетки бактерий вначале используют глюкозу, а затем после ее полного израсходования начинают катаболизировать лактозу. Оказалось, что

глюкоза репрессирует синтез  $\beta$ -галактозидазы. При наличии в среде глюкозы в клетке резко снижается количество цАМФ. Это явление называют **катаболитной репрессией**. Оно наблюдается и в тех случаях, когда вместо лактозы используется какой-то другой углевод. Катаболитная репрессия глюкозой может быть снята, если в среду добавить цАМФ. Образуется комплекс цАМФ с БАК, и РНК-полимераза присоединяется к промотору, а далее идет синтез ферментов катаболизма лактозы, даже в присутствии глюкозы.

Кроме индуцибельных оперонов, управляющих катаболизмом углеводов, у бактерий имеются и **репрессибельные опероны**. Это опероны, ответственные за синтез аминокислот аргинина, гистидина и триптофана. Максимальная транскрипция структурных генов этих оперонов достигается только при отсутствии в клетке конечных продуктов или эффекторов этих биосинтетических путей. Такие эффекторы, которыми являются конечные продукты, называют **корепрессорами**, а соответствующие регуляторные белки – **апорепрессорами**. Синтез ферментов репрессибельного оперона включается посредством дерепрессии структурных генов.

Разберем строение триптофанового оперона *E. coli* (рисунок 59). 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.

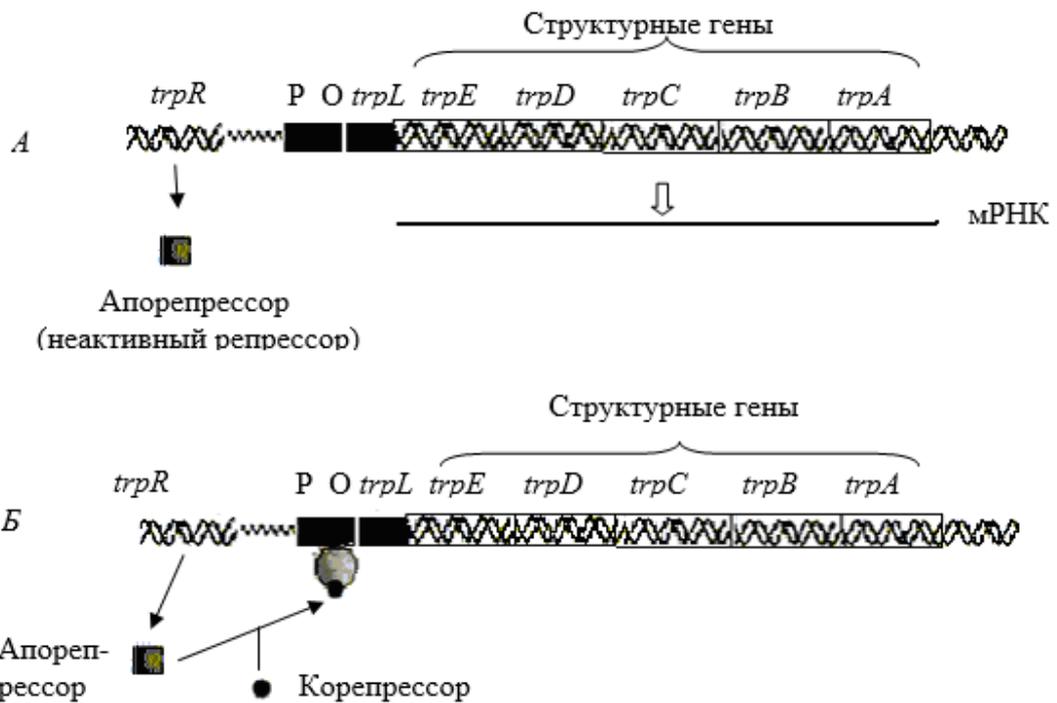


Рисунок 59 – Работа триптофанового оперона бактерий *E. coli*:  
 А – нет триптофана; Б – избыток триптофана

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 60).

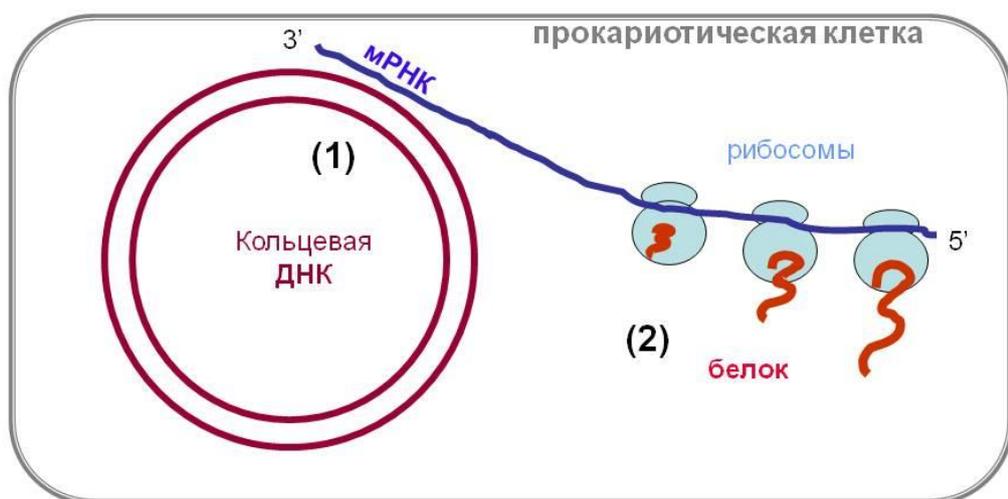


Рисунок 60 – У прокариот транскрипция (1) и трансляция (2) не разделены ни в пространстве, ни во времени

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-a). 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 61).

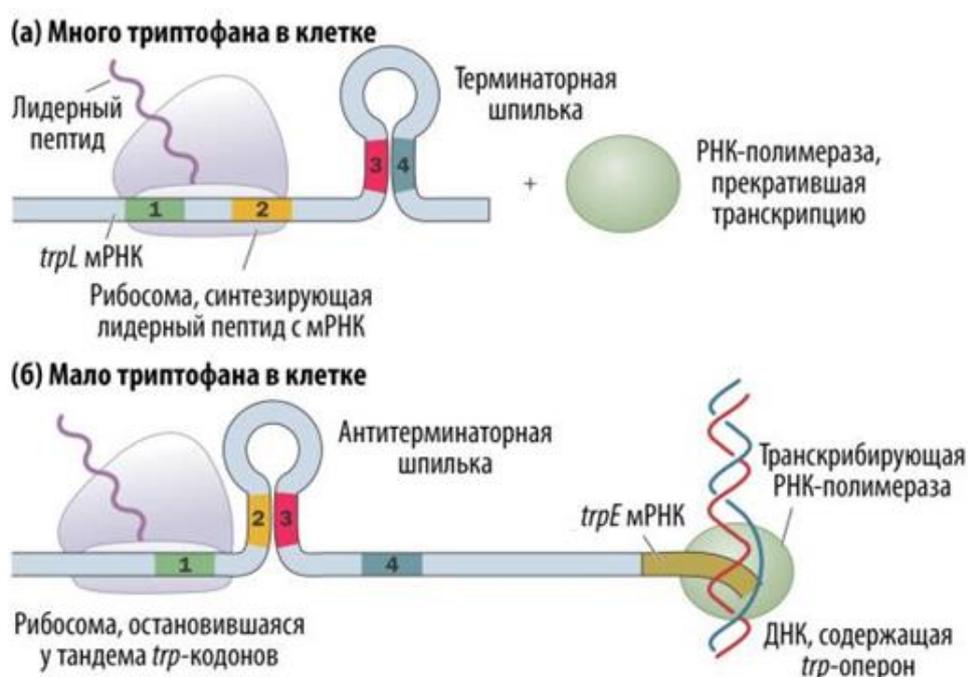


Рисунок 61 – Регуляция транскрипции аттенуатором в триптофановом опероне бактерий *E. coli*

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 модулон. 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 внутривидовым 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 аутоиндуктор, накапливающийся в среде; когда его концентрация превышает пороговый уровень (обычно при высокой плотности клеток), он вызывает **аутоиндукцию**, т.е. активацию определенных генов.

У грамотрицательных бактерий аутоиндукторы представляют собой N-ацетилгомосеринлактоны. Аутоиндукторы регулируют, например, такие процессы, как: биолюминесценция у бактерий *Vibrio fischeri*, «роение» у бактерий *Proteus mirabilis*, вирулентность у бактерий *Pectobacterium*

*carotovorum* и *Pseudomonas aeruginosa*, превращение нормальных клеток бактерий *Rhizobium* spp. в бактериоиды, наблюдаемые в ферментерах эффекты слипания и флокуляции клеток, а также другие типы кооперативного поведения.

## 2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

### Программа лабораторных занятий

#### Дневная форма получения высшего образования

*Тема 1.* Изучение значения отдельных элементов питания на рост микроорганизмов (на примере *Aspergillus brasiliensis*) (6 ч).

*Тема 2.* Выявление окислительно-восстановительных ферментов у бактерий. Методы изучения продукции гидролитических ферментов у бактерий (4 ч).

*Тема 3.* Утилизация микроорганизмами источников углерода и органических азотсодержащих соединений (4 ч).

*Тема 4.* Изучение молочнокислого брожения. Определение количества и качественные реакции на молочную кислоту. Микроскопическое изучение молочнокислых бактерий (6 ч).

*Тема 5.* Изучение маслянокислого брожения. Качественные реакции на масляную кислоту. Микроскопическое изучение маслянокислых бактерий (6 ч).

#### Заочная форма получения высшего образования

*Тема 1.* Изучение значения отдельных элементов питания на рост микроорганизмов (на примере *Aspergillus brasiliensis*) (2 ч).

*Тема 2.* Выявление окислительно-восстановительных ферментов у бактерий. Методы изучения продукции гидролитических ферментов у бактерий (2 ч).

### **3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ**

#### **3.1. Перечень рекомендуемых средств диагностики**

Учебным планом специальностей 6-05-0511-03 Микробиология 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. Питание микроорганизмов (2 ч)**

Потребности микроорганизмов в питательных веществах. Транспорт питательных веществ в клетки микроорганизмов. Типы питания микроорганизмов.

(Форма контроля – выполнение тестов на образовательном портале БГУ *edubio.bsu.by*).

##### **Тема 2. Метаболизм микроорганизмов (2 ч)**

Назначение метаболизма у микроорганизмов. Энергетический метаболизм микроорганизмов. Конструктивный метаболизм микроорганизмов. Регуляция метаболизма у микроорганизмов.

(Форма контроля – выполнение тестов на образовательном портале БГУ *edubio.bsu.by*).

##### **Тема 3. Фиксация молекулярного азота микроорганизмами (1 ч)**

Симбиотические, свободноживущие и ассоциативные азотфиксаторы. Ферменты нитрогеназы. Механизмы защиты ферментов нитрогеназ от молекулярного кислорода у азотфиксирующих прокариот. Биохимия азотфиксации у прокариот. Симбиоз клубеньковых бактерий и бобовых растений.

(Форма контроля – выполнение тестов на образовательном портале БГУ *edubio.bsu.by*).

#### **Тема 4. Билюминесценция микроорганизмов (1 ч)**

Зависимость интенсивности билюминесценции от плотности клеток микроорганизмов в популяции. Механизм билюминесценции. Использование в лабораторной практике.

(Форма контроля – выполнение тестов на образовательном портале БГУ *edubio.bsu.by*).

#### **3.3. Темы реферативных работ**

1. Питание микроорганизмов. Физиологические группы питания.
2. Транспорт веществ в клетку микроорганизмов.
3. Синтез молекул АТФ у бактерий при аэробном росте на среде с глюкозой.
4. Синтез молекул АТФ у дрожжей при аэробном росте на среде с глюкозой.
5. Синтез молекул АТФ у микроорганизмов в процессе анаэробного дыхания.
6. Синтез молекул АТФ у микроорганизмов в процессе брожения.
7. Разложение микроорганизмами целлюлозы, гемицеллюлоз, лигнина и пектиновых веществ.
8. Аэробное и анаэробное расщепление аминокислот микроорганизмами.
9. Разложение углеводов и ксенобиотиков микроорганизмами.
10. Окисление неорганических соединений прокариотами.
11. Использование микроорганизмами солнечной энергии.
12. Биосинтез аминокислот: предшественники, способы биосинтеза. Биосинтез ароматических аминокислот.
13. Биосинтез углеводов.
14. Фиксация молекулярного азота прокариотами.
15. Регуляция метаболизма у прокариот.

#### **3.4. Примерный перечень вопросов к экзамену**

1. Питание микроорганизмов. Ферментативное оснащение микроорганизмов, обеспечивающее утилизацию питательных веществ. Факторы роста. Ауксотрофы и прототрофы.
2. Физиологические группы питания прокариот. Молекулярный кислород, азот и железо как элементы питания прокариот.
3. Транспорт веществ в клетку прокариот.
4. Механизмы автотрофной фиксации  $\text{CO}_2$  у микроорганизмов.
5. Ассимиляция  $\text{CO}_2$  гетеротрофными микроорганизмами.
6. Метаболизм микроорганизмов. Назначение метаболических реакций у микроорганизмов.

7. Энергетический метаболизм прокариот. Характеристика типов энергетического метаболизма. Способы синтеза АТФ у прокариот. Источники энергии у прокариот.
8. Пути катаболизма углеводов у прокариот.
9. Аэробное дыхание у микроорганизмов.
10. Строение дыхательных цепей микроорганизмов.
11. Синтез АТФ в дыхательной цепи митохондрий дрожжей.
12. Синтез АТФ в дыхательной цепи бактерий *E.coli*.
13. Анаэробное дыхание – один из типов энергетического метаболизма у прокариот. Доноры и акцепторы электронов, используемые прокариотами при анаэробном дыхании.
14. Нитратное дыхание. Денитрифицирующие прокариоты; их характеристика, распространение в природе и значение.
15. Диссимиляционная сульфатредукция. Сульфатвосстанавливающие прокариоты; их характеристика, распространение в природе и значение.
16. Метаногенез. Распространение в природе, характеристика и значение метаногенных архей.
17. Спиртовое брожение. Эффект Пастера. Микроорганизмы, осуществляющие спиртовое брожение. Значение спиртового брожения.
18. Молочнокислое брожение, его типы. Распространение молочнокислых бактерий и их практическое использование.
19. Маслянокислое брожение. Практическое использование бактерий, осуществляющих маслянокислое брожение.
20. Ацетонобутиловое брожение. Двухфазность ацетонобутилового брожения. Практическое использование.
21. Пропионовокислое брожение: пути образования пропионовой кислоты у прокариот. Распространение пропионовокислых прокариот в природе. Практическое использование.
22. Брожение смешанного типа.
23. Бутандиоловое брожение.
24. Неполное окисление органических соединений микроорганизмами. Уксуснокислое брожение.
25. Использование белков микроорганизмами.
26. Аэробное расщепление аминокислот микроорганизмами.
27. Сбраживание аминокислот микроорганизмами. Реакция Стигленда.
28. Анаэробное разложение (сбраживание) азотистых оснований микроорганизмами.
29. Аэробное окисление азотистых оснований микроорганизмами.
30. Окисление липидов и фосфолипидов микроорганизмами.
31. Разложение целлюлозы микроорганизмами.
32. Разложение гемицеллюлоз и глюконов микроорганизмами.
33. Разложение лигнина и пектиновых веществ микроорганизмами.
34. Разложение хитина и хитозана микроорганизмами.
35. Разложение алканов микроорганизмами.
36. Разложение ароматических углеводов микроорганизмами.

37. Разложение ксенобиотиков микроорганизмами.
38. Неполное окисление органических веществ микроорганизмами. Уксуснокислое брожение.
39. Биосинтез аминокислот бактериями, основные предшественники и пути биосинтеза.
40. Биосинтез ароматических аминокислот бактериями.
41. Биосинтез нуклеотидов бактериями.
42. Биосинтез липидов бактериями.
43. Биосинтез углеводов автотрофными и гетеротрофными бактериями.
44. Биосинтез пептидогликана муреина бактериями.
45. Симбиотические, свободноживущие и ассоциативные азотфиксаторы.
46. Ферменты нитрогеназы. Механизмы защиты ферментов нитрогеназ от молекулярного кислорода у азотфиксирующих прокариот.
47. Биохимия азотфиксации у прокариот.
48. Симбиоз клубеньковых бактерий и бобовых растений.
49. Билюминесценция у бактерий. Зависимость интенсивности люминесценции от плотности клеток бактерий в популяции.
50. Фотосинтетические пигменты у фототрофных прокариот.
51. Структурная организация фотосинтетического аппарата у фототрофных прокариот.
52. Кислородный фотосинтез у прокариот.
53. Характеристика прокариот, осуществляющих кислородный фотосинтез.
54. Аноксигенный фотосинтез у прокариот.
55. Характеристика прокариот, осуществляющих аноксигенный фотосинтез.
56. Фотосинтез у экстремально галофильных архей.
57. Хемолитотрофные прокариоты; их группы и характеристика.
58. Окисление неорганических соединений азота. Нитрифицирующие прокариоты; их распространение в природе и значение.
59. Окисление неорганических соединений серы прокариотами. Тионовые прокариоты и бесцветные серные прокариоты; их характеристика, распространение в природе и значение.
60. Металлоокисляющие прокариоты. Окисление ионов железа. Ацидофильные и нейтрофильные железобактерии; их характеристика, распространение в природе и значение.
61. Окисление молекулярного водорода прокариотами. Водородные прокариоты; их характеристика, распространение в природе и значение.
62. Окисление оксида углерода прокариотами. Карбокситрофные прокариоты.
63. Использование микроорганизмами C1-соединений. Метилотрофные микроорганизмы; их практическое применение.
64. Регуляция метаболизма у прокариот на уровне активности ферментов.
65. Регуляция метаболизма у прокариот на уровне генов. Оперонная организация хромосом у прокариот.
66. Индуцибельные опероны. Катаболитная репрессия.

67. Репрессибельные опероны. Аттенуация.

68. Регулон. Модулон. Регуляция на уровне мультигенных семейств.  
Аутоиндукция.

## 4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

### 4.1. Рекомендуемая литература

#### Основная

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. *Нетрусов, А.И.* Микробиология: теория и практика. В 2 ч. / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Издательство Юрайт, 2024.

#### Перечень дополнительной литературы

1. *Белясова, Н.А.* Микробиология / Н.А. Белясова. Мн.: БГТУ, 2005.
2. *Гутина, В.Н.* Очерки по истории физиологии микроорганизмов / В.Н. Гутина. М.: Наука, 1988.
3. *Лысак, В.В.* Микробиология: учебное пособие / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2008.
4. *Лысак, В.В.* Физиология микроорганизмов: учебное пособие / В.В. Лысак. – Минск: Изд. центр БГУ, 2014.
5. *Лысак В.В.* Физиология микроорганизмов: учеб.-метод. пособие / В.В. Лысак, Е.И. Игнатенко. Минск: БГУ, 2016.
6. *Нетрусов, А.И.* Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. М.: Издательский центр «Академия», 2005.
7. *Работнова, И.Л.* История и перспективы общей физиологии микроорганизмов / И.Л. Работнова. М.: МаксПресс, 2012.
8. Современная микробиология / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. Т. 1–2.
9. *Шлегель, Г.* История микробиологии / Г. Шлегель. М.: Едиториал УРСС, 2002.

## 4.2. Электронные ресурсы

1. Образовательный портал БГУ по специальности 6-05-0511-03 Микробиология. Курс «Физиология микроорганизмов». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://edubio.bsu.by/course/view.php?id=31> – Дата доступа: 13.02.2025.

2. Физиология микроорганизмов. Учебная программа учреждения высшего образования по учебной дисциплине для специальности: 6-05-0511-03 Микробиология [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/296391> – Дата доступа: 13.02.2025..

3. *Лысак В.В.* Микробиология: учебное пособие / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/15766> – Дата доступа: 13.02.2025.

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: 13.02.2025.

5. *Лысак В.В.* Физиология микроорганизмов: учеб.-метод. пособие / В.В. Лысак, Е.И. Игнатенко. – Минск: БГУ, 2016. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/158508> – Дата доступа: 13.02.2025.