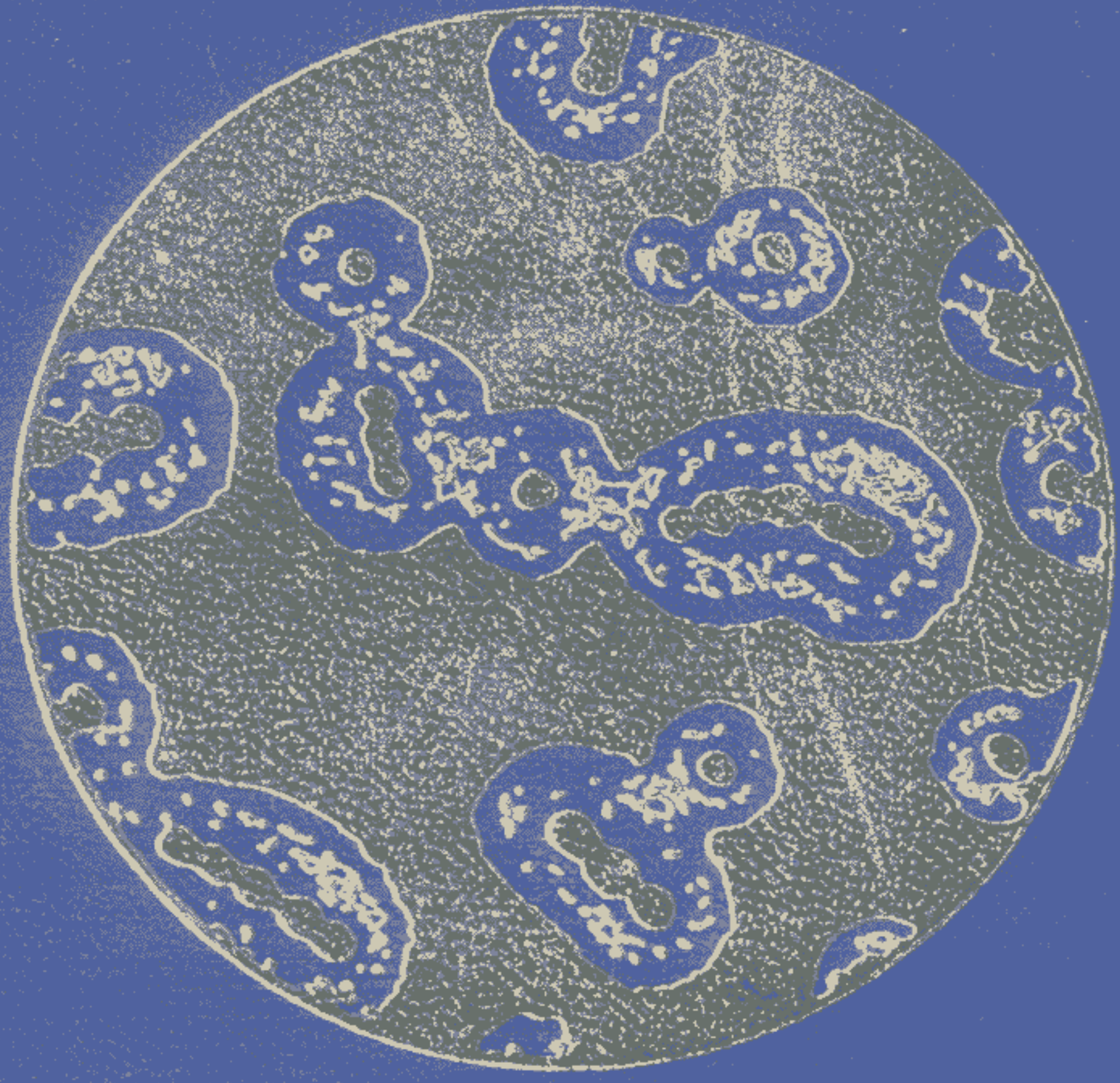
О.М. КОЛЕШКО, Т.В. ЗАВЕЗЕНОВА

МИКРОБИОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ ВИРУСОЛОГИИ



О. И. Колешко, Т. В. Завезенова

МИКРОБИОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ ВИРУСОЛОГИИ

Учебник

Рекомендован
Государственным Комитетом
Российской Федерации
по высшему образованию
в качестве учебника для
биологических специальностей
университетов

Издательство Иркутского госуниверситета
1999

ББК 28.4
К60

УДК 576.80.85

Учебник издается в рамках выполнения работ по проекту № А0037 «Восточно-Сибирский учебно-научный центр фундаментального образования» (подпроект 2.1 - 181 «Восточно-Сибирский учебно-научный центр (музей) по микробиологии») Федеральной целевой программы «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки на 1997-2000 годы»

Представлено к изданию Иркутским государственным университетом

**Рецензенты: доктор мед. наук Р. В. Киборт;
доктор биол. наук Т. Г. Зименко**

К60 Колешко О. И., Завезенова Т. В. Микробиология с основами вирусологии: Учебник -Иркутск :Изд-во Иркут. ун-та, 1999.- 452 с., 94 ил.

В учебнике изложены современные данные об организации и жизнедеятельности прокариотных микроорганизмов: строение, химический состав и биохимические функции бактериальной клетки; метаболизм и его регуляция; организация генетического аппарата и способы переноса наследственной информации; экология и геологическая деятельность микроорганизмов. С точки зрения современных представлений освещаются вопросы общей вирусологии.

Книга предназначена для студентов биологических факультетов университетов, а также преподавателей и аспирантов, для специалистов - микробиологов.

ББК 28.4

$$К\ \frac{1905000000-113}{M179(03)-99}$$

ISBN–5–7430–0094–8

**© Колешко О.И.,
Завезенова Т.В., 1999**

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 5
Введение 6
Глава 1. История развития микробиологии 12
Глава 2. Микроорганизмы и их классификация 28
2.1. Прокариоты и эукариоты 28
2.2. Проблемы систематики прокариот 33
2.3. Классификация прокариот 37
Глава 3. Морфология и анатомия бактерий 39
3.1. Форма и размеры бактерий 39
3.2 .Строение бактериальной клетки. Функция клеточных структур..... 45
3.3. Покоящиеся формы прокариот 85
Глава 4. Рост и размножение бактерий 95
4.1. Рост бактериальной клетки 95
4.2. Размножение бактерий 96
4.3. Размножение бактериальной популяции. Периодическая культура 98
Глава 5. Действие на микроорганизмы физических и химических факторов 107
5.1. Физические факторы 107
5.2. Физико-химические и химические факторы..... 122
Глава 6. Питание микроорганизмов 131
6.1. Ферментное оснащение микроорганизмов..... 131
6.2. Физиология питания 132
6.3. Типы питания 136
6.4. Потребности микроорганизмов в дополнительных питательных веществах 142
Глава 7. Метаболизм прокариот 145
7.1. Катаболизм и энергетические процессы 145
7.2. Аминокислоты как источник энергии 172
7.3. Липиды как источник энергии 176
7.4. Биосинтетические процессы 180
7.5. Регуляция метаболизма 196
Глава 8. Прокариоты. Основные группы..... 206
8.1. Отдел I. GRACILICUTES 206
8.2. Отдел II. FIRMICUTES 232
8.3. Отдел III. TENERICUTES 244
8.4. Отдел IV. MENDOSICUTES..... 249
Глава 9. Вирусы 260
9.1. Свойства и происхождение вирусов 260

9.2. Бактериофаги 275
9.3. Репродукция вирусов животных 284
9.4. Противовирусный иммунитет. Интерферон 292
Глава 10. Генетика бактерий 296
10.1. Организация генетического аппарата бактерий 298
10.2. Изменчивость микроорганизмов 299
10.3. Рекомбинация у бактерий 312
10.4. Механизм переноса и обмена генетического материала у бактерий 314
10.5. Плазмиды бактерий 325
10.6. Мигрирующие генетические элементы (МГЭ)..... 329
10.7. Генетическая инженерия 332
Глава 11. Экология микроорганизмов 336
11.1. Микрофлора почвы 336
11.2. Микрофлора воды 338
11.3. Микрофлора атмосферы 343
Глава 12. Биогеохимическая деятельность микроорганизмов 346
12.1. Круговорот азота 347
12.2. Круговорот углерода 370
12.3. Круговорот серы 378
12.4. Круговорот железа 384
Глава 13. Взаимоотношения в мире микроорганизмов. Антибиотики 387
13.1. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов 387
13.2. Конкурентные взаимоотношения микроорганизмов 390
13.3. Антибиотики 395
13.4. Бактериоцины 406
Глава 14. Взаимоотношения микроорганизмов с высшими растениями 409
14.1. Микрофлора ризосферы 409
14.2. Эпифитная микрофлора 413
14.3. Бактериальные болезни растений 414
Глава 15. Взаимоотношения микроорганизмов с человеком и животными 422
15.1. Нормальная микрофлора человека и животных 422
15.2. Патогенные микроорганизмы 426
15.3. Инфекция и иммунитет 430
Библиографический список 445
Предметный указатель 447

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящая книга написана на основе вышедшего в 1977 г. учебного пособия «Микробиология», в текст которого внесены значительные изменения и дополнения, в соответствии с достижениями в изучении отдельных вопросов, касающихся прокариотических микроорганизмов и вирусов..

За прошедшее время микробиология и вирусология пополнилась новыми открытиями и достижениями. Например, открыта новая группа прокариот - архебактерии, что в свою очередь заставило пересмотреть систематику бактерий; выявлены новые генетические структуры - IS-элементы и транспозоны; изучены молекулярные механизмы репродукции вирусов; обнаружены ферменты в составе вириона и среди них новый фермент - обратная транскриптаза. Все перечисленные аспекты получили освещение в новом издании.

Существенно переработаны гл. 2, 4, 5, 7, 9, 10, 15. Заново написаны гл. 3 и 8. Намеренно кратко освещены вопросы в гл. 7 «Метаболизм прокариот», так как они в большей мере относятся к области биохимии и подробно рассматриваются в одноименном курсе. Краткое освещение вопросов, относящихся к смежным дисциплинам, позволило в ограниченном объеме настоящего издания «Микробиология с основами вирусологии» изложить круг собственно микробиологических проблем и значительно дополнить раздел, посвященный вирусам.

ВВЕДЕНИЕ

Живой покров нашей планеты составляют растения, животные и микроорганизмы. Хотя микроорганизмы являются самыми древними существами в эволюции органического мира, человечество узнало о них только в конце XVII в. Микроорганизмы не составляют однородной в систематическом отношении группы. Название это имеет собирательное значение, оно объединяет все живые существа, имеющие микроскопические размеры и слабую морфологическую дифференцировку.

Термин «*микробиология*» происходит от греческих слов: micros - малый, bios - жизнь, logos - наука, т.е. наука о жизни малых. К микроорганизмам относятся преимущественно одноклеточные организмы - бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли, простейшие и неклеточные - вирусы. Предметом изучения микробиологии служат в основном бактерии, актиномицеты, из грибов - дрожжи, в общем плане организации рассматриваются вирусы. (Грибы, водоросли и простейшие относятся к области специальных дисциплин). Микробиология изучает строение, физиологию, биохимию, генетику и экологию микроорганизмов, их роль и значение в жизни человека и продуктивности биосферы.

Несмотря на то, что микробиология как наука сформировалась значительно позже, чем ботаника и зоология, к настоящему времени она заняла ведущее место среди биологических дисциплин в теоретических и прикладных исследованиях. Своим успешным развитием микробиология обязана в первую очередь достижениям физики и химии, которые не только обогатили ее оригинальными методами исследования, но также позволили расшифровать и интерпретировать некоторые тончайшие особенности обмена веществ у микроорганизмов. Применение электронной микроскопии дало возможность изучить тонкую структуру бактериальной клетки и вирусных частиц, а применение масс-спектрометрии, ядерно-магнитного и электронного парамагнитного резонанса позволило выяснить такие особенности обмена веществ, которые раньше для исследователей были недоступны. Еще более глубокое влияние на развитие

микробиологии оказала современная химия. В распоряжение микробиологии она дала большое число новых аналитических методов, заставила пересмотреть пути и сущность энергетического обмена, химизм биосинтеза ряда веществ. В свою очередь микробиология внесла ценный вклад в генетику, биохимию, молекулярную биологию. Использование микроорганизмов в качестве объектов генетических и биохимических исследований открыло новую эпоху в естествознании.

С достижениями микробиологии связано решение многих теоретических проблем общей биологии и медицины, а также широкое применение микроорганизмов в народном хозяйстве. Так, именно на микроорганизмах впервые была установлена роль ДНК в передаче наследственной информации, доказана сложная структура гена и зависимость мутационных процессов от изменений в структуре ДНК. Микроорганизмы играют существенную роль и в решении таких вопросов молекулярной генетики, как открытие и расшифровка генетического кода, механизмы повреждения и репарация ДНК. Благодаря ряду биологических особенностей они являются весьма удобным объектом для познания жизненно важных процессов, осуществляющихся на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. С помощью различных мутантов микроорганизмов удалось расшифровать пути биосинтеза многих аминокислот, азотистых оснований, витаминов.

Изучение биосинтетической деятельности микроорганизмов показало их способность (и высокую активность) к синтезу весьма ценных соединений, имеющих большое народнохозяйственное значение.

Успехам микробиологии обязано развитие новых отраслей промышленности, основанных на микробном синтезе сложных веществ, химический способ получения которых либо невозможен, либо очень сложен и дорог. Это прежде всего относится к белкам, липидам, аминокислотам, витаминам, ферментам, гормонам, антибиотикам и другим лекарственным и биологически активным веществам. К настоящему времени уже осуществлено промышленное производство микробного белка из углеводородов нефти. По содержанию аминокислот этот белок более полноценный по сравнению с растительным и синтезируется микроорганизмами

гораздо быстрее, чем высшими организмами. Так, в организме коровы весом 500 кг в течение суток образуется только 0,5 кг белка, в то время как такая же масса дрожжей (500 кг) за это время синтезирует более 50 т белка. Можно ожидать, что при дальнейшей разработке и совершенствовании данного процесса микробный белок будет широко использоваться не только в животноводстве, но и займет ведущее место в питании людей.

Следовательно, проблема получения белка таким способом выдвигает микробиологию на видное место среди биологических наук. С помощью микроорганизмов ведется получение природных аминокислот, ибо химический синтез дает пока ароцемические смеси, нежелательные для применения в пищевых целях. Микроорганизмы являются продуцентами витамина B_{12}, химический синтез которого еще не разработан, и стероидных гормонов.

Преимуществом микробиологического синтеза является то, что он не требует особых условий (высоких температур, давления, вакуума), исходным материалом служит доступное и дешевое природное и техническое сырье, не исключая и промышленные отходы ряда производств (деревообрабатывающего, свекло-сахарного, гидролизно-дрожжевого, нефтеперерабатывающего и др.).

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

Следствием научных достижений микробиологии является эффективное использование микроорганизмов в борьбе с вредителями сельскохозяйственных культур, повышении плодородия почвы, очистке сточных вод и других областей хозяйственной деятельности человека.

Успехи в области микробиологии открыли новые возможности и перспективы в профилактике и лечении многих инфекционных заболеваний, в борьбе с которыми ранее медицина была бессильна. За сравнительно небольшой период почти полностью ликвидированы чума, оспа, холера, малярия,

являющиеся в прошлом бичом всего человечества. В настоящее время внимание микробиологов сосредоточено на важнейшей проблеме современной медицины - проблеме злокачественных опухолей.

Таким образом, микробиология вносит существенный вклад в решение многих естественнонаучных и практических задач, проблем здравоохранения и сельского хозяйства, способствует развитию определенных отраслей промышленности и, надо полагать, разрешит еще ряд важнейших вопросов, стоящих перед человечеством. Имеются большие возможности расширения и совершенствования биотехнологических процессов, основанных на применении микроорганизмов. Решение таких актуальных проблем, как обеспечение человечества продуктами питания, возобновление энергетических ресурсов, охрана окружающей среды так или иначе связано с использованием микроорганизмов.

Ученым предстоит большая работа по выделению и освоению культивирования новых видов микроорганизмов, изучению их биологических свойств и способностей к синтезу физиологически активных веществ, что расширит область их применения в народном хозяйстве, а вместе с тем и круг разрабатываемых научных проблем. Все это содействует созданию и развитию ряда направлений в микробиологической науке. Некоторые из них в силу своей значимости уже выделились из общей микробиологии и оформились в самостоятельные дисциплины с собственными целями, задачами и объектами исследования. Среди них необходимо отметить медицинскую, ветеринарную, техническую, почвенную, геологическую и водную микробиологию, вирусологию, генетику микроорганизмов; приобретает самостоятельность космическая микробиология.

Медицинская микробиология - одна из старейших микробиологических дисциплин - изучает патогенные микроорганизмы, вызывающие заболевания человека, и разрабатывает методы диагностики, профилактики и лечения этих болезней. Она исследует также условия сохранения патогенных микробов во внешней среде, пути и механизмы их распространения, разрабатывает методы борьбы с ними.

Ветеринарная микробиология - изучает возбудителей

заболеваний животных, разрабатывает методы диагностики этих заболеваний, способы профилактики и их лечения.

Техническая (промышленная) микробиология рассматривает особенности развития микроорганизмов, используемых для получения различных органических соединений, применяемых в народном хозяйстве, разрабатывает и совершенствует научные методы биосинтеза ферментов, витаминов, аминокислот, антибиотиков и других биологически активных веществ. Перед технической микробиологией стоит также задача разработки мер предохранения продуктов питания, сырья и стройматериалов от порчи микроорганизмами.

Почвенная микробиология изучает роль микроорганизмов в образовании и плодородии почвы, в питании растений; изыскивает методы приготовления бактериальных удобрений.

Геологическая микробиология изучает роль микроорганизмов в образовании и разложении руд, получении из этих руд металлов, образовании полезных ископаемых, круговороте наиболее важных биогенных элементов.

Водная микробиология исследует микроорганизмы водоемов, их роль в пищевых цепях, круговороте веществ, загрязнении и очистке питьевой и сточных вод.

Вирусология изучает вирусы, их структурно-морфологические особенности, взаимодействие с клеточными организмами, распространение в природе и положение в органическом мире.

Генетика микроорганизмов - одна из наиболее молодых дисциплин -рассматривает молекулярные основы наследственности и изменчивости микроорганизмов, закономерности процессов и мутагенеза, разрабатывает методы и принципы управления жизнедеятельностью микроорганизмов и получения новых штаммов, полезных для человека.

Идеи и методы, разработанные молекулярной генетикой, микробиологией и молекулярной биологией, составили основу для развития генетической инженерии. Сущность ее заключается в направленном конструировании рекомбинантных молекул ДНК с последующим их введением в живой организм. При этом введенная молекула рекомбинантной ДНК становится составной частью

генетического аппарата реципиентного организма и придает ему новые несвойственные признаки. Цель генетической инженерии состоит в том, чтобы конструировать такие рекомбинантные ДНК, которые придавали бы реципиентному организму свойства, полезные для человека.

Методами генной инженерии созданы штаммы бактерий, продуцирующие гормоны роста, интерферон, инсулин. На основе сконструированного штамма, продуцента инсулина, налажено промышленное производство человеческого инсулина.

Космическая микробиология занимается изучением влияния космических условий на микроорганизмы (земные), поиском внеземной жизни, т.е. выявлением микроорганизмов в метеоритах и грунтах других планет, изысканием методов стерилизации космических кораблей (в целях исключения возможности заноса микроорганизмов с земной поверхности в космос). Она также разрабатывает проблему использования микроорганизмов в космических кораблях для обеспечения нормальных условий жизни при длительном пребывании человека в космосе.

При всем своем многообразии эти дисциплины базируются на общей микробиологии, изучающей основные закономерности строения, развития и жизнедеятельности микроорганизмов.

Глава 1

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

Микроорганизмы были открыты в конце XVII в., но деятельность их и даже практическое применение известны значительно раньше. Например, продукты спиртового и молочнокислого брожений приготавливались и использовались в самые древние времена. Полезность этих продуктов объяснялась присутствием в них «живого духа». Еще первобытные люди предохраняли от порчи пищевые продукты путем их высушивания, замораживания, соления и копчения. Однако мысль о существовании невидимых существ начала появляться при выяснении причин заразных болезней. Так, Гиппократ (VI в. до н. эры), а позже Варрон (II в.) высказывали предположения, что заразные болезни вызываются невидимыми живыми существами. Но только в XVI в. итальянский ученый Джироламо Фракастро (1478-1553) пришел к заключению, что передача болезней от человека к человеку осуществляется при помощи мельчайших живых существ, которым он дал название contagium vivum. Однако доказательств таких предположений не было. Заслуга открытия микроорганизмов принадлежит голландскому натуралисту Антонио Левенгуку (1632-1723), достигшему совершенства в шлифовании стекол и сконструировавшему микроскоп с увеличением в 300 раз. Рассматривая под микроскопом все, что попадалось под руку - капли воды, зубной налет, различные настои - А. Левенгук всюду находил мельчайших «зверюшек» - animalcula. Свои первые наблюдения он опубликовал в



А. ван Левенгук (1632-1723)

трудах Лондонского королевского общества и приложил рисунки, в которых различались кокки, палочки и спириллы, а в 1695 г. была издана его книга «Тайны природы, открытые Антонием Левенгуком», где подробно описывались результаты наблюдения за движением, разнообразием форм и размеров микроорганизмов[1].

Открытие А. Левенгука вызвало большой интерес среди естествоиспытателей. С каждым годом увеличивалось число «охотников за микробами», а вместе с тем и число описываемых микробов. Но состояние науки того времени не позволяло должным образом оценить и плодотворно использовать открытие А. Левенгука. Все исследования в течение почти двух веков сводились лишь к описанию микроорганизмов. Этот период вошел в историю микробиологии как описательный, или морфологический, и продолжался с конца XVII до середины XIX вв. Наиболее существенными в то время были работы О. Мюллера (1786), Ф. Кютцинга (1833), Х. Эренберга (1838), так как они не только описали новые формы, но и сделали попытку систематизировать микроорганизмы. Заслуживают внимания работы русского ученого М. М. Тереховского. Он установил живую природу простейших и в 1775 г. впервые в мире применил к микроорганизмам экспериментальный метод исследования, определяя влияние температуры, электрических разрядов, сулемы, опия, кислот и щелочей на их жизнеспособность. Изучая в строго контролируемых условиях движение, рост и размножение микроорганизмов, М. М. Тереховский первый указал, что делению предшествует рост и увеличение их размеров.

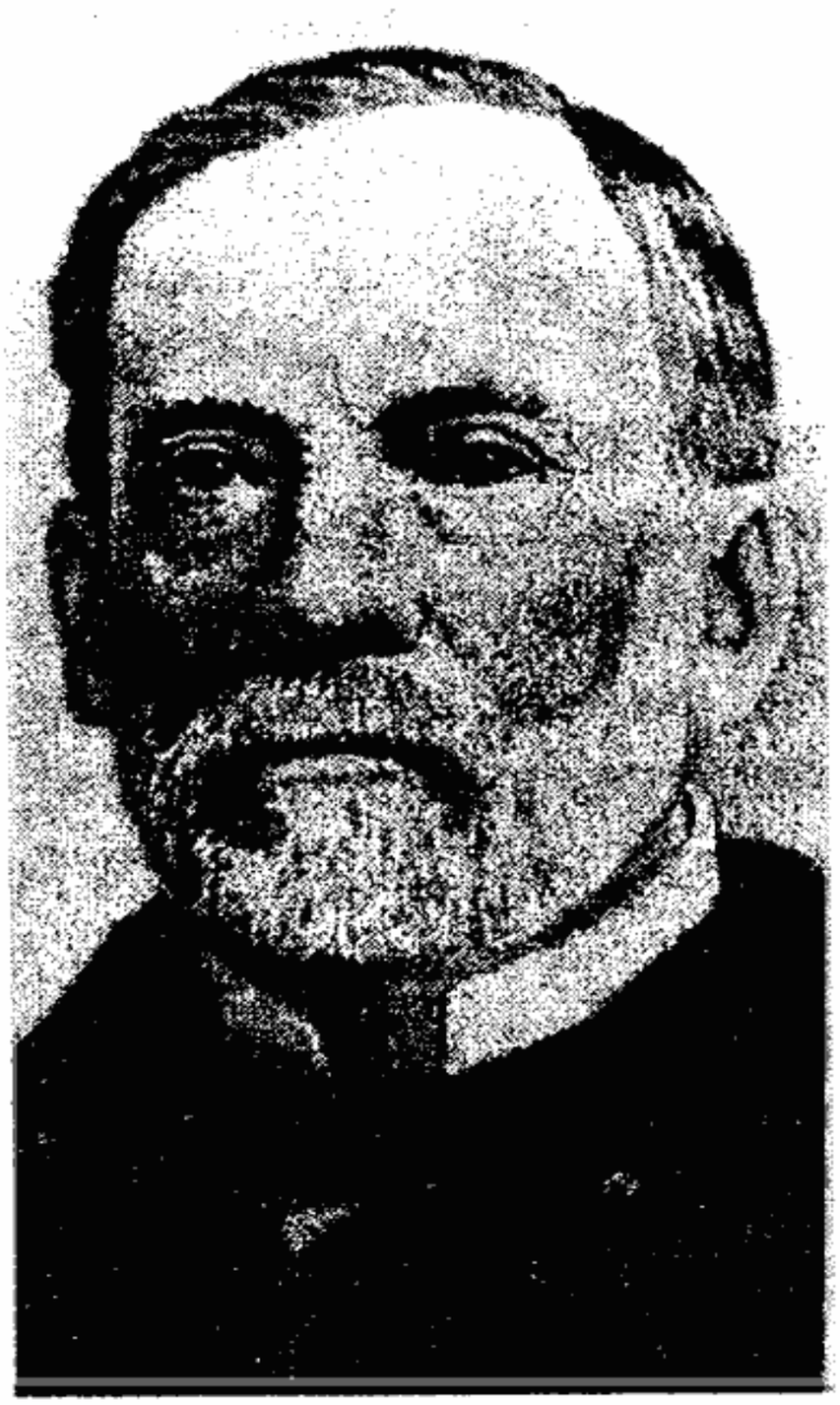
Хотя описательный период не обогатил науку ни новыми открытиями, ни ценными теориями, он все же сыграл значительную роль в накоплении фактического материала и создании условий для перехода к следующему, физиологическому, этапу в развитии микробиологии.

Начало физиологического периода относится к 60-м гг. XIX в. и связано с деятельностью выдающегося французского ученого,

---

[1] В 1698 г. Петр I посетил Голландию. Получив от Левенгука в подарок микроскоп, он привез его на родину. И уже в 1716 г. в мастерских Петра I были изготовлены первые в России микроскопы.

химика по специальности Луи Пастера (1822-1895). Микробиология обязана Л. Пастеру не только своим бурным развитием, но и становлением как науки.



Л. Пастер (1822-1895)

Первые работы Л. Пастера, выполненные в области микробиологии, посвящены изучению теории брожения. В то время в науке господствовала химическая теория Либиха. Согласно ей, брожение рассматривалось как чисто химический процесс, главным агентом которого был кислород. Без кислорода нет брожения - утверждала теория Либиха. В работах по спиртовому, затем молочнокислому брожению Л. Пастер доказал, что возбудителями этих процессов являются микроорганизмы, причем специфичные для каждого из них. Спиртовое брожение обусловлено деятельностью дрожжевых грибков, молочнокислое - палочковидных бактерий. Из убедительных опытов Л. Пастер сделал вывод, что микроорганизмы - не случайные спутники бродильных процессов, а сама причина брожения.

В противоположность химической теории Либиха Л. Пастер создал биологическую теорию брожения.

Стараясь окончательно опровергнуть теорию Либиха, он в результате исследования роли кислорода в процессах брожения сделал новое открытие - установил возможность жизни без кислорода - *анаэробиоз*. Он обнаружил в бульоне с масляно-кислым брожением неизвестные микроорганизмы в виде вибрионов, теряющие подвижность при доступе кислорода. Из этого следовало, что кислород не только не главный агент брожения, но и при определенных условиях - его ингибитор.

Общебиологическое значение имеют работы Л. Пастера по *самопроизвольному зарождению* жизни. На простых и

убедительных опытах он показал, что в сосудах со стерильным бульоном, закрытых ватными пробками во избежание контакта с воздухом, самозарождение микроорганизмов невозможно (это не значит, конечно, что Л. Пастер вообще отрицал зарождение жизни из неживой природы), т. е. невозможно самозарождение организмов из неживой природы в условиях развитой жизни.

Благодаря всем этим открытиям Л. Пастера признали как ученого-биолога, и в 1860 г. его заслуги были отмечены премией Парижской Академии наук. Тридцать лет понадобилось великому ученому для завершения работ по брожению и гниению. Занимаясь этими вопросами, Л. Пастер одновременно решал и практические задачи. Им был предложен способ предохранения вина и пива от «болезни» (скисание и прогоркание) - *метод пастеризации*. Он также изучил болезнь шелковичных червей и в результате разработал методы борьбы с ее возбудителями.

Исключительную ценность представляют работы Л. Пастера, посвященные вопросам *биологической природы заразных болезней*, ослаблению вирулентности патогенных микроорганизмов, *вакцинации*. В процессе научных исследований он установил, что не только брожение, болезни вина и пива, шелковичных червей обусловлены деятельностью микроорганизмов. Многие болезни человека и животных также вызываются микробами. Они, подобно возбудителям брожения, весьма специфичны: каждый вид патогенных микроорганизмов вызывает строго определенное заболевание. Л. Пастером были открыты возбудители куриной холеры (вибрион Мечникова), родильной горячки (стрептококки), гнойных абсцессов.

Занимаясь изучением природы инфекционных болезней и их возбудителей, Л. Пастер обнаружил важное свойство патогенных микроорганизмов - способность к ослаблению вирулентности. Попадание в организм животных таких микроорганизмов не только не приводит к заболеванию, но и предохраняет его от последующего заражения. Оценив должным образом это явление, Л. Пастер разработал ряд методов снижения (аттенуации) вирулентности микробов и успешно использовал ослабленные культуры в качестве прививок против инфекционных болезней. Культуры микроорганизмов с ослабленными вирулентными свойствами были

названы вакцинами[2], а метод прививок - вакцинацией. Следуя принципам аттенуации микробов, Л. Пастер предложил методы получения вакцин против куриной холеры, сибирской язвы, бешенства. Это потребовало огромного труда и творческого напряжения, так как, к примеру, возбудитель сибирской язвы Вас. anthracis - спорообразующий микроб, а споры не поддаются аттенуации и сохраняют свойства вирулентности, в связи с чем из споровой культуры нельзя было получить вакцину. Но это не обезоружило Л. Пастера. Культивируя возбудителя при температуре 42,5 - 43^{0}С, ему удалось получить неспорообразующий штамм и успешно использовать его для приготовления вакцины, надежно предохраняющей животных от заболевания.

Еще больше трудностей было на пути создания *вакцины против бешенства.* Как известно, возбудитель бешенства относится к вирусам, о существовании которых во времена Л. Пастера еще не было известно. Все попытки получить обычным способом культуру «микроба» - предполагаемого возбудителя бешенства - кончались неудачей. Тогда Л. Пастер пошел по другому пути. В качестве исходного материала он использовал мозг больных животных, содержащий согласно его наблюдениям яд бешенства. Л. Пастеру и его ученикам Ру и Шамберлену пришлось проделать огромную работу по изысканию способа ослабления возбудителя бешенства. В результате они установили, что возбудитель снижает вирулентность при обезвоживании. Ядовитые свойства мозга, пораженного возбудителем, в процессе высушивания его над каустической содой ослабевали и к четырнадцатому дню исчезали вовсе. Так его упорством и настойчивостью была создана вакцина против бешенства. При введении ее человеку, укушенному бешеным животным, в организме вырабатывался активный иммунитет по отношению к возбудителю данного заболевания. Это изобретение быстро приобрело широкую известность и к Л. Пастеру стали

---

[2] От лат. vaccinus - коровий. Первые препараты вакцины против оспы были получены из коровьей оспы английским врачом Э. Дженнером в конце XVIII в.

обращаться за помощью. Его лаборатория превратилась во всемирный пункт прививок против бешенства, а Л. Пастер - в лечащего врача.

Так, Л. Пастер, начав научную деятельность в области химической кристаллографии, затем доказав биологическую природу брожений и заразных болезней и разработав методы предохранительных прививок, прошел сложный и славный путь ученого.

Большое значение для развития микробиологии имели работы знаменитого немецкого ученого Роберта Коха (1843-1910). Р. Коху принадлежит огромная роль в разработке той области микробиологии, которая не была затронута Л. Пастером. Он создал методы микробиологических исследований, впервые ввел в микробиологическую практику плотные питательные среды (мясо-пептонный желатин и мясо-пептонный агар), что позволило выделять и изучать чистые культуры микробов. Р. Кохом были разработаны методы окраски (анилиновыми красителями) и методы микроскопии с иммерсионной системой. Без такого ценного вклада было бы немыслимо успешное развитие всей экспериментальной микробиологии.

Велики заслуги Р. Коха и в изучении роли микроорганизмов как возбудителей инфекционных заболеваний. Он на опыте доказал значение сибиреязвенных бацилл в этиологии сибирской язвы, что в те времена подвергалось сомнению. Р. Кох как врач и ученый много внимания уделял изучению этиологии распространенного в то время тяжелого заболевания - туберкулеза - и открыл его возбудителя (Mycobacterium tuberculosis), который был назван «палочкой Коха». Из этого возбудителя он получил препарат туберкулин, намериваясь использовать его для лечения больных туберкулезом. Однако на практике туберкулин как лечебное средство не оправдал себя, зато оказался хорошим диагностическим средством и вместе с тем послужил началом в создании ценных противотуберкулезных препаратов[3].

---

[3] Одним из таких препаратов явилась вакцина BCG, полученная французским микробиологом, учеником Л. Пастера, Альбертом Кальметтом



Р. Кох (1843-1910)

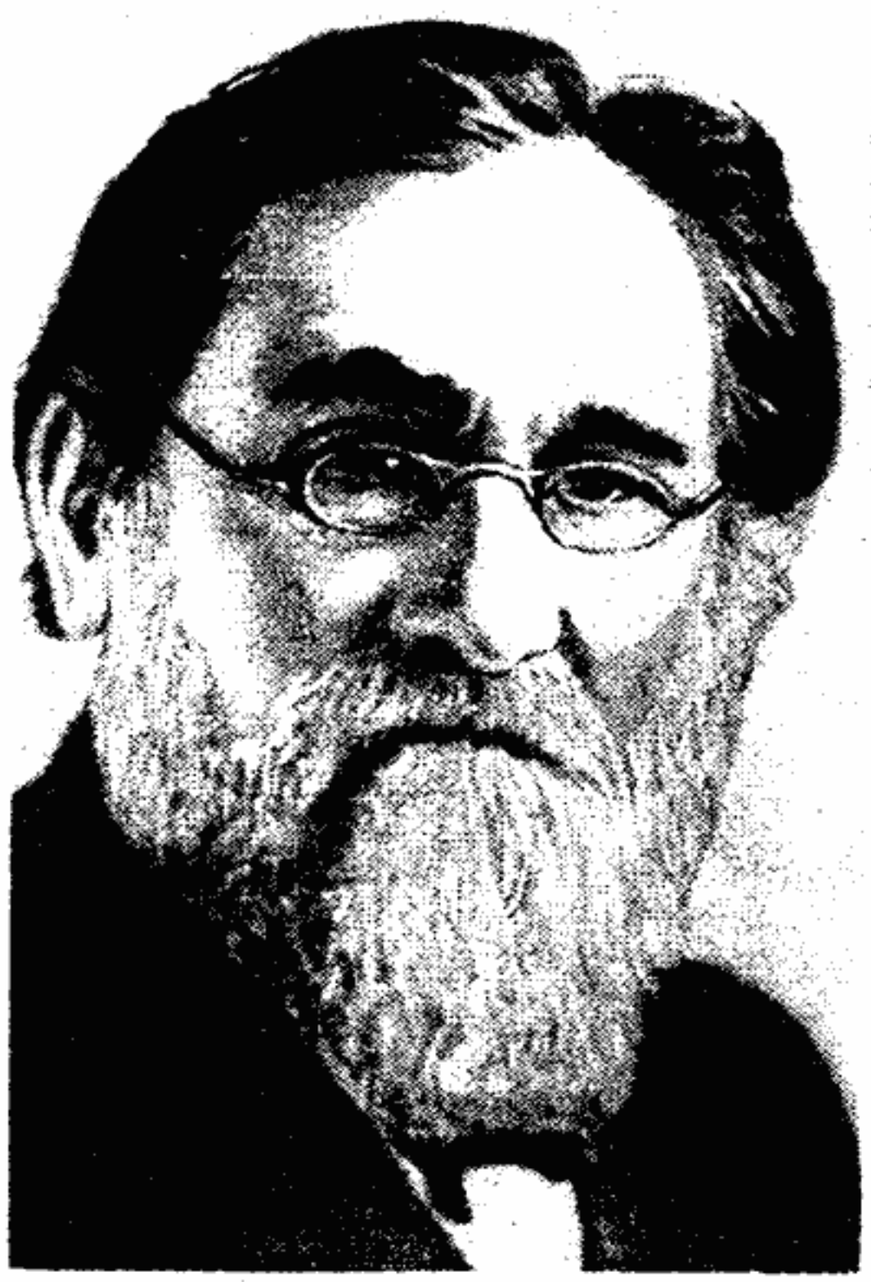
Р. Кохом и его учениками были открыты возбудители и других заболеваний - азиатской холеры, дифтерии, брюшного тифа, столбняка, гонореи.

Гениальные открытия Л. Пастера создали принципиальные научные основы микробиологии; Р. Кох усовершенствовал и разработал новые методы изучения мира микроорганизмов. Это положило начало бурному расцвету микробиологии. За короткое время были открыты возбудители большинства инфекционных заболеваний, разработаны многие научно обоснованные санитарно-гигиенические мероприятия, предложен ряд эффективных вакцин против заболеваний человека и животных. Особенно интенсивно разрабатывались вопросы медицинской микробиологии, основоположниками которой заслуженно признаются русские ученые И. И. Мечников, Н. В. Гамалея, Д. К. Заболотный.

С именем Ильи Ильича Мечникова (1845-1916) связано развитие нового направления в микробиологии - иммунологии - учения о невосприимчивости организма к инфекционным заболеваниям (иммунитет). Впервые в науке И. И. Мечниковым была разработана и экспериментально подтверждена биологическая теория иммунитета, вошедшая в историю микробиологии как фагоцитарная теория Мечникова. В основу этой теории положено представление о клеточных защитных приспособлениях организма. И. И. Мечников в опытах на животных (дафниях, личинках морской звезды) доказал, что лейкоциты и другие клетки мезодермального происхождения обладают способностью захватывать и переваривать чужеродные частицы (в том числе и

совместно с Шарлем Гереном (название вакцины по заглавным буквам фамилий - Callmett и Geren).

микробов), попадающие в организм. Это явление, названное фагоцитозом, легло в основу фагоцитарной теории иммунитета и получило всеобщее признание. Развивая далее поднятые вопросы, И. И. Мечников сформулировал общую теорию воспаления как защитную реакцию организма и создал новое направление в иммунологии - учение об антигенной специфичности. В настоящее время оно приобретает все большее значение в связи с разработкой проблемы пересадки органов и тканей, изучении иммунологии рака.



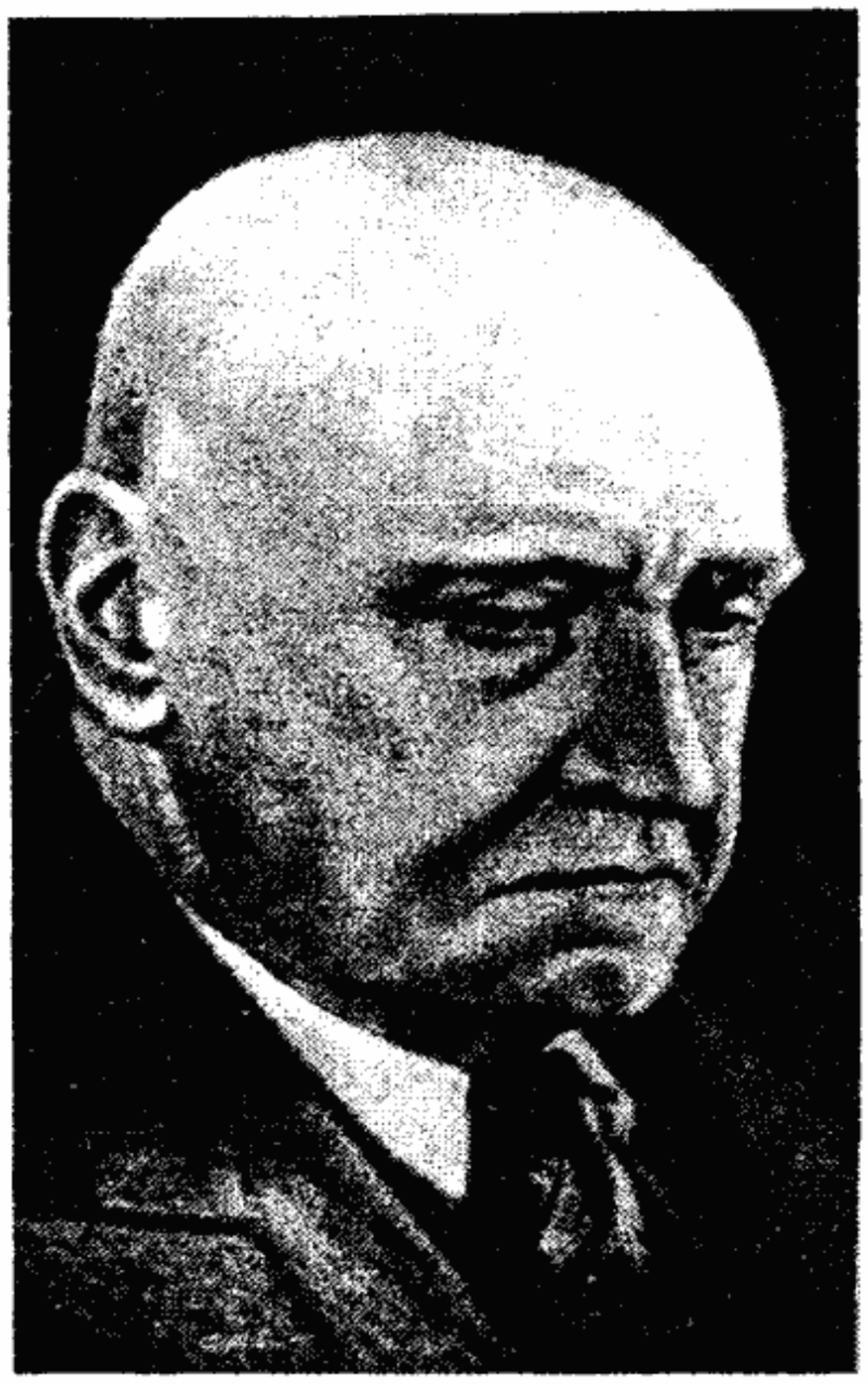
И. И. Мечников (1845-1916)

К числу важнейших работ И. И. Мечникова в области медицинской микробиологии относятся исследования патогенеза холеры и биологии холероподобных вибрионов, сифилиса, туберкулеза, возвратного тифа. И. И. Мечников является и основоположником учения о микробном антагонизме, послужившем основой для развития науки об антибиотикотерапии. Идея о микробном антагонизме была им использована при разработке проблемы долголетия. Изучая явление старения организма, он пришел к заключению, что важнейшей причиной его является хроническое отравление организма продуктами гниения, вырабатываемыми в толстом кишечнике гнилостными бактериями.

Практический интерес представляют его ранние работы по использованию гриба Metarrhizium anisopliae для борьбы с вредителем полей - хлебным жуком. Они дают основания считать И. И. Мечникова основоположником биологического метода борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений, метода, который в наши дни находит все более широкое применение и популярность.

Таким образом, И. И. Мечников - выдающийся русский биолог, сочетавший качества экспериментатора, педагога,

мыслителя-материалиста и пропагандиста научных знаний, - был человеком великого духа и труда. Ему была присвоена в 1909 г. Нобелевская премия.



Н.Ф. Гамалея (1859-1949)

Развитие микробиологии в нашей стране тесно связано также с именем крупнейшего ученого, соратника И. И. Мечникова, Николая Федоровича Гамалеи (1859-1940). Всю свою жизнь Н. Ф. Гамалея посвятил изучению инфекционных болезней и разработке мер борьбы с их возбудителями. Н. Ф. Гамалея внес крупный вклад в изучение туберкулеза, холеры, бешенства, в 1886 г. вместе с И. И. Мечниковым организовал в Одессе первую в России Пастеровскую станцию и ввел в практику прививки против бешенства. Он открыл птичий вибрион - возбудителя холероподобного заболевания птиц - и в честь Ильи Ильича назвал его вибрионом Мечникова. Затем была получена вакцина против холеры человека.

Большое внимание Н. Ф. Гамалея уделял и вопросам эпидемиологии инфекционных болезней. Он был крупнейшим специалистом в области иммунологии. Разработав оригинальный метод получения оспенной вакцины, он впервые высказал идею о выделении из бактерий наиболее полноценных антигенов и об использовании их для приготовления так называемых химических вакцин. Н. Ф. Гамалея первый наблюдал и описал явление спонтанного лизиса бактерий под влиянием известного в то время агента - бактериофага. Поэтому Н. Ф. Гамалея считается не только одним из основоположников медицинской микробиологии, но и иммунологии и вирусологии.

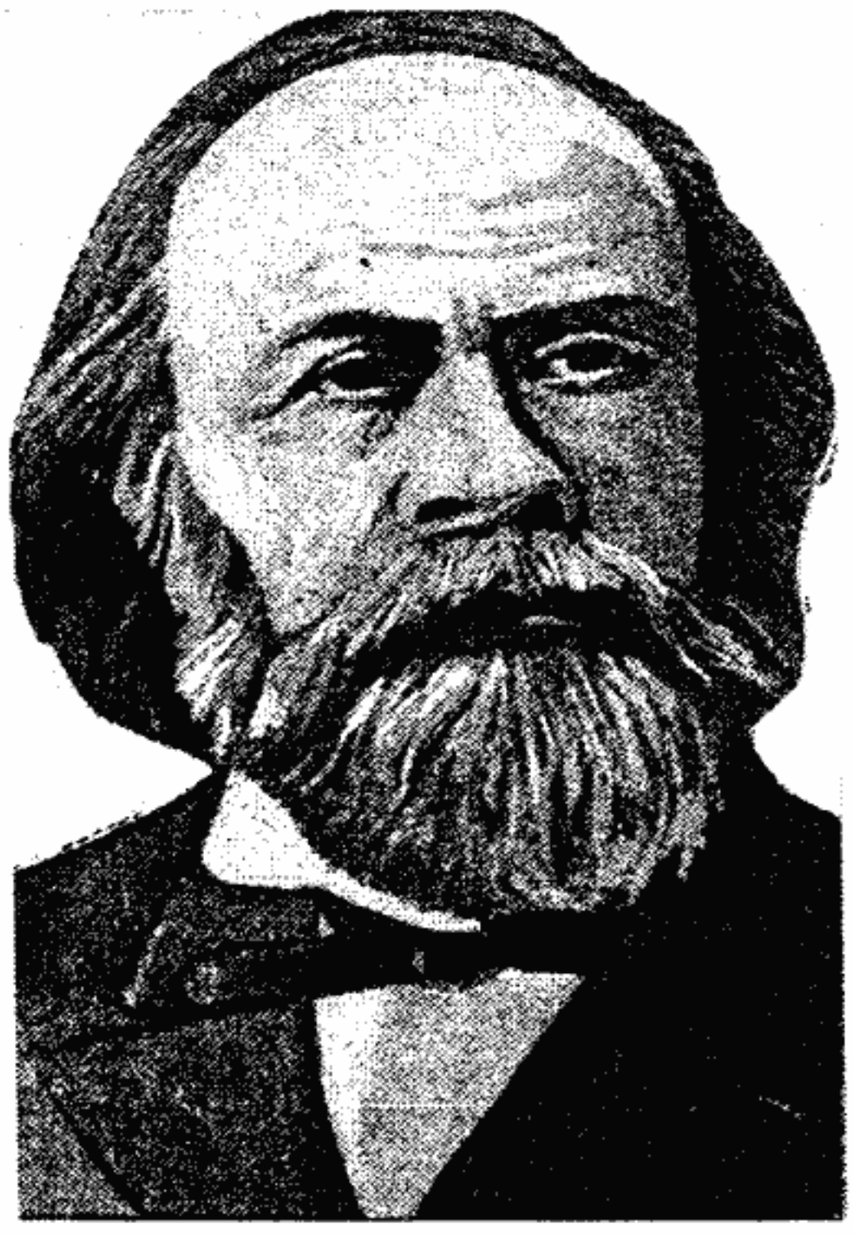
К числу выдающихся отечественных ученых, внесших огромный вклад в микробиологию инфекционных болезней, относится и Даниил Кириллович Заболотный (1866-1920). Он по

праву считается основоположником эпидемиологии. Где бы на земном шаре ни возникали эпидемии, Д. К. Заболотный всегда принимал участие в их ликвидации. Так, с 1897 по 1911 гг. он в составе русских экспедиций участвует в изучении чумы в Индии, Китае, Маньчжурии, Персии, Шотландии; холеры - в Петербурге, Поволжье, на Украине, Кавказе. Доскональное изучение эпидемии чумы дало Д. К. Заболотному возможность получить научные доказательства существовавшей гипотезы о природной очаговости этой болезни и о роли диких грызунов как хранителей ее возбудителя в природе.

Значительный вклад внес Д. К. Заболотный в изучение эпидемий холеры и организацию борьбы с ней. Им установлены пути заноса холеры, роль бациллоносительства в распространении заболевания, изучена биология возбудителя в природе и разработаны эффективные методы диагностики холеры.

Результаты исследований Д. К. Заболотного составили научную основу санитарно-гигиенических, профилактических и лечебных мероприятий по борьбе с заразными болезнями человека.

Среди основоположников общей микробиологии в России следует назвать и Льва Семеновича Ценковского (1822-1887), который много внимания уделил индивидуальному развитию и изменчивости микроорганизмов, относящихся преимущественно к группе паразитических простейших. Используя принцип аттенуации микробов, Л. С. Ценковский получил вакцинный штамм возбудителя сибирской язвы и создал отечественную вакцину, до настоящего времени успешно применяемую в ветеринарной практике.



Л. С. Ценковский (1822-1887)

Л. С. Ценковский первый установил близость бактерий и сине-зеленых водорослей и впервые описал явление симбиоза

между радиоляриями и зооксантеллами. Это открытие существенным образом сказалось на последующих работах русских ученых. Так, его ученик М. К. Воронин открыл симбиоз бактерий с высшими растениями и обнаружил бактероиды в клубеньках бобовых.

Велики заслуги Л. С. Ценковского как ученого-микробиолога, но вместе с тем нельзя не указать на то, что он придерживался ошибочной теории полиморфизма бактерий, в борьбе с которой в сущности формировалась отечественная микробиология и опровергнуть эту теорию удалось только с применением плотных питательных сред.

Отечественные исследователи заложили прочный фундамент нового направления в микробиологии - эколого-физиологического, ставшего вскоре ведущим и оказавшего влияние на развитие самостоятельных дисциплин и различных школ ученых.

В этой связи прежде всего следует отметить С. Н. Виноградского, В. Л. Омелянского, Б. Л. Исаченко, Д. И. Ивановского, Г. А. Надсона, явившихся основоположниками тех или иных направлений в общей микробиологии. Создание, например, учения об экологии почвенных микроорганизмов неразрывно связано с именем выдающегося русского исследователя Сергея Николаевича Виноградского (1856-1953). С. Н. Виноградский внес большой вклад и в познание физиологического многообразия микробного мира. Им выполнены классические работы по физиологии серобактерий, нитрифицирующих бактерий, железобактерий, результатом которых явилось открытие хемосинтеза у бактерий - величайшее открытие XIX в.



С. Н. Виноградский (1856-1953)

С. Н. Виноградский доказал, что существуют бактерии, самостоятельно синтезирующие органическое вещество, используя при этом энергию окисления минеральных соединений (сероводород,

аммиак) и углерод углекислоты, т. е. был открыт новый тип питания микроорганизмов - автотрофизм.

С. Н. Виноградским выполнены классические исследования по экологии микроорганизмов. Наиболее значительным среди них является изучение свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов.

Неизменным требованием С. Н. Виноградского было исследование микроорганизмов в естественной среде обитания или условиях, максимально приближающихся к естественным. Следуя этому принципу, он разработал простые и оригинальные методы исследования почвенных микроорганизмов. Всеобщее признание и широкое применение получил метод элективных (избирательных) сред, позволивший выделить из естественной среды ряд новых микроорганизмов и определить их роль в круговороте веществ.

С. Н. Виноградским опубликовано свыше 300 научных работ, посвященных экологии и физиологии почвенных микроорганизмов. Его по праву считают отцом почвенной микробиологии.

К числу выдающихся основоположников отечественной микробиологии следует отнести также ученика С. Н. Виноградского Василия Леонидовича Омелянского (1867-1928). Он был не только замечательным ученым, но и талантливым педагогом, популяризатором достижений микробиологии. В. Л. Омелянский, подобно Л. Пастеру, обладал глубокими знаниями в области химии, которые легли в основу его физиологического и экологического изучения микроорганизмов. Круг научных интересов В. Л. Омелянского очень широк, однако главное направление его исследований тесно связано с изучением круговорота веществ в



В. Л. Омелянский (1867-1928)

природе, в котором существенную роль он отводил микроорганизмам. Изучая процессы разложения органического вещества, он впервые выделил целлюлозоразрушающие бактерии, описал их физиологию и химизм самого процесса.

Глубоко и всесторонне В. Л. Омелянским были изучены микроорганизмы, участвующие в круговороте азота, особенно свободноживущие азотфиксаторы и нитрификаторы.

К новой области исследований относится одна из последних работ В. Л. Омелянского «Роль микроорганизмов в выветривании горных пород». Эта работа легла в основу геологической микробиологии.

Большой заслугой В. Л. Омелянского является создание первого русского учебника «Основы микробиологии», вышедшего из печати в 1909 г. и выдержавшего 9 изданий. В нем В. Л. Омелянский обобщил результаты микробиологических исследований и дал общие схемы круговорота в природе отдельных элементов, в том числе азота, углерода, серы и железа. В течение десятилетий этот учебник был настольной книгой специалистов.

Экологическое направление в микробиологии успешно разрабатывалось Борисом Лаврентьевичем Исаченко (1871-1948). Всеобщую известность приобрели его работы в области водной микробиологии. Он впервые исследовал распространение микроорганизмов в Северном Ледовитом океане и указал на их важную роль в геологических процессах и в круговороте веществ в водоемах.

Большой вклад в развитие отечественной и мировой микробиологии внес Дмитрий Иосифович Ивановский (1864-1920), открывший в 1892 г. вирусы растений и тем самым заложивший основу новой науки - вирусологии. Подчеркивая важность исследования Д. И. Ивановского, английский вирусолог Н. Пири писал: «Огромное значение открытия Ивановского для теоретического естествознания заключается в том, что им была открыта новая форма существования белковых тел». Идеи Д. И. Ивановского сыграли решающую роль в последующих блестящих успехах вирусологии, в результате которых были открыты возбудители большинства вирусных болезней человека, животных, растений и микроорганизмов. По заключению американского

вирусолога Стенли, имя Д. И. Ивановского в вирусологии следует рассматривать как имена Л. Пастера и Р. Коха в микробиологии.

С 20-х гг. XX в. интенсивно начала разрабатываться проблема изменчивости микроорганизмов. Ведущую роль здесь сыграли исследования Георгия Адамовича Надсона (1867-1940). В 1925 г. Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов впервые показали возможность получения мутантов микроорганизмов под влиянием лучистой энергии. Эти исследования имели исключительно важное значение - они заложили основы нового направления в естествознании - радиационную биологию.



Д. И. Ивановский
(1864-1920)

Большой интерес представляют также более ранние работы Г. А. Надсона, характеризующие его как микробиолога широкого профиля. Г. А. Надсон впервые выделил в чистую культуру и изучил зеленую бактерию Chlorobium limicola. Значительное место среди ранних работ Г. А. Надсона занимают исследования взаимоотношений микроорганизмов. Им описаны явления антагонизма, хищничества и симбиоза микроорганизмов. На примере плесневого гриба Spicaria им было показано, что микроорганизмы при развитии в микробных ассоциациях вырабатывают пигмент как «средство защиты и нападения».

Научный интерес и практическое значение имеют исследования Г. А. Надсона о роли микроорганизмов в круговороте серы, железа и кальция.

Г. А. Надсон впервые указал на перспективы развития геологической микробиологии. Заслуживает внимания и точка зрения Г. А. Надсона по вопросам современной космической микробиологии. Он допускал возможность сохранения жизнеспособности микроорганизмов в космическом пространстве, подчер-



Г. А. Надсон (1867-1940)

кивая значение лучей короткой волны в изменении их наследственных свойств. Г. А. Надсоном (1935) была высказана идея, которая в настоящее время является одной из важнейших проблем космической микробиологии: «Арениус интересовался импортом жизни с других планет на Землю. Меня же больше интересует обратный путь: возможность экспорта жизни с Земли на другие планеты, способные жизнь поддерживать. Может быть, такой экспорт происходит теперь, или происходил ранее, или будет происходить в далеком будущем».

Г. А. Надсон заслуженно считается одним из основоположников отечественной микробиологии, а время подтверждает гениальность его идей и научную дальновидность.

Таким образом, выдающиеся отечественные ученые заложили прочный фундамент общей микробиологии, на котором в XX в. эта наука достигла расцвета.

Развитие микробиологии ознаменовалось крупными открытиями и достижениями в области биохимии и генетики микроорганизмов. Так, в середине 50-х гг. А. Клюйвером и К. ван Нилем была сформулирована теория биохимического единства жизни, которая базируется на единых закономерностях механизмов передачи генетической информации, единства энергетического и конструктивного метаболизма совершенно независимо от рода изучаемых организмов.

В 40-50-е гг. сделаны выдающиеся открытия в области генетики микроорганизмов. В 1944 г. О. Эвери, К. Мак Леод и М. Мак-Карти доказали, что носителем генетической информации является ДНК, а в 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик расшифровали строение молекулы ДНК, раскрыли генетический код, выяснили механизмы репликации ДНК и регуляции синтеза белка, единые для всех живых организмов. Исследования Дж. Ледерберга,

Э. Тэйтума, Н. Циндера (1952-1958) показали наличие половой дифференциации бактерий, определили структуры. Ф. Жакоб и Э. Вольман (1958) открыли у бактерий внехромосомные генетические структуры - плазмиды, контролирующие разные свойства бактерий, в том числе устойчивость их к лекарственным препаратам. Трансмиссивность плазмид позволила использовать их в качестве переносчиков генов от одних организмов к другим. Успехи в области генетики микроорганизмов обусловили развитие ее нового раздела - молекулярной генетики, составляющей основу современной генной инженерии.

Современный период развития микробиологии тесно связан с научно-техническим прогрессом и потребностями народного хозяйства. Он характеризуется комплексностью исследований многообразия микробного мира, направленных как на решение общебиологических проблем, так и актуальных задач рационального использования природных ресурсов, охраны окружающей среды, развития сельского хозяйства и здравоохранения, повышения научно-технического уровня горнодобывающей и микробиологической промышленности, разработку молекулярно-биологических аспектов биотехнологии микробиологического синтеза.

Глава 2

МИКРООРГАНИЗМЫ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ

Универсальной биологической единицей всего живого является клетка. У организмов, находящихся на самых различных уровнях развития, клетки обладают поразительным сходством структурной, биохимической и физиологической организации. Они построены по единому принципу. Важнейшими компонентами являются три типа макромолекул: ДНК, РНК и белок. Биосинтез органических веществ осуществляется сходным образом на любых ступенях организации. Все эти сходства объединяют разные организмы в единый мир живых существ.

Однако наряду с чертами сходства существуют и черты различий, позволяющие дифференцировать организмы на отдельные систематические группы.

2.1. ПРОКАРИОТЫ И ЭУКАРИОТЫ

До открытия микроорганизмов все многообразие живых существ великолепно распределялось в два царства: растений (Plantae) и животных (Animalia). Основными отрицательными признаками являлись подвижный или неподвижный образ жизни, способность к фотосинтезу. Обнаруживаемые в природе микроорганизмы по этим же критериям относили либо к растениям, либо к животным. Но по мере накопления фактического материала возникали затруднения в распределении микроскопических существ в эти два царства, так как некоторые микроорганизмы сочетали в себе свойства растений и животных. Например, некоторые жгутиковые, подобно растениям, содержат хлорофилл, способны к фотосинтезу и в то же время, подобно животным, способны к движению. Другие организмы этой группы по цитологическим особенностям напоминают многоклеточные неподвижные водоросли. Миксомицеты (слизевики) также имеют комбинированные свойства организмов двух царств: в вегетативном состоянии это фототрофные амебоподобные организмы, при переходе в

покоящееся состояние образуют сложные плодовые тела, сходные с таковыми у грибов. Поэтому миксомицеты и жгутиковые ботаники считали растениями, а зоологи - животными. Еще больше трудностей возникало с классификацией бактерий. Для решения этой проблемы немецкий биолог Э. Геккель в 1866 г. предложил выделить все микроорганизмы в самостоятельное царство, которому дал собирательное название Protista[4] (протисты, простейшие существа). К протистам были отнесены простейшие, водоросли, грибы, бактерии. Все протисты отличались от растений и животных более простой организацией, отсутствием четкой дифференцировки на органы и ткани. В большинстве своем это были одноклеточные организмы. Изучение структурной организации протистов показало большую неоднородность этого царства и послужило основанием для разделения его на высшие и низшие протисты. К высшим протистам были отнесены простейшие, микроскопические водоросли и грибы, к низшим - бактерии, включая и цианобактерии (сине-зеленые водоросли). Деление на высшие и низшие протисты происходило в соответствии с установленными двумя типами клеточной организации - эукариотной (истинноядерной) и прокариотной (доядерной)[5]. Высшим протистам, а также растениям и животным присущ эукариотный тип клеток, т. е. они являются эукариотными, бактерии и цианобактерии по структуре клетки являются прокариотами. Они выделены в отдельное царство Procaryotae.

Электронно-микроскопическое изучение тонкой структуры клеток эукариот и прокариот выявило существенные различия в их строении. Перечень важнейших отличительных признаков прокариот и эукариот представлен в таблице 1. Наряду с ними в настоящее время установлено много специфических особенностей в строении и метаболизме прокариот, отличающих их от эукариотных организмов.

---

[4] Protisto - от греч. protos - самый простой.

[5] Терминология впервые предложена М. Догерти (США) в 1957 г.

Таблица 1

Отличительные признаки клеток прокариот и эукариот

Признак	Прокариоты	Эукариоты
Организация генетического материала:		
ядро	Нуклеоид (ДНК не отделена от цитоплазмы мембраной)	Ядро (ДНК отделена от цитоплазмы мембраной)
хромосомы	1	Больше 1
ядрышко	Нет	Имеется
Локализация ДНК	В нуклеоиде и плазмидах	В ядре и некоторых органеллах
Мембранные структуры:		
эндоплазматический ретикулум	Нет	Имеется
аппарат Гольджи	Нет	Имеется
лизосомы	Нет	Имеются
мезосомы	Имеются	Нет
Цитоплазматические органеллы:		
митохондрии	Нет	Имеются
хлоропласты	Нет	Имеются
Рибосомы в цитоплазме	70S	80S
Движение цитоплазмы	Отсутствует	Имеется
Клеточная стенка (там, где она имеется)	У зубактерий и цианобактерий содержит пептидогликан	Пептидогликан отсутствует
Вторичные полости	Отсутствуют	Имеются
Жгутики	Состоят из субъединиц Флагеллина	Состоят из микротрубочек, собранных в группы 2 × 9 + 2
Фиксация азота	Происходит	Не происходит
Анаэробное дыхание (не гликолиз)	Имеется	Нет

Клетка эукариот характеризуется сложным строением. Она имеет настоящее ядро с ядрышком, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной. В ядре содержится набор хромосом, постоянный для каждого вида организмов. В цитоплазме клетки расположены вакуоли, пластиды, митохондрии; сеть мембран разделяет клетку на отдельные участки - отсеки (рис. 2.1а).

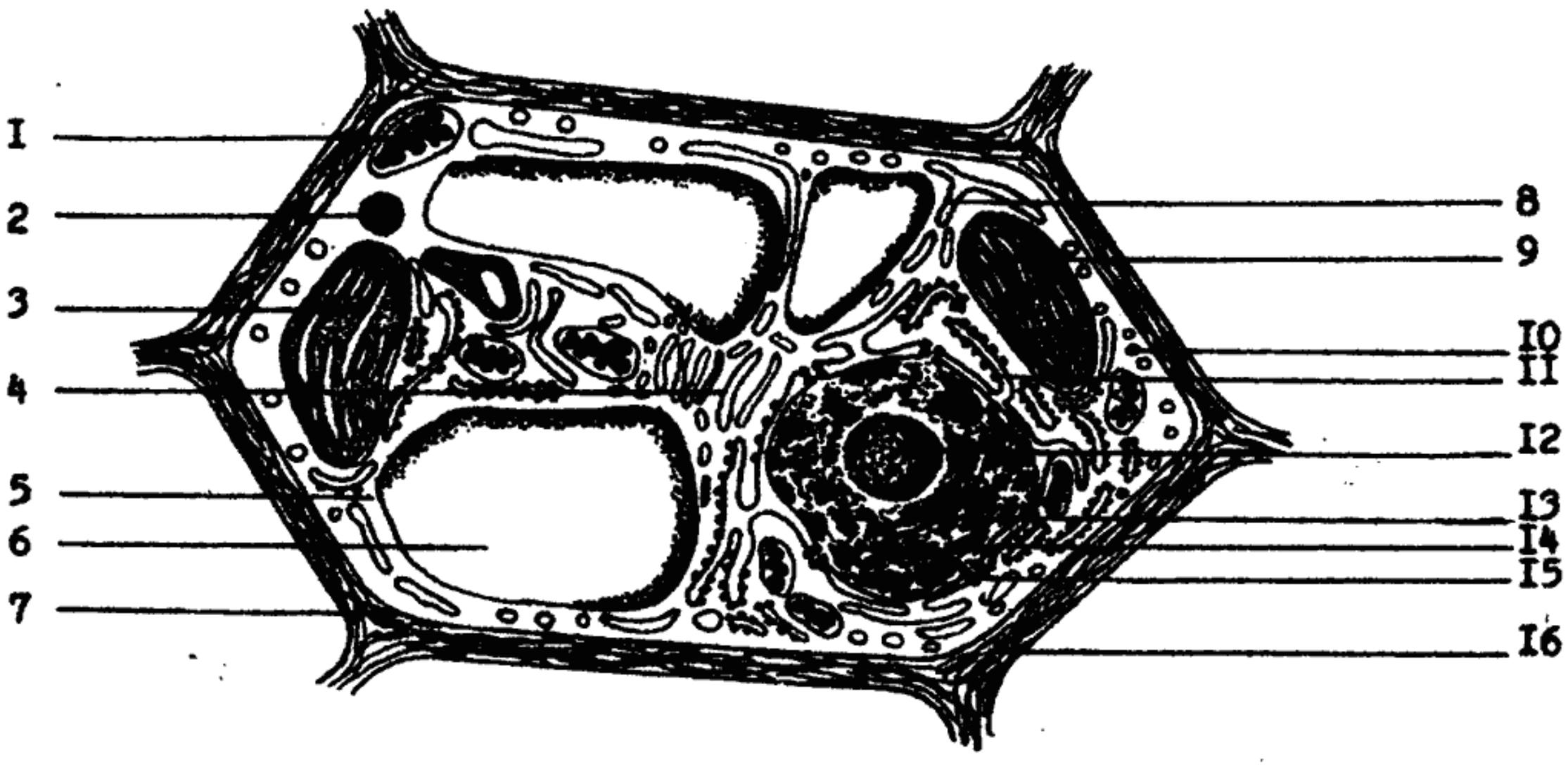


Рис.2.1а. Схематическое изображение строения эукариотической клетки:

1-митохондрия; 2-жировое включение; 3-хлоропласт; 4- аппарат Гольджи; 5-цитоплазма; 6-вакуоль; 7-плазматическая мембрана; 8-эндоплазматический ретикулум (гладкий); 9-хлоропласт; 10-микротрубочки; 11-эндоплазматический ретикулум (шероховатый); 12-ядрышко; 13-ядро; 14-ядерная мембрана; 15-пора ядерной мембраны; 16-клеточная стенка

В клетках прокариот отсутствует истинное ядро и ядерная мембрана, нет ядрышка. Ядерный аппарат представлен одной хромосомой, расположенной непосредственно в цитоплазме. Прокариоты лишены также митохондрий, хлоропластов и других органелл, характерных для клеток эукариот. Они содержат функциональные аналоги этих органелл, которые не всегда морфологически четко дифференцированы (рис. 2.1б). Так, фотосинтетический аппарат у фотосинтезирующих бактерий и цианобактерий обнаруживается в форме относительно простых

пластинчатых образований хроматофор, или тилакоидов.

Имеется существенная разница между этими двумя группами клеток и в химическом составе клеточных стенок. Основным веществом клеточных стенок прокариот является гетерополимер муреин (гликопептид, или пептидогликан), не встречающийся в клетках эукариот.

Различия в организации клетки прокариот и эукариот

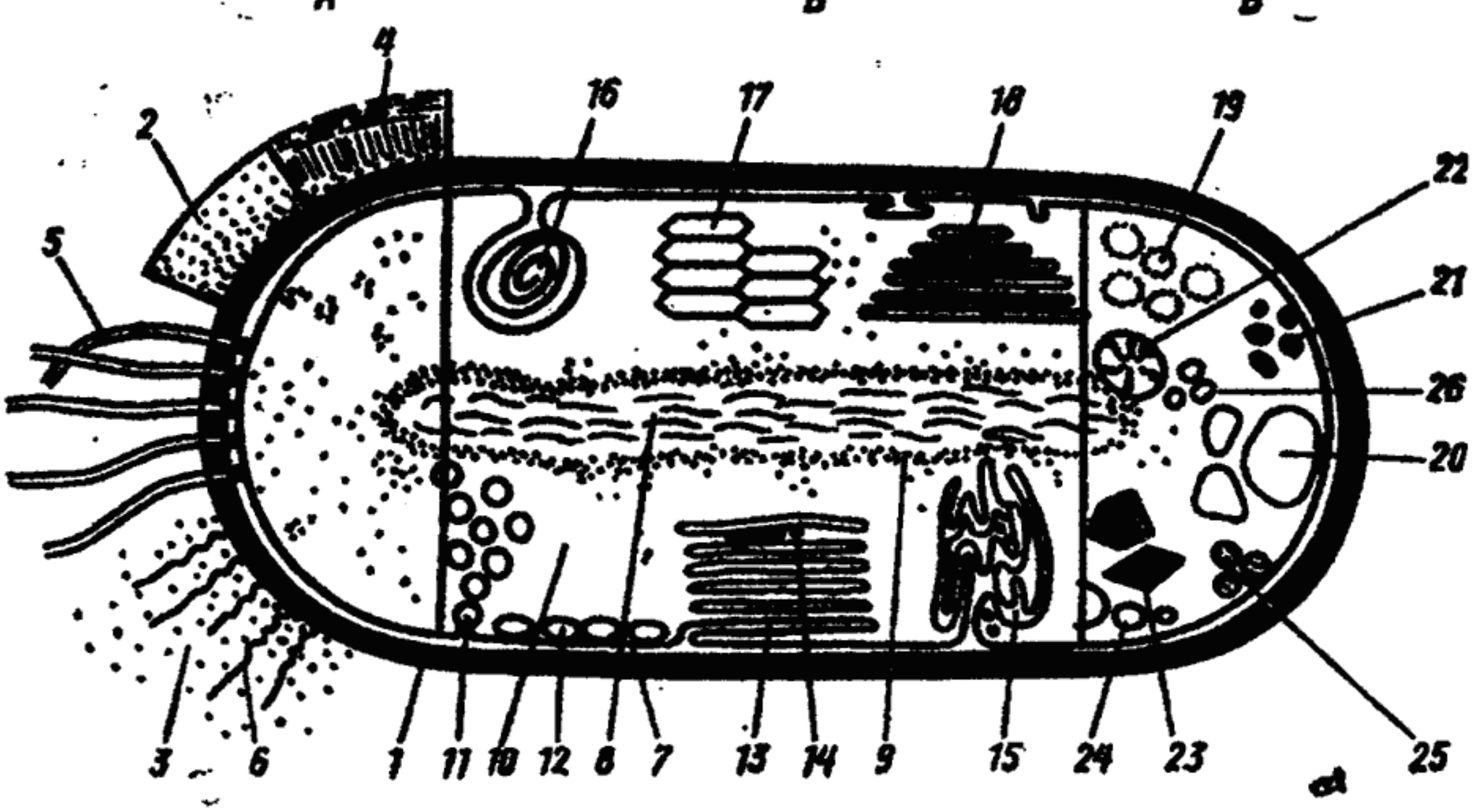


Рис.2.1б. Схематическое изображение строения прокариотической клетки:

А - поверхностные клеточные структуры и внеклеточные образования: 1-клеточная стенка; 2-капсула; 3-слизистые выделения; 4-чехол; 5-жгутики; 6-ворсинки;

Б - цитоплазматические клеточные структуры: 7-ЦПМ; 8-нуклеоид; 9-рибосомы; 10-цитоплазма; 11-хроматофоры; 12-хлоросомы; 13-пластинчатые тилакоиды; 14-фикобилисомы; 15-трубчатые тилакоиды; 16-мезасома; 17-аэросомы (газовые вакуоли); 18-ламеллярные структуры;

В - запасные вещества: 19-полисахаридные гранулы; 20-гранулы поли-β-оксимасляной кислоты; 21-гранулы полифосфата; 22-цианофициновые гранулы; 23-карбоксисомы (полиэдральные тела); 24-включения серы; 25-жировые капли; 26-углеводородные гранулы (по Schlegel, 1972)

относятся к числу самых крупных биологических «разрывов», отмеченных в эволюции органического мира. Прокариоты рассматриваются как реликтовые формы, появившиеся на первых этапах биологической эволюции еще в анаэробных условиях (в восстановительной первичной атмосфере). Несмотря на простоту организации клетки, прокариоты в процессе развития приобрели разносторонние физиолого-биохимические функции, которые обеспечивают многообразие метаболических путей и, как следствие, - широкое распространение в природе.

Развитие эукариот произошло значительно позже - с появлением кислорода в атмосфере - и рассматривается как гигантский скачок в эволюции живого мира, проявившийся в усложнении структурной организации и морфологической дифференцировке.

Уникальную группу биологических объектов составляют вирусы. Они не имеют клеточного строения и по своей природе отличаются от всех клеточных организмов. Это облигатные внутриклеточные паразиты, обладающие строгой специфичностью к клеткам-хозяевам. Они паразитируют не на организменном или клеточном, а на генетическом уровне. Внедряя свой генетический материал в геном клетки-хозяина, вирусы вызывают разрушение или выключение, или изменение клеточного генома.

Потомство вирусов никогда не образуется непосредственно из зрелого вириона как клетка от клетки, а формируется в клетке-хозяине заново путем самосборки синтезированных клеток компонентов - вирусной нуклеиновой кислоты и белка - в вирусные частицы. Вирусы имеют ряд других уникальных свойств, которые позволили выделить их самостоятельное царство Vira.

2.2. ПРОБЛЕМЫ СИСТЕМАТИКИ ПРОКАРИОТ

Систематика многочисленных живых существ, населяющих нашу планету, их классификация по определенным группам осуществляется на основании всестороннего изучения биологических свойств организмов, их происхождения и генетических связей. Систематика прокариот, как и эукариот, не является статической и полностью упорядоченной, она динамична и

беспрерывно совершенствуется. Применение современных методических приемов и высокого технического оснащения приводит к выявлению в природе новых видов микроорганизмов, а также обнаружению новых свойств у известных видов. Наглядным примером служит обнаруженная в 1978 г. американскими учеными К. Вузом и Г. Фоксом новая группа микроорганизмов - архебактерии. Выявление и описание свойств этой уникальной группы микроорганизмов является крупнейшим открытием современного естествознания. Оно вызывает необходимость пересмотра всей таксономии бактерий и перестройки филогенетического древа жизни.

Систематика, или таксономия, прокариот является не только одним из наиболее важных и сложных, но и менее разработанных разделов микробиологии. Систематика как наука занимается проблемами классификации, номенклатуры и идентификации организмов. Задачей классификации является объединение микроорганизмов с общими свойствами в определенные группы. Номенклатура дает названия отдельным группам и микроорганизмам, принадлежащим к ним. В микробиологии, также как в ботанике и зоологии, принята бинарная номенклатура, т. е. бактерии имеют родовое и видовое названия. Например, Azotobacter chroococcum и Azotobacter vinelandii - два вида бактерий, относящихся к одному роду. Идентификация устанавливает принадлежность микроорганизмов к определенному таксону на основании конкретных признаков.

В настоящее время в микробиологии существует два различных подхода к систематике, обуславливающие два принципа классификации. Одни исследователи считают, что классификация должна отражать историю развития организмов и строиться на филогенетической основе. Это *естественная классификация*. В 1936-1950 гг. исследователи голландской школы А. Клюйвер, К. ван Ниль и Р. Стейниер разрабатывали филогенетические подходы к систематике бактерий. В нашей стране сторонником этого направления был Н. А. Красильников.

Второй подход к систематике основан на учете легко определяемых признаков, удобных с точки зрения практики. Это *искусственная*, или *традиционная классификация*. Она чаще всего

заранее подчинена конкретным задачам. При такой классификации признаки, определяющие принадлежность организма к той или иной таксономической единице, часто выбираются произвольно. Иногда микроорганизмы объединяются в группы на основании одного ведущего признака. Поэтому группы микроорганизмов, классифицированные по данной систематике, могут иметь большое практическое значение, но не соответствуют естественной классификации. Искусственная классификация положена в основу определителя Берги, предназначенного для идентификации бактерий по фенотипическим признакам и содержит сведения о видах бактерий.

Одной из причин, затрудняющей классификацию микроорганизмов, является отсутствие точно установленных критериев, служащих для определения вида. По аналогии с систематикой высших организмов в микробиологии принято считать основной систематической единицей *вид* исходя из того, что под этим названием объединяется группа микроорганизмов, наделенная общими признаками и происходящая от общего предка. Наиболее подходящим и близким к истине определение вида дано Н. А. Красильниковым (1949). Взяв за основу определение В. Л. Комарова применительно к высшим организмам, Н. А. Красильников рассматривает вид бактерий как «группу или совокупность близких между собой организмов, которые имеют общий корень происхождения, на данном этапе эволюции характеризуются определенными морфологическими и физиологическими признаками, обособлены отбором от других видов и приспособлены к определенной среде обитания».

Вид является самой мелкой систематической единицей. Близкородственные виды объединяются в роды, роды - в семейства, семейства - в порядки, порядки - в классы. Высшей таксономической единицей является царство. Бактерии составляют царство Procaryotae.

В классификации прокариот используют любые поддающиеся учету фенотипические признаки: морфологические, культуральные, физиолого-биохимические, серологические. Чем больше общих признаков имеют сравниваемые организмы, тем больше сходства между ними и оснований для включения в одну таксономическую

группу. Это так называемая нумерическая, или числовая таксономия, построенная на принципах классификации французского ботаника М. Адансона (1757). Главной идеей М. Адансона является равноценность всех признаков, по которым организмы должны группироваться по принципу максимального числа совпадающих признаков. Использование множества разнообразных фенотипических признаков часто сопровождается анализом полученной информации с помощью вычислительной техники. Нумерическая таксономия является трудоемким методом и к тэму же учитывает только около 10 % признаков фенотипа.

Ценным дополнением к фенотипическим характеристикам прокариот в целях их классификации является молекулярно-биологический анализ генома. Определение молекулярного содержания ГЦ-оснований (гуанина и цитозина) у широкого круга прокариот показало, что особи одного и того же вида имеют одинаковый состав оснований ДНК, а разные виды, принадлежащие к одному роду, имеют близкие значения нуклеотидного состава. Например, у Az. chroococcum содержание ГЦ составляет 65-66 %, у Az. vinelandii - 65,8-66,3, у Az. beijerinkii - 66,2 % от общего количества оснований. Для оценки степени генетического родства организмов используется метод гибридизации их ДНК, который позволяет определить количество сходных (гомологичных) участков нуклеотидной последовательности в молекулах ДНК, выделенных из сравниваемых организмов. Сущность метода состоит в том, что выделенные из разных микроорганизмов ДНК разделяют нагреванием на отдельные цепи. Затем их смешивают и охлаждают. При медленном охлаждении смеси комплементарные участки цепей воссоединяются (ренатурируют). Степень воссоединения зависит от гомологии ДНК. Чем ближе друг к другу сравниваемые организмы с точки зрения их эволюционного происхождения, тем больше они будут иметь сходных участков нуклеотидных последовательностей в ДНК и тем большая часть двух цепей ренатурирует. Это сходство служит мерой генетического родства сопоставляемых организмов. Однако сведения о гомологии ДНК применимы в основном для видовой идентификации и недостаточны в систематике на уровне родов и более высоких таксонов. Нуклеотидный состав и гомология ДНК

являются полезным дополнением к совокупности морфологических, цитологических, физиолого-биохимических и других свойств, используемых в систематике прокариот.

В последнее десятилетие для решения вопросов эволюции и систематики живых организмов особое внимание обращено на рибосомальные РНК (рРНК), как наиболее консервативные по структуре и функциям макромолекулы. Из трех типов рРНК наиболее пригодными для данных исследований оказались средние рРНК: 16S рРНК у прокариот и 18S рРНК у эукариот. Нуклеотидные последовательности у данных рРНК проанализированы более чем у 200 организмов, принадлежащих к разным царствам. Результаты привели к открытию группы живых существ, составляющих третью ветвь эволюции и самую древнюю по происхождению, что получило отражение в названии группы - архебактерии (см. ниже).

Молекулярно-биологический подход, а также хемотаксономия являются в настоящее время основными направлениями исследований, имеющих целью не только установление особенностей организации разных организмов, но и совершенствование системы их классификации и познания эволюции всего живого мира нашей планеты.

2.3. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОКАРИОТ

Первые попытки классификации микроорганизмов относятся ко второй половине XVIII в. В 1786 г. О. Мюллер объединил все известные микроорганизмы в одну группу под общим названием инфузории. Эта группа подразделялась на два рода - монас и вибрио, куда входили только бактерии. В 1838 году появилась систематика Г. Эренберга, по которой бактерии также относятся к классу инфузорий, но делятся на два семейства - монадины с одним родом монас и вибрионилы с четырьмя родами, включающими палочковидные, нитевидные и извитые формы. Г. Эренберг описал много новых видов бактерий. Значительным шагом вперед явились исследования Ф. Кона (1854) и К. Негели (1857) в Германии и Л. Ценковского (70-е годы XIX в.) в России. По их систематике бактерии были окончательно отнесены к растительному царству и

было проведено четкое разграничение микроорганизмов по морфологическим признакам.

В настоящее время бактерии классифицируют в соответствии с Определителем Берги, выпускаемом периодически Международным Комитетом по тематике прокариот с привлечением крупных специалистов разных стран. Ценность Определителя Берги в том, что он представляет собой наиболее полную сводку известных бактерий и содержит необходимые тесты для идентификации их. В основу классификации прокариот в 9-м издании Определителя Берги (т.1, 1994 г.) положены наличие клеточной стенки и ее структурная организация. В соответствии с этим критерием царство Procaryotae разделено на 4 отдела: Gracilicutes (от лат. cutes - кожа, gracilis - тонкий) - грамотрицательные бактерии; Firmicutes (от лат. firmus - прочный) - грамположительные бактерии; Tenericutes, или Molicutes (от лат. mollis - мягкий) - бактерии, не имеющие клеточной стенки - микоплазмы; Mendosicutes (от лат. mendosus - ошибочный) - архебактерии, клеточная стенка которых иного состава, чем аналогичная структура других прокариот.

Каждый из перечисленных отделов представлен разным количеством таксономических и физиологических групп бактерий, характеристика которых дана в гл. 8.

Глава 3

МОРФОЛОГИЯ И АНАТОМИЯ БАКТЕРИЙ

Первые сведения о морфологии и размерах обычных типов бактерий были получены еще Левенгуком. Однако детальное изучение микроорганизмов долгое время затруднялось из-за отсутствия совершенной микроскопической техники. Поэтому для биолога XIX в. бактерии казались наиболее примитивными организмами с точки зрения их клеточной организации и крайним пределом жизни. Известный немецкий ботаник Фердинанд Кон утверждал, что эти мельчайшие и в то же время простейшие из всех живых форм образуют пограничную линию жизни, насколько нам позволяют судить наши оптические возможности, за пределами этих форм жизни не существует. Ничтожные размеры бактерий казались многим несовместимыми с какой-либо клеточной дифференцировкой, аналогичной высшим организмам. И только успехи в развитии физики, химии, электроники привели к созданию совершенной микроскопической техники и разработке тончайших физико-химических методов исследования, применение которых позволило изучить строение бактериальной клетки и функции отдельных клеточных структур.

3.1. ФОРМА И РАЗМЕРЫ БАКТЕРИЙ

По форме бактерии разделяются на три основные группы: шаровидные, или кокковидные, палочковидные и извитые.

Кокки имеют округлую форму, диаметр их 1-2 мкм. В зависимости от расположения клеток после деления кокков различают ряд групп: *микрококки* - клетки располагаются поодиночно; *диплококки* - клетки не разъединяются, а остаются связанными по две; *стрептококки* - клетки образуют цепочки разной длины (рис.3.1). Все эти морфологические группы имеют место при правильном делении клеток в одной плоскости. Однако кокки могут делиться в нескольких плоскостях и направлениях. При делении кокков в различных направлениях возникают скопления

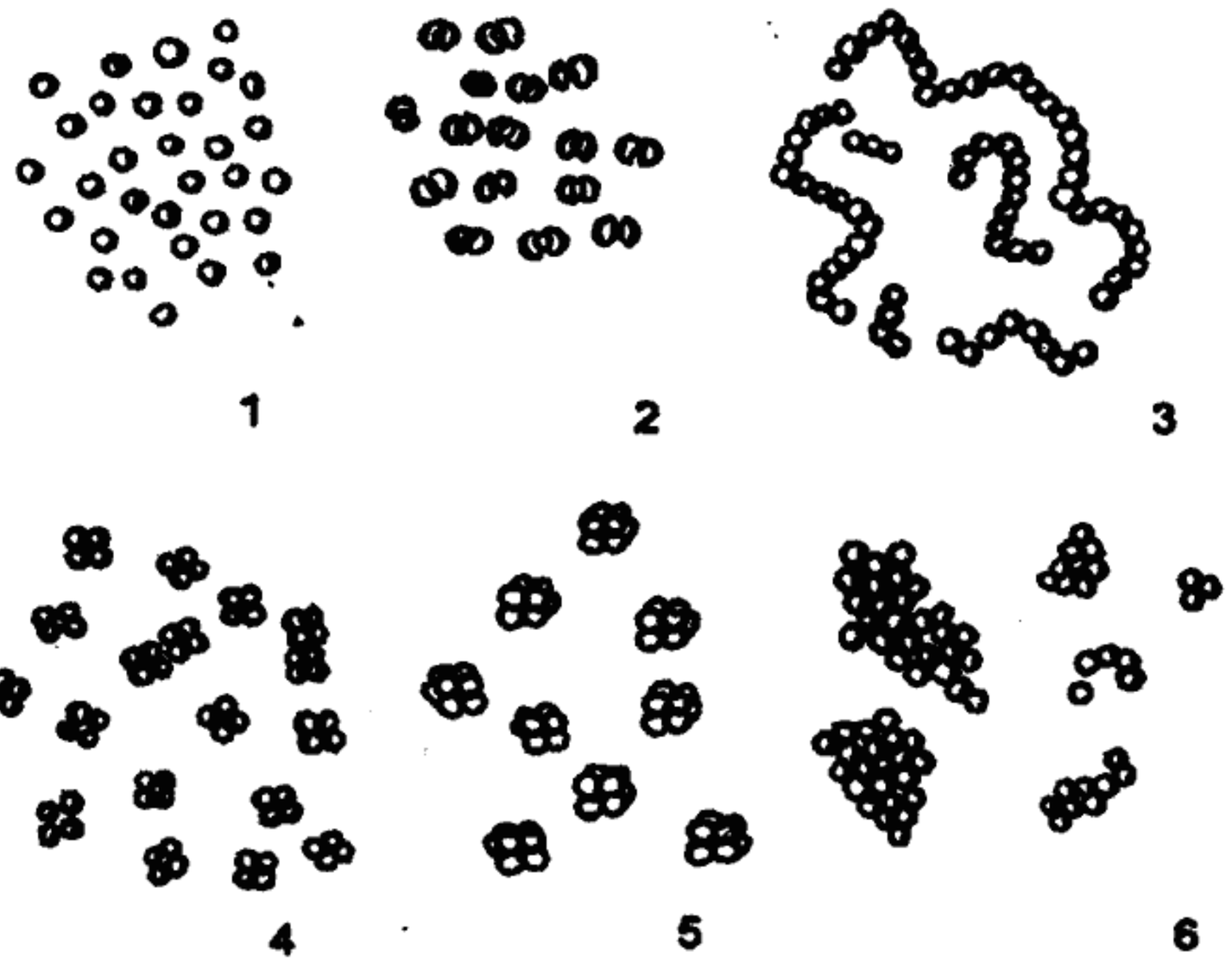


Рис.3.1. Шаровидные бактерии: ***1 - микрококки; 2 - диплококки; 3 - стрептококки; 4 - тетракокки; 5 - сарцины; 6 - стафилококки***

клеток, напоминающих гроздья винограда. Это *стафилококки*. Деление кокков в двух взаимно перпендикулярных направлениях приводит к образованию *тетракокков*. При одновременном делении кокков в трех плоскостях получаются пакеты из восьми кокков в виде тюков кубической формы. Это характерно для *сарцин*.

Отдельные представители кокков имеют полукруглую форму клеток. Это **пневмококки, менингококки и гонококки**. Форма пневмококков напоминает пламя свечи, клетки соединены попарно широкими основаниями. Менингококки и гонококки имеют форму бобов или кофейных зерен, клетки соединены по две вогнутыми сторонами. Бобовидную форму имеют клетки бактерий рода Renobacter.

Кокковые формы, за исключением Sarcina ureae (мочевой сарцины), не образуют спор, неподвижны, широко распространены в природе. Многие из них патогенны и являются возбудителями воспалительных процессов (пневмококки, менингококки, гноеродные стрептококки и стафилококки), другие - непатогенные - вызывают, например, молочнокислое брожение (Str. lactis,

Str. cremoris), некоторые используются в производстве для биосинтеза декстрана - заменителя плазмы крови (Leuconostoc mesenteroides).

К палочковидным относится самая многочисленная группа бактерий. Клетки их имеют цилиндрическую форму с округлыми либо срезанными концами (рис.3.2).

Для определения бактерий характерно соединение палочковидных клеток в длинные нити, в результате чего образуются многоклеточные нитевидные формы. Представителями нитевидных бактерий являются железобактерии (род Leptothrix), бесцветные серобактерии (роды Beggiatoa и Thiothrix) и другие, достигающие в длину больше 1 см (рис. 3.3).



Рис.3.2. Палочковидные бактерии и бациллы

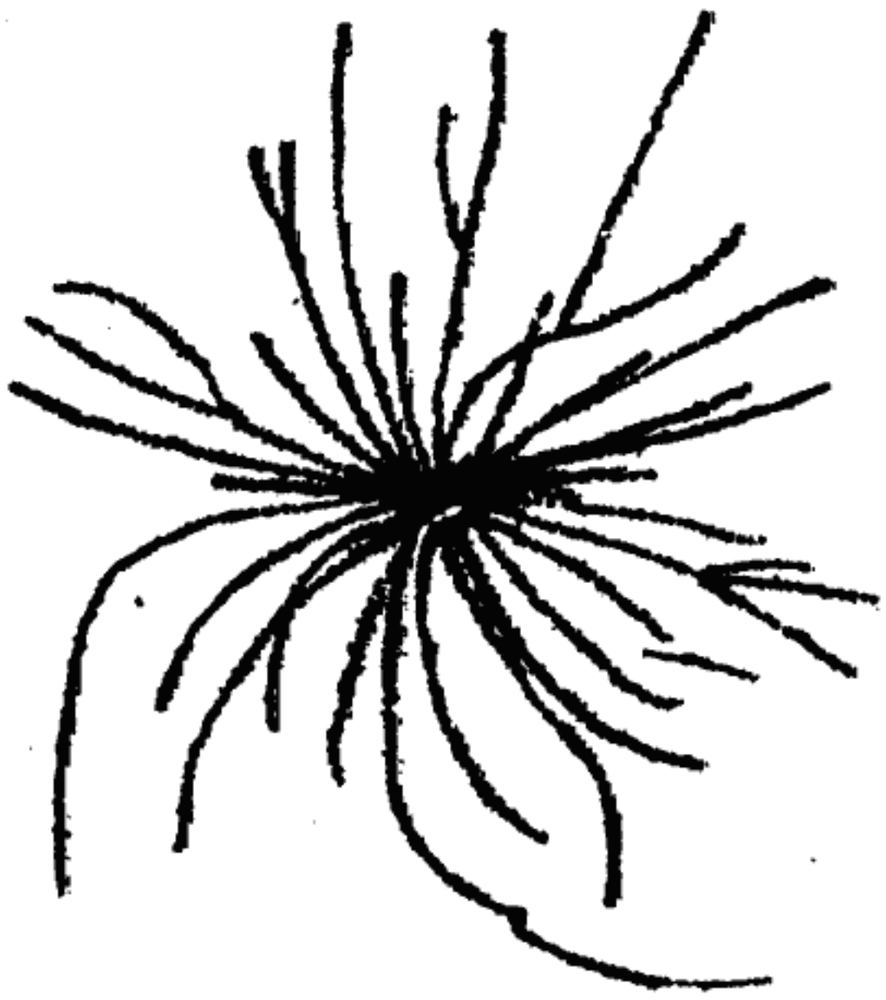


Рис. 3.3.Нитчатая бактерия Thiothrix (по Р. Стениеру с соавт.)

Применение электронной микроскопии в микробиологических исследованиях позволило выявить ряд модификаций палочковидной формы бактерий. Это описанные Д. И. Никитиным (1970) бактерии со сферическими вздутиями (Agrobacterium polyspheroides), похожие на кукурузные початки, бактерии с бугристыми выростами, выделенные в новый род Tuberoidobacter (рис. 3.4); бактерии со спиральной извитостью по типу каната (рис.3.5),

образующие звездчатые скопления (последние были впервые описаны Т. В. Аристовской в 1965 г. и выделены в самостоятельный род Seliberia - в честь советского микробиолога Г. Селибера).



Рис.3.4. Tuberoidobacter (увеличение × 20 000)

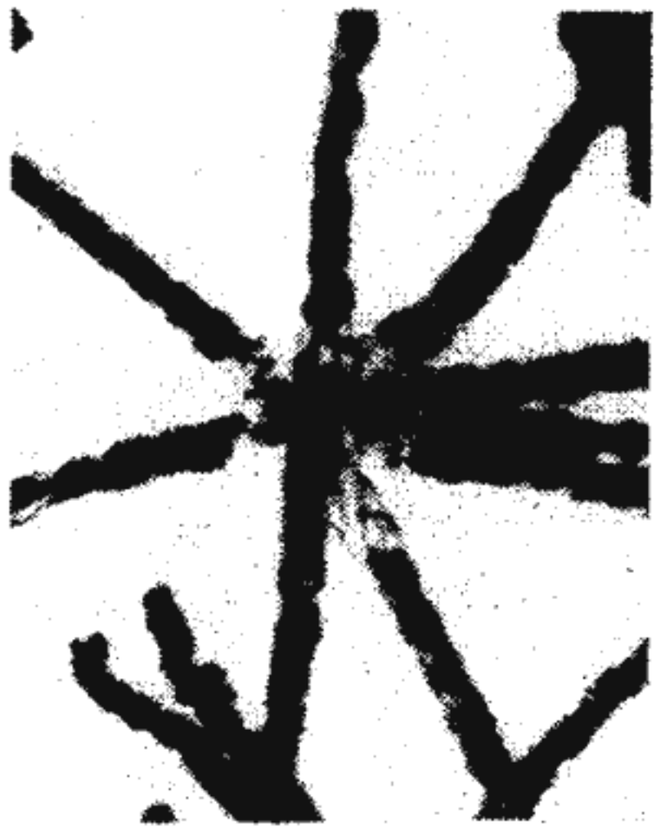


Рис.3.5. Seliberia stellata (увеличение ×15 000)

По способности к спорообразованию палочковидные формы делятся на две группы: *бактерии* и *бациллы*. Клетки, не образующие спор, называются бактериями. Они, как правило, располагаются одиночно. В преобладающем большинстве это мелкие палочки, относящиеся к родам Bacterium и Pseudomonas. Палочковидные формы, образующие споры, называются бациллами. Они различаются между собой по форме клеток, обусловленной размерами и местом расположения спор. Если спора располагается в центре клетки и диаметр ее не превышает диаметр клетки, то такой тип называется собственно бациллами; если диаметр споры превышает диаметр клетки, то при расположении споры в центре клетка имеет веретеновидное утолщение и называется *клостридием*, а при расположении споры в конце - принимает вид барабанной палочки или теннисной ракетки и называется *плектридием*.

К группе *извитых форм* относятся изогнутые или спиралевидно извитые клетки. В зависимости от формы и количества завитков различают три типа клеток: *вибрионы, спириллы* и *спирохеты (*рис. 3.6). Вибрион изогнут в виде полумесяца или запятой, спирохета - в виде мелких витков спирали, спирилла имеет несколько крупных завитков. Большинство извитых форм представлено патогенными видами (холерный вибрион, трепонема сифилиса), но среди них есть и сапрофиты, обитающие в почве, воде и участвующие в круговороте серы (Vibrio desulfuricaus, Spirillum volutans и др.). Извитые формы имеют весьма различные размеры клеток: от мелких – 1,5-2 мкм (вибрионы) до очень крупных – 2-3 х 15-20 мкм (спириллы).

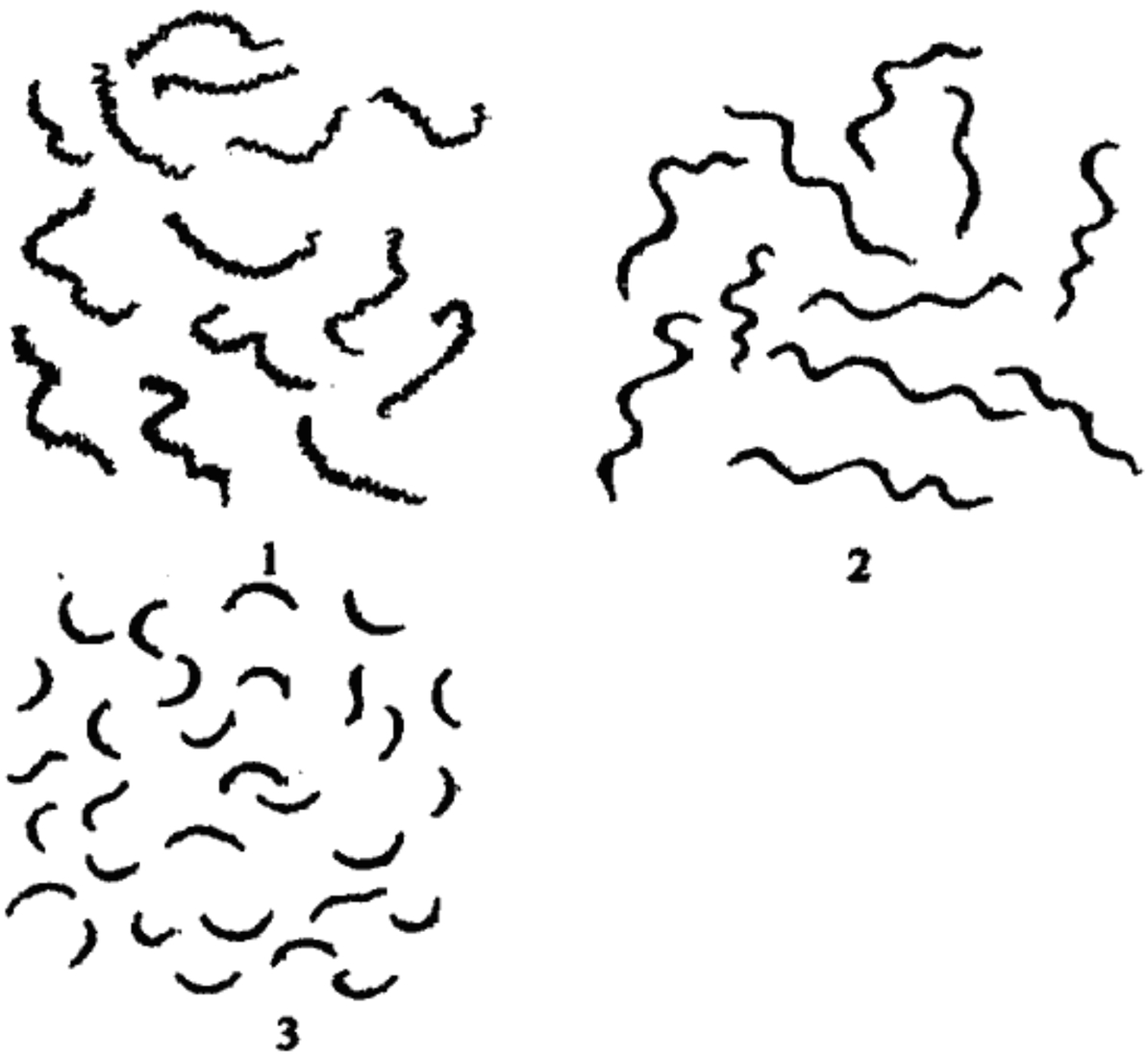


Рис.3.6. Извитые формы бактерий: *1- спириллы; 2 - спирохеты; 3 - вибрионы*

Кроме описанных бактерий, которые являются основными в природе, известны и иные формы. Так, бактерии рода Mycobacterium наряду с палочковидной на ранней стадии развития имеют

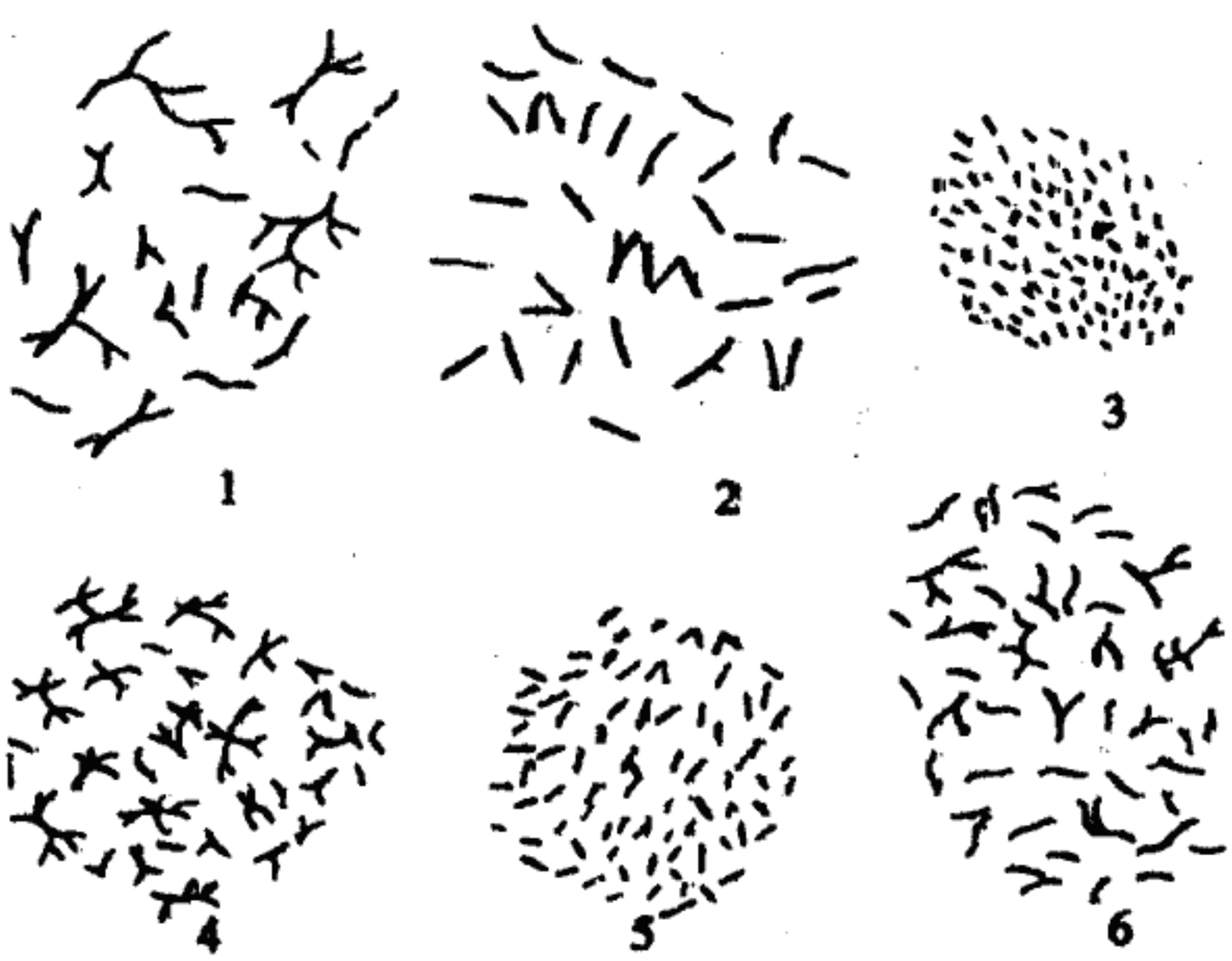


Рис.3.7. Микобактерии разных видов (увеличение × 600) *1 - Mycob. mucosum; 2 - Mycob. rubrum; 3 - Mycob. album; 4 - Mycob. cyaneum; 5 - Mycob. bifidum; 6 - Mycob. citrym*

ветвистую форму. Ветвление может быть многократным - по 2-5 веток на клетку (рис. 3.7). Особенно сильным ветвлением характеризуются клетки актиномицетов. Некоторые представители их образуют хорошо развитый многократно ветвящийся мицелий со сложным строением органов спороношения (рис. 3.8).

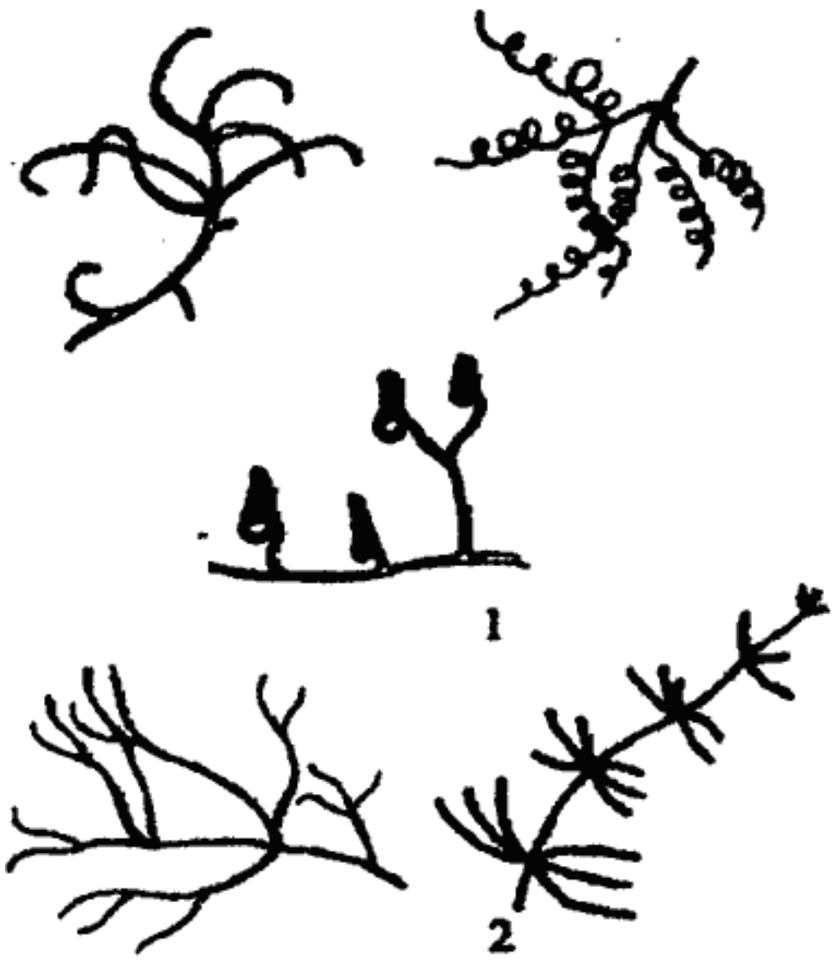


Рис.3.8 Спороносцы (1) и мицелий (2) актиномицетов

Своеобразную морфологию имеют стебельковые (род Caulobacter) и почкующиеся (род Hyphomicrobiym) бактерии (рис. 3.9). Основная часть клетки их имеет неправильную палочковидную или грушевидную форму и снабжена придатками в виде длинных стебельков или гиф и почек. Стебельковые и почкующиеся бактерии особенно широко распространены в пресных и соленых водоемах.

Рис. 3.9. Стебельковые и почкующие бактерии: *1- Newskia; 2- Gallionella; 3- Caulobacter; 4- Hyphomicrobium; 5- Rhodomicrobium*

Значительное влияние на форму и размеры клеток оказывают состав среды, возраст культуры и условия культивирования. Из всех форм наибольшей стабильностью характеризуются кокки, наибольшей вариабельностью - палочковидные клетки.

3.2. СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. ФУНКЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР

Бактериальная клетка, несмотря на свои малые размеры, морфологически дифференцирована. В ней различают клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, цитоплазму с различными включениями и ядро, или нуклеоид. Кроме этих основных структур, некоторые виды бактерий имеют капсулы, жгутики и фибрии, а отдельные представители образуют споры (рис. 3.10).

3.2.1. Клеточная стенка

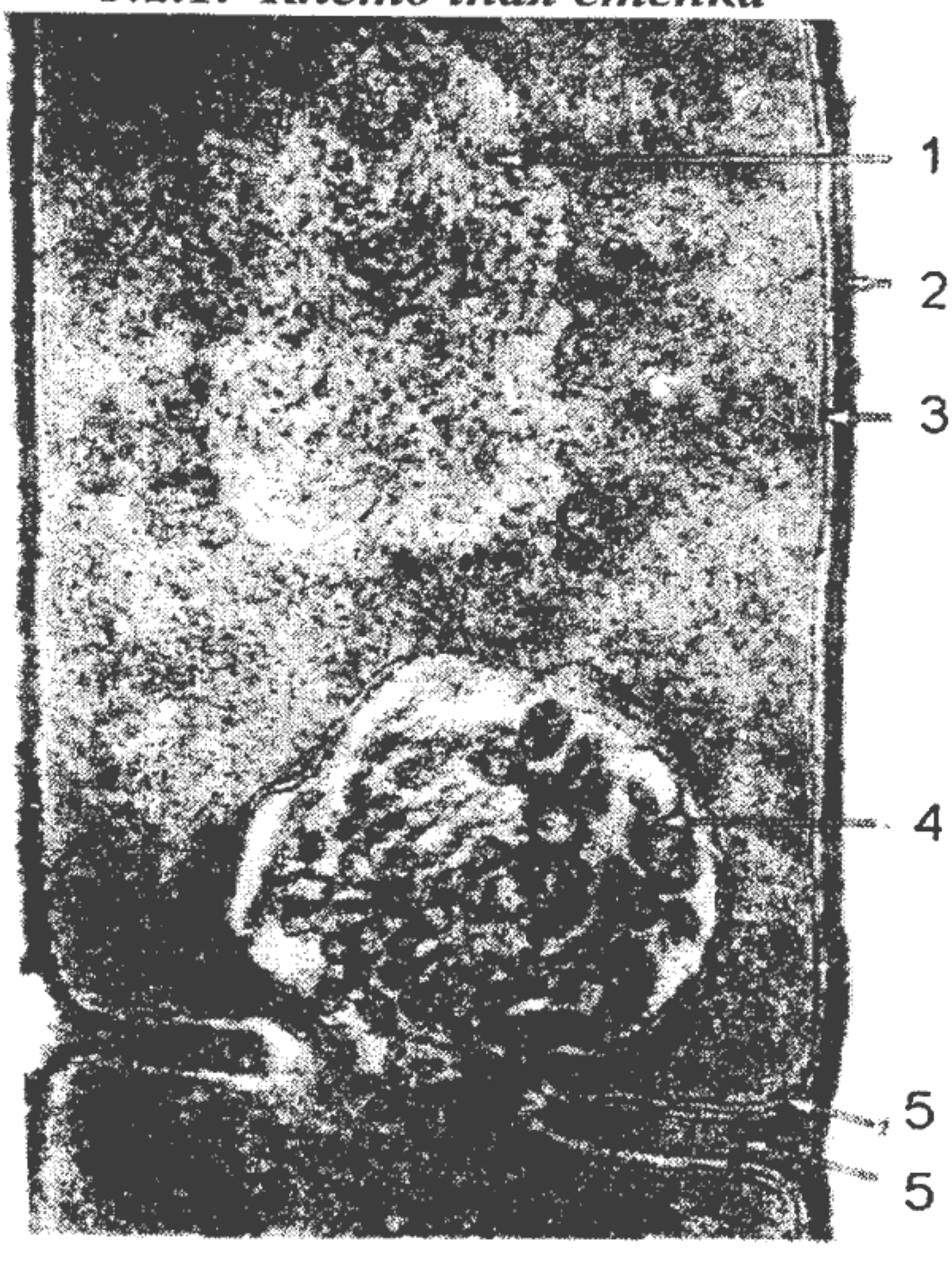


Рис. 3.10. Микрофотография среза клетки Bac. subtilis (увеличение × 190 000): ***1 - нуклеоид; 2 - клеточная стенка; 3 - цитоплазматическая мембрана; 4 - мезосома; 5 - образующаяся поперечная перегородка***

3.2.1. Клеточная стенка

Клеточная стенка бактерий - это тонкая бесцветная структура, покрывающая клетку снаружи. У большинства бактерий она невидима в обыкновенный микроскоп без специальной обработки. Однако у крупных форм, например у серобактерии Beg. mirabilis, стенка заметна отчетливо. При явлении плазмолиза, который наступает при помещении клеток в 1-2 %-ный гипертонический раствор NaCl или раствор глюкозы, контуры стенки приобретают четкость и она хорошо видна при фазово-контрастной микроскопии.

Стенка бактериальной клетки составляет до 50 % сухой массы организма, толщина ее колеблется в пределах 20-80 нм. Клеточная стенка - плотная ригидная структура. Она обладает эластичностью и достаточной механической прочностью, выдерживает внутриклеточное осмотическое давление, достигающее 10-30 атм.

Химический состав клеточных стенок различных видов бактерий неодинаков, довольно сложен и отличает их не только от клеток растений и животных, но и друг от друга.

Основным компонентом клеточной оболочки высших растений и водорослей является целлюлоза. Из целлюлозы состоят, например, микрофибриллы большинства водорослей - до 50-80 % сухой массы оболочки клетки. В микрофибриллах клеточных оболочек большинства мицелиальных грибов преобладает хитин - полимер N-ацетилглюкозамина.

Совершенно иной химический состав имеют клеточные стенки бактерий. Такие соединения как целлюлоза и хитин не характерны для них. Правда, некоторые виды бактерий способны синтезировать целлюлозу и компоненты хитина. Так, у Sarcina ventriculi целлюлоза составляет толстый внешний слой клеточной стенки. Помимо Acetobacter xylinum, это единственный представитель прокариот, синтезирующий данный полимер. Компонент хитина - ацетилглюкозамин обнаруживается у всех видов бактерий, за исключением некоторых архебактерий.

В клеточных стенках бактерий содержится два класса новых, необычных соединений, присущих только прокариотам. Это пептидогликан и тейхоевые кислоты.

Пептидогликаны и тейхоевые кислоты. Пептидогликан, или муреин (от лат. myrus - стенка) представляет собой гетерополимер, состоящий из цепочек чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты (эфир молочной кислоты и N-ацетилглюкозамина), соединенных β-1,4-гликозидной связью. К карбоксильной группе мурамовой кислоты присоединен пептид, включающий чаще всего четыре аминокислоты - тетрапептид. Аминокислотный состав пептида различных видов бактерий не одинаков: у Staph. aureus содержится α–лизин, у E. coli – мезо-диаминопимелиновая кислота, у Corynebacterium – 2-4-диаминомасляная (рис. 3.11).

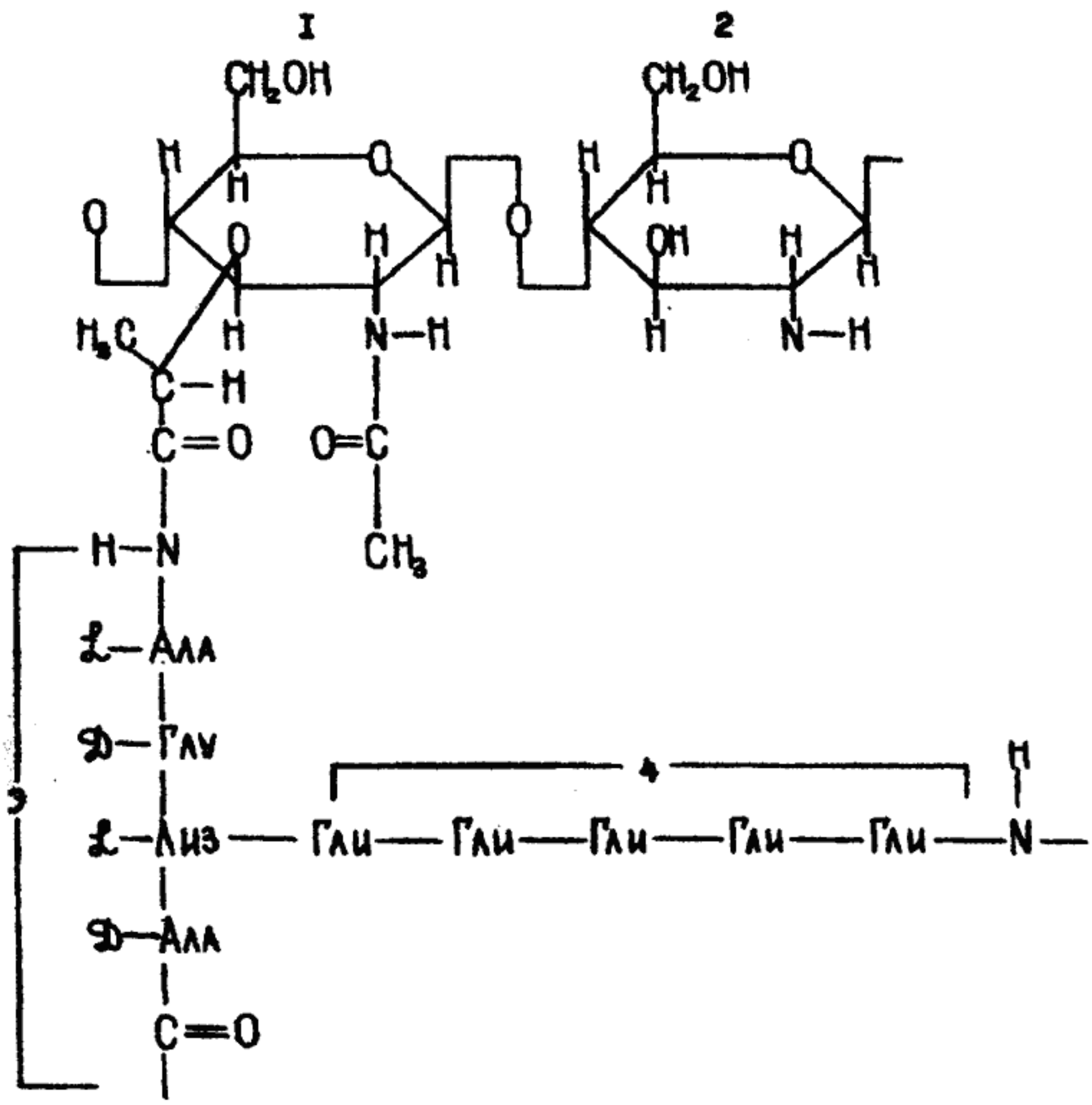


Рис.3.11. Структура пептидогликана стафилококка:

1- N-ацетилмурамовая кислота; 2 - N-ацетилглюкозамин; 3 - тетрапептид; 4 - глидоновый мостик

На основании аминокислотного состава пептидов и соединяющих их мостиков различают ряд подгрупп пептидогликана. Особенностью пептидной части этого полимера является наличие D-аминокислот (в белках они не встречаются) и высокое содержание диаминокислот. Обе аминогруппы, входящие в состав муреина диаминокислоты, участвуют в образовании пептидных связей - с D-аланином и аминокислотным мостиком. Посредством мостиков осуществляются поперечные сшивки пептидогликановых цепей. В итоге формируется гигантская молекула, напоминающая по виду мешок, состоящая из сети полисахаридных цепей, связанных множеством поперечных пептидных связей. За счет образования поперечных сшивок обеспечивается жесткая трехмерная пространственная организация молекулы, обусловливающая механическую прочность и ригидность клеточной стенки.

Пептидогликан чувствителен к литическому действию лизоцима, который расщепляет β-1-4-гликозидные связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой. Обработка бактерий лизоцимом приводит к разрушению сформированной клеточной стенки. Ингибитором синтеза пептидогликана является ряд антибиотиков: пенициллин, цефалоспорин, бацитрацин, ванкомицин. К примеру, пенициллин подавляет активность фермента транспептидазы, катализирующего образование поперечных сшивок между образующимися цепями пептидогликана. Не сшитый полимер не используется для образования клеточной стенки бактерий.

Тейхоевые кислоты (от греч. «тейхос» - стенка) представляют собой растворимые в воде полимеры, состоящие из остатков трехатомного спирта глицерола или пятиатомного - рибитола, которые соединены друг с другом фосфодиэфирными связями (рис. 3.12). Цепи тейхоевых кислот могут содержать от 10 до 50 остатков спирта. Большинство тейхоевых кислот включают значительное количество D-аланина, аминогруппы которого придают тейхоевым кислотам амфотерные свойства. Кроме D-аланина свободные гидроксильные группы спиртов могут быть замещены глюкозой, N-ацетилглюкозамином, галактозой. Наличие свободных гидро-

ксилов фосфорной кислоты обусловливает сродство тейхоевых кислот к двухвалентным катионам.

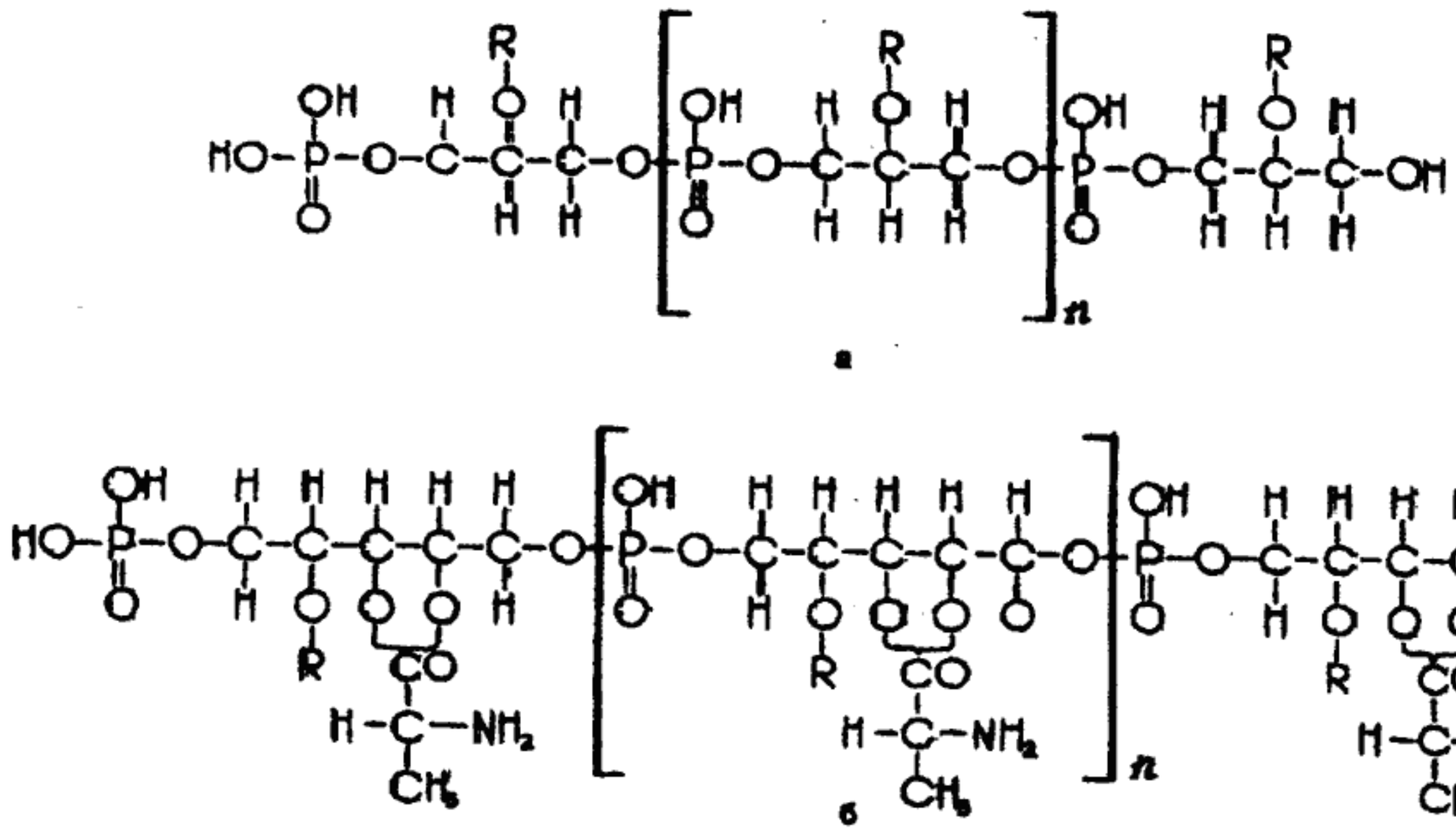


Рис.3.12. Структура тейхоевых кислот клеточной стенки: *а -глицеролтейхоевая; б - рибитолтейхоевая*

Клетки одного штамма бактерий, как правило, содержат тейхоевую кислоту только одного типа: рибитолтейхоевую или глицеролтейхоевую. Эти уникальные соединения содержатся в клеточных стенках только грамположительных бактерий, где они прочно связаны с пептидогликаном. Так как тейхоевые кислоты представляют собой длинные линейные молекулы, они могут проходить через весь пептидогликановый слой до наружной части клетки и играть роль поверхностных антигенов, обусловливая, таким образом, антигенную специфичность клеточной поверхности бактерий. Кроме того, создавая в клеточной стенке высокую плотность строго ориентированных зарядов, тейхоевые кислоты оказывают влияние на проникновение ионов в клетку, обеспечивая высокую плотность двухвалентных катионов в области цитоплазматической мембраны. Это благоприятствует поддержанию физической целостности мембраны и ее связи с рибосомами.

У некоторых бактерий тейхоевые кислоты участвуют в регуляции активности автолитических ферментов, осуществляющих

в определенных условиях гидролиз муреина собственной клетки. Так, у пневмококков тейхоевые кислоты ингибируют действие литических ферментов клетки путем связывания с ними. Нарушение этой связи приводит клетки к лизису.

Пептидогликан является основным структурным компонентом клеточных стенок почти всех прокариот, за исключением архебактерий, у которых он либо совсем отсутствует, либо имеет иной химический состав. Например, у метанобразующих бактерий пептидогликан содержит вместо муреиновой кислоты талозоминуроновую, а пептидная часть не содержит D-аминокислот, состоит только из α-форм.

В зависимости от химического состава и структуры клеточной стенки все бактерии разделяют на грамположительные и грамотрицательные. Это основано на способности их окрашиваться фиолетовыми красителями трифенилметанового ряда - кристаллвиолетом или генцианвиолетом - и не обесцвечиваться нейтральными растворителями - спиртом, ацетоном. Этот метод окраски введен впервые в 1884 г. датским врачом Христианом Грамом и окраска по Граму используется как важнейший таксономический признак бактерий. Сущность его состоит в следующем. Фиксированные клетки окрашиваются кристалл-виолетом или генцианвиолетом, затем протравливаются 30 с раствором Люголя (1 + KI), промываются спиртом, водой и докрашиваются 1 %-ным водным фуксином. Грамположительные бактерии приобретают синий цвет, грамотрицательные - красный.

По структуре и химическому составу клеточной стенки грамположительные бактерии существенно отличаются от грамотрицательных (табл. 2).

У грамположительных бактерий клеточная стенка представляет собой гомогенный электронно-плотный слой толщиной 20 - 80 нм. Основную массу (50-90 % сухого вещества) составляет пептидогликан, образующий ригидный толстый слой. Он плотно прилегает к ЦПМ. Пептидогликановый слой пронизан тейхоевыми кислотами, которые могут выходить на поверхность клеточной стенки. Кроме этих основных полимеров в клеточных стенках грамположительных бактерий содержатся в небольших количествах липиды, полисахариды, белки. Липиды и

полисахариды ковалентно связываются с пептидогликаном, образуя сложную, механически прочную структуру.

Таблица 2

Характеристика химического состава клеточных стенок бактерий

Компоненты	Грамположительные	Грамотрицательные
Пептидогликан	+	+
Тейхоевые кислоты	+	-
Липиды	+	+
Белки	±	+
Полисахариды	+	-
Липополисахариды	-	+
Липопротеиды	-	+

точная стенка грамотрицательных бактерий более тонкая (10-15 нм) и многослойная (рис.3.13). Внутренний слой представлен пептидогликаном, содержание которого значительно меньше (1-10 %), чем в стенках грамположительных бактерий. Толщина данного слоя 2-3 нм. Наружный слой более рыхлый и толстый - 8-10 нм, имеет сложный химический состав. В нем обнаружены белки, фосфолипиды и липополисахариды, расположенные мозаично. По структуре и химическому составу этот слой имеет сходство с цитоплазматической мембраной. Он получил название наружной мембраны и имеется только у грамотрицательных бактерий.

Наружная мембрана является дополнительным барьером, препятствующим проникновению в клетку крупных молекул. Так, она препятствует поступлению в клетку антибиотиков, в частности пенициллина, актиномицина Д. Вполне возможно, что по этой причине грамотрицательные бактерии менее чувствительны к антибиотикам, чем грамположительные.

Липополисахариды наружной мембраны определяют антигенную специфичность бактерий, а также служат рецепторами для адсорбции фагов.

Белки наружной мембраны выполняют разные функции. Одни из них, так называемые белки матриксапорины, формируют в

мембране гидрофильные поры, через которые осуществляется диффузия аминокислот, небольших олигосахаридов и пептидов (молекулярная масса от 600 до 900 Да[6]). Транспорт веществ через поры, образованные поринами, лишен специфичности. Порины являются также рацепторами для фагов и колицинов.

Вторая группа белков - минорные белки, как и предыдущая группа, выполняют транспортные и рецепторные функции. Важная роль отводится им в транспорте железосодержащих соединений в клетке разных видов грамотрицательных бактерий.

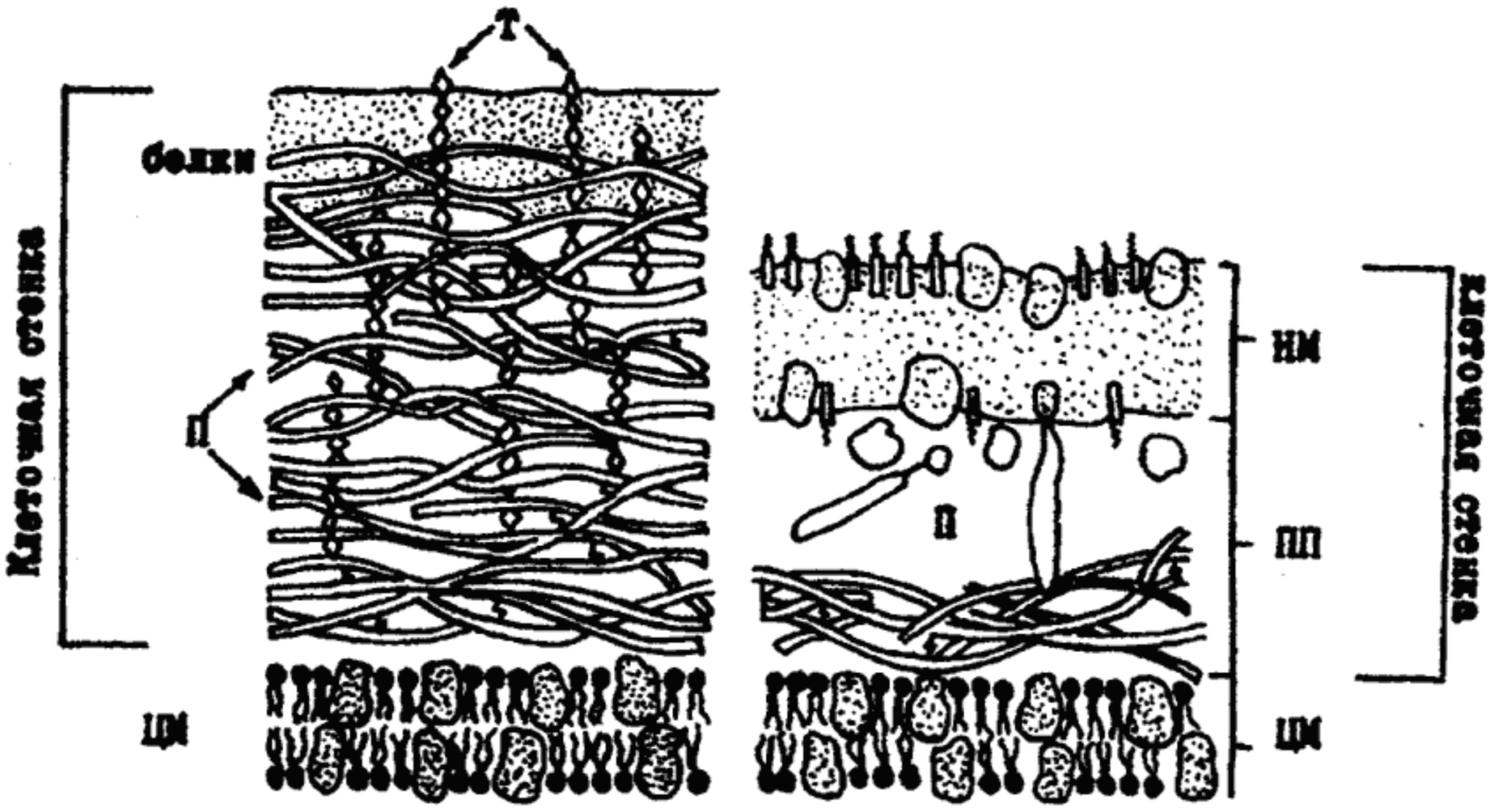


Рис. 3.13. Схематическое строение клеточной стенки грамположительных (а) и грамотрицательных (б) бактерий: *НМ - наружная мембрана; ПП - периплазматическое пространство; ЦМ - цитоплазматическая мембрана; П - пептидогликан; Т - тейхоевые кислоты*

Таким образом, структура клеточной стенки грамотрицательных бактерий намного сложнее, чем грамположительных. Структурные особенности и химический состав клеточных стенок лежат в основе механизма окрашиваемости бактерий по Граму.

---

[6] Да - дальтон, или единица атомной массы, равен 1,66033 x 10^{-27} кг.

Ответственность за окраску по Граму несут муреин и частично липиды, оказывающие влияние на проницаемость клеточной стенки. Обработка бактерий спиртом вызывает разбухание муреина и уменьшение диаметра пор клеточной стенки, что в целом приводит к снижению ее проницаемости. Так как грамположительные бактерии характеризуются высоким содержанием муреина, то в результате обработки спиртом стенки их становятся почти непроницаемыми для красителей и вымывание краски не происходит. У грамотрицательных слой муреина тонкий и не играет существенной роли в проницаемости стенки. Кроме того, проницаемость клеточной стенки у грамположительных бактерий увеличивается за счет растворения и вымывания липидов спиртом, содержание которых довольно высокое (до 22 %), и к тому же они хорошо растворяются в нейтральных органических растворителях. Все это способствует обесцвечиванию клетки. Доказательством того, что в окраске по Граму основную роль играет клеточная стенка, является тот факт, что при удалении ее с окрашенных клеток протопласты грамположительных бактерий при промывании спиртом обесцвечиваются, превращаясь в грамотрицательные. Следовательно, окрашенный комплекс удерживает клеточная стенка.

Клеточная стенка у грамотрицательных бактерий отделена от цитоплазматической мембраны электронно-прозрачным промежутком, получившим название периплазматического пространства, или периплазма. В нем содержатся кроме тонкого слоя муреина (2-3 нм) специфические белки, так называемые связывающие, или транспортные белки. Это водорастворимые белки, обладающие высоким сродством к определенным питательным субстратам - аминокислотам, сахарам, неорганическим ионам. Они являются составной частью систем активного транспорта, но самостоятельно осуществлять этот процесс они не могут и функционируют только в сочетании со специфическими пермеазами, локализованными в цитоплазматической мембране. Транспортные белки связывают соответствующие субстраты и переносят их от внешней мембраны к цитоплазматической. В периплазматическом пространстве содержится также ряд гидролитических ферментов - нуклеазы, щелочная и кислая фосфатазы, пенициллиназа. У грамположительных бактерий эти ферменты являются типичными экзоферментами, у

грамотрицательных выход их из клеток задерживается наружной мембраной, которая является барьером для белков и некоторых других соединений. Наличие в периплазме ферментов позволяет клетке использовать более широкий круг веществ, поступающих извне. Так как данные ферменты изолированы от цитоплазмы, то содержание их не угрожает содержимому клетки подвергнуться автолизу, или самопереварированию.

Важнейшие функции клеточной стенки заключаются в следующем. Она обеспечивает клетке определенное постоянство формы, защищает содержимое от ее внешних воздействий, определяет способность к адсорбции фагов, так как на ее поверхности расположены фагочувствительные рецепторы, играет важную роль и в реакции иммунитета. Установлено, что между фагоцитарной активностью лейкоцитов и поверхностной структурой бактериальных клеток существует определенная зависимость. Особенности структуры клеточной стенки определяют чувствительность бактерий к повреждающему действию сыворотки крови и форменных элементов.

Таким образом, клеточная стенка бактерий - сложная полифункциональная система, обладающая необходимыми реологическими свойствами (упругость, пластичность, прочность) и обеспечивающая анатомическую целостность клетки, геометрическую форму ее и контакт с внешней средой.

3.2.2. Протопласты и сферопласты

Клеточная стенка бактерий может быть удалена без существенных изменений метаболизма. Такие «голые» клетки в зависимости от степени удаления стенки получили название протопластов, или сферопластов. Протопласты представляют собой сферической формы структуры, у которых стенка удалена полностью. Сферопласты также имеют сферическую форму, но отличаются тем, что стенка у них частично сохраняется.

Протопласты обычно образуются из грамположительных бактерий, сферопласты - из грамотрицательных. Но не исключена возможность получения протопластов и из грамотрицательных бактерий. Для этого необходимо предварительное разрушение

наружной мембраны, что может быть достигнуто обработкой бактерий ЭДТА (этилендиаминтетроацетат), или другими агентами, растворяющими липополисахариды мембраны.

Различная степень удаления клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий в одних и тех же условиях является следствием различного химического состава и структурной организации их клеточных стенок.

Общим свойством протопластов и сферопластов является чрезвычайная чувствительность к осмотическому давлению среды. Они могут существовать только в гипертонических и изотонических растворах (0,1-1,0 М раствор сахарозы или хлористого натрия), в гипотонических растворах они подвергаются лизису.

В основе получения протопластов и сферопластов лежит воздействие на клеточную стенку веществами, блокирующими ее синтез или разрушающими пептидогликан (ригидный слой). К первым относятся антибиотики пенициллин, бацитрацин, ванкомицин, которые подавляют синтез пептидогликана; ко вторым - ферменты лизоцим, мутанолизин, лизостафин, оказывающие специфическое действие на гликозидные и пептидные связи пептидогликана.

Протопласты и сферопласты обладают способностью к реверсии в исходные бактериальные формы. Уровень зависит от физиологического состояния протопластирующих клеток. Наиболее эффективно ревертируют протопласты, полученные из бактерий, находящихся в ранней экспоненциальной фазе роста. Положительное влияние на реверсию протопластов оказывают добавление в регенерационную среду дрожжевого экстракта, сыворотки, аминокислот, входящих в состав клеточной стенки, а также замена агара желатиной в твердой среде.

Наблюдения в электронный микроскоп за реверсией протопластов Bac. licheniformis показало, что вначале происходит увеличение их размеров, затем следует образование рыхлой, потом более плотной клеточной стенки. Одновременно формируются поперечные связи в пептидогликане, что придает ригидность клеточной стенке. Ревертировавшие протопласты способны к делению.

Протопласты и сферопласты используются для изучения структуры и функций клеточных мембран, биохимических особенностей микроорганизмов, а также для изучения генетических свойств бактерий. Применение протопластов в генетических исследованиях основано на их способности к слиянию и рекомбинационному взаимодействию между геномами.

Процесс слияния протопластов с целью получения рекомбинантного потомства выгодно отличается по ряду особенностей от других способов генетического обмена: 1) отсутствие барьера нескрещиваемости; 2) возможность взаимодействия полных родительских геномов и цитоплазм; 3) двунаправленный перенос генетической информации, т. е. оба родителя в равной мере могут служить донорами генетического материала. При слиянии протопластов взаимодействуют не отдельные фрагменты хромосом донорной и реципиентной клеток, как это имеет место при трансформации, конъюгации и трансдукции, полные геномы обоих родительских клеток. В формировании рекомбинантного потомства роль их одинакова. Образующиеся в результате слияния протопластов рекомбинанты характеризуются значительным разнообразием и могут быть использованы для генетического анализа. В протопластах способны репродуцироваться фаги. Однако, это возможно лишь в тех случаях, когда бактерии инфицированы фагом до разрушения клеточной стенки, т. е. превращения в протопласты. В подходящей среде, в изо- или гипертонических растворах, протопласты и сферопласты проявляют метаболическую активность, могут увеличиваться в размерах, но утрачивают способность к размножению.

Протопласты разных видов бактерий - грамотрицательны и неподвижны несмотря на наличие жгутиков.

Тождественны протопластам природные *L-формы бактерий*, которые в силу разных причин утратили способность к синтезу пептидогликана и также не имеют клеточной стенки. Они имеют форму сферических и вакуолизированных тел от «гигантских» (2-8 мкм) до ультрамикроскопических (0,25 мкм) размеров. Отсутствие ригидной клеточной стенки позволяет им вытягиваться в тонкие нити, проходящие через бактериальные фильтры.

L-формы открыты в 1935 г. сотрудницей Листеровского института (Лондон) Е. Клинебергер-Нобель и в честь института получили свое название. Впервые они обнаружены в культуре бациллы Streptobacillus moniliformis, выделенной из уха крысы. Позже были описаны L-формы самых разнообразных видов бактерий: кишечной и дизентерийной палочки, протея, стрепто-кокков, азотобактера, актиномицетов и др. Эти формы возникают спонтанно и индуцированно под действием агентов, блокирующих синтез клеточной стенки. Такими агентами могут служить антибиотики, ферменты, химические вещества (хлористый литий, теллурит натрия). Например, добавление в среду пенициллина (100-200 ед/мл) препятствует синтезу клеточной стенки в растущих культурах протея, кишечной палочки. При удалении пенициллина или перенесении клеток на среду без него синтез клеточной стенки возобновляется. Однако встречаются и стабильные L-формы, не обладающие способностью к реверсии. В клетках некоторых стабильных L-форм компоненты пептидогликана полностью отсутствуют, у лабильных содержится мурамовая кислота, но в относительно низкой концентрации (10-15 % от содержания в нормальных клетках). Образование стабильных L-форм, возможно, имеет мутационную природу.

L-формы способны расти на плотных питательных средах и в культуре тканей. По характеру колоний и некоторым другим свойствам их разделяют на два типа: 3А и 3В. Тип 3А на агаризованных средах образует очень мелкие располагающиеся под поверхностью агара колонии, состоящие из гранул. Иногда такая колония прорастает на поверхность. Этот тип довольно стабилен и с трудом возвращается к исходной форме. Тип 3В образует на поверхности агара четко очерченные приподнятые колонии с темным ячеистым или зернистым центром, уплотненным вследствие роста колонии в толщу агара, L-формы типа 3В нестабильны. Они легко возвращаются к исходной форме бактерий.

Для роста этих организмов пригодны те же среды, что и для роста исходных бактерий. Однако стабильные L-формы лучше развиваются на средах, богатых питательными веществами и обладающих высокими осмотическими свойствами.

3.2.3. Цитоплазматическая мембрана и ее производные

Под клеточной стенкой бактерии расположена цитоплазматическая мембрана (ЦПМ). Она отделяет содержимое клетки от клеточной стенки и является обязательной структурой любой клетки.

Толщина ЦПМ бактерий обычно около 6-8 нм. На ее долю приходится до 15 % сухой массы клетки. Она состоит из липидов (15-45 %), белков (45-60 %) и небольшого количества углеводов (около 10 %). Липиды представлены фосфолипидами - до 30 % сухой массы мембраны. Среди них преобладают фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерид (кардиолипин) - обязательный компонент митохондриальных мембран эукариот. В меньшем количестве содержатся фосфатидилинозит и фосфатидилэтаноламин. Кроме фосфолипидов в мембране обнаружены различные гликолипиды, небольшие количества каротиноидов и хинонов. В составе липидов, производных глицерина, выявлены нетипичные для мембран жирные кислоты - насыщенные или мононенасыщенные с 16 - 18 углеродными атомами, а также кислоты, не встречающиеся в мембранах эукариот - циклопропановые и разветвленные жирные кислоты с 15-17 углеродными атомами. Набор жирных кислот, как и состоящих из них липидов мембран, является видоспецифичным для прокариот.

Мембранные липиды представлены небольшими полярными молекулами, несущими гидрофильные (головки) и гидрофобные (хвосты) группы. В водной среде они спонтанно образуют замкнутый бимолекулярный слой - бислой. Этот слой служит существенным барьером для ионов и полярных соединений. Организованные в бимолекулярный слой липиды составляют структурную основу мембраны, поддерживают механическую стабильность и придают ей гидрофобность.

Белки составляют больше половины сухой массы мембраны. Их насчитывается более 20 различных типов. Исходя из различий в прочности связи с липидами и расположением в мембране, белки подразделяют на интегральные и периферические. Интегральные белки погружены в гидрофобную область мембраны, где образуют многочисленные связи с углеводородными цепями липидов,

создавая липопротеидные комплексы. Периферические белки локализованы на поверхности гидрофильного слоя и часто присоединяются к интегральным белкам (рис. 3.14).

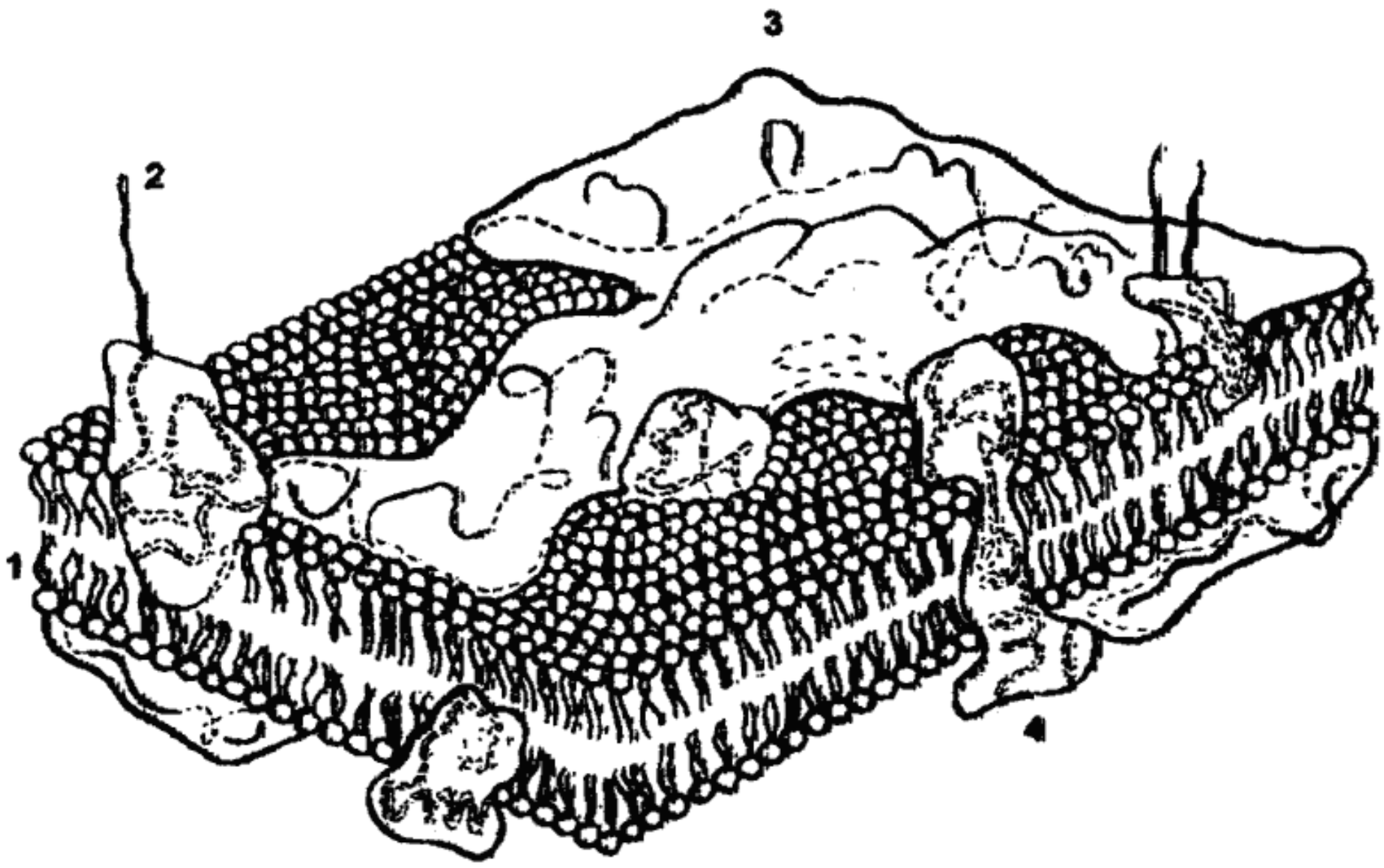


Рис.3.14. Структура цитоплазматической мембраны: *1 - липиды; 2 - гликопротеиды; 3 - периферические белки; 4 - интегральные белки*

Мембранные белки по их функциям в составе мембран можно разделить на две группы: структурные и динамические.

Функции структурных белков ограничиваются поддержанием структурной целостности мембраны. Они располагаются на поверхности гидрофильного липидного слоя, выступая в роли молекулярного бандажа.

К динамическим относят белки, которые непосредственно участвуют во всех процессах, происходящих на мембране. Их разделяют на три класса: транспортные, участвующие в транспорте соединений внутрь и наружу клетки; каталитические, выполняющие функции ферментов в реакциях, происходящих на мембране; белки-рецепторы, специфически связывающие определенные соединения (токсины, гормоны) на наружной стороне мембраны.

Углеводы в мембране находятся не в свободном состоянии, а взаимосвязаны с белками и липидами в гликопротеиды. Они, как

правило, локализованы только на наружной поверхности мембраны и выполняют функции рецепторов узнавания факторов внешней среды.

Цитоплазматическая мембрана бактерий, как и все другие биологические мембраны, является асимметричной жидкокристаллической структурой. Асимметрия обусловлена различиями в химическом строении молекул белка и их расположении в липидном бислое мембраны. Одни белки расположены на поверхности бислоя, другие - погружены в его толщу, третьи проходят насквозь от внутренней до внешней поверхности бислоя. Строго определенная ориентация мембранных белков в свою очередь обусловлена тем, что они синтезируются и включаются в мембрану асимметрично. Наружная и внутренняя поверхности мембраны различаются также по ферментативной активности. В зависимости от условий (например, температуры) ЦПМ может находиться в различных фазовых состояниях: разжиженном или кристаллическом. При переходе одной жидкокристаллической фазы в другую изменяется подвижность компонентов мембраны и плотность ее упаковки, что, в свою очередь, приводит к нарушению ее функциональной активности.

Структурная организация и функции цитоплазматической мембраны. Для объяснения природы и механизма многочисленных функций ЦПМ наиболее подходящей является жидкостно-мозаичная модель организации биологических мембран, предложенная Р. Сингером и А. Николсоном в 1972 г. Согласно данной модели, мембраны представляют собой двумерные растворы определенным образом ориентированных глобулярных белков и липидов. Липиды образуют бислой, в котором гидрофильные «головки» молекул обращены наружу, а гидрофобные «хвосты» погружены в толщу мембраны, обладая при этом достаточной гибкостью. Мембранные липиды и многие белки свободно перемещаются в бислое, но только в латеральном направлении (латеральная диффузия). В поперечном направлении, т. е. от одной поверхности мембраны к противоположной, белки перемещаться не могут, а липиды перемещаются крайне медленно (1 раз за несколько часов). Причиной отсутствия или низкой активности поперечной диффузии, по-видимому, является асимметричное распределение липидов:

одних липидов больше в наружной части бислоя, других - во внутренней. Следствием этого является неодинаковая электронная плотность (проводимость) бислоя в поперечном направлении.

В жидкокристаллическом или разжиженном состоянии ЦПМ находится только при определенных, так называемых биологических температурах. При понижении температуры (ниже точки плавления, Тпл) липиды переходят в кристаллическое состояние, повышается степень вязкости вплоть до затвердевания мембраны. Значение температуры, вызывающей затвердевание мембраны, определяется содержанием ненасыщенных и разветвленных жирных кислот. Чем больше их в мембране, тем ниже температура перехода липидов из жидкокристаллического состояния в кристаллическое.

Прокариоты обладают способностью регулировать текучесть мембраны путем изменения числа двойных связей и длины цепей молекул жирных кислот. Так, у E. coli при понижении температуры среды от 42^0 С до 27^0 С соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в мембране снижается с 1,6 до 1,0, т. е. содержание ненасыщенных жирных кислот достигает уровня насыщенных. Это предотвращает увеличение вязкости и обеспечивает сохранение клетками физиологической активности при пониженной температуре.

ЦПМ выполняет у прокариот многочисленные жизненно важные функции. В основном они определяются локализованными в ней белками, которые выполняют роль каналов, рецепторов, регенераторов энергии, ферментов, транспортные функции и другие. ЦПМ является основным осмотическим барьером, который, благодаря наличию механизмов мембранного транспорта, осуществляет избирательное поступление веществ в клетку и удаление из нее продуктов метаболизма. Избирательная проницаемость ЦПМ обусловлена локализованными в ней субстратспецифическими пермеазами, осуществляющими активный перенос через мембрану различных органических и минеральных веществ. В ЦПМ содержатся ферменты биосинтеза мембранных липидов и макромолекул, входящих в состав клеточной стенки, наружной мембраны, капсулы. ЦПМ является местом локализации окислительно-восстановительных ферментов, осуществляющих

транспорт электронов, окислительное и фотосинтетическое фосфорилирование, генерирование электрохимической энергии трансмембранного потенциала ($\Delta\overline{\mu}_{н^+}$) и химической (АТФ). ЦПМ выполняет важные функции в биосинтезе и транслокации секретируемых белков грамотрицательными бактериями. Биосинтез данных белков осуществляется на рибосомах, прикрепленных к ЦПМ. У грамотрицательных бактерий на ЦПМ имеются специальные рецепторные белки, «узнающие» сигналы из большой рибосомной субчастицы о прикреплении рибосомы и начале синтеза белка. Мембранные рецепторные белки взаимодействуют с большой субъединицей рибосомы, образуется рибосомомембранный комплекс, на котором осуществляется синтезсекретируемых белков. Таким путем, например, E. coli синтезирует щелочную фосфотазу, Bac. subtilis - α-амилазу. ЦПМ обеспечивает также перенос данных белков в периплазматическое пространство. Велика роль ЦПМ в регуляции клеточного деления, репликации хромосомы и плазмид и последующей сегрегации этих генетических элементов между вновь образующимися дочерними клетками.

Все прокариоты наряду с цитоплазматической мембраной содержат ее производные - внутриклеточные мембраны, которые выполняют специализированные функции. Цитоплазматическая мембрана способна к образованию всевозможных инвагинаций (впячиваний). Эти инвагинации составляют внутриклеточные мембраны, которые имеют различную протяженность, упаковку и локализацию в цитоплазме. Они могут быть собраны в сложные клубки - пластинчатые, сотовидные или трубчатые образования. Менее сложные мембраны имеют вид простых петель или канальцев различной протяженности. Независимо от сложности организации внутриклеточных мембран, все они являются производными цитоплазматической мембраны. Величина активной поверхности их превышает таковую цитоплазматической мембраны. Это дает основание судить о большой функциональной активности данных структур в клетках.

Особенно богатый внутриклеточный мембранный аппарат обнаружен у азотфиксирующих и фотосинтезирующих бактерий, бруцелл, нитрифицирующих бактерий. У фотосинтезирующих бактерий (Rhodospirillum rubrum) мембраны имеют вид замкнутых пузырьков - везикул. Их образование начинается с впячивания цитоплазматической мембраны, которое затем образует трубочку. На трубочке появляются перетяжки, разделяющие ее на ряд пузырьков. Эти пузырьки называют хроматофорами. В них содержатся поглощающие свет пигменты - бактериохлорофиллы и каротиноиды, ферменты транспорта электронов - убихиноны и цитохромы, компоненты системы фосфорилирования. У некоторых фотосинтезирующих прокариот, в частности у пурпурных серобактерий и цианобактерий, фотосинтезирующий аппарат представлен стопками мембран, которые имеют уплощенную форму и по аналогии с гранами хлоропластов зеленых растений называются тилакоидами (рис. 3.15). В них концентрируются пигменты фотосинтеза, ферменты электрон-транспортной цепи и системы фосфорилирования. Особенностью тилакоидов цианобактерий является отсутствие связи с цитоплазматической мембраной. Это единственная группа прокариот, имеющая дифференцированную мембранную систему.

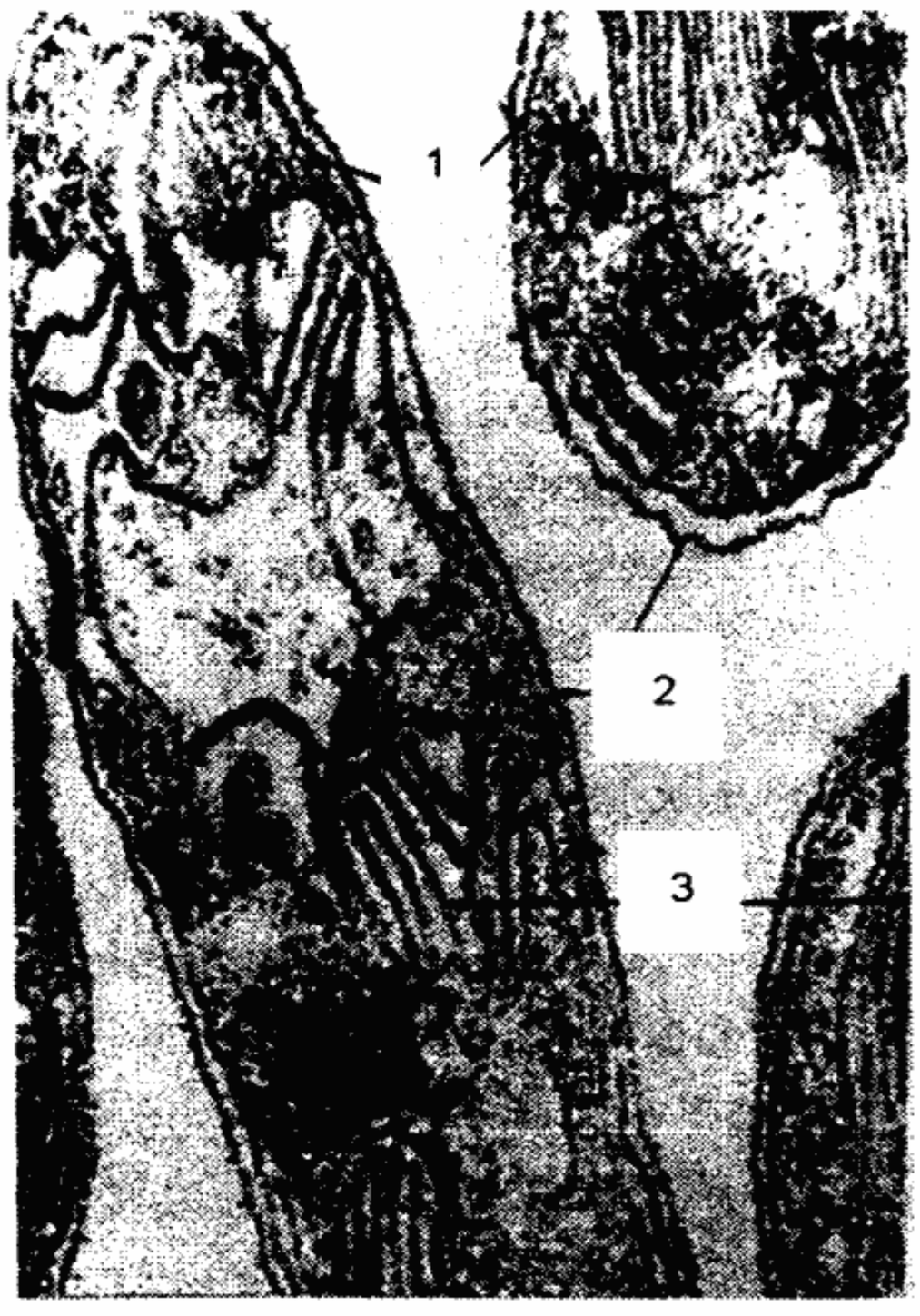


Рис.3.15.Строение фотосинтезирующих серобактерий (увеличение × 60 000): *1 - цитоплазматическая мембрана; 2 - клеточная стенка; 3 - фотосинтетические мембранные структуры (ламеллярный тип)*

У нитрифицирующих бактерий внутриклеточный мембранный аппарат имеет вид пластинок, или ламелл, состоящих из плоских пузырьков (рис. 3.16). Из внутриклеточных мембран наиболее сложную структуру имеют мезосомы. Они представляют собой спиралевиднозакрученные, плоские или сферически трубчатые тельца. Формируются мезосомы в период клеточного деления в зоне образования поперечной перегородки. Они принимают участие в репликации хромосомы и распределении геномов между дочерними клетками, в синтезе веществ клеточной стенки. На участие мезосомы в делении клетки указывает связь ее с ДНК нуклеоида. Хорошо развитые мезосомы обнаруживаются только у грам-положительных бактерий.

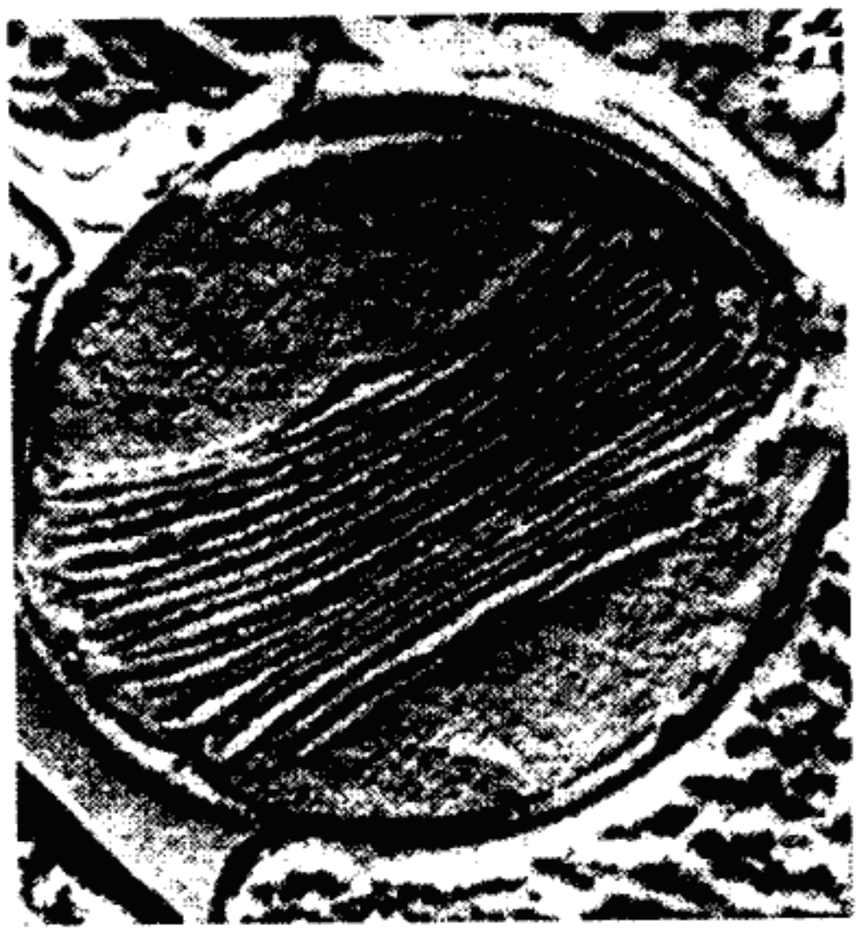


Рис. 3.16. Мембранный аппарат Nitrosocystis × 22 500

Накопленные к настоящему времени сведения говорят о том, что мембранные структуры бактерий достаточно дифференцированы и обеспечивают ход различных метаболических процессов в клетке.

3.2.4. Цитоплазма и цитоплазматические включения

Цитоплазма - полужидкая коллоидная масса, состоящая на 70-80 % из воды и заполняющая внутреннюю полость клетки.

В цитоплазме различают две фракции. В одной из них представлены структурные элементы: рибосомы, аэросомы, карбоксисомы, запасные включения, генетический аппарат. В другой фракции содержится сложная смесь растворимых РНК, ферментных белков, пигментов, минеральных веществ, продуктов и субстратов метаболических реакций. Эта фракция получила название цитозоля.

Благодаря наличию разнообразных органических соединений цитоплазма бактериальных клеток характеризуется повышенной вязкостью. Она в 800-8000 раз больше вязкости воды (приближается к вязкости глицерина). Молодые клетки, находящиеся в лаг-фазе или на начальных этапах логарифмической фазы, имеют более низкую вязкость цитоплазмы; у стареющих - вязкость повышается, напоминая по консистенции гель. Степень вязкости цитоплазмы характеризует не только возраст клетки, но и ее физиологическую активность. Повышение вязкости цитоплазмы у старых культур является одним из факторов, обусловливающих снижение физиологической активности клеток. Цитоплазма является средой, связывающей все внутриклеточные структуры в единую систему.

Рибосомы. В цитоплазме бактериальной клетки постоянно содержатся структуры сферической формы, размером 15-20 нм, молекулярной массой $3 \cdot 10^6$.

Рибосомы состоят на 60-65 % из рибосомальной РНК и на 35-40 % из белка. Последние богаты основными аминокислотами. При ультрацентрифугировании рибосомы бактерий оседают со скоростью, составляющей около 70 единиц Сведберга (S)[7], за что получили название 70S-рибосом. Цитоплазматические рибосомы эукариот крупнее и их называют 80S-рибосомами (константа седиментации их равна 80S).

Каждая рибосома состоит из двух субъединиц: 30S и 50S, которые различаются размерами молекул РНК и количеством входящего в их состав белка. Большая субъединица (50S) содержит две молекулы рРНК - 5S и 23S и 35 молекул различных белков. В состав малой субъединицы (30S) входит одна молекула 16 рРНК и 21 молекула разного типа белков. Количество рибосом в клетке непостоянно - от 5000 до 90000. Оно определяется возрастом клетки и условиями культивирования бактерий. Минимальное количество содержится в начале лаг-фазы, а максимальное - в экспоненциальной фазе роста культуры. У кишечной палочки в период активного роста на полноценной питательной среде за 1 с синтезируется 5-6 рибосом. Большая часть их в цитоплазме бактерий находится в свободном состоянии, а остальная -

[7] S = 1 сведберг-единице = 10^{-13} см (с) ед. поля.

объединена нитями матричной РНК в полисомы. Количество рибосом в полисомах может достигать нескольких десятков. Это свидетельствует о высокой белоксинтезирующей активности клетки, так как рибосомы являются местом белкового синтеза. Их образно называют «фабриками» белка.

Газовые вакуоли (аэросомы). Данные структуры присущи только некоторым водным и почвенным бактериям. Они обнаружены у фототрофных серобактерий, бесцветных нитчатых бактерий, а также у бактерий рода Renobacter. В клетке их содержится до 40-60 (рис. 3.17). Газовые вакуоли окружены тонкой



Рис. 3.17. Клетка Renobacter vocuolatum с аэросомами (увеличение × 70 000)

белковой мембраной. Внутри их содержатся газовые пузырьки, число которых непостоянно. Состав и давление газа в пузырьках и аэросомах в целом определяются количеством газов, растворенных в окружающей среде. Аэросомы находятся либо в сжатом состоянии, либо заполнены газом среды. Состояние их регулируется гидростатическим давлением среды. Резкое увеличение давления вызывает сжатие аэросом и клетки при этом утрачивают плавучесть.

Аэросомы регулируют плавучесть клетки, обеспечивая возможность перемещения ее в благоприятные условия аэрации, освещения, содержания питательных веществ. Особенностью является их одноразовое функционирование в состоянии заполненности газом. После сжатия под действием гидростатического давления повторно газом они не заполняются и

постепенно разрушаются. Клетка может воспроизводить их только путем образования заново.

При заполненных газом аэросомах бактерии удерживаются на поверхности воды, при сжатых - погружаются в ее толщу либо оседают на дно водоема. Этот своеобразный способ перемещения выработался в процессе эволюции в основном у бактерий, лишенных жгутиков, а следовательно, и способности к активному передвижению.

Фикобилисомы. Эти внутриклеточные структуры характерны для цианобактерий. Они имеют вид гранул диаметром 28-55 нм, являются местом локализации водорастворимых пигментов - фикобилипротеидов, которые определяю цвет цианобактерий и участвуют в фотосинтезе.

Хлоросомы, или хлоробиум-везикулы - структуры, в которых локализован фотосинтезирующий аппарат зеленых бактерий рода Chlorobium. Они имеют вытянутую форму, длиной 100-150 нм, шириной 50-70 нм, окружены однослойной белковой мембраной. Хлоросомы расположены плотным слоем под цитоплазматической мембраной, но физически отделены от нее. В хлоросомах зеленых бактерий содержатся пигменты фотосинтеза - бактериохлорофиллы, которые поглощают кванты света и энергию передают в реакционные центры фотосинтеза.

Карбоксисомы. В клетках отдельных видов фототрофных (цианобактерии, некоторые пурпурные бактерии) и хемолитотрофных (нитрифицирующие бактерии) прокариот содержатся структуры, имеющие форму многогранника, размером 90-500 нм. В соответствии с выполняемой функцией они получили название карбоксисомы. В них содержится фермент рибулозо-дифосфаткарбоксилаза, который катализирует реакцию связывания углекислоты с рибулозодифосфатом в цикле Кальвина. У авто-трофных бактерий они являются местом фиксации двуокиси углерода. Карбоксисомы окружены однослойной белковой мембра-ной, которая предохраняет фермент от воздействия внутрикле-точных протеаз.

Запасные питательные вещества. Кроме описанных структурных элементов, в цитоплазме бактерий содержатся в виде включений гранулы различной формы о размеров. Присутствие их в

клетке непостоянно и связано с составом питательной среды и физиологическим состоянием культуры. Многие цитоплазматические включения состоят из соединений, которые служат источником энергии и источником элементов питания. Они образуются обычно в культурах на свежих, богатых питательными веществами средах, когда рост клеток в силу каких-то причин заторможен, или после окончания периода активного роста. Химический состав включений различен и неодинаков у разных видов бактерий. Ими могут быть *полисахариды, липиды, кристаллы и гранулы неорганических веществ.*

Из полисахаридов следует прежде всего назвать *крахмал, гликоген и крахмалоподобное вещество - гранулезу.* Наиболее распространенным является гликоген. Он обнаружен у бацилл, сальмонелл, кишечной палочки, сарцин и др. У споровых анаэробов рода Clostridium клетки содержат мелкие гранулы гранулезы. Данные включения используются клеткой как источники энергии и углерода.

Липиды накапливаются в цитоплазме бактерий в виде мелких капель и зерен. У многих бактерий липидные включения представлены поли-β-оксимасляной кислотой, на долю которой часто приходится до 50 % сухой биомассы бактерий. Особенно богаты данным соединением бактерии рода Bacillus и фототрофные бактерии. Поли-β-оксимасляная кислота синтезируется в больших количествах при росте микроорганизмов на средах, богатых углеводами. В каждой цепи полилактида на долю остатков β-оксимасляной кислоты приходится до 60 %, в связи с чем для бактерий это соединение является идеальной «кладовой» энергии. У некоторых микроорганизмов накапливаются воска и нейтральные жиры (триглицериды). Так, у микобактерий и актиномицетов воска иногда составляют до 40 % сухой массы, нейтральными жирами богаты клетки дрожжей рода Candida, Rhodotorula, количество их достигает почти 60 %.

Все липидные включения у микроорганизмов служат источником энергии и углерода.

В клетках многих бактерий часто обнаруживаются особые включения, названные *зернами волютина*. По химической природе волютин представляет собой полифосфат. Название волютин

происходит от видового названия серобактерий Spirillum volutans, у которых впервые были описаны эти включения. Волютин обладает свойством метахромазии, т.е. вызывает изменение цвета некоторых красителей. Если бактерии окрасить метиленовым синим или толуидиновым синим, то зерна волютина приобретают пурпурный или красно-фиолетовый цвет. В связи с этим исследователи В. Бабеш и Е. Эрнст, впервые описавшие данные включения, назвали их метахроматическими зернами. Зерна волютина имеют сферическую форму, размером до 0,5 мкм. Они образуются в условиях хорошего питания микроорганизмов, особенно на средах, богатых углеводами, а также при наличии в среде глицерина. Обнаруживается волютин в клетках как патогенных, так и сапрофитных бактерий, например, у спирилл, азотобактера, возбудителя дифтерии.

Волютин используется клеткой в основном как источник фосфатных групп и частично энергии.

У бесцветных и пурпурных серобактерий при окислении сульфидов внутри клетки в виде капель откладывается минеральная *сера*. Накопление серы происходит на средах, богатых сероводородом H_2S. При исчерпании сульфидов из среды бактерии используют внутриклеточную серу. Для бесцветных серобактерий она служит источником энергии, для фотосинтезирующих пурпурных серобактерий - донором электронов.

У цианобактерий запасным веществом является цианофицин. Это полипептид, состоящий из аргинина и аспарагиновой кислоты. Он служит источником азота при недостатке его в среде. Накопление гранул цианофицина происходит в стационарной фазе роста культуры и может составлять до 8 % сухой массы клетки.

3.2.5. Нуклеоид

Первые сведения о ядре бактерий как вполне организованной структуре были получены в 1897 г. благодаря работам М. Мейера. Однако малые размеры бактериальной клетки и высокое содержание РНК, которая окрашивается ядерными красками так же, как и ДНК, затрудняли четкое выявление ядерных структур. Поэтому вопрос относительно наличия ядра у бактерий, его морфологической

структуры и физиологических функций решался в течение многих десятилетий. Не вызывало сомнения наличие у бактерий наследственного аппарата. Это подтверждалось тем, что клетки одного вида бактерий при размножении производят потомство с аналогичными свойствами, т. е. дают культуру исходного вида. Вопрос о ядре у бактерий и его структуре получил окончательное решение только с развитием электронно-микроскопических и генетических исследований. Сейчас установлено, что бактерии имеют структуры, состоящие из ДНК, функционально тождественные ядрам клеток высших организмов. По аналогии они называются бактериальными ядрами или нуклеоидами.

Химическая природа и организация ядерного материала бактерий были установлены австралийским ученым Ж. Кейрнсом в 1963 г. с помощью радиоавтографического метода. Он вносил в питательную среду меченный тритием H^3-тимидин (предшественник тимина) и выращивал на этой среде E. coli. Затем из клеток бактерий экстрагировалась ДНК, которая помещалась на фотографическую пленку. После соответствующей экспозиции на пленке получался радиоавтограф. Радиоавтография (результат содержания меченого тимина) подтверждала, что исследуемое вещество является дезоксирибонуклеиновой кислотой, ибо ДНК - единственное вещество в клетке, содержащее тимин.

На радиоавтографе (рис. 3.18) видно, что ДНК E. coli имеет нитевидную, замкнутую в кольцо структуру, которая реплицируется как единое целое. Кернс зафиксировал последовательные стадии репликации кольцевой ДНК, показав, что обе комплементар-



Рис. 3.18. Радиоавтография кольцевой хромосомы E. coli в процессе репликации

ные нити ДНК удваиваются в точке репликации одновременно.

Длина молекулы ДНК E. coli составляет 1-1,4 мм. По своим генетическим функциям она тождественна хромосоме.

Таким образом, нуклеоид прокариот представляет собой кольцевую хромосому, которая является гигантской молекулой ДНК с молекулярной массой 1,4-3 × 10^9 Да. Несмотря на свои относительно крупные размеры бактериальная хромосома - высокоупорядоченная компактная структура. Компактность обеспечивается образованием множества (20-100) суперскрученных петель, которые располагаются в различных областях хромосомы. Бактериальная хромосома взаимодействует в клетке с белками полиамина (спермином и спермидином), которые выполняют функцию, аналогичную гистонам прокариот - нейтрализуют отрицательные заряды ДНК, обусловленные ее химической структурой, а именно, наличием в фосфатных остатках ионизированных гидроксильных групп. Нуклеоид бактерий отличается от ядра эукариотических клеток отсутствием ядерной мембраны, ядрышка и митотического способа деления. Он находится в непосредственном контакте с цитоплазмой клетки.

Репликация ДНК. Одной из функций бактериальной ДНК является репликация (самоудвоение), или воспроизведение себе подобной структуры. Для двухцепочечных кольцевых ДНК характерна двунаправленная репликация. В общих чертах этот процесс можно представить следующим образом. На ДНК (хромосоме) имеются фиксированные точки - локусы, определяющие начало и конец репликации. Эти точки обозначаются буквами «О» (от origin - начало) и «Т» (termination - окончание) соответственно. Репликация всегда предшествует делению клетки. Хромосома одним или несколькими участками прикрепляется к цитоплазматической мембране. Инициация репликации происходит в точке «Ц» и выражается в появлении репликационных вилок. Цепи ДНК постепенно раскручиваются и каждая из них служит матрицей для образования второй комплементарной цепи. Репликационные вилки продвигаются в противоположных направлениях: одна движется по часовой стрелке, другая - против. По мере их продвижения синтезируются комплементарные цепи ДНК. Обе вилки встречаются в точке окончания репликации («Т»),

которая расположена диаметрально противоположно точке «О» - началу репликации. Репликация заканчивается образованием двух одинаковых молекул ДНК, или двух генетически равнозначных хромосом, несущих одинаковую генетическую информацию, тождественную материнской хромосоме (рис. 3.19). Это обеспечивается благодаря полуконсервативному механизму репликации, при котором каждая из образовавшихся молекул ДНК содержит одну родительскую цепь и одну вновь синтезированную.

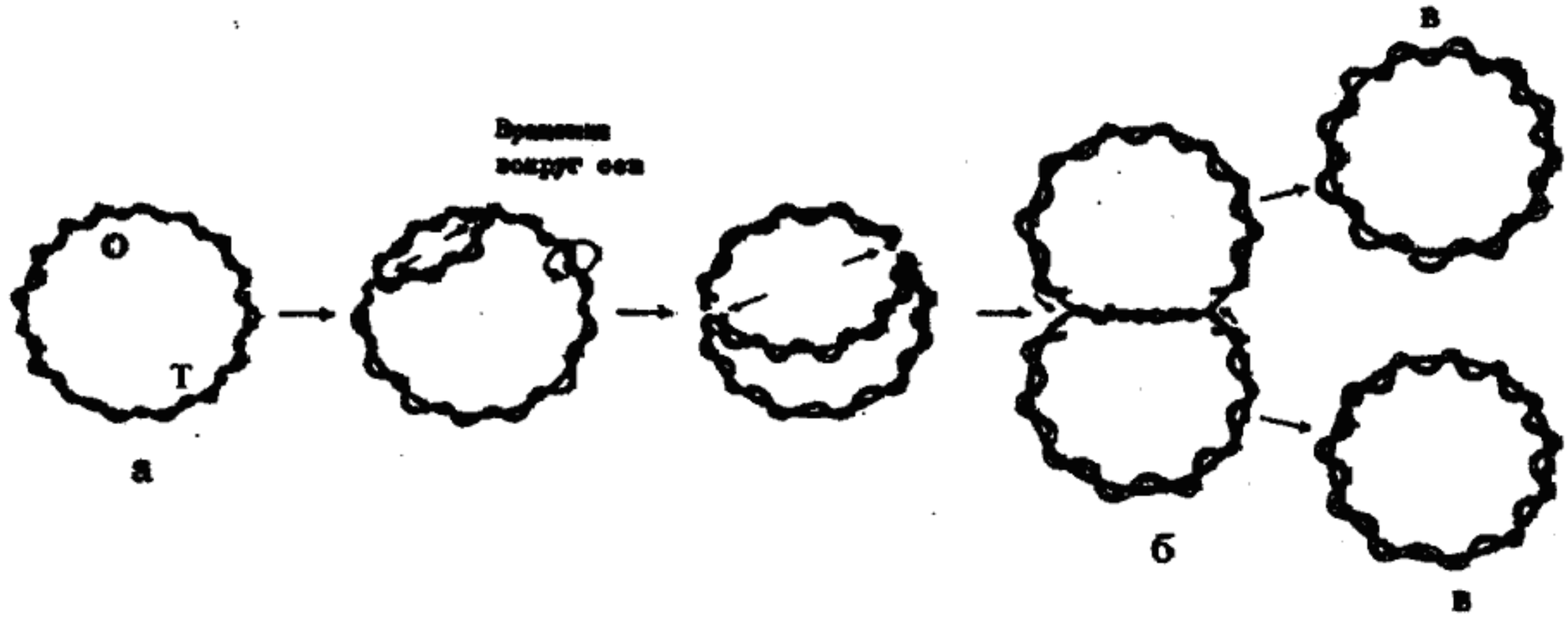


Рис.3.19. Схема двунаправленной репликации ДНК: *а - родительская молекула; б - промежуточные репликативные формы; в - дочерние молекулы; О - точка начала репликации; Т - точка окончания репликации*

Репликация ДНК - сложный процесс. В нем принимает участие много разных белков, в том числе и ферментов. Они обеспечивают узнавание точки начала репликации, раскручивание двойной цепи - дуплекса, стабилизацию одиночных цепей, образование затравочной цепи РНК (праймера) для инициации активности ДНК-полимеразы, сборку интактных цепей, узнавание участка терминации, суперскручивание двух новых дуплексов ДНК и образование нативной конформации.

Ведущую роль в репликации ДНК играет ДНК-полимераза. Она связывает между собой нуклеотиды в полинуклеотидную цепь. Причем, связывает только по направлению от 5′ к 3′-концу. Но так как ДНК состоит из цепей противоположной полярности (5′ ⟶ 3′ и 3′ ⟶ 5′), то синтез одной цепи (5′ ⟶ 3′) может происходить

непрерывно в направлении продвигающейся репликационной вилки, а синтез второй, противоположной цепи (3′ ⟶ 5′) должен идти в обратном направлении. Но ДНК-полимераза неспособна инициировать синтез новой цепи ДНК. Для этого ей необходимо наличие «затравки» - полинуклеотидной цепи со свободным 3-ОН концом. Поэтому синтез ДНК начинается с образования короткого отрезка РНК (10-60 пар оснований), служащего «затравкой», или праймером. Этот процесс обеспечивает фермент ДНК-праймаза, который копирует часть матричной цепи ДНК. Затем ДНК-полимераза присоединяет свободные нуклеотиды к 3-ОН концу «затравки», образуя короткие отрезки ДНК, так называемые фрагменты Оказаки длиной в 1000-2000 нуклеотидов. По окончании образования всех фрагментов праймер удаляется экзонуклеазой, разрывы между фрагментами застраиваются ДНК-полимеразой в соответствии с матричными участками ДНК. Фрагменты Оказаки сшиваются лигазой, т. е. последовательно соединяются фосфодиэфирными связями. В результате образуются две идентичные двухцепочечные молекулы ДНК (рис. 3.20).

Известны и иные механизмы репликации. Так, удвоение кольцевой ДНК многих вирусов, некоторых фагов и плазмид осуществляется по механизму катящегося кольца. Репликация ДНК у бактерий при конъюгации также происходит аналогичным образом. Это однонаправленный процесс, осуществляющийся следующим образом. В одной из цепей ДНК образуется разрыв и синтез новой цепи начинается с 3′-конца этой разорванной родительской цепи с использованием второй в качестве матрицы. Это приводит к вытеснению 5′-конца разорванной цепи, которая впоследствии служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи.

Репликация ДНК тесно связана с делением клетки. Расхождение образовавшихся хромосом осуществляется в результате роста клеточной мембраны между точками прикрепления хромосом.

Бактериальный нуклеоид, так же как и ядро клеток растений и животных, является носителем наследственной информации, регулирует направленность белкового синтеза, специфичность белков, и, кроме того, обеспечивает функционирование всех внутриклеточных процессов.

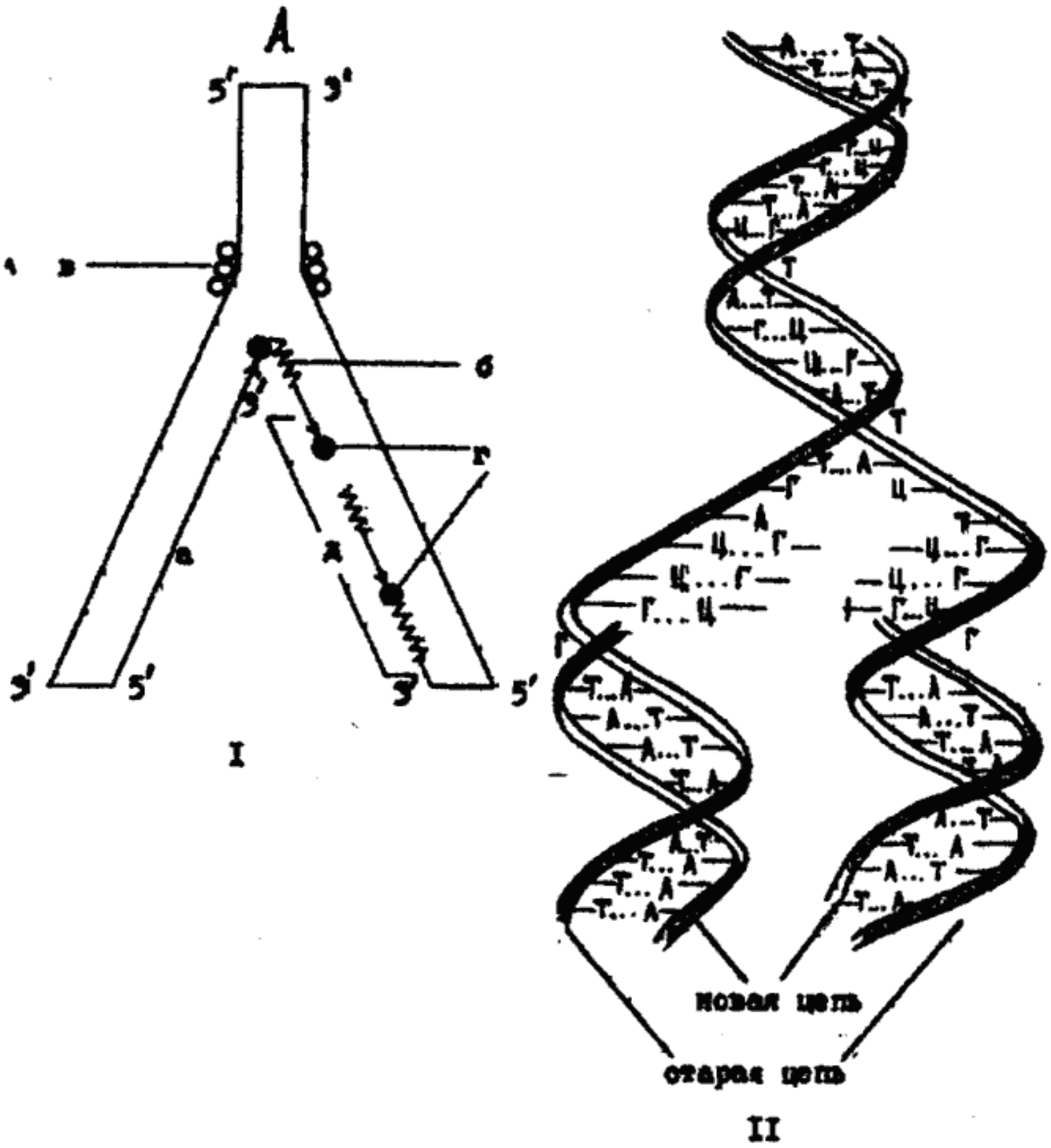


Рис. 3.20. Механизм репликации двуцепочечной ДНК:
I - репликативная вилка; II - полуконсервативный характер репликации; А - старая цепь; а - вновь синтезированная цепь, б - РНК-затравка, в - расплетающие белки, г - ДНК-полимераза, д - фрагменты Оказаки

3.2.6. Капсула и слизистые слои

Некоторые бактерии имеют структуры, которые не являются жизненно необходимыми для клетки. Их можно удалить механическим или ферментативным способом: не нарушая при этом жизнеспособности клетки. К таким структурам относится капсула и слизистые слои, покрывающие клеточную стенку снаружи.

Капсула по консистенции представляет собой желеобразный слизистый слой (рис. 3.21). Колонии капсульных бактерий на

плотных средах отличаются особым блеском и тягучестью; в жидких средах образуют зооглейные скопления. Хорошо выражена капсула у бактерий родов Azotobacter, Leuconostoc; из патогенных форм - Streptococcus, Klebsiella; возбудителя сибирской язвы - Bac. anthracis и др. Капсулообразование не служит видовым признаком. У одного и того же вида бактерий бывают капсульные и бескапсульные штаммы. Капсульные штаммы могут мутировать в бескапсульные. Тогда на агаре вместо гладких S-колоний (от англ. smooth - гладкий) появляются шероховатые R-колонии (от англ. rough - шероховатый). Благоприятное влияние на образование капсулы оказывает наличие в среде углеводов; возбудители пневмонии и сибирской язвы образуют обильные капсулы, находясь в организме человека или животного.

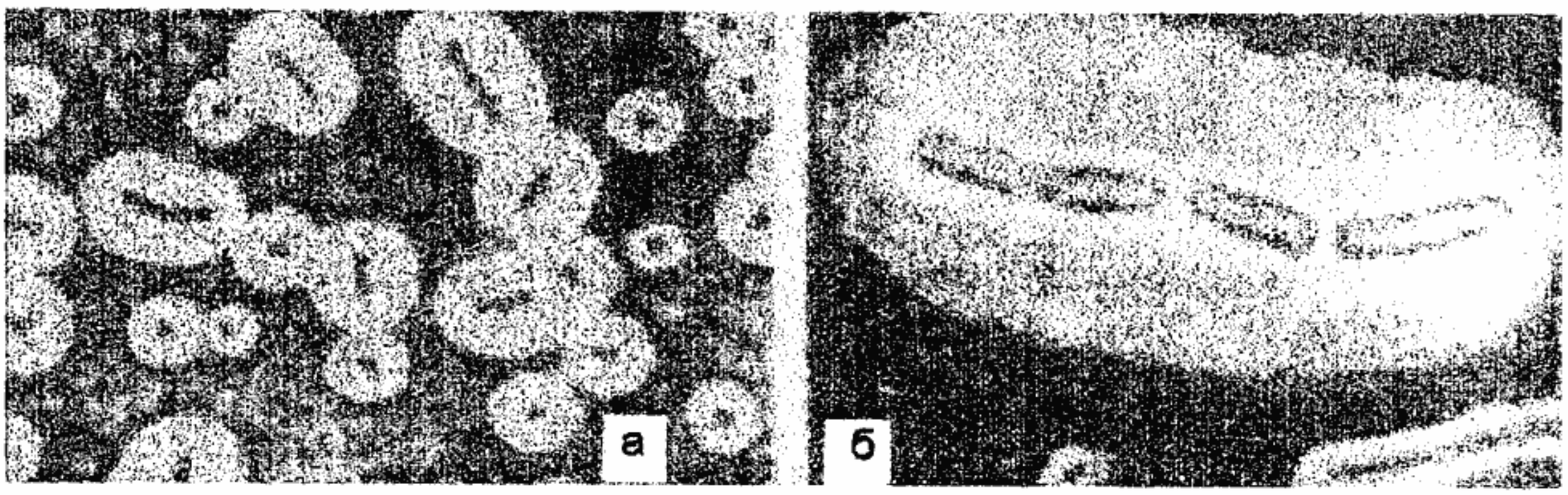


Рис.3.21. Бактериальные капсулы:
а - кокки; б - бациллы

В зависимости от толщины и консистенции капсульного слоя различают микрокапсулу, макрокапсулу и слизистый слой. Микрокапсула имеет толщину менее 0,2 мкм, прилегает непосредственно к клеточной стенке и некоторыми исследователями рассматривается как часть ее. Далее за микрокапсулой следует макрокапсула толщиной около 0,2 мкм. При негативной окраске бактерий (смешивании с китайской тушью) она хорошо видна в световой микроскоп (светлая на темном фоне). Макрокапсула характеризуется специфической внешней структурой. Поверх макрокапсулы концентрируется слизистый слой. Связь с капсулой у него непрочная. Об этом свидетельствует обнаружение в

культуральной жидкости материала, из которого состоит слизистый слой.

В образовании капсулы принимает участие клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана.

Химический состав капсул неодинаков у разных микроорганизмов. Долгое время считали, что они состоят только из полисахаридов. В 1920 г. К. Тениссен впервые выделил капсульное вещество и определил его как полисахарид галактан (производное галактозы). Кроме галактана, в капсулах бактерий были обнаружены декстран, леван, целлюлан. Позже О. Эвери и К. Тениссен, исследуя капсулы пневмококков и сибиреязвенных бацилл, обнаружили, кроме полисахаридов, полипептиды, построенные из D и L-форм глютаминовой кислоты. Вместе с полисахаридами капсулы образуют белково-полисахаридный комплекс. Этот комплекс является главным органическим компонентом капсул определенных видов бацилл. Наличие белка обнаружено также в капсулах стрептококков. Капсулы, содержащие различные полимеры, имеют сложную структуру. В частности, капсула бацилл состоит из полисахаридной сети, промежутки между петлями которой заполнены глютамилполипептидом.

Несмотря на наличие белка в капсулах отдельных видов микроорганизмов, наиболее распространенным веществом как капсул, так и слизистых слоев являются полисахариды. У некоторых микроорганизмов капсула представлена гомополисахаридами, т. е. полисахаридами, содержащими остаток сахара одного типа. Так, у Leuconostoc mesenteroides капсульное вещество образовано глюканом (остатки глюкозы), некоторые виды уксусно-кислых бактерий производят слизистые слои из целлюлозы, соединяющей клетки в прочную пленку. Большинство полисахаридов капсул являются гетерополисахаридами.

Наиболее изучены гетерополисахариды капсул патогенных бактерий, в особенности возбудителя пневмонии Streptococcus pneumoniae, у которого они несут функции капсульных антигенов и определяют иммуногенные свойства штаммов. На основании химического состава капсульных гетерополисахаридов бактерии этого вида разделены на 80 серотипов (сероваров), каждый из которых характеризуется присущей ему антигенной

специфичностью. Как правило, капсулы S. pneumoniae состоят из гетерополимеров, содержащих нейтральные сахара - глюкозу, галактозу, рамнозу, а также аминосахара и уроновые кислоты. Среди них есть соединения редкой природы. Так, в полисахариде серотипа 5 выявлен необычный аминосахар - N-ацетилпневмозамин, у шести серотипов обнаружен фосфорилхолин, не встречающийся в составе капсульных полисахаридов других прокариот. Капсулы многих серотипов пневмококка образованы полимерами типа рибит-тейхоевых кислот. К таковым относится арабит-тейхоевая кислота, наличие которой ранее было неизвестно в природе. Кроме пневмококков полиолсодержащие полимеры типа тейхоевых кислот найдены в капсулах многих грамположительных бактерий.

Полисахариды являются доминирующими компонентами капсульной слизи грамотрицательных бактерий. Многие виды бактерий рода Pseudomonas, Azotobacter vinelandii продуцируют экзополисахариды типа альгината - полимера, состоящего из ацетилированных остатков уроновых кислот.

Фитопатогенные бактерии Xanthomonas campestris образуют капсульный полисахарид ксантан, имеющий уникальную структуру. Основная цепь его представлена молекулой целлюлозы, в которой каждый второй остаток глюкозы замещен ацетилированным трисахаридом.

Капсульные полисахариды большинства бактерий выполняют функции склеивания клеток в агрегаты и прикрепления их к твердым поверхностям. Так, внеклеточная целлюлоза бактерий Sarsina ventriculi соединяет клетки в прочные, правильной формы пакеты (тюки). Полисахариды капсул целлюлозолитических бактерий осуществляют прикрепление их к растительным тканям. Полисахариды капсульных антигенов обеспечивают узнавание специфических поверхностных рецепторов макроорганизма и адсорбцию на них бактерий. Например, видоспецифическими рецепторами бобовых растений являются поливалентные белки - лектины. Определенным сродством к ним обладают некоторые полисахариды -капсулы клубеньковых бактерий - и взаимодействуют с ними по типу антиген-антитело. В результате такого взаимодействия бактерии прочно прикрепляются к корневым волоскам растений и инфицируют их. Аналогичный процесс

происходит и у фитопатогенных бактерий рода Agrobacterium - возбудителей корончатого галла двудольных растений.

Капсулы бактерий, несмотря на сложный химический состав, имеют упорядоченную ультраструктуру. Они состоят из микрофибрилл различной химической природы, которые формируют параллельные слои. Сложная структура выявлена у грамотрицательных бактерий. Так, у азотобактера капсула состоит из четырех слоев: внутренний представлен полисахаридом, над ним расположен слой пигмента меланина, затем опять полисахаридный слой, верхний слой составляют липиды и глобулы белка. У грамположительных бактерий слоистость капсулы выражена гораздо слабее.

Капсулы удерживаются на поверхности клеточной стенки в основном за счет ионных связей, которые устанавливаются через посредство ионов кальция и магния. У некоторых микроорганизмов выявлены ковалентные связи между компонентами клеточной стенки и капсулы. Предполагается, что у бацилл полисахарид капсулы соединен ковалентной связью с гликопептидами клеточной стенки. Благодаря этому капсула прочно удерживается на поверхности клеток.

Капсула бактерий выполняет разнообразные функции: предохраняет клетку от обезвоживания, затрудняет проникновение фагов, является дополнительным осмотическим барьером. Она является местом локализации капсульных антигенов, определяющих иммуногенные свойства бактерий. У патогенных бактерий капсула является одним из факторов вирулентности и токсигенности. Повышение вирулентности капсульных бактерий связано со способностью капсульных гликанов ингибировать фагоцитарную активность лейкоцитов макроорганизма. Фагоцитирование капсульных бактерий часто носит незаконченный характер.

В критических условиях капсула бактерий может служить источником питательных веществ, как обнаружено, к примеру, у азотобактера.

3.2.7. Жгутики

Жгутики являются нитевидными структурами, расположенными на поверхности клетки (рис. 3.22). Они, подобно капсуле, могут быть удалены без нарушения метаболизма клетки.

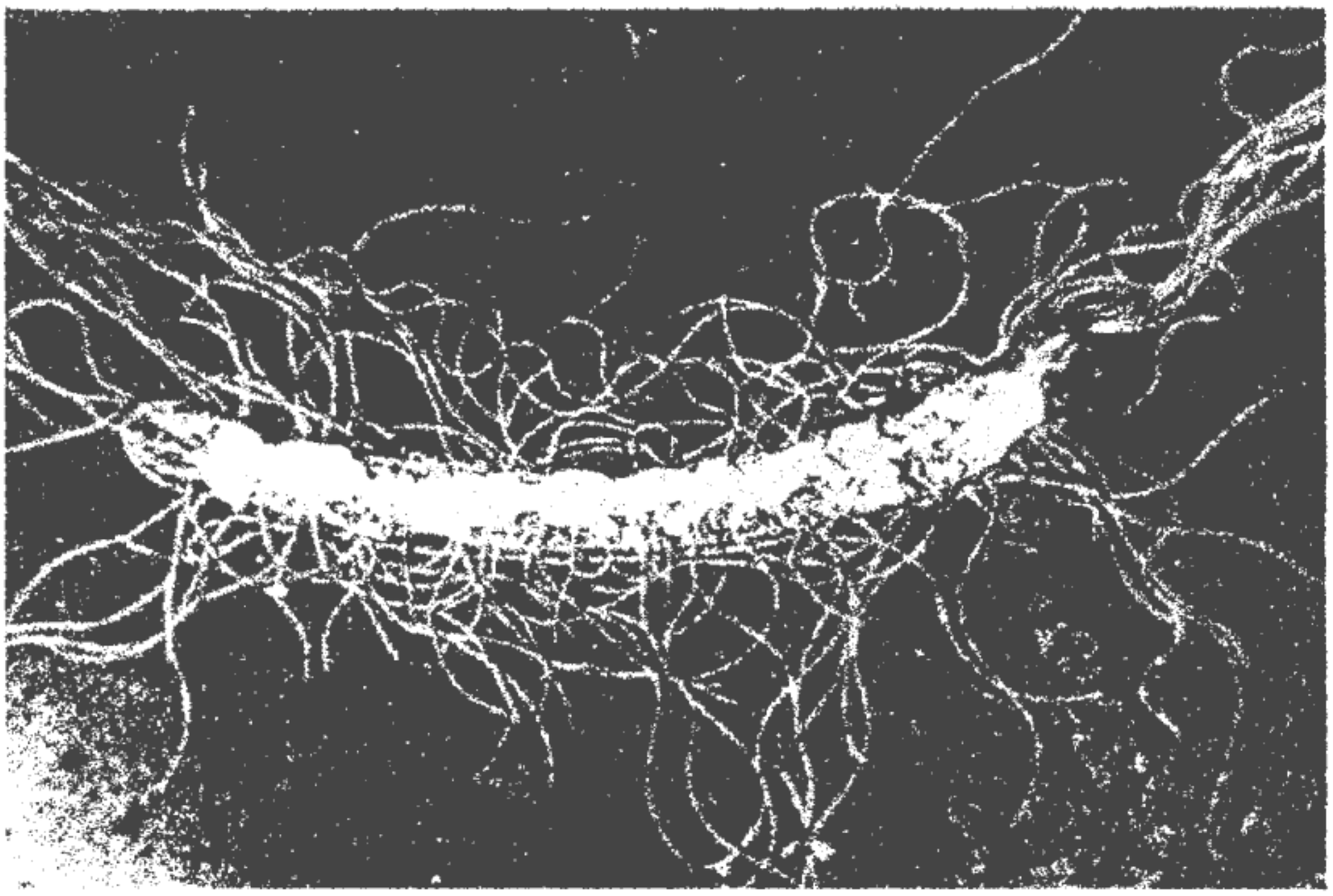


Рис.3.22. Жгутики бактерий

Первые сведения о наличии жгутиков у бактерий сообщил Г. Эренберг в 1838 г., а в 1897 г. В. Мигула дал их морфологическое описание. Количество жгутиков у бактерий непостоянно. Оно изменяется в зависимости от условий культивирования. У спирилл может быть от 5 до 30 жгутиков, у протея - от 50 до 100. Длина жгутиков достигает 20 мкм, что значительно превышает длину бактериальной клетки; диаметр (толщина) жгутиков очень малый - 10-20 нм. По характеру расположения жгутиков бактерии делятся на ряд групп: монотрихи - жгутик на одном полюсе клетки (представители рода Pseudomonas); амфитрихи - по одному жгутику на обоих полюсах (бактерии рода Nitrosomonas); лофотрихи - пучок жгутиков на одном из полюсов (бактерии рода Spirillum); перитрихи - жгутики расположены по всей поверхности клетки (бактерии рода Proteus).

Химический состав жгутиков довольно однообразен. Они состоят из белка флагеллина (от лат. flagellum - жгутик), молекулярная масса которого 25000-60000. В аминокислотном составе флагеллина преобладают глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты. Количество ароматических аминокислот - незначительное, а триптофан, цистеин и цистин либо содержатся в следовых количествах, либо вовсе отсутствуют. Электронно-микроскопические исследования выявили сложную структурную организацию жгутиков. Жгутиковый аппарат состоит из трех частей (рис. 3.23). Основная наружная часть - спиральная жгутиковая нить. У поверхности клеточной стенки она переходит в утолщенное образование изогнутой формы - крюк, который прикрепляет нить к базальному телу, локализованному в ЦПМ и клеточной стенке.

Нить жгутика состоит из субъединиц белка флагеллина. У одних бактерий белковые субъединицы собраны в цепи, спирально уложенные по всей длине жгутика с шагом спирали 2-2,5 нм. У других - жгутики имеют фибриллярную структуру - состоят из белковых субфибрилл, которые также имеют спиральную форму укладки, только с большим

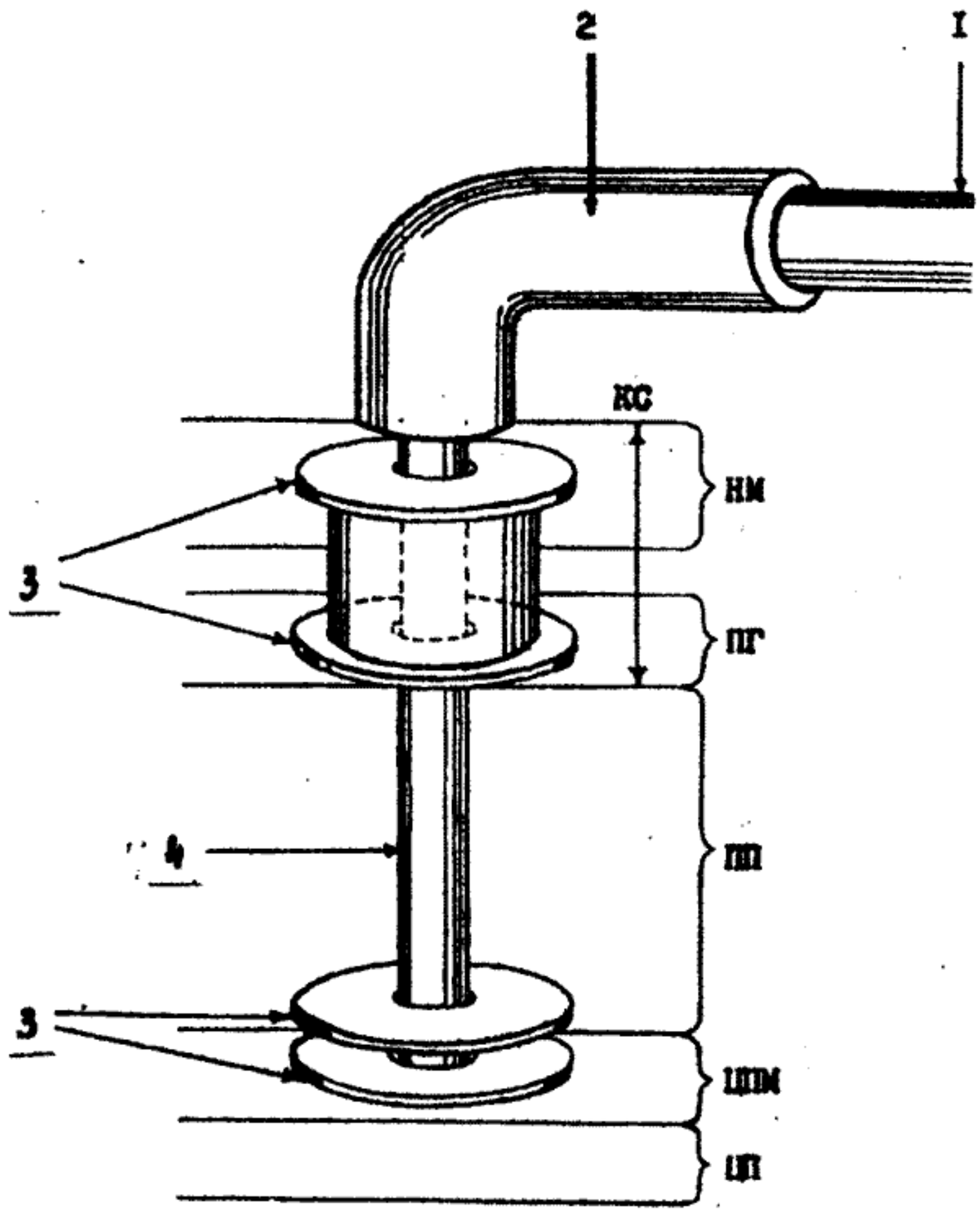


Рис. 3.23. Строение жгутикового аппарата бактерий:
1 - нить, 2 - крюк, 3 - кольца, 4 - стержень, НМ - наружная мембрана, ЦПМ - цитоплазматическая мембрана, ПГ - пептидогликан, ПП - периплазматическое пространство, ЦП - цитоплазма, КС - клеточная стенка

шагом спирали. Как в тех, так и других , внутри спирали проходит полый канал, по которому передвигаются молекулы белка из цитоплазмы к дистальному концу (верхушке), с которого идет наращивание жгутика.

Изогнутая часть - крюк - состоит из иного белка, чем нить и полагают, что он служит для обеспечения гибкого соединения нити с базальным телом. В состав базального тела входит сложная система, состоящая из 2 или 4 колец, нанизанных на стержень крючка. У грамположительных бактерий - 2 кольца, обозначенные M и S, у грамотрицательных - 4 - M, S, P, L. M-кольцо находится в ЦПМ; S - у грамположительных бактерий - в пептидогликановом слое, у грамотрицательных - в периплазматическом пространстве, примыкая к внутренней поверхности пептидогликана. Имеющиеся у грамотрицательных бактерий дополнительные внешние кольца P и L расположены соответственно в пептидогликановом слое и в наружной мембране. Они обеспечивают более прочное укрепление жгутика в клетках, имеющих тонкий слой пептидогликана и рыхлую клеточную стенку. Внешняя пара колец выполняет функции дополнительной арматуры крепления жгутиков.

Жгутики являются органами движения бактерий. Характер движения определяется особенностью расположения жгутиков. Монотрихи всегда движутся по прямой линии, перитрихи - беспорядочно и с кувырканием. Скорость движения также различна: большинство подвижных форм бактерий за секунду проходит расстояние, близкое размерам их тел. Самая подвижная бактерия - холерный вибрион: при длине тела в 2 мкм он проходит за секунду до 30 мкм.

Перемещение бактерий осуществляется за счет вращательного движения жгутиков. По современным данным жгутики представляют собой спиральные роторы, каждый из которых способен вращаться вокруг собственной оси. Функцию мотора выполняют внутренние кольца M и S. Вращаясь относительно друг друга, они приводят в движение вмонтированный в них стержень крючка, а он, в свою очередь, сообщает вращение связанной с ним жгутиковой нити. Вращение жгутиков передается клетке и она начинает вращаться в противоположном направлении. Спокойное плавательное движение бактерий в одном направлении осуществ-

ляется путем равномерного вращения жгутиков против часовой стрелки. Изменение вращения жгутиков в обратном направлении приводит бактерии к кувырканию. Движение бактерий осуществляется за счет энергии трансмембранного электрохимического потенциала ($\Delta\bar{\mu}_{н^+}$). Жгутиковый мотор превращает электрохимическую форму энергии в механическую.

Аналогами бактериальных жгутиков (по строению и химическому составу) являются аксиальные фибриллы (нити) спирохет. Они обвивают протоплазматический цилиндр (тело) клетки, включающий цитоплазму и цитоплазматическую мембрану. Протоплазматический цилиндр окружен наружным чехлом, состоящим из пептидогликана и трехслойной структуры, аналогичной наружной мембране клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Таким образом аксиальные фибриллы оказываются под чехлом. Число фибрилл разное - от 2 до 100, причем, у каждой клетки два набора фибрилл, прикрепленных субполярно. Свободные концы фибрилл направлены к центру клетки. Спирохеты могут осуществлять движения трех типов: вращение вокруг собственной оси, поступательное винтовое, или штопорообразное, движение и волнообразное изгибание клетки за счет сокращения аксиальных нитей. Движение спирохет, так же как и жгутиковых бактерий, осуществляется за счет электрохимической формы энергии ($\Delta\bar{\mu}_{н^+}$). Скользящий тип движения, присущий разным представителям прокариот - миксобактериям, цианобактериям, нитчатым серобактериям также, по-видимому, осуществляется при помощи скрытых внутренних структур - белковых фибрилл. Подтверждением этого является обнаружение у некоторых прокариот со скользящим типом движения тонкого слоя фибрилл, расположенного в клеточной стенке между пептидогликановым слоем и наружной мембраной. У нитчатых цианобактерий фибриллы формируют единую систему, обвивающую в виде спирали весь трихом. Скольжение цианобактерий сопровождается вращением нити. Направление движения зависит от направления хода спирали белковых фибрилл и является таксономическим признаком.

Механизм скользящего движения связан с особенностями строения клеточной стенки, а именно: наличием упорядоченно расположенных белковых субфибрилл. Они аналогичны жгутиковым нитям, только находятся в клеточной стенке, а не на ее поверхности. У скользящих бактерий описаны структуры, напоминающие базальные тела, которые также осуществляют запуск движения фибрилл. В результате их вращательного движения на поверхности клетки появляется так называемая «бегущая волна» - движение неровной клеточной стенки - и клетка отталкивается от твердого субстрата. Скользящее движение происходит за счет химической энергии АТФ или электрохимической ($\Delta\bar{\mu}_{H^+}$). Полагают, что слизь, обильно выделяемая скользящими прокариотами, в движении их существенной роли не играет. В определенных условиях она может облегчать отталкивание клетки от субстрата.

Подвижные бактерии могут осуществлять направленные передвижения - таксисы, обусловленные различными внешними агентами. В зависимости от характера воздействия (привлечения или отталкивания) таксис бывает положительным или отрицательным. Различают несколько видов таксиса: хемотаксис (реакция клеток на химическое вещество), аэротаксис (на кислород), фототаксис (на свет). Например, фототрофные бактерии благодаря фототаксису скапливаются в освещенном месте; аэробные - в зоне наличия кислорода. Если водную суспензию аэробных бактерий поместить на предметное стекло и покрыть покровным, то через некоторое время масса клеток будет сконцентрирована у края покровного стекла, т. е. там, где более высокое содержание кислорода.

3.2.8. Фимбрии

Нитевидные структуры фимбрии, или ворсинки, образуются как у жгутиковых, так и безжгутиковых бактерий. Они короче и тоньше жгутиков (длина 0,4-4 мкм, толщина - 5-10 нм), имеют вид прямых нитей и покрывают всю поверхность клетки. Число их доходит до многих тысяч. Они обнаружены у палочковидных и

шаровидных бактерий (рис. 3.24). Фимбрии состоят из белка пилина, молекулярная масса которого составляет около 17000 дальтон. Белковая субъединица уложена в виде одинарной полой внутри спирали, берущей начало в ЦПМ.

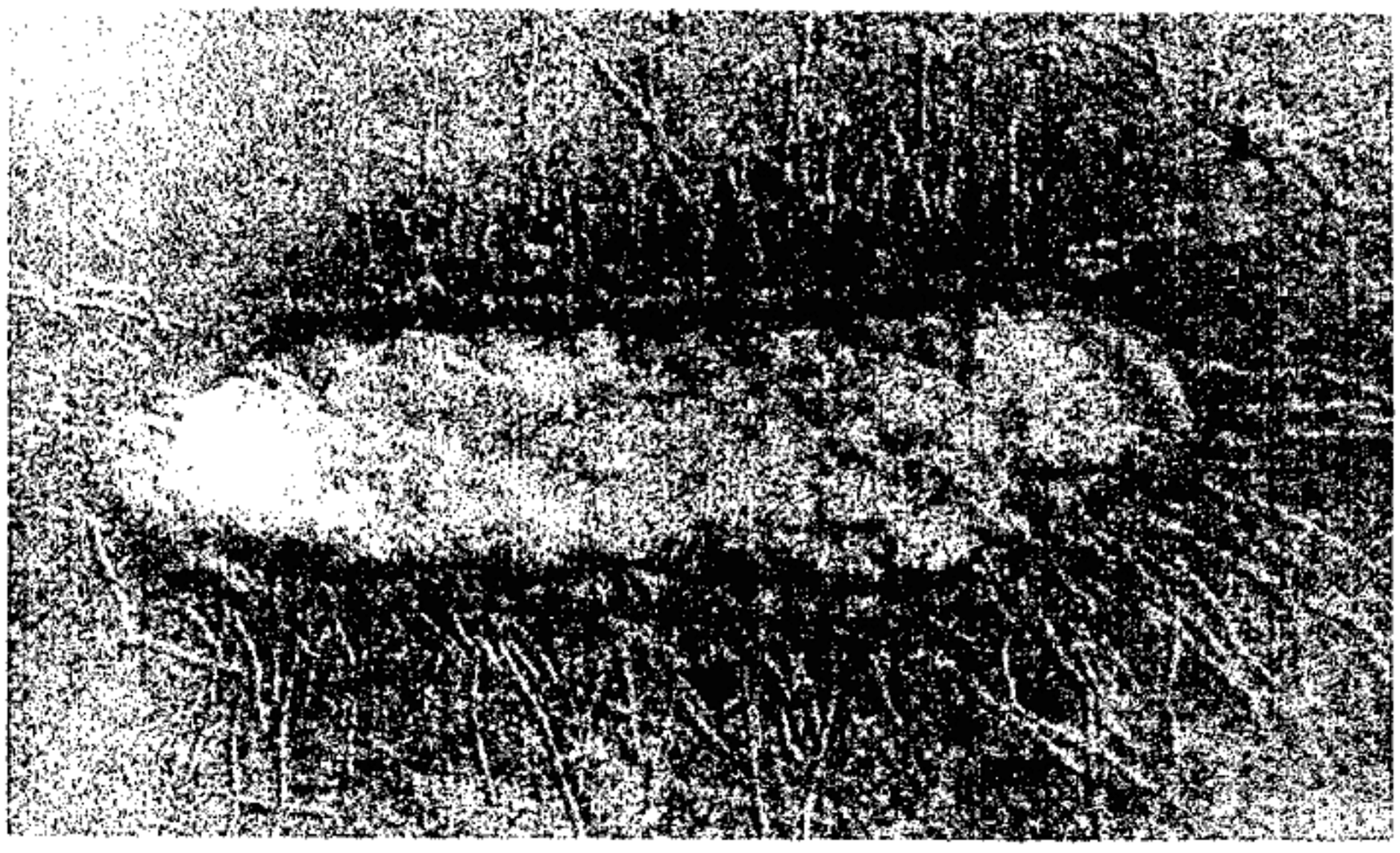


Рис. 3.24. Фимбрии (ворсинки) бактерий

Различают два типа ворсинок: I тип характерен для всех видов бактерий и выполняет функции объединения клеток в агрегаты или при-крепления их к субстратам; II тип ворсинок рассматри-вают как половые или F-пили. Они обнаружены только у клеток-доноров, содержащих F, RTF- и Col-факторы. В отличие от обычного типа фимбрий F-пили толще и длиннее и встречаются в количестве 1-2 на клетку. Они представляют собой полые трубочки, состоящие почти полностью из белка пилина, молекулярная масса которого равна 16600. Половые ворсинки обеспечивают контакт двух клеток при конъюгации бактерий. Это осуществляется путем прикрепления окончания половой ворсинки к специфическому сайту реципиентной клетки. После прикрепления ворсинка втягивается в клетку донора и сближает конъюгирующие клетки «стенкой к стенке». Сама F-ворсинка выполняет роль конъюгационного тоннеля, по которому происходит передача ДНК донорной клетки в реципиентную.

На F-ворсинках содержатся специфические сайты, на которых адсорбируются мужские фаги. Через ворсинки она проникает в клетку. Образование половых ворсинок детерминируется F, Col и R-факторами.

3.3. ПОКОЯЩИЕСЯ ФОРМЫ ПРОКАРИОТ

К покоящимся формам относятся специализированные клетки - цисты, акинеты и эндоспоры. Они предназначены для обеспечения выживания вида в неблагоприятных условиях. Появление покоящихся форм свидетельствует о морфологической и функциональной дифференцировке клеток у прокариот. Образованию их способствуют определенные питательные вещества, температура, pH, аэрация. При попадании в подходящую среду они прорастают в вегетативные клетки.

Для всех покоящихся форм характерен предельно низкий уровень метаболических процессов, что определяет длительность сохранения ими жизнеспособности. Основными механизмами, обеспечивающими устойчивое пребывание клеток в состоянии покоя, являются: наличие в этих клетках специальных репрессоров - ингибиторов ферментативной активности; крайне низкое содержание свободной воды в цитоплазме (спороплазме); конформационное изменение ферментов, вызванное обезвоживанием покоящихся клеток. В отличие от исходных вегетативных клеток покоящиеся формы обладают повышенной устойчивостью к разнообразным неблагоприятным факторам внешней среды, в связи с чем обеспечивают надежное сохранение вида в природе. Наибольшей устойчивостью к действию температуры, кислотности среды, высушивания, литических ферментов и др. характеризуются эндоспоры. Известно, что эндоспоры некоторых бактерий отмирают на 90 % только в результате нагревания при 100^0 С в течение 10-15 мин, в то время как цисты азотобактера полностью погибают после прогревания их при 60^0 С в течение 15-20 мин; акинеты цианобактерий отмирают на 95 % после нагревания при 40^0 С в течение 10 мин.

Цисты. Покоящиеся клетки овальной формы и более крупных размеров, чем вегетативные, покрытые толстым слоем уплотненной слизи, называются цистами. Образование цист, присущее азотобактеру, миксобактериям, спирохетам, риккетсиям характерно для стареющих культур. Появление их у азотобактера сопровождается изменением морфологии клеток. Присущие молодой культуре палочковидные клетки укорачиваются в размерах за счет

утолщения и превращаются в кокковидную форму. В цитоплазме накапливаются гранулы поли-β-оксимасляной кислоты. Жгутики теряются, подвижность прекращается. Одна или несколько таких клеток покрываются толстой слизистой капсулой и переходят в покоящееся состояние, характерное для цист. Последние обладают более высокой устойчивостью к высушиванию, нагреванию, действию осмотического давления, чем вегетативные клетки.

У миксобактерий образование цист является закономерной стадией развития. После активного размножения клетки собираются и образуют скопления в отдельных точках слизистого матрикса. Эти скопления в виде простого бугорка или сложных, ярко окрашенных деревоподобных структур возвышаются над субстратом и носят названия плодовых тел. В плодовых телах клетки миксобактерий переходят в покоящееся состояние. Они принимают овальную форму, происходит утолщение клеточной стенки, уплотнение цитоплазмы, дополнительный синтез белка. Такие покоящиеся клетки у миксобактерий получили название миксоспор. Они устойчивы к нагреванию, высушиванию и другим неблагоприятным факторам. От вегетативных клеток отличаются большей оптической плотностью и сильным преломлением света, что позволяет обнаруживать их с помощью светового микроскопа. Образование цист у миксобактерий можно индуцировать внесением в среду глицерина или аминокислот.

Акинеты. Покоящиеся клетки нитчатых цианобактерий получили название акинет. Они образуются из отдельных клеток в период замедления роста культуры. Превращающаяся в акинету клетка увеличивается в размерах, утолщается пептидогликановый слой клеточной стенки и уплотняется слизистый чехол. В цитоплазме накапливается больше запасных включений - гликогена, полифосфатов, цианофицина, повышается содержание ДНК и рибосомы. Количество хлорофилла и фикобилиновых пигментов уменьшается, снижается интенсивность фотосинтеза. В акинетах меньше воды, чем в вегетативных клетках. Подобно цистам, они обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям. Образованию акинет способствуют низкая температура, высушивание, высокое содержание глутамина.

3.3.1. Эндоспоры

Споры у бактерий образуются внутри клетки и носят название эндоспор. Образование эндоспор присуще палочковидным бактериям родов Bacillus и Clostridium и является для них характерным и постоянным признаком. Среди бактерий других морфологических групп спорообразование - редкое явление. Всего известно 15 родов бактерий, отдельные представители которых образуют эндоспоры, например, роды Sporosarcina, Sporospirillum, Desulfotomaculum.

Эндоспоры - это особый тип покоящихся клеток, которые в отличие от цист и акинет образуются внутри вегетативной клетки - спорангия. Споры могут иметь сферическую или овальную форму и занимать в клетке центральное или терминальное положение.

В отличие от вегетативных клеток они обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды: высокой температуре, высушиванию (годами могут сохраняться в высушенном состоянии), действию повышенных концентраций солей, а некоторые выдерживают даже длительное кипячение. В литературе описаны случаи прорастания спор бактерий, выделенных из гробниц египетских пирамид. Высокая устойчивость спор к неблагоприятным воздействиям имеет большое биологическое значение для спорообразующих бактерий. Эта особенность, а также то, что в клетке, как правило, образуется только одна спора, свидетельствует о том, что процесс спорообразования не является средством размножения бактерий, а служит приспособлением к сохранению вида.

Хотя спорообразование - естественный физиологический процесс, в то же время для спорообразующих бактерий он вовсе не обязательный этап жизненного цикла. При благоприятных условиях питания эти бактерии длительное время могут развиваться без образования спор. Основным фактором, вызывающим спорообразование, является концентрация в среде органических и азотсодержащих веществ. Доказательством этого может быть усиление спорообразования при помещении вегетативных клеток в дистиллированную воду. Через 10-12 ч споры образуют около 90 % клеток. Однако, если в течение первых 5 ч после помещения клеток

в воду добавить глюкозу, то спорообразование прекратится. Благоприятное влияние на образование спор оказывает повышенное содержание кислорода, присутствие в воде катионов марганца и калия. Оптимумы температуры и pH для спорообразования те же, что и для развития бактерий.

Спорообразование - сложный процесс, в котором можно выделить несколько этапов. На первом, подготовительном этапе, изменяется направленность метаболических процессов клетки: происходит активный синтез спорового белка, который в отличие от белка вегетативной клетки содержит больше цистеина и аминокислот с гидрофобными группами; синтезируется уникальное соединение - дипиколиновая кислота, которая присуща только споре. В этот же период происходят морфологические изменения нуклеоида - ядерное вещество вытягивается по длине клетки в виде тяжа. При наличии в клетке двух нуклеоидов, что часто бывает в период завершения экспоненциальной фазы роста, они объединяются и также образуют тяжевидную структуру. Затем часть (примерно 1/3) этой структуры отделяется и переходит к одному из полюсов клетки - в спорогенную зону. Это может быть одна или несколько копий хромосомы материнской клетки. Здесь же происходит уплотнение цитоплазмы, которая вместе с генетическим материалом отделяется перегородкой от остального клеточного содержимого. Перегородка формируется из цитоплазматической мембраны, которая инвагинирует от периферии к центру, срастается и разделяет таким образом спороплазму и цитоплазму клетки (рис. 3.25). Описанные этапы образования спор - обратимы. Если к спорулирующей культуре на стадии формирования проспоры внести антибиотик хлорамфеникол (ингибитор синтеза белков, в том числе и мембранных), то процесс обрастания спороплазмы прекратится и начнется обычный процесс клеточного деления. Дальнейшие этапы спорогенеза необратимы. Следующий этап спорогенеза - образование проспоры. Он состоит в том, что мембрана вегетативной клетки обрастает отделенный участок спороплазмы с ядерным материалом. В результате формируется структура, расположенная внутри материнской клетки и полностью изолированная от нее двумя элементарными мембранами - наружной и внутренней. Эта структура получила название проспоры. В сформированную

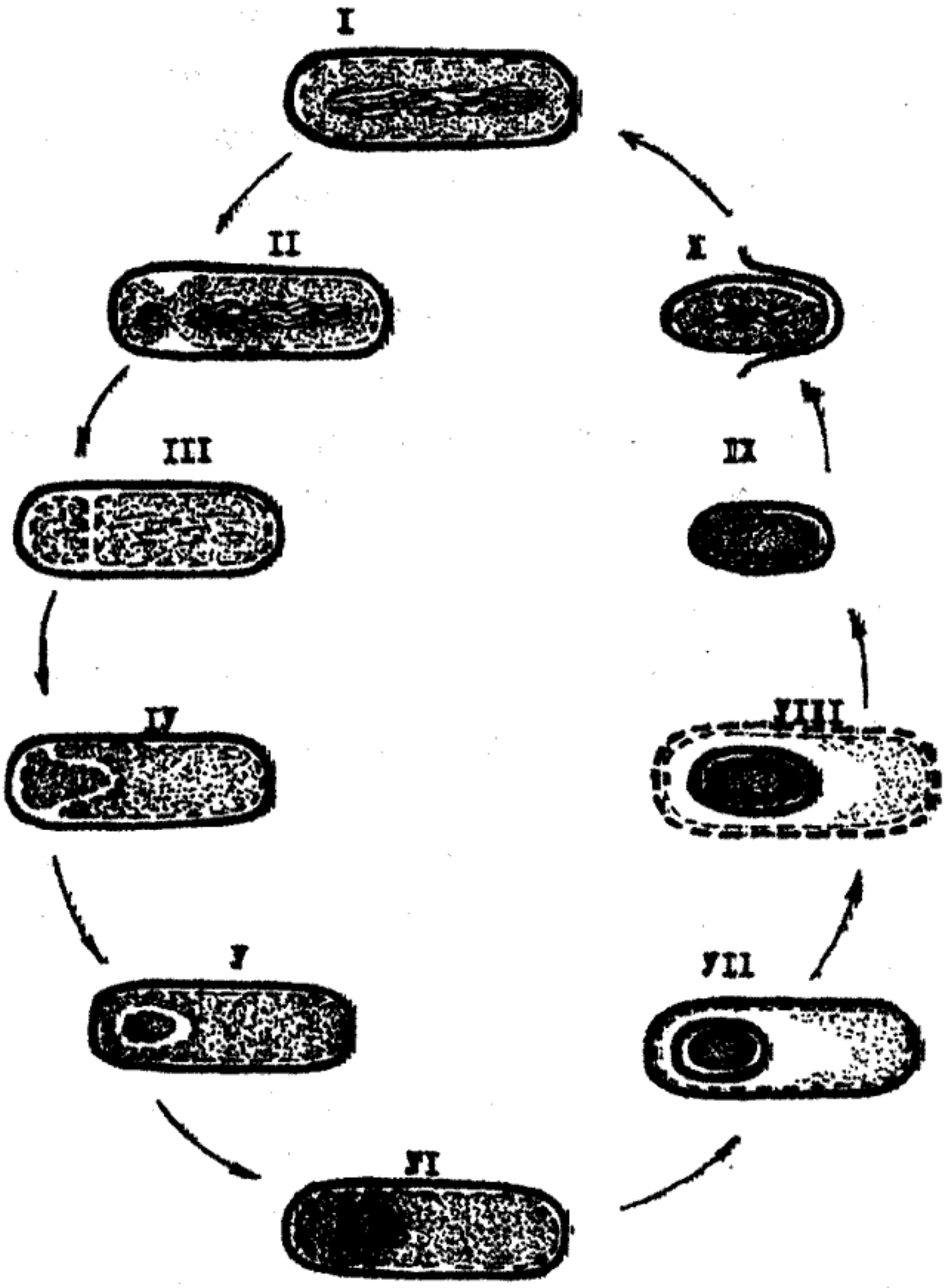


Рис.3.25. Образование эндоспор у бактерий рода Bacillus: ***I - вегетативная клетка, II - инвагинация ЦПМ, III - образование споровой перегородки, IV - обрастание проспоры клеточной мембраной, V - сформулированная прспора, VI - образование кортекса, VII - формирование покровов споры, VIII - лизис материнской клетки, IX - свободная зрелая спора, X - прорастание споры***

проспору начинают интенсивно поступать из материнской клетки дипиколиновая кислота и ионы кальция. За образованием проспоры следует этап образования кортекса, который формируется между наружной и внутренней мембранами проспоры. По мере развития споры толщина кортекса увеличивается. Кортекс состоит из особого пептидогликана, химически отличающегося от такового клеточных

стенок. В состав его входят три повторяющиеся субъединицы: мурамовая, аланиновая и тетрапептидная.

С наличием кортекса связаны морфологии и другие свойства споры. Это установлено на мутантах, потерявших способность к формированию кортекса. Дефектные по развитости кортекса споры имели неправильную форму, не преломляли свет, мало аккумулировали дипиколиновой кислоты и обладали слабой эффективностью прорастания. Степень развитости кортекса определяет уровень обезвоживания спороплазмы и устойчивость споры к действию неблагоприятных факторов. Он предохраняет также спороплазму от действия литических ферментов, разрушающих клетку.

Вслед за формированием кортекса наступает этап образования споровых покровов - оболочки споры, которая может быть многослойной. У разных видов спорообразующих бактерий оболочки различаются по толщине, строению и количеству слоев. Оболочка синтезируется поверх наружной споровой мембраны. В синтезе принимает участие наружная мембрана споры и протопласт материнской клетки. У некоторых бактерий поверх споровой оболочки формируется еще одна структура - экзоспориум. Он может быть однослойным (Cl. botulinum, тип Е), многослойный (Cl. corynoforum). Строение его определяется видом бактерий.

Оболочка споры состоит в основном из белка и небольшого количества липидов и гликолипидов. Белок характеризуется наличием значительного количества дисульфидных связей, которые придают высокую механическую прочность наружным покровам, обеспечивают устойчивость к действию литических ферментов и предохраняют спору от преждевременного прорастания. Мутанты спор, лишенные оболочки, прорастают сразу после освобождения из материнской клетки даже в неблагоприятных для роста условиях.

Экзоспориум состоит из белков и липидов. Полагают, что он защищает спору от внешних воздействий.

После завершения формирования оболочек споры начинается ее созревание. Процесс сопровождается активным поглощением уникального соединения - дипиколиновой кислоты, которая синтезируется спорулирующей клеткой только в период спорообразования. В вегетативной клетке дипиколиновая кислота

отсутствует. В зрелой споре она представлена в виде хелата кальция - дипиколинат кальция, составляя 10-15 % массы сухой споры. С этим соединением связывают высокую термостабильность спор и пребывание их в покоящемся состоянии. В процессе созревания спора приобретает характерную для вида форму и размеры, занимает соответствующее положение в клетке. Спустя некоторое время происходит автолиз материнской клетки и спора высвобождается в среду.

Спорообразование регулируется генетическим аппаратом клетки. Выявлено более 100 так называемых spo-генов, контролирующих разные этапы формирования спор. Эти гены расположены группами в разных участках хромосомы. При вегетативном росте клетки они не проявляют себя. Полагают, что они находятся под контролем системы репрессии, которая снимается прекращением роста спорообразующей клетки.

Эндоспоры существенно отличаются от образующих их бактерий по химическому составу. Только спорам присуще наличие дипиколиновой кислоты. В отличие от вегетативной клетки споры характеризуются низким содержанием свободной воды. Это одна из причин слабой или предельно низкой активности метаболических процессов спор, а также устойчивости их к воздействию неблагоприятных физико-химических факторов. Долгое время вообще отрицалась какая-либо физиологическая активность спор в состоянии покоя. Только применение совершеннейших микро-спирометров позволило установить наличие слабого дыхания спор.

Споры отличаются от вегетативных клеток высоким содержанием липидов. Так, в клеточных стенках Bac. subtilis общих липидов находится до 0,7 % в оболочках споры - 3,0 %. Оболочкам спор свойственно также относительно большое количество белка. Но зато свободных аминокислот в спорах предельно мало: не обнаружена и β-гидрооксимасляная кислота, характерная для вегетативной клетки большинства споровых бактерий. Спорам присуще также сравнительно высокое содержание кальция и магния и несколько меньшее - фосфора и калия.

Споры, как и вегетативная клетка, имеют полный набор ферментов, однако в покоящейся споре они находятся в недеятельном состоянии. Активность ферментов проявляется при

попадании споры в благоприятную среду и при ее прорастании. Прорастанием называется процесс превращения споры в вегетативную клетку. Необходимым условием для этого является наличие влаги.

В прорастании эндоспор, как и их образовании, различают несколько этапов: активацию, инициацию и вырастание. Освободившиеся из клетки споры даже в благоприятных условиях сразу не прорастают. Остаются в покоящемся состоянии. Но их можно вывести из состояния покоя, подвергнув воздействию активирующих факторов. Таким фактором является повышенная температура - 65-80^0 С. Кратковременное (5 мин) прогревание споровой суспензии индуцирует способность спор к прорастанию. Но для начала процесса необходим химический пусковой механизм - инициатор прорастания. Роль его могут выполнять углеводы, аминокислоты (в частности L-аланин), неорганические ионы. Прорастание сопровождается сложными физиологическими и биохимическими изменениями.

На первом этапе прорастания происходит гидратация структур, т. е. поглощение воды и набухание, вместе с тем увеличивается проницаемость оболочек, снижается светопреломляемость их.

В результате этого активируются биохимические процессы: усиливается дыхание и возрастает активность литических ферментов. Истинное прорастание начинается на втором этапе, когда под действием литических ферментов растворяются оболочки спор, вначале внутренняя, затем наружная; освобождаются и удаляются дипиколиновая кислота и частично гликопептид. В этот период теряется 25-30 % сухого веса споры. Разрыв оболочек спор обычно происходит в одной любой точке и там появляется «росток» новой клетки. Далее следует удлинение ростка и формирование полноценной вегетативной клетки. Прорастание споры происходит значительно быстрее, чем ее образование. В среднем этот процесс занимает 4-5 ч. Процесс прорастания спор, так же как и образования, носит необратимый характер.

Спорообразование у некоторых видов бацилл сопровождается появлением несвойственных вегетативной клетке соединений. Так, у Bac. thuringiensis - возбудителя паралича у гусениц чешуекрылых насекомых - рядом со спорой образуется белковый кристаллик

ромбовидной формы, получивший название «параспорального тельца» (рис. 3.26). Этот белок обладает высокой токсичностью для личинок некоторых насекомых. Он освобождается из клетки вместе со спорой.



Рис.3.26. Спора и белковый кристалл Bac. thuringiensis

У многих спорообразующих бактерий ранние этапы споруляции сопровождаются образованием различных пептидных антибиотиков - эдеинов, подавляющих синтез ДНК; бацитрацинов - подавляющих синтез клеточных стенок; грамицидинов и полимиксинов, влияющих на структурные и функциональные свойства мембран. Роль этих соединений в спорообразовании известна. Предполагается, что они могут регулировать различные стадии процесса дифференцировки, как образование проспоры, кортекса, оболочек и т. д.

Экзоспоры. Покоящимися клетками и одновременно репродуктивными структурами у актиномицетов наряду с эндоспорами являются экзоспоры. Они образуются путем фрагментации гиф воздушного мицелия на отдельные участки, каждый из которых превращается в спору. Формирование экзоспор сопровождается утолщением клеточной стенки за счет образования дополнительных наружных покровов. Однако такие структуры, как кортекс и экзоспориум, характерные для эндоспор, у экзоспор отсутствуют. Не обнаружено в экзоспорах и дипиколиновой

кислоты. В связи с этим, экзоспоры актиномицетов существенно не отличаются от мицелия по устойчивости к повышенной температуре и другим неблагоприятным факторам. Однако в высушенном состоянии они могут более длительное время сохранять жизнеспособность. Обнаружение экзоспор присуще почти всем эуактиномицетам. Кроме актиномицетов экзоспоры образуют некоторые почкующиеся и метанолокисляющие бактерии. У фототрофных бактерий Rhodomicrobium экзоспоры формируются на конце гифы материнской клетки; у метилотрофных бактерий Methylosinus trichosporium экзоспоры отпочковываются непосредственно от материнской клетки.

Глава 4

РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Важнейшим свойством всех живых организмов являются рост и размножение. Рост - это физиологический процесс постепенного и согласованного увеличения количества всех биохимических компонентов организма. Рост приводит к увеличению массы организма, размножение - к увеличению числа особей в популяции.

4.1. РОСТ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

При изучении роста бактерий необходимо разграничивать «рост бактериальной клетки» и «рост культуры». Рост клетки - это увеличение ее размеров, рост культуры - это увеличение числа клеток, что является результатом их роста и размножения.

Индивидуальный рост бактерий происходит благодаря протеканию в них множества взаимосвязанных реакций биосинтеза клеточных компонентов, в результате чего растущая клетка достигает размеров, характерных для бактерий данного вида. Характер роста определяется химическими и физическими условиями среды. Благоприятные условия способствуют быстрому росту, который обеспечивается повышенной концентрацией рибосом в клетке. В связи с этим, активно растущие клетки содержат более высокое количество РНК и белка. Кроме того в благоприятных условиях роста в клетках накапливаются запасные питательные вещества - волютин, гликоген, поли-β-оксимасляная кислота. В клетках, растущих в богатой среде, происходит ускорение синтеза макромолекул, затем по достижению необходимого количества их начинается деление клеток.

По мере обеднения среды питательными веществами, биосинтетические процессы замедляются, что приводит к образованию мелких клеток с пониженным содержанием РНК. Часто наряду с мелкими клетками образуются более крупные клетки с извращенной морфологией, называемые инволюционными.

4.2. РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Скорость роста бактерий зависит как от внешних условий, так и от физиологических особенностей самой клетки. При наличии благоприятных условий рост бактериальной клетки завершается размножением. Основным способом размножения большинства бактерий является простое деление клетки пополам. Делению предшествует репликация (удвоение) хромосомы. Эти два процесса тесно взаимосвязаны. Частота репликации регулируется скоростью роста клетки. Репликация бактериальной хромосомы осуществляется описанным ранее способом (см. п. 3.2.5).

Изучение закономерности равномерного распределения генетического материала между дочерними клетками, образовавшимися в результате деления материнской клетки, позволило Г. Жакобу, С. Бреннеру и Т. Кузену (1963) сформулировать концепцию репликона. Репликон - единица репликации, это участок ДНК, содержащий регуляторные элементы, необходимые для независимой репликации. У бактерий таковым являются хромосома и плазмиды. Каждый репликон содержит не менее двух локусов, участвующих в контроле репликации: структурный ген-репликатор (ген-инициатор), детерминирующий синтез белка-инициатора и специальный сайт-репликатор, который распознает сигналы на начало удвоения хромосомы.

После некоторого периода роста клетка достигает определенного физиологического состояния. Из цитоплазматической мембраны в репликон поступают сигналы о необходимости репликации хромосомы и готовности клетки к делению. Под влиянием сигналов активизируется деятельность структурного гена и синтезируется белок-инициатор. Он, воздействуя на репликатор, запускает репликацию.

Между системой репликации хромосомы и делением клетки существует координированное взаимодействие: делению клетки всегда предшествует удвоение хромосомы. После завершения репликации начинается процесс деления клетки. У грамположительных бактерий и цианобактерий это осуществляется образованием поперечной перегородки, разделяющей материнскую клетку на две равноценные дочерние.

Деление происходит следующим образом. Вначале синтезируется двуслойная цитоплазматическая мембрана. Затем на внутренней стороне клеточной стенки образуются два бугорка. Они интенсивно растут и, проникая кольцеобразно внутрь клетки между слоями образовавшейся цитоплазматической мембраны, образуют двойную перегородку, делящую клетку пополам.

Деление большинства грамотрицательных бактерий происходит путем перетяжки. При этом геномы расходятся по полюсам клетки, цитоплазматическая мембрана и клеточная стенка растягиваются, впячиваясь от периферии к центру клетки до контакта друг с другом. В результате клетка перешнуровывается на две дочерние. Деление клеток образованием перегородки или перетяжкой получило название бинарного в связи с формированием двух одинаковых дочерних клеток.

Кроме описанного бинарного деления, у бактерий известен другой способ размножения - почкование. Почкованием размножаются бактерии родов Hyphomicrobium, Pedomicrobium и других, объединенных в группу почкующихся бактерий. Эти организмы имеют вид вытянутых палочек (0,5х 2 мкм), иногда грушевидных, оканчивающихся гифами, или простеками (выростами).

Размножение у этих бактерий начинается с образования почки на конце гифы или непосредственно на материнской клетке. Почка разрастается в дочернюю клетку, формирует жгутик и отделяется от материнской клетки. По достижению зрелого состояния жгутик теряется и процесс развития повторяется.

В отличие от бинарного деления при почковании исходная клетка остается материнской, а вновь образованная - дочерней. Между ними имеются морфологические и физиологические различия.

Актиномицеты размножаются фрагментами мицелия и спорами. У одних (род Micromonospora) единичные споры формируются на гифах вегетативного мицелия, у других (род Streptomyces и др.) цепочки спор образуются на концах гиф воздушного мицелия, так называемых конидиеносцах. Фрагменты мицелия и споры в благоприятных условиях влажности, температуры прорастают и дают начало новым организмам.

Нитчатые цианобактерии кроме бинарного деления размножаются участками трихом и гормогониями. Последние представляют собой укороченные нити, состоящие из мелких вегетативных клеток одинаковой формы и размеров. При отмирании средних клеток трихома (нити) гормогонии выскальзывают из чехла материнского трихома, растут, делятся, образуя новые трихомы. Гормогонии, в отличие от материнского трихома, не имеют гетероцист и никогда не окружены чехлом.

Независимо от того, каким путем идет процесс размножения бактерий, скорость этого процесса огромна: за 24 ч может смениться столько поколений, сколько у человека за пять тысяч лет. Скорость размножения зависит от многих условий и для каждого вида бактерий различна. При наличии в среде необходимых питательных веществ, благоприятной температуры и кислотности среды деление каждой клетки может повторяться через 20-30 мин (E. coli). При такой скорости размножения из одной клетки за сутки возможно образование $472 \cdot 10^{19}$ клеток (2^{72}, 72 генерации).

Интенсивное размножение имеет для бактерий большое биологическое значение. Оно обеспечивает сохранение микроорганизмов на земной поверхности. При наступлении неблагоприятных условий они погибают массами, но достаточно сохраниться где-нибудь нескольким клеткам, как при подходящих условиях они дадут большое потомство клеток.

Численность популяции микроорганизмов в естественных местообитаниях, например, в почве или воде, постоянно меняется в соответствии с изменением условий существования. Но в лабораторных условиях на питательных средах изменение численности популяции микроорганизмов происходит закономерным образом.

4.3. РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ. ПЕРИОДИЧЕСКАЯ КУЛЬТУРА

Периодической называют культуру , в которую после засева бактериями соответствующей питательной среды в процессе роста не добавляются никакие компоненты и не удаляются из нее продукты метаболизма (закрытая система). Закономерность

размножения бактериальной популяции в периодической культуре описывается s-образной кривой, которая выражает зависимость числа клеток (или биомассы) от продолжительности роста культуры.

При развитии популяции в жидкой среде различают четыре основные фазы роста, последовательно сменяющие друг друга: начальную, или лаг-фазу; экспоненциальную, или логарифмическую фазу; стационарную фазу и фазу отмирания (рис. 4.1).

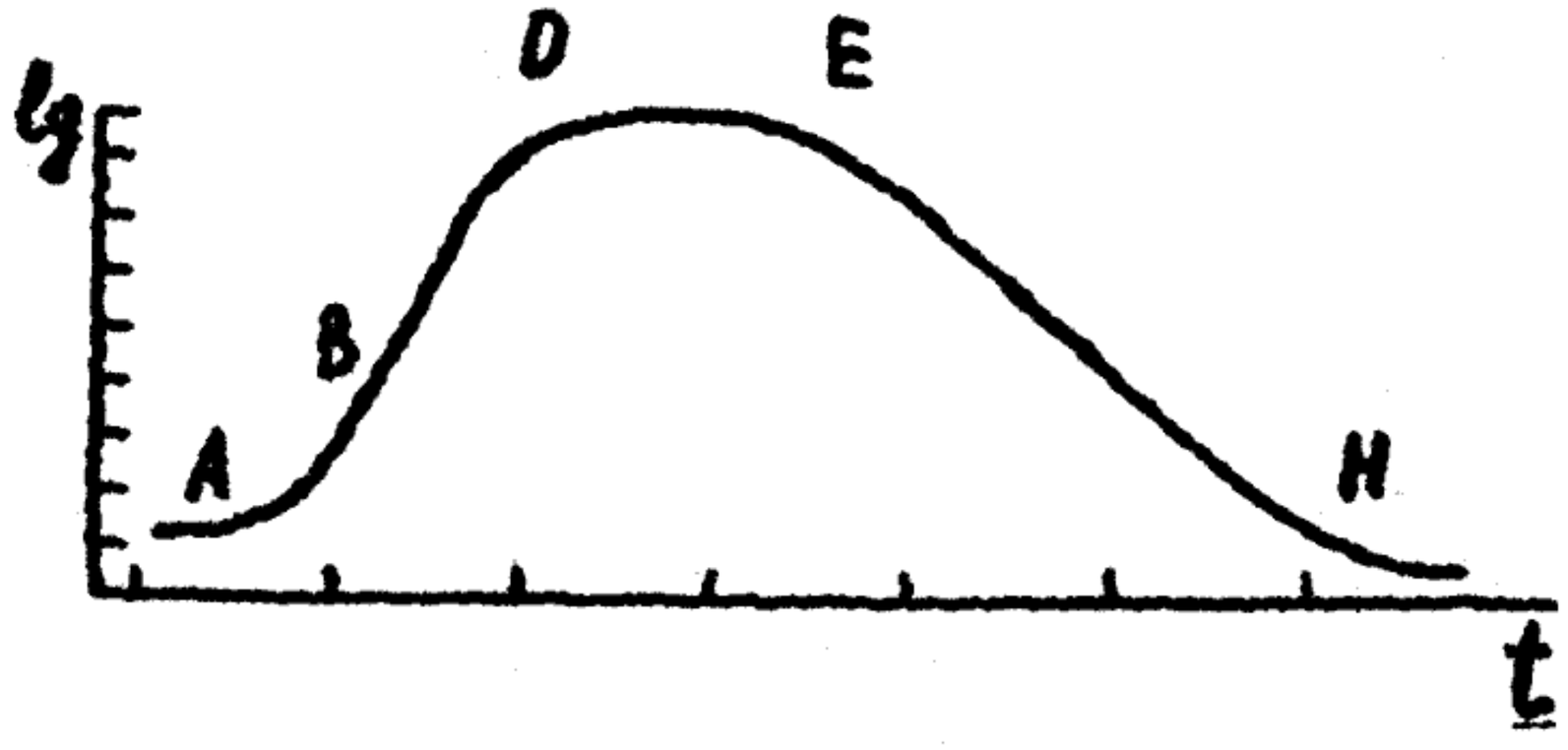


Рис. 4.1. Кривая роста бактериальной культуры: ***A-B - лаг-фаза; B-D - экспоненциальная; D-E - стационарная; E-H - фаза гибели***

Лаг-фаза охватывает период времени от засева бактерий в питательную среду до начала деления клеток. В течение лаг-фазы число клеток не увеличивается. Происходит приспособление клеток к новым условиям среды, выражающееся в синтезе индуцибельных ферментов, повышение метаболической активности, увеличение размеров клеток.

Длительность лаг-фазы зависит от качества среды, в которой ранее выращивалась культура и в которую произведен посев. Чем полноценнее среда, в которую засевается культура, тем короче лаг-фаза. Большое внимание на продолжительность лаг-фазы оказывает количество и возраст засеваемых клеток. Чем старше культура и чем меньше взято клеток для посева, тем длительнее эта фаза. Лаг-фаза может затянуться, если питательная среда не полноценная, т. е. если она не содержит в достаточном количестве аминокислот, витаминов и других необходимых веществ.

Иногда в культуре может наблюдаться наличие двух лаг-фаз. Это обычно происходит на средах, содержащих смесь питательных веществ. Некоторые культуры на таких средах проявляют способность к поочередному использованию источников питания. В 1942 г. Моно впервые описал поочередное использование двух типов углеводов E. coli и назвал это явление диауксией. В основе этого явления лежит катаболитная репрессия. При развитии E. coli на среде, содержащей глюкозу и сорбит, вначале потребляется глюкоза; синтез ферментов, необходимых для потребления сорбита, угнетается. Они образуются только после того, как вся глюкоза будет потреблена и клетка приступит к использованию другого источника питания – сорбита. В случае диауксии лаг-фаза снова повторяется.

Потребление субстрата сопровождается увеличением бактериальной массы - биомассы. Прирост биомассы называется урожаем. Урожай клеток отражает интенсивность развития культуры. Важным показателем, характеризующим эффективность использования субстрата или продуктивность культуры в конкретных условиях среды, является экономический коэффициент. Он выражается отношением урожая (выросшей биомассы) к количеству потребленного субстрата: $Y = \frac{X}{S_1}$, где Y - экономический коэффициент; X - количество выросшей биомассы, г; S_1 - количество потребленного субстрата, г. Количество потребленного субстрата определяют как разность между исходной S_0 и остаточной S концентрацией его: $S_1 = S^0 - S$.

Лаг-фаза сменяется *экспоненциальной, или логарифмической фазой роста.* В этой фазе все клетки находятся в состоянии активного деления. Нарастание клеток идет в геометрической прогрессии: скорость размножения постоянная; продолжительность генерации, т. е. время между двумя последовательными делениями клетки, минимальная. Прирост бактерий в единицу времени пропорционален наличному количеству клеток.

Показателем интенсивности роста культуры является удельная скорость роста (μ), которая означает прирост биомассы, или числа

клеток за один час на единицу растущей биомассы. Математически это выражается формулой:

$$\mu = \frac{2{,}303(\lg m_1 - \lg m_0)}{t_1 - t_0}$$

где m_0 и m_1 - величины начальной и через время t биомассы (или числа клеток); $t_1 - t_0$ - промежуток времени между начальным и последующим определениями биомассы или подсчетом числа клеток.

Другим важным параметром скорости роста культуры является среднее время удвоения биомассы, или время генерации (g), т. е. время между двумя последовательными делениями клетки. Оно определяется по увеличению численности клеток за определенный промежуток времени t. Если в начале экспоненциальной фазы число клеток было A, то после первой генерации, т. е. после первого деления количество клеток удвоится и будет равно $A \cdot 2$; после второй генерации количество клеток станет $A \cdot 2^2$; после третьей - $A \cdot 2^3$; после n генераций конечное число клеток B окажется $A \cdot 2^n$, т. е. $B = A \cdot 2^n$.

В микробиологической практике для выражения общего числа клеток чаще пользуются не абсолютными числами, так как они достигают огромных величин, а их логарифмами. Прологарифмировав данное уравнение, получим:

$$\lg B = \lg A + n \lg 2$$

Величины A и B (начальное и конечное число клеток) определяем одним из методов подсчета числа клеток: в счетной камере, на мембранных фильтрах или путем высева культуры из чашки Петри со средой с последующим учетом выросших колоний.

Число генераций n находим из уравнения:

$$n \lg 2 = \lg B - \lg A, \text{ где } n = \frac{\lg B - \lg A}{\lg 2}$$

Зная число генераций (делений клеток) и продолжительность опыта, легко определить скорость размножения клеток (в минутах):

$$g = \frac{t}{n}$$

Подставляя в формулу значение n, получим : $g = \frac{t \lg 2}{\lg B - \lg A}$

Учитывая, что даже в экспоненциальной фазе происходит отмирание клеток (около 20 %), в данную формулу вносится 20 %-ная поправка, что от 2 составляет 0,4. В конечном итоге формула получит следующий вид:

$$g = \frac{t \lg 1{,}6}{\lg B - \lg A}$$

Удельная скорость роста и время генерации взаимосвязаны. Поэтому, определив экспериментально один из параметров, можно вычислить другой по формуле:

$$\mu = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0{,}693}{g}$$

Продолжительность скорости размножения в экспоненциальной фазе различна у разных микроорганизмов. Так, для E. coli она может быть 20-30 мин; для азотобактера - 70-80 мин; для клубеньковых бактерий - до 90 мин. Рост культуры в экспоненциальной фазе называют сбалансированным, считая, что в это время все компоненты клетки синтезируются в одинаковой степени. Однако в условиях периодической культуры рост является сбалансированным в течение очень короткого интервала времени. В процессе роста культуры происходит изменение состава питательной среды; питательные вещества потребляются, а ненужные продукты метаболизма накапливаются. Реакцией клетки на изменения качества среды является изменение интенсивности синтеза РНК, белка, полисахаридов и других необходимых компонентов.

Качественные изменения среды являются основной причиной замедления роста культуры. В результате наступает *стационарная фаза.* Она соответствует периоду, когда число жизнеспособных клеток в популяции перестает увеличиваться, хотя многие из них находятся в стадии активного деления. В этой фазе количество вновь появляющихся и переходящих в стадию покоя клеток

приблизительно равно. На протяжении всей фазы численность популяции не изменяется. У разных видов она наступает через различные промежутки времени: у E. coli через 24 ч, у азотобактера через 72 ч. Количество клеток в стационарной фазе достигает максимума, размеры их становятся близкими к размерам клеток исходного посевного материала. После достижения стационарной фазы жизнеспособность клеток снижается и начинается *фаза отмирания.*

В этой фазе гибель микробов превышает скорость их размножения. Отмечаются морфологические и физиологические изменения клеток, появляются инволюционные формы. Отмирание бактерий в культуре наступает под влиянием различных причин: истощения питательной среды, накопления в среде вредных продуктов метаболизма, изменения физико-химических свойств среды в неблагоприятную сторону «естественного старения» клеток. Некоторая часть клеток гибнет в результате спонтанного автолиза, т. е. под действием собственных ферментов. Основную роль здесь играют протеолитические ферменты . Они вызывают разрушение белковых веществ в клетке, что приводит ее к гибели. Спонтанный автолиз наблюдается у всех видов микроорганизмов. Решающим фактором в процессе автолиза является накопление в стационарных культурах продуктов метаболизма.

Таким образом, цикл развития периодической культуры довольно сложный. Действующие на клетку факторы очень многочисленны и меняются по ходу развития культуры. Вначале культура страдает от высокой концентрации питательных веществ по сравнению с их содержанием в среде, с которой взят посевной материал, т. е. происходит торможение роста избытком субстрата. Через некоторое время культура начинает развиваться с возрастающей скоростью, достигая ее максимального уровня. Затем постепенно сказывается исчерпание элементов питания и отравление продуктами обмена, развитие культуры замедляется и в конце концов прекращается.

4.3.1. Непрерывные культуры

Периодические культуры - не единственный способ выращивания микроорганизмов. В 50-е годы был разработан и теоретически обоснован метод непрерывного культивирования микроорганизмов, или метод проточных культур. Сущность его состоит в том, что в сосуд ферментер, где производится выращивание бактерий, все время поступает свежая питательная среда и одновременно с такой же скоростью выводится культуральная жидкость. Таким образом, микроорганизмы находятся все время в постоянных условиях в отношении наличия питательных веществ и продуктов обмена. Последние фактически отсутствуют в проточных культурах. Регулируя скорость проточной среды, можно управлять развитием бактериальной популяции, например задержать культуру в логарифмической фазе роста на любое длительное время.

Непрерывное культивирование осуществляется в специальных приборах - хемостатах и турбидостатах. В хемостате рост культуры контролируется концентрацией субстрата. Поддерживая постоянной концентрацию одного из необходимых субстратов (источник азота или углерода) путем регулирования скорости протока среды, можно стабилизировать скорость роста культуры и плотность популяции. При больших скоростях протока среды рост культуры более интенсивный и приближается к максимальному, при меньших - более медленный вследствие ограниченного поступления субстрата. При хемостатном режиме культивирования плотность популяции ограничивается концентрацией лимитирующего субстрата. Чем выше содержание вещества, лимитирующего рост, тем выше скорость размножения популяции, т. е. скорость размножения зависит от скорости протока среды. Но увеличение скорости протока с целью устранения ограничения роста культуры субстратом приводит к вымыванию культуры, снижению плотности популяции. Это обычно происходит в тех случаях, когда скорость разбавления, называемая также коэффициентом разбавления, превышает удельную скорость роста (прирост биомассы в единицу времени, расчитанный на единицу исходной растущей биомассы). Скорость

изменения числа клеток в культиваторе хемостата (или величины биомассы) выражается уравнением:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx; \quad \frac{dx}{dt} = x(\mu - D),$$

где x - исходная растущая биомасса; D - коэффициент разбавления; t - время; μ - удельная скорость роста; - скорость прироста биомассы.

Коэффициент разбавления $D = \frac{F}{V}$, где F - скорость потока среды, мл/ч; V - объем среды в культиваторе, мл; величина D выражает смену объемов среды за 1 ч. Таким образом, скорость изменения величины биомассы клеток в хемостате равна разности между скоростью прироста биомассы и скоростью выноса ее из культиватора. Если $\mu = D$, то потери клеток в результате вымывания и прирост их в результате размножения уравновешиваются и плотность популяции остается постоянной.

В отличие от хемостатов принцип работы турбидостата основан на регулировании скорости протока среды плотностью популяции. В турбидостате плотность популяции контролируется с помощью фотоэлемента, соединенного с реле, которое регулирует подачу среды. Как только плотность популяции достигнет заданного уровня, реле срабатывает и в культиватор начинает поступать свежая среда. В результате концентрация клеток уменьшается до определенного уровня, после чего автоматически отключается подача среды. В турбидостате достигается максимальная скорость роста культуры при большей плотности популяции и большей точности регулирования поступления среды.

Метод непрерывного культивирования нашел широкое применение в изучении физиологии микроорганизмов, так как он позволяет культивировать микроорганизмы в контролируемых условиях. Крайне полезным оказался этот метод в микробиологической промышленности, так как он дает возможность управлять биосинтетическими процессами микроорганизмов.

4.3.2. Синхронизированные культуры

Синхронизированными называются культуры, где все клетки делятся одновременно. В естественных культурах - периодических и проточных - такого явления не наблюдается. Даже в экспоненциальной фазе роста в культуре содержатся неделящиеся и находящиеся на разных стадиях деления клетки. Синхронное деление клеток вызывают искусственно, воздействуя на культуру различными факторами. Одним из наиболее распространенных методов является воздействие на культуру субоптимальной (пониженной) либо супероптимальной (повышенной) температурой. Предполагается, что неблагоприятные температуры больше сказываются на развитии делящихся клеток, более чувствительных к действию различных факторов. В результате происходит торможение развития. За это время к делению подготовятся другие клетки культуры. Следующее за ним воздействие оптимальной температуры постепенно вызывает синхронное деление клеток.

Для получения синхронных культур используют также метод вынужденного голодания. Клетки помещают на неполноценную среду, культивируют, затем переносят на полноценную. У фотосинтезирующих бактерий синхронные культуры можно получить чередованием световых и темновых режимов культивирования. Известны также механические методы: это пропускание культуры через специальные фильтры (отбор клеток одинакового размера) и центрифугирование. Последний метод основан на том, что клетки, находящиеся в начале цикла деления, более мелкие и оседают медленнее. Синхронные культуры используют для изучения синтеза отдельных клеточных компонентов в процессе деления клетки.

Глава 5

ДЕЙСТВИЕ НА МИКРООРГАНИЗМЫ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

В естественных условиях микроорганизмы подвергаются воздействию разных по своей природе факторов. Влияние этих факторов может либо стимулировать развитие, либо вызывать торможение метаболизма, либо приводить клетки к гибели. Условно факторы внешней среды можно разделить на физические, химические и биологические.

5.1. ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

К физическим факторам, определяющим жизнеспособность микроорганизмов и интенсивность их развития, относятся влажность, осмотическое и гидростатическое давление, температура, радиация. Прокариотические микроорганизмы в отличие от эукариотических существуют в более широком диапазоне изменений.

5.1.1. Влажность

Ни один из экологических факторов не определяет в такой мере развитие микроорганизмов, как влажность. Обмен веществ, биосинтез клеточных структур, т. е. все биохимические реакции возможны только в водной среде. В среде, лишенной влаги, прекращается питание, так как в сухом виде питательные вещества не могут транспортироваться в клетку. Влажность определяет доступность питательных элементов для микроорганизмов. Особенно нуждаются во влаге клетки, находящиеся в стадии роста.

Микроорганизмы характеризуются различной чувствительностью к недостатку влаги. Наибольшей чувствительностью отличаются нитрифицирующие и азотфиксирующие бактерии. Некоторые микроорганизмы более устойчивы к пониженному содержанию влаги. В высушенном состоянии они могут сохранять жизнеспособность продолжительное время. Устойчивость к высу-

шиванию у разных видов микробов весьма различна. Так, например, гонококки и холерный вибрион переносят высушивание в течение 2 дней, туберкулезная палочка - в течение 90 дней. Особенно высокой устойчивостью к высушиванию характеризуются споры микробов.

Микроорганизмы в высушенном состоянии остаются бездеятельными, так как при отсутствии влаги у них прекращаются или предельно замедляются все процессы метаболизма - происходит торможение жизнедеятельности, наступает так называемое состояние анабиоза. В этом состоянии у микроорганизмов обмен веществ сведен до минимума, но жизнеспособность клеток сохраняется. При последующем увлажнении таких микроорганизмов все функции жизнедеятельности восстанавливаются.

Микроорганизмы в природе часто подвергаются обезвоживанию при контакте с сухой почвой, сухим воздухом или сухими растительными остатками. В северных и средних широтах в зимний период клетки микроорганизмов теряют часть воды в результате замораживания.

В практике высушиванием пользуются для консервирования овощей, фруктов и различных лекарственных трав. Для сохранения производственных и музейных культур микробов, живых прививочных препаратов (вакцин) широко применяется высушивание путем замораживания в условиях вакуума (лиофильная сушка). Микробы при этом переходят в состояние анабиоза, стойко и длительно сохраняя свои свойства.

Механизм действия обезвоживания. Известно, что в клетках микроорганизмов содержится до 85 % воды. Распределение ее в клетке неравномерное и зависит от влажности среды, в которой находятся микроорганизмы. Согласно гипотезе Е. Кога (1966), внутриклеточная вода может быть в четырех состояниях:

1. При влажности среды выше 20 % вода целиком заполняет клетку и функционирует как непрерывная среда. При данной влажности все биохимические реакции протекают нормально.

2. При влажности ниже 20 % вода с коллоидами клетки образует гель и ферментативные процессы затруднены.

3. При влажности 5 - 10 % вода располагается по отдельным участкам клетки, но обмен молекулами воды между участками еще возможен; ферментативные реакции практически отсутствуют.

4. При влажности ниже 5 % вода строго локализована и изолирована по отдельным структурам клетки.

При обезвоживании микробной биомассы вода перемещается внутри клетки от центральной части к периферии. Вместе с водой перемещаются и растворенные в ней вещества. При этом периферийные районы клетки, прилегающие к цитоплазматической мембране, насыщаются растворенными в воде клеточными веществами, т. е. здесь концентрируются органические вещества типа углеводов, свободных аминокислот, витаминов. С повышением их концентрации может происходить коагуляция или даже денатурация белка, что приводит к инактивации отдельных ферментов. Инактивация ферментов и потеря клетками жизнеспособности во время обезвоживания могут наступить в результате сахароаминных реакций, протекающих между карбонильной группой глюкозы и свободными аминогруппами белка клетки. При длительном процессе обезвоживания клетки могут терять жизнеспособность в результате дезорганизации ферментативных реакций, приводящих к автолизу. Грубых морфологических изменений при обезвоживании микроорганизмов не наблюдается.

5.1.2. Осмотическое давление

Доступность воды для микроорганизмов определяется ее активностью в среде (a_ω), которая зависит от величины осмотического давления, или концентрации растворенных веществ. Чем выше концентрация раствора, тем выше его осмотическое давление и ниже активность воды. Любое вещество, содержащееся в растворителе (в данном случае - воде), притягивает молекулы растворителя и таким образом снижает их подвижность. Численно активность воды (a_ω) равна отношению давления водяных паров над раствором к давлению паров над чистой водой. Эта величина выражается в долях единицы. Активность воды определяют согласно уравнению:

$$a_\omega = \frac{P}{P_0} = \frac{n_2}{n_1 - n_2},$$

где a_ω - активность воды; P - давление водяного пара раствора; P_0 - давление пара чистой воды; n_1 - число молей воды; n_2 - число молей растворенного вещества (1 кг воды, или 1 л, содержит 55,51 молей). Для дистиллированной воды $a_\omega = 1$.

Из гипертонических растворов, т. е. из таких, у которых осмотическое давление выше, чем в клетке, микроорганизмы не могут потреблять воду. Это явление известно в биологии как физиологическая сухость. В естественной среде оно имеет место в засоленных почвах и соленых водоемах. Нижние пределы активности воды, в которых возможен рост микроорганизмов, разные для разных видов. Например, для дрожжей родов Candida и Saccharomyces нижний предел a_ω составляет 0,93 для Bac. subtilis - 0,949, E. coli - 0,935. Экстремальные галофилы в присутствии NaCl развиваются при a_ω 0,75-0,78. За исключением галофилов, большинство бактерий активнее развивается в питательном бульоне, где активность воды составляет 0,999. Внесение в среду органических и минеральных веществ снижает активность воды. Особенно сильное снижение вызывает внесение NaCl. При концентрации его 27-30 % $a_\omega = 0,8$. Глюкоза и сахароза оказывают более слабое влияние на активность воды при содержании их в растворе в таких же количествах, как и NaCl (27-30 %) $a_\omega = 1$.

Осмотическое давление внутри клеток бактерий соответствует 35-40 атм. Если бактерии поместить в раствор с более высоким осмотическим давлением, то они погибнут в результате плазмолиза, а если раствор имеет более низкое давление, то гибель клеток произойдет от плазмоптиза. Однако наличие ригидной клеточной стенки обеспечивает относительную устойчивость бактерий к колебаниям осмотических условий. Большинство бактерий мало чувствительно к изменению концентраций солей в пределах 0,5-3,0 %.

Более того, известен ряд микроорганизмов, которые нормально развиваются при высоком осмотическом давлении. Например, некоторые виды дрожжей размножаются в меде,

бактерии - в соленой рыбе. Такие микроорганизмы называются осмофильными. В большинстве своем это галофилы (любящие соль), характеризующиеся повышенной потребностью в хлористом натрии. Одни из них слабо галофильные - лучше развиваются на средах, содержащих 2-5 % хлористого натрия. К ним относятся бактерии родов Achromobacter и Pseudomonas, обитающие в морской воде. Другие - крайне галофильные - нуждаются в более высокой концентрации хлористого натрия. Это все виды бактерий рода Halobacterium и ряд бактерий рода Micrococcus и Sarsina.

Крайне галофильные микроорганизмы обнаружены в водах Мертвого моря, солончаковых почвах, а также рассолах для солений продуктов. Они обычно вызывают порчу соленой рыбы и мяса.

Крайне галофильные микроорганизмы, или экстремальные галофилы, адаптированы к существованию в средах повышенного содержания солей за счет поддержания высокой внутриклеточной концентрации растворенных веществ. Так, у Halobacterium nalobium концентрация ионов калия составляет 30-40 % сухого вещества клетки. Потребность в калии у галобактерий может стать столь высокой, что этот ион становится фактором, лимитирующим рост культуры.

Регуляция активности внутриклеточной воды осуществляется клеткой путем изменения концентрации неионных растворенных веществ, таких, как многоатомные спирты: глицерин, арабит. Роль спиртов состоит в том, что они поддерживают низкую величину a_ω в клетках, выросших при высоких концентрациях солей. Если в клетке концентрация солей ниже, чем в питательной среде, то активность внутриклеточной воды будет выше, чем в среде. В таком случае бактерии не смогут потреблять воду и развиваться не будут. Клетки регулируют активность внутриклеточной воды путем регуляции синтеза и распада многоатомных спиртов, концентрация которых изменяется в ответ на изменение концентрации солей во внешней среде. Ферментный аппарат экстремальных галофилов хорошо приспособлен к высоким концентрациям солей, особенно ионов калия, преобладающих в цитоплазме. Они необходимы ферментам либо для проявления активности, либо для стабилизации. Потребность в повышенном содержании солей проявляет белоксинтезирующая система галобактерий. Для

сохранения стабильности рибосом требуется высокая солевая концентрация - до 3М KCl и 0,1М $MgCl_2$, причем KCl нельзя заменить NaCl, иначе происходит беспорядочная агрегация рибосом. При низких концентрациях солей (0,001 $MgCl_2$), поддерживающих в норме структуру рибосом E. coli, галобактерии теряют большую часть белков. Синтез белка у галофилов активно протекает в присутствии 3,8М KCl. Особенностью белкового синтеза у данных бактерий является нечувствительность к антибиотикам, ингибиторам данного процесса у других бактерий: хлорамфениколу, стрептомицину, эритромицину. Высокие концентрации солей стабилизируют гидрофобные связи и обеспечивают создание активной конфигурации белков экстремально галофильных бактерий, что особенно важно для ферментных белков.

Изучение биохимической основы галофилии показало, что некоторые ферменты крайне галофильных бактерий функционируют только при высоком содержании хлористого натрия. Кроме того, ионы натрия необходимы им для усвоения из среды питательных веществ. Так, Halobacterium solinarium ионы натрия нужны для потребления глутамата; морским псевдомонадам - для потребления сахаров и ряда аминокислот.

5.1.3. Гидростатическое давление

Природными средами, где преобладают высокие давления, являются моря и океаны, глубинные месторождения нефти. Гидростатическое давление, как экологический фактор, влияет на распространение и активность микроорганизмов. В океане давление возрастает с глубиной, на каждые 10 м глубины давление повышается на 1 атм. Среднее давление на дне Тихого океана 380 атм. В сочетании с низкой температурой это очень неблагоприятные условия для жизни. Немногие из обычных бактерий способны активно развиваться в данных условиях. Изучение выделенной из морских глубин Ps. bathijeetes показало, что при давлении 1000 атм и 3^0 С, т.е. условиях, близких к естественным, она развивалась крайне медленно: лаг-фаза длилась около 4 месяцев, время генерации в экспоненциальную фазу составляло 33 сут, в то время

как при 1 атм и 37^0 С время генерации было менее 1 ч. Даже невысокое гидростатическое давление (50-150 атм) оказывает неблагоприятное биологическое действие. Так, у галобактерий и фотосинтезирующих бактерий происходит разрыв газовых вакуолей, если давление в среде повышается на 5 атм (при норме 1 атм). Отрицательное действие давления усиливается в неблагоприятных условиях температуры и кислотности среды. Особенно возрастает чувствительность бактерий к давлению у крайних нижних границ температурной области роста. При низкой температуре даже невысокое давление 50-100 атм сильно ингибирует рост. Рост E. coli прекращается даже при 100 атм и 30^0 С, если pH среды понизить до 5,2. Таким образом, эффект действия повышенного давления зависит от изменения оптимальных условий роста микроорганизмов.

Но в природе существуют бактерии, которые выдерживают огромные давления. Такие бактерии называются барофильными (от греч. baros - тяжесть). Представителем является Bac. submarinus, выделенный из Тихого океана с глубины 5000 м. Из нефтяных скважин изолированы барофильные сульфатредуцирующие бактерии. Они оказались более активными при сравнительно высоком давлении (400-500 атм). Большинство же микроорганизмов относится к баротолерантным и выдерживает довольно высокое давление (630 атм) только в течение 1 ч. При длительном воздействии гидростатического давления происходит денатурация белков и инактивация ферментов.

Повышенное давление оказывает ингибирующее действие на синтез белка. Наиболее чувствительной стадией является аминоацилирование тРНК и связывание ее с рибосомами (полисомами). У некоторых микроорганизмов давление ингибирует транспорт растворенных веществ в клетку и тем самым тормозит их рост. У психрофильных бактерий давление может повреждать клеточную мембрану. Отмечается и ряд других изменений: увеличение скорости некоторых химических и ферментативных реакций; уменьшение объема органических коллоидов; увеличение вязкости жидкостей и повышение электролитической диссоциации.

Максимальное давление, при котором возможен рост того или иного микроорганизма, определяется барочувствительностью

жизненно важных физиологических процессов: белкового синтеза, образования и использования АТФ, транспорта растворенных веществ через мембрану, регуляторных функций клетки.

5.1.4. Температура

Существует большое разнообразие температурных условий в природных местообитаниях микроорганизмов. Свыше 80 % биосферы принадлежит к постоянно холодным областям. В одних областях (глубины океанов) низкая температура (около 5^0 С) остается постоянно, в других (зоны с умеренным климатом) - она меняется в течение года, составляя в среднем 12^0 С. Значительно меньшую часть биосферы занимают места с постоянно высокой температурой. Это действующие вулканы (1000^0 С), фумаролы (до 500^0 С), горячие источники (93-101^0 С), компосты (до 70^0 С), а также отходы технологических процессов, например, охлаждающиеся воды ТЭЦ (55-80^0 С). Основная продуктивная часть биосферы принадлежит к областям с меняющимся температурным режимом. Колебания температуры в течение года могут составлять от 0 до 30^0 С в зонах умеренного климата, от -80 до $+5^0$ С и выше в зоне холодного климата.

Верхние и нижние границы температурного диапазона в разных средах занимают исключительно микроорганизмы. Температура определяет не только интенсивность их развития, но и саму возможность их существования. В зависимости от значения температуры и продолжительности воздействия она может регулировать рост, изменять морфологию и метаболизм, вызывать гибель микроорганизма. Эту температурную зависимость выражают тремя кардинальными точками: минимум - температура, при незначительном снижении которой скорость роста микроорганизмов стремится к нулю, оптимум - температура, при которой скорость роста микроорганизмов является максимальной; максимум - температура, при незначительном повышении которой скорость роста микроорганизмов стремится к нулю.

По отношению к уровню оптимальной температуры все микроорганизмы делят на три основные группы: психрофилы, мезофилы и термофилы. Для психрофилов оптимальной

температурой развития является 15-20^0 С. К ним относятся обитатели холодных источников, северных морей и океанов, а также глубоких озер. Рост этих микроорганизмов возможен в пределах от точки замерзания среды до 30^0 С. Психрофилы включают большинство светящихся бактерий (род Photobacterium). На питательных средах их культуры излучают свет. Свечение белое, зеленовато-лунное или голубое. Представитель Photobact. fischeri, выделенный из морской воды, растет при 5-10^0 С.

Одним из факторов, определяющих низкую оптимальную температуру роста психрофилов, является высокая чувствительность белкового синтеза к повышению температуры. Психрофильная бактерия Micrococcus cryophilus при 22,5^0 С прекращает синтез белка и утрачивает жизнеспособность. У Photobacterium ficheri при 25^0 С не синтезируются ферменты биолюминесценции и свечение бактерий не происходит. Низкий температурный оптимум роста психрофилов определяется также снижением мощности окислительно-восстановительных ферментов при повышении температуры. Рост психрофилов при низких температурах обеспечивается их способностью регулировать жирно-кислотный состав клеточных мембран. С понижением температуры в фосфолипидах мембран увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот. Это позволяет мембранам находиться при низких температурах в функционально активном жидкокристаллическом состоянии.

К **мезофилам** относятся микроорганизмы, имеющие температурный оптимум 28-37^0 С. Это большинство широко распространенных сапрофитных и патогенных бактерий (E. coli, Ps. pyocyaneum, Staph. albus, Bas. Subtilis и т. д.).

Термофилы представляют интересную экологическую группу микроорганизмов. К ним относятся микроорганизмы с температурным оптимумом 50-60^0 С. Они широко распространены в природе, обнаруживаются в почве, воде, иле, торфе, навозе. Но самое интенсивное развитие их наблюдается в местах, постоянно или длительное время подвергающихся воздействию высокой температуры. Естественными очагами обитания термофилов, являются горячие источники. Среди термофилов обнаружены как споровые, так и неспоровые бактерии и актиномицеты. Термофилия

широко распространена среди анаэробных бактерий. Известны маслянокислые, целлюлозные, метанообразующие бактерии. В термальных источниках Камчатки и Курильской гряды чаще других встречаются бактерии рода Clostridium, из горячих ключей Тиберии выделены неспоровые бактерии род. Hyphomicrobium, в почвах и водах Крайнего Севера (о-ва Диксон, Новая Земля) - установлено наличие термофилов: Bac. coagulans и Bac. stearothermophilus.

В 70-80 гг. выявлен ряд новых термофильных микроорганизмов с высоким оптимумом роста - 80-90^0 С. Они выделены в особую группу экстремально-термофильных бактерий. Представителем является Thermus aquaticus - неспороносная грамотрицательная палочка, выделенная американским исследователем А. Броком в 1968 г. из ила кипящих источников Иеллоустонского национального парка. Оптимум развития этой бактерии соответствует температуре 70-80^0 С, максимальная температура роста доходит до 93^0 С. В 1970 г. подобные бактерии найдены в горячих источниках Японии. В связи с тем, что данные бактерии не обнаруживаются в холодных источниках (минимальная температура роста 40^0 С), есть основание считать, что они приспособлены к обитанию только в горячей воде.

Происхождение термофилов неизвестно. Существует мнение о первичном возникновении термофилов в период преобладания на земном шаре повышенных температур, и они рассматриваются как наиболее древние формы микроорганизмов. Высказывается и другое мнение, согласно которому термофилы произошли в результате спонтанных мутаций из мезофилов. Однако в этом случае понадобилась бы реорганизация всего организма, так как по современным данным структурные клеточные компоненты термофилов, такие, как клеточная стенка, мембраны, рибосомы, а также входящие в их состав белки, липиды, ферменты отличаются от аналогичных компонентов мезофилов как качественно, так и количественно.

Термофильные микроорганизмы разделяют на четыре подгруппы: термотолерантные термофилы - максимальная температура роста 55-60^0 С, оптимальная 35-40^0 С, способны расти и при 20^0 С; факультативные термофилы - максимальная и оптимальная температура роста 50-65^0 С. Как и термофилы

предыдущей группы, они способны расти при 20^0 С. Строгие, или облигатные, термофилы - максимальная и оптимальная температуры роста 65-70^0 С, минимальная - 40^0 С. Экстремальные термофилы - максимальная температура роста 80-90^0 С, при температуре 40^0 С и ниже рост отсутствует.

Биологические особенности термофилов. В настоящее время уделяется много внимания выяснению причин, обуславливающих возможность развития термофилов при повышенных температурах. Развитие молекулярной биологии дало возможность детально изучить функциональную зависимость различных клеточных компонентов от высокой температуры. В 1969 г. американский исследователь А. Брок высказал мнение о решающей роли клеточной мембраны в предохранении клетки от теплового повреждения. Аналогичные мнения имеются и в отношении роли клеточной стенки.

Клеточная стенка термофильных бактерий обладает большой устойчивостью к действию высокой температуры. Это обусловлено ее химическим составом и более термостабильным механизмом синтеза компонентов клеточной стенки.

Мембрана термофилов также отличается высокой механической прочностью, судя по осмотической устойчивости протопластов и сферопластов этих микроорганизмов. Предполагают, что это связано с составом мембранных липидов. Установлено, что в составе мембранных липидов термофильных бактерий преобладают жирные кислоты с длинными и разветвленными цепочками.

Рибосомы, выделенные из термофильных бактерий, обладают значительно большей термостабильностью, чем рибосомы, выделенные из мезофильных форм. Наибольшая стабильность рибосом у термофилов обусловлена различием в составе и структуре рибосомальных протеинов. Изучение термостабильности рибосом у бактерий Thermus aquaticus и E. coli (оптимальные температуры роста соответсвенно 70^0 С и 37^0 С) показало, что рибосомы первых устойчивы к нагреваг нию до 79^0 С, в то время как вторых разрушаются при нагревании до 59^0 С. Исследование химического состава рибосом выявило различия в содержании белка и РНК: у Thermus aquaticus белка ~ 59 %, РНК - 41 %, у E. coli белка - 41 %,

РНК - 59 %. Увеличение содержания белка, по-видимому, обеспечивает повышенную термостабильность рибосом клетки.

Кроме того, термофилы характеризуются более высоким содержанием оснований гуанина и цитозина в молекуле рибосомальной и транспортной РНК. Это также связывают с термостабильностью клетки. У термофильных микроорганизмов по сравнению с мезофильными наблюдается более ускоренный синтез иРНК. Это, возможно, позволяет термофилам осуществлять быстрый синтез белка.

Аналогичными свойствами выявлены и у ДНК термофилов. Она также содержит повышенное количество ГЦ и отличается термостабильностью.

Ферменты термофильных микроорганизмов имеют более высокий температурный оптимум. Особенно высокой терморезистентностью характеризуются ферменты экстремально-термофильных бактерий. Так, аминоацилирующие ферменты, участвующие в синтезе белка у Thermus aquaticus, имеют температурный оптимум 70^0 С, т. е. температурный оптимум аминоацилирования коррелирует с температурным оптимумом роста этой бактерии. Высокая термостабильность присуща также ферментам гликолитического превращения углеводов и гидролитическим ферментам. Например, фосфофруктокиназа и фосфоглюкокиназа не инактивировались при прогревании в течение часа при 80^0 С. Среди гидролитических ферментов высокой термоустойчивостью обладает α-амилаза. Она не инактивируется при нагревании 65-70^0 С в течение 24 ч.

Перечисленные свойства термофильных бактерий если не полностью, то в значительной мере обусловливают термостабильность бактерий. Многие из этих свойств у облигатно-термофильных микроорганизмов закреплены наследственно, и поэтому последние не могут развиваться в обычных температурных условиях.

Механизм действия температуры на микроорганизмы. Отрицательное влияние на жизнедеятельность микроорганизмов оказывает как низкая, так и высокая температура. Однако степень влияния и механизм действия разной температуры на клетку

совершенно различны. Низкая температура чаще всего вызывает бактериостатический эффект, проявляющийся в прекращении роста и размножения бактерий. Механизм действия низкой температуры состоит прежде всего в затормаживании биохимических процессов, и только в случае образования кристаллов льда внутри клетки происходят повреждение и разрыв клеточных структур. Разрушающее действие низкой температуры чаще всего имеет место в логарифмической фазе роста культуры.

Наиболее губительна для микроорганизмов высокая температура, обусловливающая свертывание белка, а отсюда - нарушение активности ферментов, проницаемости клеточной стенки, расстраивание слаженного равновесия всех биохимических процессов.

Известно, что повышение температуры способствует ускорению биохимических реакций. Но это ускорение не одинаково для всех типов реакций из-за разного температурного оптимума активности ферментов. В результате происходит дезорганизация внутриклеточного физико-химического равновесия, обеспечивающего нормальное развитие организма. Усиление действия термического фактора сопровождается также изменением физических структур макромолекул (протеина, глюцидопротеиновых комплексов и др.).

Рядом исследователей отмечается, что при нагревании бактериальных клеток повышается чувствительность их к действию протеолитических ферментов, а процессу свертывания белка предшествует выделение в окружающую среду РНК. Выделение РНК начинается при более низких температурах, чем денатурация белка.

5.1.5. Радиация

На все живые организмы действуют излучения разных типов - естественные и искусственные. К естественным относятся неионизирующая солнечная радиация, ионизирующая радиация космических лучей, радиоактивных изотопов, содержащихся в скальных породах, почве, воде, атмосфере.

Искусственное ионизирующее излучение возникает в результате испытаний ядерного оружия, работы атомных электростанций и других источников, использующих атомную энергию.

Излучение действует на организм или вещество только в том случае, если оно им поглощается. Результат действия излучения зависит от длины волны и поглощенной дозы.

Большая часть солнечной радиации приходится на длинноволновые инфракрасные (тепловые) лучи, лучи видимого света и расположенные рядом невидимые коротковолновые ультрафиолетовые лучи.

Видимый свет (длина волны 300-1000 нм) оказывает благоприятное действие на развитие только небольшой группы пурпурных и зеленых фотобактерий, в также цианобактерий, которые используют энергию света для осуществления фотосинтеза. Все остальные бактерии лучше развиваются в полной темноте. Рассеянный свет хотя и не оказывает губительного действия, но значительно задерживает размножение.

Прямым солнечным лучам свойственно бактерицидное действие. Бактерицидность их связана с активностью коротковолновой части спектра - с ультрафиолетовыми лучами (длина волны 10-300 нм). Действие ультрафиолета может быть либо летальным (смертельным), либо мутагенным, т. е. вызывающим наследственные изменения. Эффективность действия УФ зависит от биологических свойств облучаемого микроорганизма и дозы облучения. Наиболее активными являются лучи с длинной волны около 260 нм. Они поглощаются пуриновыми и пиримидиновыми основаниями нуклеиновых кислот. Под действием УФ-лучей в молекуле ДНК происходит димеризация тимина - образование ковалентных связей между соседними основаниями тимина. Наличие димеров тимина препятствует репликации ДНК и клетка теряет способность к делению.

Образование димеров в ДНК служит основной причиной летального и мутагенного действия ультрафиолетового облучения на биологические системы. Около 90 % биологических повреждений, вызванных УФ, связано с димеризацией оснований в ДНК. Кроме образования димеров УФ-лучи могут вызывать разрыв водородных связей между комплементарными нитями ДНК, гидроксилирование цитозина и урацила, образование поперечных сшивок.

Внешним проявлением изменений в структуре ДНК может быть несбалансированный рост клеток, изменение их морфологии, прекращение деления. Повреждающее действие ультрафиолетового облучения частично снижается обработкой культур видимым светом. Этот процесс получил название фотореактивации. В основе фотореактивации лежит активация видимым светом с длиной волны от 360 до 420 нм фермент-субстратного комплекса, который образуется соединением фермента фотореактивации с димером ДНК. Активация приводит к разрыву ковалентных связей димера и образованию мономеров. Более эффективное восстановление повреждений ДНК происходит при темновой репарации.

Действие ионизирующей радиации (длина волны менее 10 нм) менее специфично, чем ультрафиолета, хотя также оказывает в основном влияние на нуклеиновые кислсты и вызывает либо летальный, либо мутагенный эффект.

Повреждения ДНК, вызываемые ионизирующими излучениями, представляют собой одноцепочечные разрывы в ДНК, модификации пиримидиновых оснований, которые вызывают свободные радикалы, образующиеся под действием радиации.

Некоторые микроорганизмы обладают высокой устойчивостью к действию ионизирующей радиации. Так, в воде атомных реакторов часто обнаруживается бактерия Micrococcus radiodurans, содержащая красный пигмент и характеризующаяся чрезвычайной устойчивостью как к ионизирующему, так и ультрафиолетовому излучению.

Одной из причин устойчивости является особенность нуклеотидного состава ДНК этой бактерии: у нее содержится меньше АТ пар. Отношение Г + Ц/А + Т у Microc. radiodurans в 1,6 раза больше, чем в E. coli. Кроме того, у Microc. radiodurans высокая эффективность удаления димеров тимина. Процесс репарации исключительно точен. Резистентность к радиации коррелирует у микроорганизмов со способностью к репарации. Исключительно эффективную систему репарации имеет другой вид микрококков - Microc. radiophilus. Он обладает наивысшей радиорезистентностью к γ-излучению и УФ-облучению - в 25-50 раз устойчивее кишечной палочки (УФ-резистентного штамма E. coli K 12 AB 1157).

5.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

К физико-химическим факторам, оказывающим прямое или косвенное влияние на жизнедеятельность микроорганизмов, относится кислотность среды - pH; к химическим - природные и синтетические химические соединения.

5.2.1. Реакция среды

Реакция среды определяется активной концентрацией водородных и гидроксильных ионов, образующихся при электролитической диссоциации химических соединений в водном растворе. Концентрация водородных ионов обусловливает наличную (актуальную) кислотность. Для количественной характеристики реакции среды введен водородный показатель - pH (отрицательный логарифм концентрации водородных ионов). Концентрация водородных ионов влияет на рост и размножение микроорганизмов, определяет границы их существования. Причем, влияние может выражаться в непосредственном воздействии H^+ на клетку, или проявляться косвенно - через воздействие на ионное состояние разных веществ, а отсюда и на доступность их для микроорганизмов. Кроме того, pH оказывает вличние на стабильность и функции макромолекул в биологических процессах, на равновесие электрических зарядов на поверхности клетки.

Большая часть микроорганизмов активнее развивается при концентрации ионов водорода, близкой к pH 7, т. е. нейтральной реакции среды. Предельные концентрации ионов водорода, выше и ниже которых прекращается рост и размножение, соответствуют pH 1 и pH 11. При данных значениях pH способны развиваться лишь немногие бактерии и грибы.

По отношению к кислотности среды микроорганизмы могут быть разделены на следующие группы: нейтрофилы, ацидофилы и алкалофилы. Нейтрофилы предпочитают нейтральную реакцию среды, но могут развиваться в диапазоне pH от 4 до 9. Типичными нейтрофилами являются аммонифицирующие, нитрифицирующие, азотфиксирующие бактерии. Ацидофилы (кислотолюбивые) облигатные растут в узком диапазоне pH – 4 и ниже, факуль-

тативные ацидофилы, кроме кислой среды, могут развиваться и в нейтральной среде. Это уксуснокислые и молочнокислые бактерии. Среди облигатных ацидофилов имеются организмы, растущие в кислой среде при умеренной температуре (род Thiobacillus) - мезофильные ацидофилы, и организмы, развивающиеся в кислой среде при температуре около 70^0 С - термофильные ацидофилы. Они представлены весьма ограниченным числом видов - Thermoplasma acidophila, Sulfolobus acidocaldarius. Алкалофильных (щелочелюбивых) микроорганизмов, нуждающихся для развития в щелочной среде (pH 10 и выше), в природе еще меньше - только отдельные представители рода Bacillus (Bac. pasteurii, расщепляющий мочевину, растет при pH 11).

Мало известно о механизмах устойчивости микроорганизмов к кислоте или щелочи. Не обнаружено каких-либо структурных или физиологических свойств облигатных ацидо- и алкалофилов, связанных с их устойчивостью к кислоте или щелочи. В большей мере здесь имеет место косвенное влияние концентрации водородных ионов на развитие тех или иных микроорганизмов. При низких значениях pH понижается растворимость углекислоты и доступность углерода для микроорганизмов, а растворимость некоторых катионов, как Cu^{2+}, Al^{3+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} увеличивается и может достигать таких уровней, которые токсичны для многих микроорганизмов. При высоких значениях pH, т. е. в щелочной среде, понижается растворимость многих катионов, таких как Fe^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}; они осаждаются в виде карбонатов или фосфатов и становятся недоступными для микроорганизмов.

Изменения pH среды могут вызвать у некоторых микроорганизмов компенсаторные ферментативные сдвиги. Так, E. coli реагирует на повышение кислотности среды синтезом декарбоксилаз аминокислот, а на повышение щелочности среды - синтезом дезаминаз, которые вызывают декарбоксилирование или дезаминирование аминокислот. Продукты реакций нейтрализуют повышенную кислотность или щелочность среды.

Внутриклеточный pH у ацидофилов и алкалофилов близок к нейтральному значению. Постоянство внутриклеточного pH, независимо от pH среды, поддерживается у одних микроорганизмов (Thermoplasma acidophilus) благодаря непроницаемости цито-

плазматической мембраны для ионов водорода, у других (Sulfolobus acidocaldarius) - благодаря активным метаболическим процессам удаления ионов H^+ или OH^-. Способность ацидофилов и алкалофилов к удалению из клеток избыточных ионов водорода и гидроксила и поддержание внутриклеточного pH в нейтральной области позволяет одним развиваться в кислой среде, другим - в щелочной.

5.2.2. Молекулярный кислород

В качестве биогенного элемента кислород необходим всем организмам. Большинство организмов использует свободный молекулярный кислород и кислород органических и минеральных соединений. Только некоторые бактерии и отдельные виды простейших не нуждаются в молекулярном кислороде. Еще Пастером было замечено, что микроорганизмы различаются по своей потребности в молекулярном кислороде: одни развиваются при постоянном притоке кислорода, другие могут жить при полном его отсутствии. Микроорганизмы, развитие которых зависит от присутствия кислорода, были названы Пастером аэробами (от греч. aeros - воздух), независящие - анаэробами.

Изучение потребности микроорганизмов в кислороде выявило большое число форм, способных расти как при наличии кислорода, так и при его отсутствии. Это послужило основанием для более узкой дифференциации микроорганизмов. По отношению к кислороду микроорганизмы делятся на четыре группы: облигатные (обязательные) аэробы, облигатные анаэробы, факультативные (необязательные) анаэробы, микроаэрофилы.

Аэробы развиваются только за счет энергии, получаемой при окислении веществ кислородом. Поэтому их жизнь полностью зависит от наличия кислорода. Анаэробы в окислительных реакциях в качестве акцепторов водорода используют нитраты, сульфаты или другие окисленные соединения, т. е. энергетические процессы у них происходят без участия молекулярного кислорода. Более того, молекулярный кислород для них токсичен. Они получили название облигатных анаэробов. Но среди них есть отдельные виды родов Bacteroides, Methanobacterium, Methanosarcina, которые погибают

при следовых количествах молекулярного кислорода. Их называют строгими анаэробами. В отличие от них анаэробы, которые в процессах метаболизма не используют молекулярный кислород, но и не погибают при контакте с ним, называются аэротолерантными. Примером являются молочнокислые бактерии.

Среди облигатных аэробов также выявлены различия в отношении к уровню молекулярного кислорода в среде. Некоторые из них не могут расти при концентрации кислорода, равной или превышающей его атмосферную концентрацию - 21 %, а растут при более низких концентрациях - от 2 до 10 %. Они получили название микроаэрофилов.

Часто снижение потребности облигатных аэробов в кислороде обусловлено источником азота или энергии. Например, аэробные азотфиксирующие бактерии, как облигатный аэроб Azotobacter, для использования молекулярного азота нуждаются в пониженном содержании кислорода (около 2 %), так как кислород является ингибитором ферментного комплекса - нитрогеназы, катализирующего азотфиксацию. При развитии на среде со связанным азотом, например, аммонийным, они легко переносят атмосферную (21 %) концентрацию кислорода.

Физиологическое отношение микроорганизмов к молекулярному кислороду определяется наличием ферментов, способных реагировать с ним. Аэробные микроорганизмы используют молекулярный кислород в основном в энергетическом метаболизме в качестве конечного акцептора электронов. При этом, одним из главных продуктов окисления является перекись водорода, токсичная для клетки, и небольшие количества еще более токсичного вещества - свободного перекисного радикала, или супероксидного аниона $O_2^{\cdot -}$.

Он образуется в реакциях, катализируемых флавопротеидными ферментами в результате ступенчатого восстановления молекулярного кислорода при переносе на O_2 одного электрона:

$$O_2 + e \longrightarrow O_2^{\cdot -}$$

Супероксидный анион - реакционно активное соединение, содержащее неспаренный электрон. Он опасен для жизни клетки,

так как может участвовать в реакциях, вызывающих различные повреждения: перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, окисление SH-групп белков, повреждение ДНК и др. Защитным механизмом клетки, предотвращающим накопление супероксидных анионов в летальных количествах, является фермент супероксиддисмутаза, который катализирует превращение анионов в кислород и перекись водорода:

$$\dot{O_2^-} + \dot{O_2^-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Перекись водорода разлагается каталазой на воду и кислород.

Супероксиддисмутаза содержится у многих микроорганизмов за исключением строгих анаэробов. Эти же микроорганизмы образуют и каталазу. У молочнокислых бактерий - аэротолерантных анаэробов каталаза отсутствует и H_2O_2 разлагается пероксидазами. Супероксиддисмутаза является обязательным ферментом для любого организма, контактирующего с молекулярным кислородом.

Очень сильным окислителем является еще один кислородный радикал, так называемый синглетный кислород - $^*O_2$. Молекула его находится в возбужденном состоянии и обладает высокой токсичностью. Синглетный кислород образуется в результате спонтанных дисмутаций супероксидных анионов и в процессе фотодинамического эффекта. Под последним понимают окисление биологически важных соединений молекулярным кислородом на свету в присутствии фотосенсибилизирующих пигментов (или красителя). Поглощение видимого света приводит к переходу молекулы фотосенсибилизатора в возбужденное синглетное состояние (*Д):

$$Д + h\gamma \longrightarrow {}^*Д.$$

Молекулы, перешедшие в синглетное состояние, могут возвращаться в основное (Д) или переходить в долгоживущее триплетное состояние (^{T}Д), в котором они фотодинамически активны. Молекула фотосенсибилизатора в триплетном состоянии реагирует с O_2 и переводит его в возбужденное синглетное состояние:

$$^{т}Д + O_2 \longrightarrow Д + {}^{*}O_2$$

Синглетный кислород способен окислять многие компоненты клетки - аминокислоты, нуклеозиды, липиды, полисахариды и прочие соединения и вызывать разные нарушения клеточного метаболизма.

Активными сенсибилизаторами являются пигменты, хлорофиллы, цитохромы и поглощающие свет красители.

Защитным приспособлением клеток от действия синглетного кислорода является наличие у них каротиноидных пигментов. Эти пигменты осуществляют гашение синглетного состояния кислорода и возвращение его в исходную форму O_2. Каротиноиды являются обязательным компонентом фотосинтезирующего аппарата всех фототрофных организмов. Они же содержатся в клетках многих аэробных нефотосинтезирующих микроорганизмов, где также функционируют как гасители синглетного кислорода, образующегося при взаимодействии O_2 с клеточными цитохромами.

5.2.3. Химические соединения

Химические соединения различной природы, воздействуя на микроорганизмы, могут вызывать три эффекта: стимулирующий, бактериостатический и бактерицидный. Стимулирующий эффект наблюдается в тех случаях, когда соединение служит питательным субстратом для микроорганизма. Потребление его стимулирует рост и размножение. Если вещество подавляет рост, а после удаления его рост микроорганизма возобновляется, то такое действие называется бактериостатическим (задерживающим) или в более широком плане - микробостатическим (от греч. stasis - остановить). Бактерицидным является действие любого вещества, убивающее бактерии.

Характер действия химических веществ определяется их концентрацией и природой микроорганизма. Так, сероводород на развитие большинства бактерий оказывает бактерицидное действие, ингибируя активность дыхательных ферментов. Для серобактерий это же соединение является стимулирующим, поскольку служит для них источником энергии и ионов водорода. Таким образом, одно и

то же соединение на разные микроорганизмы влияет по-разному. Сахара в зависимости от концентрации также действуют неодинаково на одни и те же виды микроорганизмов. При сравнительно низком содержании сахар (0,5-2 %) стимулирует их развитие и служит источником энергии. Повышение концентрации сахара до 20-40 % повышает осмотическое давление раствора и в результате оказывает бактериостатическое действие на клетки. Это послужило основанием для использования сахара в пищевой промышленности (консервирование фруктов, приготовление сиропов, джемов, варенья).

Многие химические соединения даже в минимальных концентрациях оказывают на микроорганизмы отрицательное действие. Они получили название антимикробных веществ.

5.2.4. Антимикробные вещества

По своей химической структуре антимикробные вещества представляют очень неоднородную группу соединений. К ним относятся вещества органической и неорганической природы.

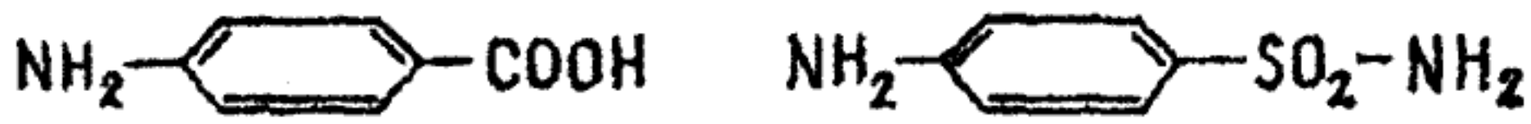
Из неорганических соединений сильным антимикробным действием обладают соли тяжелых металлов, в частности соли ртути (сулема), серебра, свинца, урана. Проникая внутрь клетки, они взаимодействуют с белками, образуя с ними нерастворимые в воде соединения - альбуминаты, вызывая тем самым их необратимую коагуляцию. В результате подавляются каталитические функции белков - ферментов и пермеаз. Некоторые из них инактивируют ферменты, связываясь с группами активного центра. Так, соли ртути, серебра, мышьяка реагируют с сульфгидрильными группами ферментов, изменяя их структуру и нарушая активность. Эти ингибиторы не отличаются специфичностью, а действуя на все ферменты, содержащие сульфгидрильные группы. Они являются сильными ядами широкого спектра действия. Бактерицидное действие их проявляется в ничтожных концентрациях (сулема убивает клетки бактерий в разведении $1:10^4$, серебро - $1:10^8$).

Некоторые сильные окислители, как хлорная известь, перекись водорода, озон, йод взаимодействуют с компонентами цитоплазматической мембраны, нарушая ее физиологические

функции. Губительное действие хлора проявляется в разведении 1: 10^3.

Из *органических соединений* антимикробным действием обладает *этиловый спирт, фенол, крезол, формальдегид* и др. Этиловый спирт (50-70 %) оказывает более сильное действие, чем концентрированный. Широко используемый в санитарно-бактериологической практике ароматический спирт фенол, или карболовая кислота, взаимодействует с цитоплазматической мембраной, вызывая растворение липидов и нарушая этим самым ее основное свойство - полупроницаемость. Вегетативные клетки бактерий быстро гибнут от 3-5 %-ного раствора фенола. Очень ядовит также формальдегид. Он вступает во взаимодействие с аминными группами пептидов и аминокислот, связывает их и в результате нарушает физиологическую деятельность клетки.

К числу органических соединений, обладающих антимикробным действием, относится и ряд веществ, полученных путем химического синтеза. Наибольшей известностью пользуются *сульфамидные препараты,* применяемые в химиотерапии для уничтожения патогенных бактерий. По структуре формулы сульфамиды весьма сходны с важным клеточным метаболитом - парааминобензойной кислотой (ПАБК), которая входит в состав витамина - в фолиевую кислоту:



ПАРААМИНОБЕНЗОЙНАЯ КИСЛОТА

СУЛЬФАНИЛАМИД

Сульфамидные препараты выступают конкурентами ПАБК и в случае избытка их в организме включаются (вместо ПАБК) в комплекс фолиевой кислоты. Однако функции ПАБК они выполнять не могут. Ферментативные реакции, зависящие от наличия фолиевой кислоты, расстраиваются, нарушается жизнедеятельность клетки. Эти вещества, являющиеся конкурентами или антагонистами естественных метаболитов клетки, получили название антиметаболитов. Все они обладают антимикробным действием.

Некоторые антимикробные вещества получили широкое практическое применение для подавления роста патогенных микробов. Они называются дезинфицирующими веществами, а прием использования их - дезинфекцией. Наибольшее практическое применение находит хлорная известь (0,5-5 %-ные водные растворы), йод (2 %-ный раствор), двухлористая ртуть, или сулема (1:1000), фенол и его производные (1-5 %-ные растворы), этиловый и изопропиловый спирты (70 %-ные растворы).

Глава 6

ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Питание является неотъемлемой функцией каждого живого организма. В процессе питания организм получает вещества, идущие на синтез клеточных структур, а также служащие источником энергии для всех процессов жизнедеятельности. Для питания микроорганизмов необходимы те же элементы, что для растений и животных. В первую очередь это углерод, азот, кислород и водород. Они являются основой всех органических веществ, которые входят в состав живой клетки.

6.1. ФЕРМЕНТНОЕ ОСНАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Питание микроорганизмов как физиолого-биохимический процесс осуществляется благодаря наличию в клетке различных ферментов, катализирующих все жизненно необходимые реакции. Микробная клетка, подобно клеткам высших организмов, оснащена достаточно активным ферментным аппаратом. Ферменты микроорганизмов обладают теми же свойствами и функциями, что и ферменты высших организмов. В соответствии с катализируемыми реакциями все ферменты разделяются на шесть классов: *оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы.* Несмотря на малые размеры микробной клетки, распределение в ней ферментов строго упорядочено. Ферменты энергетического обмена и транспорта питательных веществ локализованы в цитоплазматической мембране и ее производных. Многие ферменты не связаны с отдельными структурами клетки, а находятся в цитоплазме.

Ферменты бактерий подразделяются на *эндо-* и *экзоферменты.* Эндоферменты функционируют только внутри клетки. Они катализируют реакции биосинтеза и энергетического обмена. Экзоферменты выделяются клеткой в среду и катализируют реакции гидролиза сложных органических соединений на более простые, доступные для ассимиляции микробной клеткой. К ним

относятся гидролитические ферменты, играющие исключительно важную роль в питании микроорганизмов.

6.2. ФИЗИОЛОГИЯ ПИТАНИЯ

Изучение химического состава бактериальной клетки показало, что основные органические соединения (белки, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и др.) характерны для микроорганизмов всех типов. Они синтезируются клетками из веществ той среды, где развивается микроорганизм. Такие вещества, в которых нуждается микроорганизм и которые он потребляет из окружающей среды для удовлетворения своих пищевых потребностей, получили название питательных, а среды, содержащие их, - питательных сред. Состав питательных сред определяется пищевыми потребностями микроорганизмов. Последние весьма разнообразны, поэтому и разнообразен набор питательных сред, применяемых для культивирования микроорганизмов. Универсальных сред нет. Для каждого вида или группы близких видов необходима своя среда. Среды, предназначенные для развития отдельных видов микроорганизмов, называются элективными, или избирательными. По своему происхождению они бывают естественными, или натуральными, и синтетическими (лабораторными). Естественные среды состоят из веществ растительного и животного происхождения. Это могут быть клетки и ткани (культура тканей) или экстракты из них. На таких средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в них содержатся в основном все необходимые компоненты. Синтетические среды готовятся из химически чистых элементов, которые берутся в строго определенных концентрациях. Состав этих сред в отличие от естественных всегда известен.

Микроорганизмы отличаются от всех других организмов огромной скоростью потребления питательных веществ. Экспериментальным путем установлено, что бактериальная клетка за сутки потребляет «пищи» в 20 раз больше веса своего тела. Это свидетельствует о повышенном обмене веществ у микроорганизмов. Специальных органов питания микроорганизмы не имеют. Питательные вещества поступают в клетку через всю ее

поверхность. Это способствует быстрому обмену веществ между клеткой и средой.

6.2.1. Механизм поступления веществ в клетку

Поступление веществ в клетку регулируется цитоплазматической мембраной, которая является основным осмотическим барьером. Капсулы и слизистые слои в силу рыхлости своей структуры не оказывают сдерживающего действия на прохождение в клетку большинства веществ. Клеточная стенка по сравнению с ними - более сильный барьер, но главным образом для макромолекул. Установлено, что клеточные стенки грамположительных бактерий непроницаемы для декстранов с молекулярным весом 10^3. Кроме того, клеточные стенки некоторых микроорганизмов обладают избирательной проницаемостью и в отношении ряда низкомолекулярных соединений. Это обусловлено тем, что входящие в состав стенок отрицательно заряженные гликопептиды и тейхоевые кислоты могут действовать как ионообменники, регулируя прохождение через стенку положительно заряженных ионов.

Но основную ответственность за избирательное поступление веществ в клетку несет цитоплазматическая мембрана. Известно несколько путей переноса питательных веществ через цитоплазматическую мембрану. Одни из веществ диффундируют через мембранную перегородку по градиенту концентрации - пассивная диффузия. Главной движущей силой такого переноса является разность концентраций вещества по обе стороны мембраны, т. е. в среде и цитоплазме клетки. Однако путем пассивной диффузии в клетку поступает преимущественно вода. Большинство растворенных веществ проходит через мембрану благодаря действию специальной системы переноса, включающей белки-переносчики - пермеазы.

Пермеазы - это субстратспецифичные мембранные белки. Например, пермеаза для лактозы у E. coli - одиночная полипептидная цепь, относится к интегральным мембранным белкам. Пермеазы локализованы в цитоплазматической мембране и составляют значительную часть мембранного белка. Об этом можно

судить по тому, что в мембране у E. coli насчитывается до 8000 участков, в которых содержатся пермеазы, переносящие галактозу.

Пермеазы связывают молекулы растворенных веществ из внешней поверхности мембраны и переносят их к внутренней, откуда эти вещества высвобождаются в цитоплазму. В основе переноса веществ через цитоплазматическую мембрану, т. е. на расстояние более 7,5 нм (толщина мембраны), лежит изменение формы пермеазного белка (конформационное изменение), вызванное присоединением переносимого вещества.

С участием пермеаз осуществляется два типа переноса веществ: *облегченная диффузия* - по градиенту концентрации, т. е. от большей концентрации к меньшей, и *активный транспорт* - против градиента концентрации, т. е. от меньшей концентрации к большей.

Облегченная диффузия отличается от пассивной тем, что она осуществляется при помощи пермеаз, но без затрат энергии. Скорость ее зависит от концентрации вещества во внешней среде. Активный перенос в отличие от облегченной диффузии всегда сопровождается расходованием энергии. Это энергозависимый процесс. На перенос каждой молекулы субстрата затрачивается энергия, эквивалентная молекуле АТФ.

Описанными способами в клетку поступают вещества в химически неизмененном виде. Но у многих бактерий транспорт углеводов, оснований, жирных кислот осуществляется путем сопряжения их поступления в клетку с фосфорилированием. Например, глюкоза перед поступлением в клетку фосфорилируется и превращается в глюкозо-6-фосфат, т. е. происходит химическая модификация молекулы. Образующаяся глюкозо-6-фосфат переносится в цитоплазму. Такой способ переноса, который сопряжен с превращением субстрата в его производное, называется процессом транслокации групп. Транслокация сахаров осуществляется фосфотрансферазной системой, особенность которой состоит в том, что донором фосфатной группы является фосфоенолпируват, а не АТФ.

Источником энергии для активного транспорта служит электрохимическая энергия трансмембранного потенциала ($\Delta\bar{\mu}_{H^+}$),

или протонный градиент, который генерируется потоком электронов в дыхательной цепи.

Система транслокации функционирует у большинства факультативно аэробных бактерий, но отсутствует у некоторых бактерий с чисто дыхательным типом метаболизма, как, например, у аэробных псевдомонад. У них преобладает активный транспорт углеводов в клетку.

Необходимым условием поступления веществ в клетку является их растворимость в воде. Микробная клетка может потреблять только те вещества, которые находятся в растворенном виде. Однако имеется ряд органических веществ, которые или совсем не растворяются в воде или дают коллоидные растворы (белки, жиры, полисахариды). В то же время эти вещества необходимы для питания большинства бактерий. Поэтому прежде чем использовать их как питательные субстраты, бактерии при помощи экзоферментов производят предварительный гидролиз их до более простых и растворимых соединений. Например, крахмал расщепляется ферментом амилазой до мальтозы; белковые вещества под действием протеаз расщепляются до аминокислот; липиды расщепляются липазой до глицерина и жирных кислот. Получающиеся в результате гидролиза вещества обладают меньшими размерами молекул, растворимы в воде и легко поступают в цитоплазму клетки.

Поступление минеральных солей в клетку зависит от степени диссоциации их на ионы, от pH среды, заряда цитоплазматической мембраны. В клетку легче проникают вещества, имеющие заряд, противоположный заряду коллоидных мицелл цитоплазматической мембраны. В основе этого явления лежит закон взаимодействия электрических зарядов, согласно которому одноименные заряды отталкиваются, разноименные - притягиваются. Если цитоплазматическая мембрана имеет положительный заряд, то в клетку легче проникают ионы с отрицательным зарядом.

Среди питательных веществ для микроорганизмов в зависимости от выполняемых функций различают вещества как источники энергии и как строительные блоки, или как конструктивные материалы. В первую группу входят те соединения, которые в окислительно-восстановительных реакциях образуют

АТФ. Это углеводы, спирты и другие подобного рода соединения. Ко второй группе относятся вещества, идущие на синтез клеточных компонентов. Это аминокислоты, белки и их комплексы с липидами, полисахаридами, нуклеотидами. Некоторые из указанных веществ обладают двойной функцией. Например, глюкоза используется клеткой главным образом как источник энергии, но в то же время она может служить источником углерода и гидроксильных групп для построения углеродосодержащих компонентов клетки. Аминокислоты идут преимущественно на синтез белка и вместе с тем являются источником энергии.

6.3. ТИПЫ ПИТАНИЯ

Микроорганизмы в отличие от растений и животных характеризуются многообразием типов питания. Это связано с их способностью использовать разные источники энергии и разные соединения доя конструктивного метаболизма.

Источником углерода для одних микроорганизмов могут служить неорганические соединения, в частности углекислота, для других - органические вещества. Те микроорганизмы, которые получают углерод только из углекислоты и синтезируют из него необходимые органические вещества, называются автотрофами (от греч. autos - сам, trophe - питание). Они обладают наибольшей автономностью и независимостью своего развития от жизнедеятельности других организмов, могут жить в чисто минеральных средах. Другие микроорганизмы используют углерод из органических соединений и называются гетеротрофами (от греч. heteros - другой, trophe - питание). Они способны развиваться только в средах, содержащих органические соединения.

Восстановление углерода до органических соединений требует затрат энергии. Источником энергии может быть солнечный свет и химические связи органических и минеральных веществ. Организмы, которые используют световую энергию, называются фототрофами, или фотосинтезирующими, а те, которые используют энергию химических реакций (химическую энергию), называются хемотрофами, или хемосинтезирующими. Соответствующие

названия имеют и микроорганизмы, обладающие этими типами питания.

К фотолитотрофам относятся цианобактерии, фотосинтезирующие бактерии, использующие для процессов синтеза энергию солнечного света. Подобно высшим растениям в цитоплазме клеток этих бактерий содержатся пигменты типа хлорофилла. Бактериальный хлорофилл по химической структуре весьма сходен с хлорофиллом растений. Основное различие между ними состоит в том, что у бактериохлорофилла в первом пирольном кольце вместо винильной группы ($CH_2 = CH$-), характерной для хлорофилла растений, находится ацетильная группа (CH_3CO-), а также содержится на два атома водорода больше. Максимумы поглощения света этих двух хлорофиллов не совпадают.

Кроме хлорофилла все фотосинтезирующие бактерии содержат каротиноиды, которые также принимают участие в фотосинтезе, передавая энергию поглощаемого света бактериохлорофиллу.

В основе бактериального фотосинтеза лежит превращение световой энергии, поглощенной пигментами, в химическую энергию макроэргических связей АТФ, образуемой в процессе фотофосфорилирования и используемой затем для усвоения углекислого газа и процессов биосинтеза.

В общих чертах процесс фотосинтеза у бактерий происходит так же, как у зеленых растений. Но у растений источником водорода является вода, которая окисляется до кислорода. У фотолитотрофных бактерий источником водорода для фотосинтеза является сероводород или молекулярный водород. Поэтому кислород никогда при этом процессе не выделяется. Еще одно отличие: растения для восстановления одной молекулы углекислоты используют четыре кванта энергии, бактерии - только один квант. Конечные продукты фотосинтеза у растений и бактерий одинаковы: это соединения типа углеводов.

Бактериальный и растительный фотосинтез может быть представлен следующими обобщенными уравнениями:

$$CO_2 2H_2A \xrightarrow{\text{свет}} [CH_2O] + H_2O + 2A \quad (H_2A \text{ - донор водорода})$$

бактериальный фотосинтез

свет

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow [CH_2O] + O_2$$

растительный фотосинтез

К фотосинтезирующим бактериям относятся: зеленые бактерии, пурпурные серобактерии и пурпурные несеробактерии.

К *фотоорганотрофам* относятся несерные пурпурные бактерии, которые для восстановления углекислого газа могут использовать водород органических соединений. Пурпурные несерные бактерии входят в состав сем. Rhodospirillaceae и представлены двумя родами: Rhodospirillum - клетки спиральной формы и Rhodopseudomonas - клетки палочковидной формы. Исследования физиологии данных бактерий проведены на чистых культурах Ван-Нилем. В отличие от серобактерий они являются факультативными анаэробами, нуждаются в витаминах, хорошо развиваются на органических средах. Причем развитие их может происходить как на свету, так и в темноте. Эти бактерии используют в качестве источника энергии или солнечный свет, или аэробное окисление. На свету они могут развиваться в строго анаэробных условиях. В отличие от серобактерий, которые для фотосинтеза используют водород сероводорода или других соединений серы, у пурпурных несерных бактерий донором водорода служат органические соединения. На свету акцептором водорода является углекислота. Вначале происходит окисление органического вещества путем дегидрирования, т. е. отнятием водорода, затем этот водород переносится на молекулы углекислоты:

$$C_2H_3O_2Na + 3H_2O \longrightarrow CO_2 + 8H + NaHCO_3$$
$$2CO_2 + 8H \longrightarrow 2\,(CH_2O) + 2H_2O$$

В темноте акцептором водорода в аэробных условиях является кислород, в анаэробных - сера. Поэтому развитие несерных пурпурных бактерий в темноте возможно только при наличии кислорода или серы. Эти микроорганизмы характеризуются полным набором основных дыхательных ферментов, переносчиков водорода: НАД, ФАД, цитохромы. Окисление субстрата происходит по циклу трикарбоновых кислот. Пурпурные бактерии используют

органические вещества не только в качестве доноров водорода, но и как непосредственные источники углерода.

К хемолитотрофам относятся бактерии, которые способны ассимилировать углекислоту и синтезировать органические вещества за счет химической энергии, получаемой при окислении различных минеральных веществ: аммиака, нитритов, сероводорода, водорода и железа. В отличие от фотосинтеза, где используется энергия света, этот процесс получил название хемосинтеза. Хемосинтез открыт в 1887 г. С. Н. Виноградским у бесцветных серобактерий, затем у ряда других микроорганизмов.

Большинство хемолитотрофных бактерий способно развиваться в чисто минеральных средах, используя углекислоту в качестве источника углерода, а минеральные вещества в качестве источников энергии и электронов, окисляя их в процессе дыхания. Все хемолитотрофные бактерии ассимилируют CO_2 через цикл Кальвина. У облигатных хемолитотрофов (тиобацилл и нитрифицирующих бактерий) имеются специальные структуры - карбоксисомы, содержащие фермент рибулозодифосфаткарбоксилазу, с помощью которого осуществляется фиксация CO_2. Неспособность облигатных хемолитотрофов использовать органические субстраты связана с тем, что у них не функционирует цикл Кребса из-за отсутствия одного из ключевых ферментов цикла α-кетоглуторатдегидрогеназы.

Существует несколько физиологических групп хемолитотрофных бактерий.

Они характеризуются специфичностью в отношении окисляемого субстрата. Например, нитрифицирующие бактерии рода Nitrosomonas окисляют аммиак до нитрита, а Nitrobacter окисляет нитрит до нитрата:

$$2NH_3 + 3O_2 \longrightarrow 2HNO_2 + 2H_2O + 65{,}6 \text{ ккал},$$
$$2HNO_2 + O_2 \longrightarrow 2HNO_3 + 20{,}9 \text{ ккал}.$$

Бесцветные серобактерии окисляют сероводород до элементарной серы, а затем серу до серной кислоты:

$$2H_2S + O_2 \longrightarrow 2S + 2H_2O + 65 \text{ ккал},$$

$$+2H_2O$$
$$2S + 3O_2 \longrightarrow 2H_2SO_4 + 283 \text{ ккал.}$$

Железобактерии окисляют закисное железо в окисное:

$$2FeCO_3 + 2H_2O + O_2 \longrightarrow Fe_2(OH)_6 + 2CO_3 + 29{,}8 \text{ ккал.}$$

Энергия, выделяющая в результате окислительных реакций, используется хемолитотрофами для восстановления углекислоты. На восстановление молекулы углекислого газа требуется больше энергии, чем ее выделяется при окислении молекулы аммиака или сероводорода, к тому же коэффициент использования выделяющейся энергии невелик (у нитрификаторов 5-10 %). В связи с этим хемолитотрофным микроорганизмам приходится перерабатывать очень большое количество веществ по сравнению с тем количеством органического вещества, которое они синтезируют. Например, Nitrosomonas окисляет до 35 молекул аммиака на одну молекулу восстановленной углекислоты (Работнова, 1966):

$$CO_2 + 2H_2O + 155 \text{ ккал} \longrightarrow HCOH + H_2O$$

Образующийся муравьиный альдегид или другое подобное соединение полимеризуется в углеводы. Хемолитотрофные организмы, окисляющие неорганические вещества, являются важнейшими геохимическими агентами. С их деятельностью в природе связано образование и разрушение полезных ископаемых, они осуществляют важнейшие этапы круговорота минеральных элементов.

К хемоорганотрофам относятся микроорганизмы, которые нуждаются в готовых органических соединениях. Источником энергии и источником водорода для них служат органические вещества. Это самая разнообразная и весьма многочисленная группа микроорганизмов. Они широко распространены в природе и играют огромную роль в разложении органических веществ. В качестве источников углерода хемоорганотрофы используют готовые органические соединения самой различной химической структуры.

Наиболее подходящими являются соединения, содержащие альдегидные и кетонные группы, а также насыщенные связи.

Кроме органического углерода, гетеротрофные микроорганизмы нуждаются в углекислоте. Последняя играет важную роль в промежуточном обмене. Чаще всего гетеротрофы используют углекислоту для карбоксилирования трехуглеродных соединений - пирувата и фосфоенолпирувата, в результате чего образуется щавелевоуксусная кислота, легко вступающая в дальнейшее превращения, например, в цикле трикарбоновых кислот. Образующиеся промежуточные продукты используются клеткой для биосинтеза макромолекул.

Из хемоорганотрофов наибольшей степенью гетеротрофности характеризуются облигатные внутриклеточные паразиты, т. е. микроорганизмы, которые могут жить только внутри клеток других организмов. К ним относятся бактерии порядков Rickettsiales и Chlamydiales. Паразитический образ жизни привел к упрощению у них ферментных систем энергетического метаболизма. Например, у некоторых хламидий отсутствует система АТФ-АДФ, ферменты гликолиза, ЦТК. Это поставило их в полную зависимость от клеток-хозяев, неспособность к росту на питательных средах. В отличие от них, факультативные паразиты могут развиваться на искусственных питательных средах, хотя и очень сложного состава, включающего мясной автолизат, нативную кровь или сыворотку, набор витаминов и т. д.

Кроме паразитов, к гетеротрофам относится большая группа сапрофитных бактерий (от греч. sapros - гнилой, phyton - растение), которые также развиваются за счет готовых органических соединений. В отличие от паразитов, сапрофиты используют отмершие ткани растений и животных, продукты жизнедеятельности разных организмов. В. Л. Омелянский назвал эту группу бактерий «могильщиками органического мира».

6.4. ПОТРЕБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВАХ

Потребности микроорганизмов не ограничиваются наличием в питательной среде источников энергии и доноров электронов. Для роста и развития их требуются также *минеральные элементы*, а для некоторых - так называемые *ростовые вещества.*

Минеральные элементы. Концентрации элементов минерального питания, необходимые для максимального роста микроорганизмов, различные для разных видов. Такие из них, как фосфор, магний, калий требуются в сравнительно больших количествах - 0,2-0,5 г/л. Они называются макроэлементами. Микроэлементы - молибден, цинк, медь, кобальт и другие - нужны в очень низких концентрациях (0,1 - 0,001.мг/л).

Минеральные элементы входят в состав различных органических веществ клетки. Некоторые из них (железо, сера, медь, цинк) входят в состав активной группы ферментов; соли фосфорной кислоты играют незаменимую роль в энергетическом обмене микроорганизмов.

Основной функцией минеральных элементов в клетке является активация различных ферментов. Так, для азотфиксирующих бактерий важное значение имеют молибден, железо, кобальт. Молибден и железо входят в состав азотфиксирующей ферментной системы, поэтому они необходимы для азотфиксации. Кобальт играет большую роль в окислительно-восстановительных реакциях цикла Кребса, активируя действие ферментов транспорта электронов.

Минеральные элементы вносятся в питательную среду в виде соответствующих солей, составляя минеральную основу ее.

Ростовые вещества. В эту группу веществ входят витамины, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, органические кислоты. Они крайне необходимы для развития всех микроорганизмов. Некоторые микроорганизмы синтезируют их самостоятельно. Однако другие в процессе развития утратили эту способность (или никогда не обладали ею), и поэтому, чтобы обеспечить нормальное развитие их, недостающие соединения надо вносить в питательную среду. Такие дополнительные вещества

называются ростовыми, или факторами роста. Например, палочки тифа и ботулизма неспособны синтезировать триптофан, и при отсутствии его в питательной среде они не развиваются. Триптофан является для них существенным фактором роста.

Микроорганизмы, нуждающиеся в факторах роста, называются ауксотрофными, а не нуждающиеся - прототрофными. Ауксотрофными чаще всего являются мутанты прототрофов, которые можно получить из прототрофов путем искусственного мутагенеза. Ауксотрофы отличаются от исходных прототрофов потребностью в определенных факторах роста. Они растут на сложных естесственных средах, в состав которых вводится дрожжевой экстракт или (для определенных ауксотрофов) кукурузный экстракт.

Ростовые вещества нужны микроорганизмам в ничтожных количествах (мкг/л). Они чаще всего входят в состав ферментов и поэтому играют незаменимую роль в физиологии микробной клетки. Например, витамин B_2, или рибофлавин, содержится в дыхательных ферментах - флавиновых дегидрогеназах, поэтому он необходим всем аэробным микроорганизмам. Но многие бактерии синтезируют его самостоятельно и хорошо развиваются на питательных средах, где это вещество отсутствует.Некоторые молочнокислые бактерии, стрептококки и светящиеся бактерии способностью к синтезу рибофлавина не обладают. Он должен находиться в готовом виде в питательной среде. Такие бактерии являются ауксотрофными по рибофлавину.

Аналогичную функцию выполняет витамин B_5, или входит в состав дыхательных ферментов - первичных, или анаэробных, дегидрогеназ - и играет важнейшую роль в окислительных процессах клетки. К наличию его в среде чувствительны золотистый стафилококк, дизентерийная палочка и некоторые другие микробы, не обладающие способностью синтезировать этот витамин. Витамин B_6, или пиридоксин, входит в состав декарбоксилаз и трансаминаз - ферментов, имеющих большое значение в обмене аминокислот.

Парааминобензойная кислота является ростовым фактором для многих патогенных бактерий: пневмококков, гонококков, возбудителей дизентерии. В средах, не содержащих парааминобензойную кислоту, эти бактерии размножаться не могут.

Кислота необходима микроорганизмам для синтеза фолиевой кислоты, пуриновых оснований и ряда аминокислот (серин, гистидин, тирозин и метионин). Парааминобензойная кислота содержится в значительных количествах в дрожжах и печени животных.

Ростовыми факторами некоторых микроорганизмов являются также аминокислоты. Глутаминовая кислота, например, стимулирует рост гемолитических стрептококков, палочки сибирской язвы, гонококка; цистин является фактором роста для Proteus morganii и т. д. Ряд микроорганизмов нуждается в пуриновых и пиримидиновых основаниях. Эта потребность больше всего выражена у молочнокислых бактерий.

Источниками ростовых веществ могут служить экстракты из органов животных (печень, сердце), растений (семена и проростки), а также и самих бактериальных тел.

Глава 7

МЕТАБОЛИЗМ ПРОКАРИОТ

Метаболизм, или обмен веществ, складывается из двух взаимосвязанных процессов - катаболизма и анаболизма. ***Катаболизм*** - это ферментативное расщепление сложных органических соединений, осуществляющиеся в клетке за счет реакции окисления. Катаболизм сопровождается освобождением энергии и преобразованием ее в химическую форму фосфатных связей АТФ или других макроэргических связей.

Анаболизм - это синтез органических соединений - белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов - из простых предшественников, поступающих в клетку из внешней среды или образующихся в процессе катаболизма. Процессы синтеза связаны с потреблением свободной энергии, которая для организмов поставляется АТФ или другими макроэргическими соединениями.

Катаболизм и анаболизм протекают в клетке одновременно и составляют сущность метаболизма (рис.7.1.).

У бактерий типы метаболизма определяются их способностью использовать соответствующие источники энергии и синтезировать основные продукты обмена.

7.1. КАТАБОЛИЗМ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Жизнь микроорганизмов, как и всех других организмов, связана с непрерывным расходованием энергии. Энергия необходима для переноса веществ в клетку, для осуществления движения и главным образом для синтеза органических веществ. Все реакции биосинтеза эндотермические, т. е. осуществляются с потреблением энергии. Поэтому, чтобы клетка могла синтезировать необходимые компоненты, реакции анаболизма должны быть сопряжены (связаны) с реакциями катаболизма, при которых выделяется энергия. Связь осуществляется посредством образования при катаболизме таких соединений, как АТФ (аденозинтрифосфат), УТФ (уридинтрифосфат), ЦТФ (цитидинтрифосфат), ацетил-коэнзим А (ацетил-КоА) - активированная уксусная кислота.

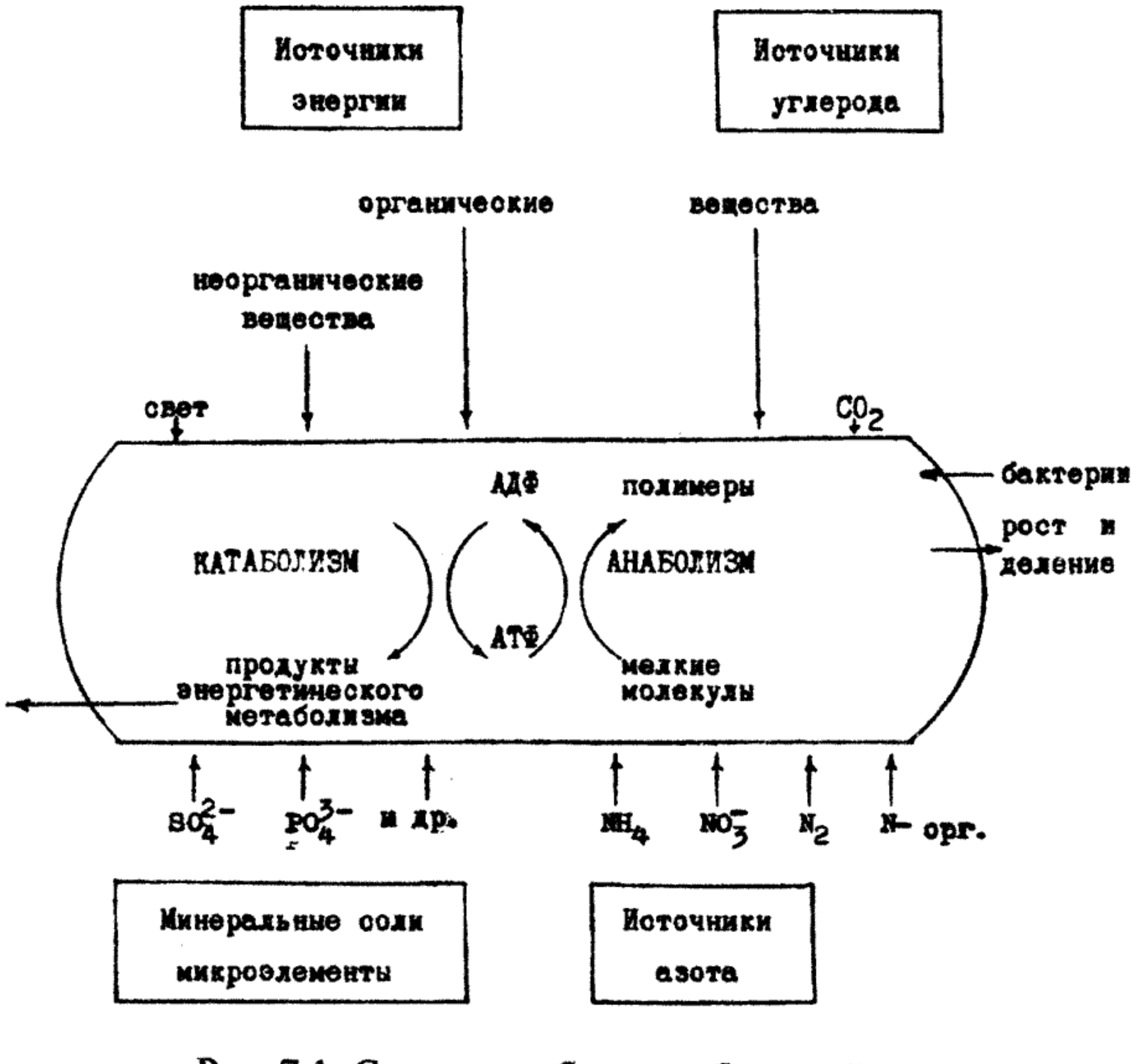


Рис. 7.1. Схема метаболизма бактерий

Центральное место в энергетическом метаболизме занимает АТФ, которая является основным донором свободной энергии в биологических системах. Это соединение легко отдает энергию и быстро регенерирует, причем отдает ее не всю сразу, а порциями. Поэтому АТФ была названа «разменной валютой» энергетического метаболизма.

Как видно из представленной формулы, АТФ - соединение нуклеотидного типа, содержащее три остатка фосфорной кислоты. Причем два концевых остатка содержат макроэргические связи, каждая из которых заключает - 34,5 кДж/моль, тогда как энергия обычной фосфатной связи составляет только - 9,6 кДж/моль.

В 60-х годах XX в. английским биохимиком Питером Митчеллом была постулирована, а потом доказана хемиосмотическая гипотеза, согласно которой в клетках существует

вторая универсальная форма свободной клеточной энергии - электрохимическая, или энергия электрохимического трансмембранного градиента ионов водорода, обозначаемого символом $\Delta\bar{\mu}_{н^+}$ и измеряемого в вольтах (В, мВ).

Электрохимическая энергия образуется в результате работы электротранспортной цепи, функционирующей при дыхании и фотосинтезе. При транспорте электронов на цитоплазматической мембране создается трансмембранный градиент протонов водорода в силу неравномерного накопления их по обе стороны мембраны - наружной и внутренней. На цитоплазматической мембране при функциолнировании дыхательной цепи $\Delta\bar{\mu}_{н^+}$ достигает 230 мВ.

Энергия трансмембранного потенциала первоначально появляется в электрохимической форме, затем при участии H^+-зависимого АТФ-синтетазного ферментного комплекса может превращаться в энергию АТФ. Этот ферментный комплекс локализован в цитоплазматической мембране и обеспечивает взаимное превращение двух форм клеточной энергии ($\Delta\bar{\mu}_{н^+} \rightleftarrows$ АТФ).

Химическая энергия АТФ используется преимущественно в реакциях биосинтеза, протекающих в цитоплазме клетки. Электрохимическая энергия трансмембранного потенциала ($\Delta\bar{\mu}_{н^+}$) обеспечивает процессы, локализованные только на мембране: поступление веществ в клетку, удаление продуктов метаболизма, обратный транспорт электронов с восстановлением НАД $(Ф)^+$, работу двигательного аппарата клетки (у подвижных бактерий). Нормальная жизнедеятельность бактерий, как и других организмов, обеспечивается наличием в клетке энергии в той и другой легко мобилизируемой форме.

Большинство микроорганизмов получают энергию при расщеплении различных органических веществ - углеводов, аминокислот, липидов и других, потребляемых из внешней среды. В клетке эти вещества подвергаются окислению через ряд последовательных ферментативных реакций. В основе их лежит перенос электронов. Реакции окисления сопровождаются выделением энергии и образованием более простых соединений,

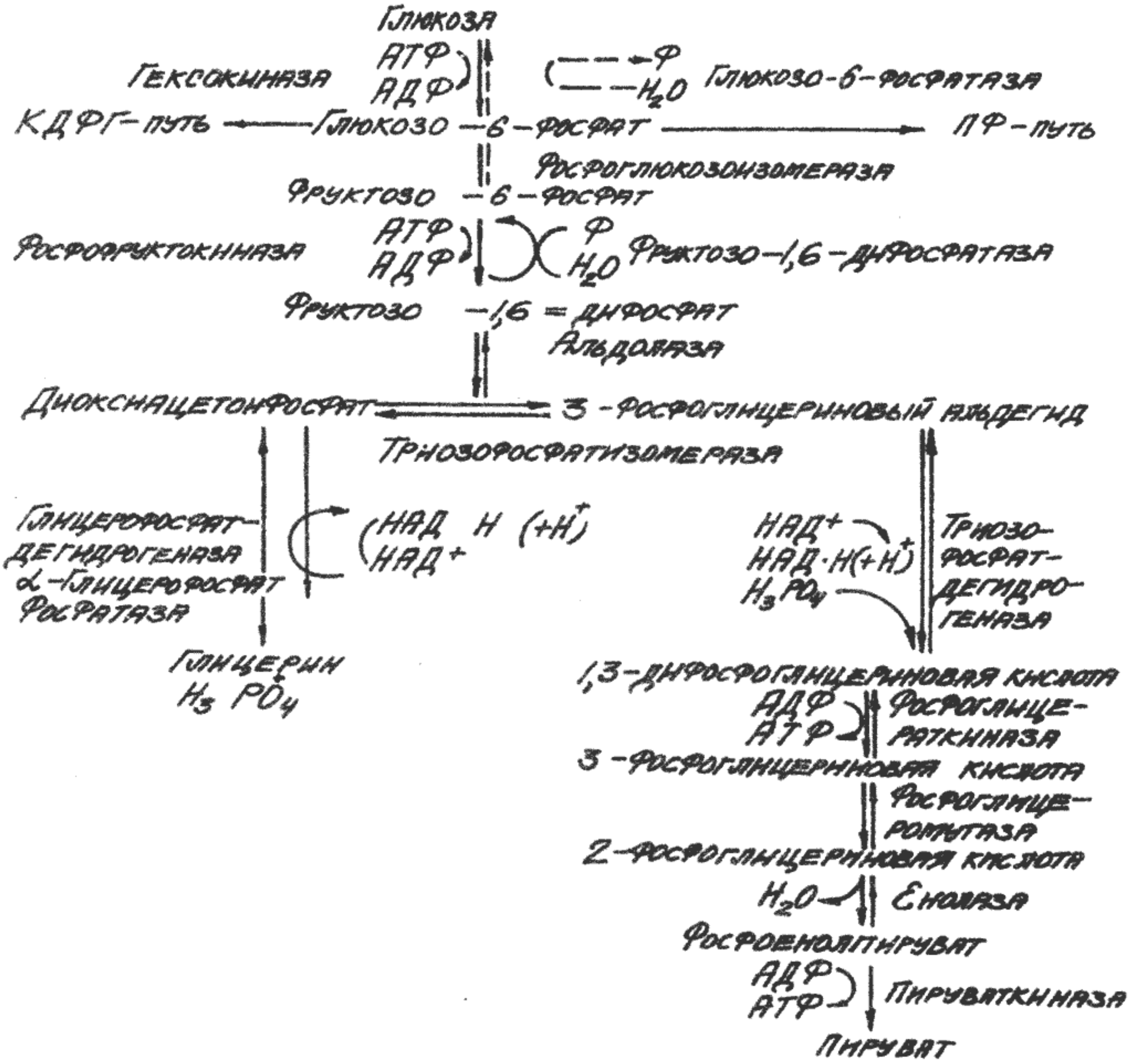
служащих исходным материалом для процессов биосинтеза. Хемолитотрофные бактерии получают энергию путем окисления неорганических соединений, таких как сероводород, аммиак, нитрит, молекулярный водород и др. Окисление осуществляется в процессе аэробного или анаэробного дыхания. В дыхательной цепи путем окислительного фосфорилирования образуется АТФ.

Углеводы как источник энергии. Для большинства гетеротрофов основным источником энергии являются углеводы. Расщепление углеводов микроорганизмы производят различными путями, в которых важнейшим промежуточным продуктом, занимающим ключевую позицию, является пировиноградная кислота (пируват).

К настоящему времени у микроорганизмов хорошо изучено три основных пути расщепления углеводов: гексозодифосфатный, пентозофосфатный и путь Энтнера - Дудорова.

Гексозодифосфатный путь (гликолиз), или путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (ЭМП) является главным путем, по которому расщепляет углеводы большинство микроорганизмов. Превращение углеводов гликолитическим путем начинается с фосфорилирования. При участии фермента гексокиназы и АТФ глюкоза фосфорилируется по шестому углеродному атому с образованием глюкозо-6-фосфата. Это активная форма глюкозы. Она служит исходным продуктом при расщеплении углеводов любым из трех указанных путей.

При гликолизе глюкозо-6-фосфат изомеризуется в фруктозо-6-фосфат, затем под действием фруктокиназы фосфорилируется по первому углеродному атому. Образовавшийся дифосфатный эфир сахара под действием фермента альдолазы легко распадается на две триозы: фосфоглицериновый альдегид и диоксиацетонфосфат. Реакции между образовавшимися соединениями обратимы: диоксиацетонфосфат под действием изомеразы превращается в фосфоглицериновый альдегид. Фосфоглицериновый альдегид присоединяет остаток фосфорной кислоты и превращается в дифосфоглицериновый альдегид:



В дальнейшем происходит дегидрирование образовавшегося альдегида НАД-содержащей дегидрогеназой, в результате чего образуется 1-3-дифосфоглицериновая кислота и освобождается энергия, используемая клеткой для синтеза АТФ. При участии фосфоглицераткиназы богатая энергией фосфатная группа переносится на АДФ, образуется 3-фосфоглицериновая кислота и АТФ. Происходит фосфорилирование на уровне субстрата (фосфатная группа от одного субстрата передается на другой). 3-фосфоглицериновая кислота под действием фермента фосфоглицеромутазы превращается в 2-фосфоглицериновую кислоту. Фермент энолаза превращает 2-фосфоглицериновую

кислоту в 2-фосфопировиноградную кислоту (энольную форму). На последнем этапе молекула фосфопировиноградной кислоты расщепляется с образованием пировиноградной кислоты, фосфат присоединяется к АДФ, превращая его в АТФ. На стадии образования пировиноградной кислоты заканчивается анаэробная фаза превращения углеводов, называемая гликолитической. В этом процессе образуется всего 2 молекулы пирувата, 4 молекулы АТФ и 2 молекулы НАД · Н (+ H^+). Но так как две молекулы АТФ первоначально затрачиваются на фосфорилирование гексозы, общий выход АТФ при превращении одной молекулы глюкозы составляет 2 молекулы. Максимальное количество энергии, получаемое клеткой при окислении одной молекулы углеводов гликолитическим путем, равно 47000 кал.

Пентозофосфатный путь (путь Варбурга-Дикенса-Хорекера) окисления углеводов широко распространен у многих организмов, но у микроорганизмов он был открыт только в 1940-1950 гг. Первоначально этот путь превращения углеводов был установлен Варбургом и Кристианом у эритроцитов и дрожжей, затем оказалось, что он характерен для всех видов семейства Enterobacteriaceae и других бактерий.

Окисление гексоз пентозофосфатным путем состоит из серии реакций, каждая из которых катализируется последовательным действием ряда ферментов. Конечными продуктами этого процесса являются 3-фосфоглицериновый альдегид и рибозо-5-фосфат.

Пентозофосфатный путь расщепления глюкозы может быть представлен следующим образом (рис.7.2). Исходный продукт глюкозо-6-фосфат дегидрируется с образованием фосфоглюконолактона, который затем гидролизуется до 6-фосфоглюконовой кислоты. Фосфоглюконовая кислота в дальнейшем окисляется путем декарбоксилирования через рибулозо-5-фосфат с образованием либо рибозо-5-фосфата, либо ксилулозо-5-фосфата, которые могут превращаться в глицериновый альдегид. Последний гликолитическим путем превращается в пируват и гексозофосфаты, снова включаются в цикл. Образование рибулозы и рибозы путем окислительного декарбоксилирования выявлено у многих микроорганизмов.

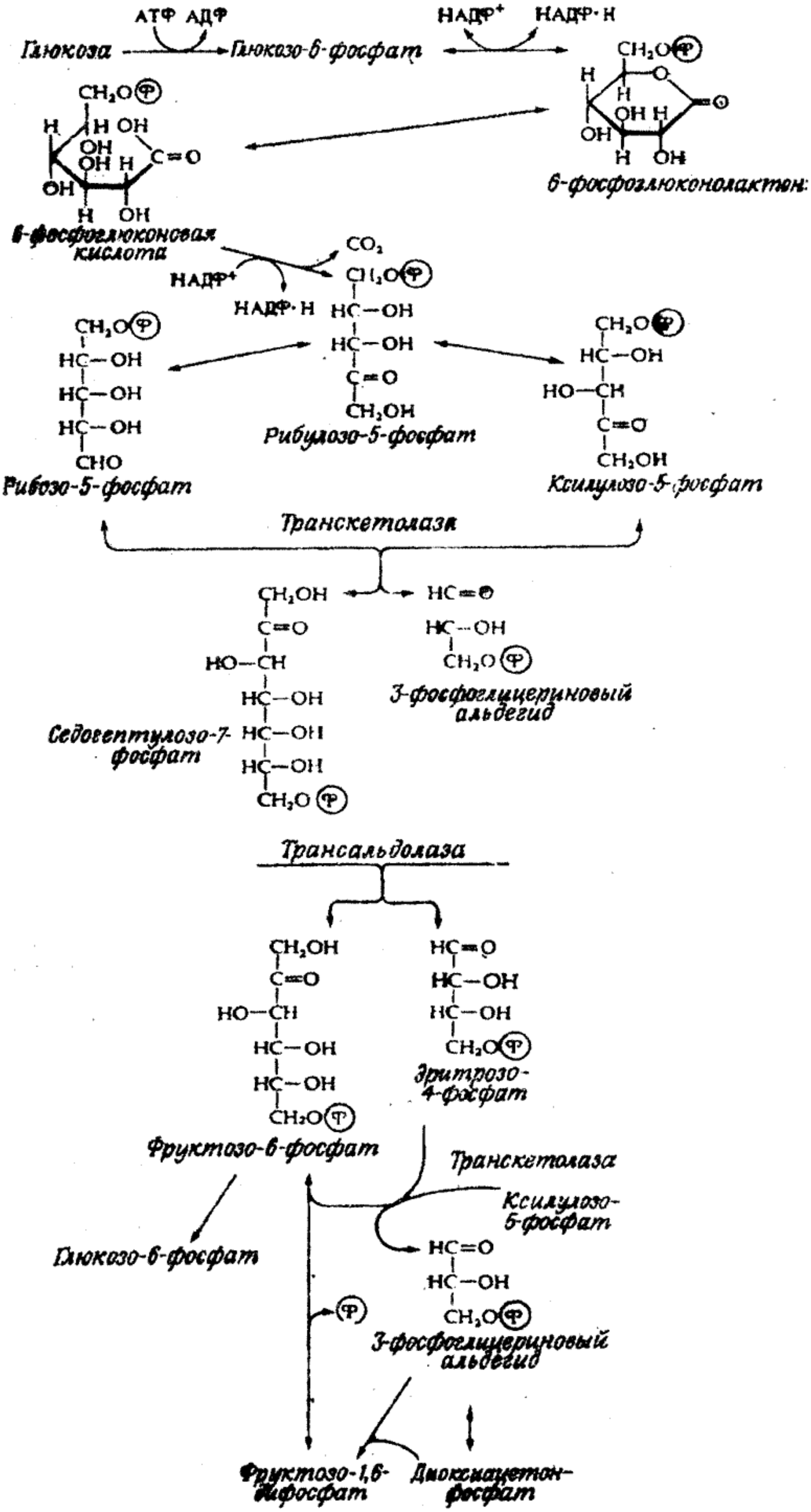


Рис. 7.2. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы

Значение пентозофосфатного пути состоит в обеспечении клетки исходными веществами для биосинтеза. Образующиеся пентозофосфаты являются предшественниками нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Кроме того, важная функция пентозофосфатного пути заключается в снабжении клетки НАДФ · Н, необходимым для осуществления восстановительных реакций биосинтеза. Как механизм получения энергии этот путь в два раза менее эффективен, чем гликолитический: на каждую молекулу глюкозы образуется молекула АТФ. Он рассматривается как дополнительный путь окисления углеводов. Это как бы «шунт» гликолитического пути.

Путь Энтнера-Дудорова (КДФГ-путь) открыт у микроорганизмов в 1952 г. Он менее распространен, чем два предыдущих и возможен лишь у некоторых групп прокариот. По этому пути окисление углеводов производят энтеробактерии, азотобактер, клубеньковые бактерии, отдельные псевдомонады и уксуснокислые бактерии.

Первым продуктом данного пути является глюкозо-6-фосфат. Она дегидрируется до 6-фосфоглюконовой кислоты. Затем после дегидратации образуется продукт, характерный только для пути Энтнера-Дудорова - 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконовая кислота (КДФГК). Последняя расщепляется на пируват и 3-фосфоглицериновый альдегид, который под действием ферментов гликолиза превращается во вторую молекулу пировиноградной кислоты:

глюкоза + АТФ ⟶ глюкозо-6-фосфат ⟶ 6-фосфоглюконат ⟶

2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконат ⟶ пируват + 3-фосфоглицериновый альдегид.

При окислении одной молекулы глюкозы КДФГ-путем образуется одна молекула АТФ и две молекулы НАДФ · Н. Этот путь обеспечивает использование микроорганизмами глюконовой кислоты.

Таким образом, основным ключевым продуктом расщепления углеводов разными путями является пировиноградная кислота, которая при участии ферментов превращается в различные интермедиаты.

Полное окисление пировиноградной кислоты происходит в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса) и дыхательной цепи.

Цикл трикарбоновых кислот. Включению пировиноградной кислоты в цикл Кребса предшествует окисление ее до ацетил-коэнзима А (КоА). Это осуществляется в результате сложной реакции, состоящей из окислительного декарбоксилирования пирувата и активирования образовавшегося ацетата при посредстве КоА. Окисление пировиноградной кислоты до ацетил-КоА катализируется пируватдегидрогеназной системой:

$$CH_3COCOOH + КоА - SH + НАД^+ \longrightarrow$$
$$\longrightarrow CH_3\text{-}CO \sim S - КоА + НАД \cdot H_2 + CO_2$$

Ацетил-КоА под действием цитрат-синтазы вступает в реакцию со щавелевоуксусной кислотой, образуя лимонную кислоту, которая является основным звеном цикла трикарбоновых кислот (рис.7.3). Лимонная кислота претерпевает ряд превращений и в результате образуется α-оксоглутаровая кислота. Реакция дегидрирования изолимонной кислоты сопряжена с восстановлением одной молекулы НАД до НАДН. α-оксоглутаровая кислота в свою оцередь подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием сукцинил-КоА. Это соединение содержит высокоэнергетическую тиоэфирную связь. На следующем этапе цикла тиоэфирная связь сукцинил-КоА разрывается, образуется янтарная кислота (сукцинат), а освобождающаяся энергия используется для синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата (у животных фосфорилируется не АТФ, а ГТФ). Следовательно, в данном случае имеет место субстратное фосфорилирование.

Янтарная кислота окисляется в дальнейшем сукцинатдегидрогеназой до фумаровой кислоты. Последняя под действием фумаразы гидратируется с образованием яблочной кислоты, котора посредством дегидрирования превращается в

щавелевоуксусную кислоту. Эта реакция завершает полный оборот цикла трикарбоновых кислот. Затем происходит конденсация образовавшейся молекулы щавелевоуксусной кислоты с другой молекулой ацетил-КоА и запускается следующий оборот цикла.

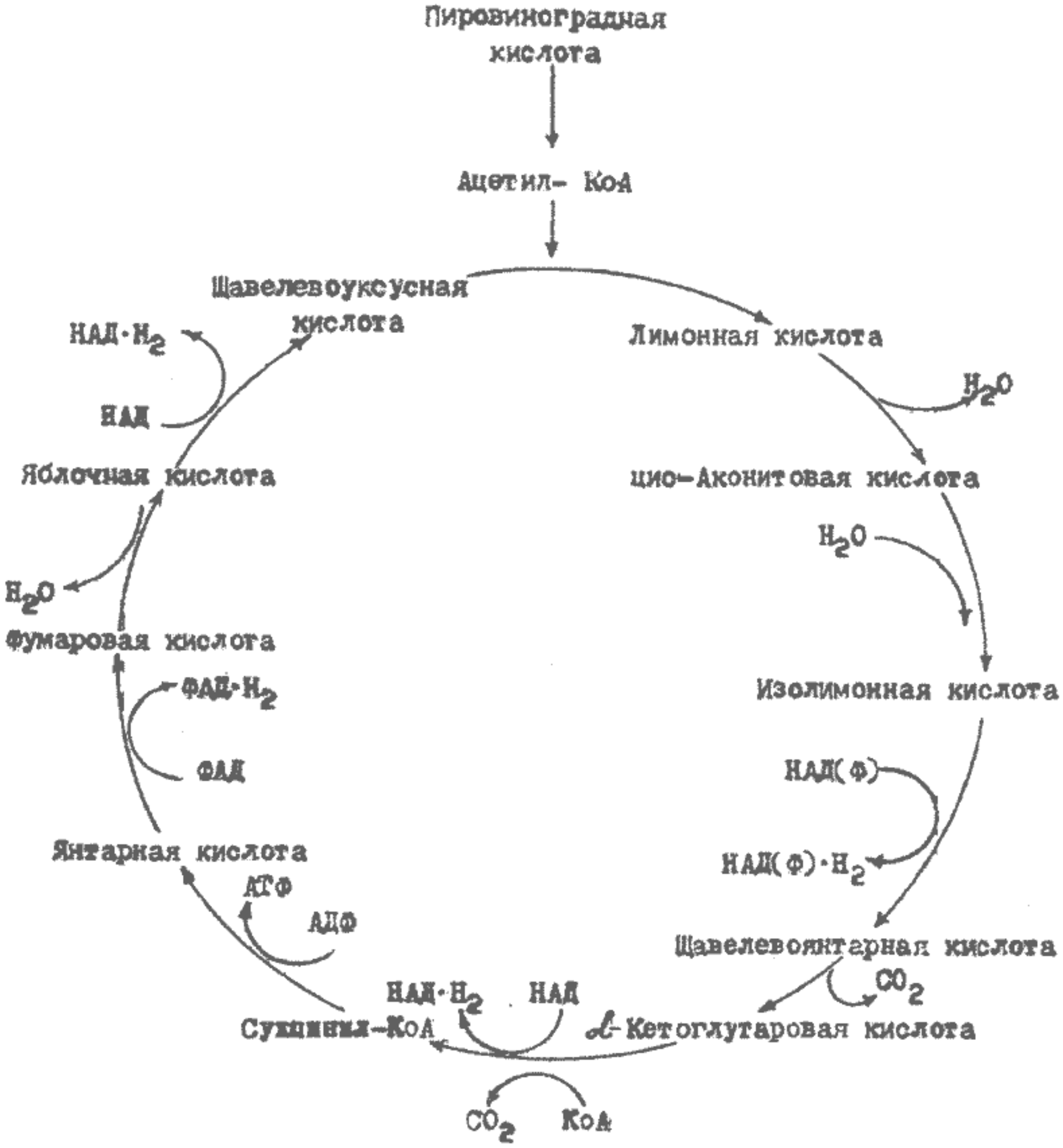


Рис. 7.3. Цикл трикарбоновых кислот

В результате одного оборота цикла образуется 3 молекулы НАД · H_2 и 1 молекула АТФ.

Цикл трикарбоновых кислот обеспечивает полное окисление пировиноградной кислоты до CO_2 и H_2O. Кроме того, в цикле трикарбоновых кислот образуется ряд интермедиатов, как α-оксоглутаровая, щавелевоуксусная, янтарная, фумаровая кислоты, которые необходимы для биосинтетических процессов. Поэтому не

только аэробы, а даже строгие анаэробы содержат многие ферменты этого цикла.

Таким образом, основными метаболическими путями, присущими почти всем микроорганизмам, являются: гликолиз, который протекает в цитозоле и выполняет две важные функции - расщепляет глюкозу с образованием АТФ и поставляет углеродные скелеты молекул для биосинтеза; пентозофосфатный путь, протекающий также в цитозоле и выполняющий две основные функции - генерирование НАДФ · Н для восстановительных реакций биосинтеза и образование рибозо-5-фосфата для синтеза нуклеотидов; цикл трикарбоновых кислот, функционирующий исключительно в мембранах. Он осуществляет заключительные этапы окисления источников энергии - углеводов, аминокислот, органических кислот.

7.1.1. Дыхание микроорганизмов

Дыхание - метаболический процесс протекающий в клетках с освобождением энергии и генерированием АТФ, в котором конечным акцептором электронов (водорода) служат неорганические соединения. В зависимости от конечного акцептора электронов различают аэробное и анаэробное дыхание. При аэробном дыхании акцептором водорода является кислород, при анаэробном - неорганические окисленные соединения типа нитратов и сульфатов.

Аэробное дыхание. В качестве энергетического субстрата для дыхательного метаболизма микроорганизмы используют широкий круг природных соединений. Независимо от сложности структуры окисляемого субстрата потребление его в качестве источника энергии основано на одном и том же принципе: постепенное расщепление до образования простых соединений, способных вступать в реакции цикла трикарбоновых кислот. Таким соединением основных метаболических путей является пируват.

Окисление пирувата при аэробном дыхании осуществляется в цикле Кребса, в который он поступает при посредстве ацетил-КоА. Полное окисление его приводит к освобождению двух молекул углекислоты и восьми атомов водорода. Акцептором водорода, как указано выше, у аэробных бактерий является кислород. Передача

водорода (электронов) на кислород осуществляется через последовательную цепь молекул-переносчиков, так называемую дыхательную цепь, или цепь транспорта электронов:

$$\text{Субстрат} \longrightarrow \text{НАД}\cdot H_2 \longrightarrow \text{Флавопротеид} \longrightarrow \text{Кофермент О} \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{Цитохром в} \longrightarrow \text{Цитохром с} \longrightarrow \text{Цитохром } aa_3 \longrightarrow O_2$$

Дыхательная цепь представляет собой систему пространственно организованных молекул-переносчиков, осуществляющих перенос электронов от окисляемого субстрата к акцептору. Она развита у аэробов и факультативных анаэробов, только у последних терминальным акцептором электронов, кроме кислорода, являются нитраты и сульфаты.

Компонентами дыхательной цепи, локализованными в мембране, являются такие переносчики белковой природы, как флавопротеиды, FeS-белки, цитохромы, и небелковой природы - хиноны (убихиноны, менахиноны). НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы, отщепляющие водород от окисляемого субстрата - растворимые ферменты; флавопротеидные дегидрогеназы могут находиться либо в мембране, либо в растворимой форме в цитоплазме.

Флавопротеиды и хиноны осуществляют перенос атомов водорода, а FeS-белки и цитохромы - электронов. Так как мембранные системы, содержащие переносчики электронов, погружены в цитоплазму, то имеется прямое взаимодействие между дыхательной цепью, с одной стороны, и окисляемым субстратом, АДФ и неорганическим фосфатом цитоплазмы - с другой. Такое свободное взаимодействие дыхательной цепи с цитоплазмой определяет отличительные особенности функционирования дыхательного аппарата прокариот от эукариот. Так, дыхательные цепи прокариот менее стабильны по сотаву переносчиков электронов и энергетически менее эффективны. В дыхательной цепи эукариот имеются три участка, где происходит выброс протонов и генерирование $\rightarrow \Delta\overline{\mu}_{H^+}$, у большинства прокариот - только один-два участка, т. е. суммарный выход энергии у прокариот ниже.

Функционирование дыхательной цепи осуществляется следующим образом. Водород окисляемого субстрата, освобожденный в реакциях цикла Кребса или мобилизованный непосредственно НАД (H_2)-зависимыми дегидрогеназами передается в дыхательную цепь на флавиновые дегидрогеназы, затем на убихиноны. Здесь атом водорода расщепляется на протон и электрон. Протон выделяется в среду, электрон передается на систему цитохромов до цитохромоксидазы. Она передает электрон на кислород-терминальный акцептор, который активизируется и соединяется с водородом, образуя воду и перекиси. Последние разлагаются каталазой на воду и кислород. Перенос электронов приводит к значительному изменению свободной энергии в клетке.

Расчеты энергетического баланса показали, что при расщеплении глюкозы гликолитическим путем и через цикл трикарбоновых кислот с последующим окислением в дыхательной цепи до CO_2 и H_2O на каждый моль глюкозы образуется 38 молей АТФ. Причем максимальное количество АТФ образуется в дыхательной цепи - 34 моля; 2 моля - в ЭПМ-пути и 2 - в ЦТК.

Ввиду большого разнообразия ферментных систем, входящих в дыхательную цепь, окисляемых субстратов и терминальных акцепторов у бактерий существует большое количество разнообразных дыхательных цепей. Так, в дыхательной цепи уксусно-кислых бактерий отсутствуют цитохромы a + a_3: дегидрогеназы $\rightarrow C \rightarrow C_1 \rightarrow A_1 \rightarrow O_2$. Еще меньший набор компонентов имеет дыхательная цепь Agrobacterium tumefaciens: НАДН $\rightarrow$ дегидрогеназа $\rightarrow Q \rightarrow C \rightarrow O_2$. Дыхательная цепь клубеньковых бактерий и азотобактера характеризуется наличием разнообразных цитохромов: дегидрогеназы $\rightarrow$ b$\rightarrow$ c$\rightarrow$ a$\rightarrow$ $a_3 \rightarrow O_2$. Укороченные дыхательные цепи характерны для многих бактерий. В энергетическом обмене они менее полезны для бактерий из-за низкого выхода АТФ.

Биолюминесценция. У некоторых бактерий существует ответвление от основнорй дыхательной цепи. Электроны от НАД передаются не на ФАД, а на ФМН (флавомононуклеотид). Последний реагирует с ферментом люциферазой, кислородом и альдегидом пальмитиновой кислоты. Люцифераза (Л) катализирует

реакцию восстановительного альдегида ($АН_2$) с АТФ (продукт этой реакции при последующем окислении испускает видимый свет):

$$А \cdot H_2 + АТФ + Л \longrightarrow Л \cdot АН_2 + ФФ \text{ (фосфат)};$$
$$Л \cdot АН_2\text{–АМФ} + O_2 \longrightarrow \text{свет + окисленный продукт.}$$

Эта реакция получила название «светлячковой» из-за ее наличия у светлячка Photinus piralis. Ее используют для количественного определения АТФ, потому что интенсивность свечения находится в прямой зависимости от количества АТФ.

Механизм биолюминесценции состоит в том, что в результате взаимодействия ФМН с люциферазой, кислородом и альдегидом электроны в некоторых молекулах переходят в возбужденное состояние и возвращение их на основной уровень сопровождается испусканием света. Образования АТФ при люминесценции не происходит. Поэтому эффективность функционирования дыхательной цепи снижается, т. е. клетка не получает всей энергии, заключенной в окисляемом субстрате, так как часть ее превращается в световую.

Свечение бывает тем интенсивнее, чем лучше условия аэрации культуры. Светящиеся бактерии являются весьма чувствительными индикаторами молекулярного кислорода. М. Бейеринк применял светящиеся бактерии в качестве индикатора для обнаружения кислорода при бактериальном фотосинтезе (в те времена не было известно, что бактериальный фотосинтез протекает без выделения кислорода).

Способностью к биолюминесценции обладают факультативно-анаэробные морские бактерии, объединенные в род Photobacterium (светящиеся бактерии).В аэробных условиях они окисляют органические субстраты с испусканием лунно-голубого света. Биолюминесценция рассматривается как приспособление некоторых микроорганизмов к защите от вредного действия кислорода.

Неполное окисление. Большинство аэробных микроорганизмов в процессе дыхания осуществляют полное окисление углеводов до углекислоты и воды. При этом

высвобождается вся энергия, заключенная в субстрате. Примером может служить окисление глюкозы пекарскими дрожжами:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 688500 \text{ кал.}$$

Однако окисление может быть и неполным. Это зависит от видовой принадлежности микробов и условий развития. Обычно неполное окисление наблюдается при избытке в среде углеводов и недостатке кислорода. Конечными продуктами неполного окисления являются органические кислоты, такие как уксусная, лимонная, фумаровая, глюконовая и др. Типичным примером неполного окисления является образование уксусной кислоты из спирта бактериями рода Acetobacter:

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O + 118 \text{ кал.}$$

Этот окислительный процесс используется микроорганизмами для получения энергии. При неполном окислении образование макроэргических фосфатных связей происходит в процессе переноса электронов. Однако общий выход энергии при этом значительно меньший, чем при полном окислении. Часть энергии окисляемого исходного субстрата сохраняется в образующихся органических кислотах. В связи с тем, что сходные кислоты (янтарная, молочная) образуются при брожении углеводов, неполное окисление называют «окислительным брожением». Отличительной особенностью неполного окисления является участие кислорода в реакциях. Поэтому аэрация - необходимое условие образования органических кислот микроорганизмами. Установлено, что образование α-глутаминовой кислоты бактериями (Corynebacterium glutamicum) происходит только в строго аэробных условиях. Причем выход данной аминокислоты может быть очень высоким - 0,6 моля глутамина на 1 моль использованной глюкозы.

Микроорганизмы, развивающиеся за счет энергии неполного окисления, используются в микробиологической промышленности для получения органических кислот, в том числе и аминокислот.

Анаэробное дыхание. В анаэробных условиях, т. е. при отсутствии молекулярного кислорода, некоторые микроорганизмы,

такие как Micrococcus denitrificans и бактерии родов Desulfovibrio и Desulfotomaculum в качестве акцептора водорода используют окисленные минеральные соединения - нитраты, сульфаты, которые легко отдают кислород, превращаясь в восстановленные формы. Продуктами восстановления нитратов служит нитрит и молекулярный азот; сульфаты восстанавливаются до сероводорода и других соединений. Образовавшиеся восстановленные продукты выделяются из клетки. Окисление органического вещества в анаэробных условиях происходит путем дегидрогенирования. Отщепляемый водород поступает в дыхательную цепь и переносится на соответствующий акцептор. Конечная реакция катализируется нитратредуктазой. Последняя в анаэробных условиях функционирует как цитохромоксидаза.

Нитратредуктаза является индуцибельным ферментом. Синтез ее происходит только в анаэробных условиях при наличии нитрата. Кислород ингибирует синтез нитратредуктазы. При наличии нитратредуктазы в клетке (если бактерии из анаэробных условий переносятся в аэробные) кислород конкурирует с нитратом за электроны в дыхательной цепи, подавляя тем самым функции данного фермента. Вот почему нитратное и сульфатное дыхание осуществляется только в анаэробных условиях.

Способность микроорганизмов использовать в качестве акцепторов электронов нитраты и сульфаты позволяет производить им полное окисление субстрата и получать таким путем необходимое количество энергии. Так, денитрифицирующие бактерии при нитратном дыхании производят полное окисление органических субстратов, выход энергии при этом только на 10% ниже, чем при аэробном дыхании. Образование АТФ происходит в результате фосфорилирования в дыхательной цепи.

7.1.2. Брожение

Брожение - ферментативное расщепление углеродсодержащих органических соединений в анаэробных условиях, происходящее с выделением энергии. В противоположность анаэробному дыханию акцептором водорода при брожении являются органические соединения, образующиеся в реакциях окисления. В отличие от

неполного окисления, которое имеет сходство с брожением по образующимся продуктам, кислород в реакциях брожения не участвует.

Л. Пастер (1861) писал: «Жизнь возможна и без кислорода, за счет брожения. Брожение есть способ существования бактерий без воздуха». Анаэробные микроорганизмы получают энергию путем брожения значительно меньшую (примерно в 30 раз), чем при аэробном дыхании.

Все основные типы брожений начинаются с гликолитического расщепления углеводов и идут одинаково до образования пировиноградной кислоты. Образующийся в процессе гликолиза НАД · Н в анаэробных условиях не может быть окислен кислородом. Но так как он необходим для метаболизма клетки, то для регенерации НАД бактерии используют пируват или образованные из него соединения.

Л. Пастер (1861) писал: «Жизнь возможна и без кислорода, за счет брожения. Брожение есть способ существования бактерий без воздуха». Анажробнын микроорганизмы получают энергию путем брожения значительно меньший (примерно в 30 раз), чем при аэробном дыхании.

Все основные типы брожений начинаются с гликолитического расщепления углеводов и идут одинаково до образования пировиноградной кислоты. Образующийся в процессе гликолиза НАД · Н в анаэробных условиях не может быть окислен кислородом. Но так как он необходим для метаболизма клетки, то для регенерации НАД бактерии используют пируват или образованные из него соединения. В результате в среду выделяются различные восстановительные продукты - спирты или кислоты.

Характер превращения пировиноградной кислоты зависит от специфики микроорганизма (рис.7.4). Дрожжи, осуществляющие спиртовое брожение при помощи пируватдекарбоксилазы, расщепляют пировиноградную кислоту на уксусный альдегид и CO_2. Уксусный альдегид служит конечным акцептором водорода и восстанавливается в этиловый спирт:

$$CH_3COCOOH \longrightarrow CH_3CHO + CO_2$$
$$CH_3CHO + НАД \cdot H^+ + H^+ \longrightarrow C_2H_5OH + НАД$$

Маслянокислые бактерии используют уксусный альдегид, превращая его путем конденсации в масляную кислоту.

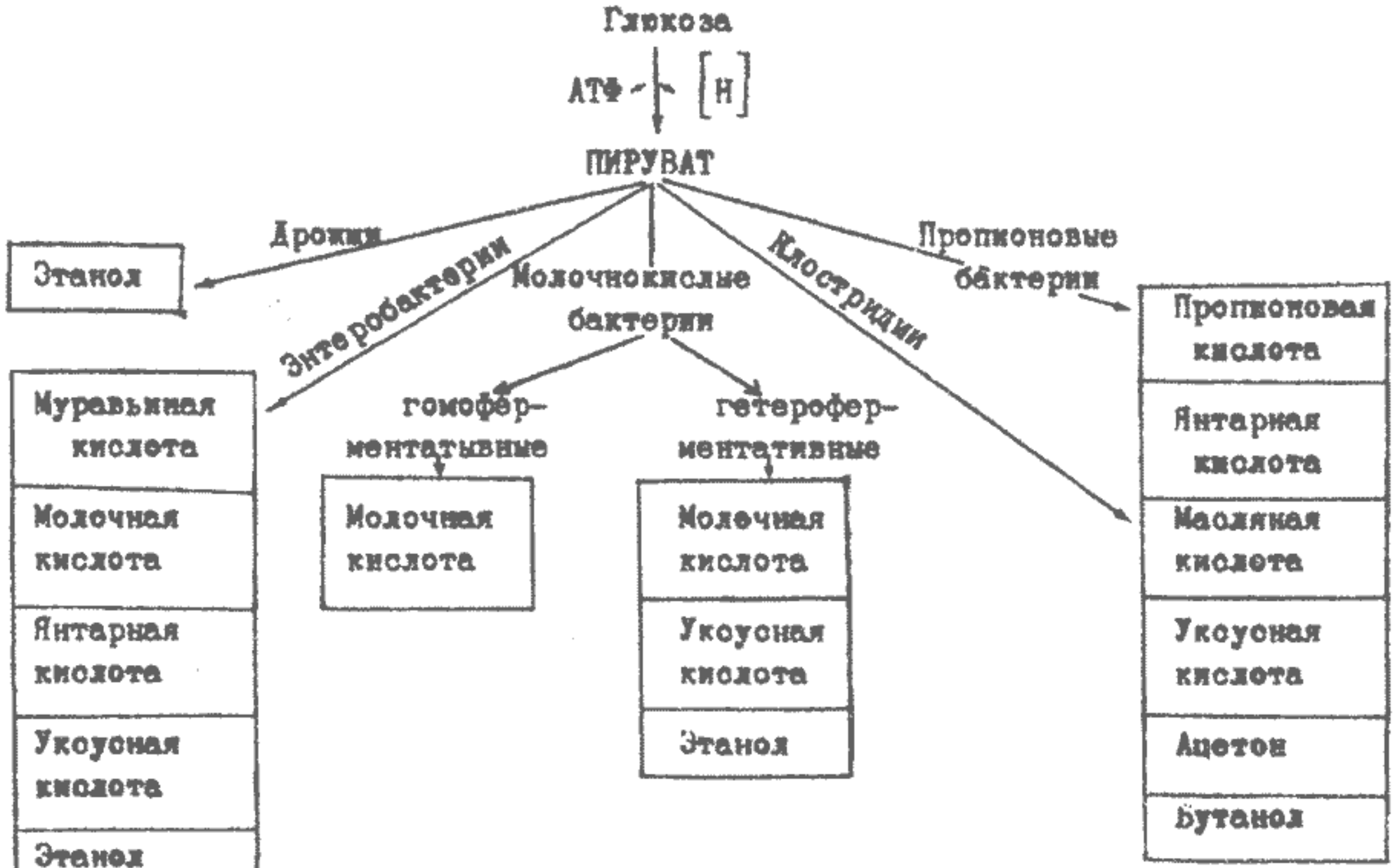


Рис. 7.4. Превращение пирувата при различных типах брожения

Гомоферментативные молочнокислые бактерии используют в качестве акцептора водорода пировиноградную кислоту, восстанавливая ее до молочной кислоты:

$$CH_3COCOOH + НАД \cdot H \longrightarrow CH_3CHOH \cdot COOH + НАД$$

Другая группа микроорганизмов - гетероферментативные молочнокислые бактерии - может использовать в качестве акцептора водорода и пировиноградную кислоту, и уксусный альдегид. Поэтому при брожении углеводов образуются различные конечные продукты: молочная кислота, этиловый спирт, уксусная кислота, водород, углекислота. Эта особенность молочнокислых бактерий служит основой для разделения их на гомоферментативные и гетероферментативные.

7.1.3. Основные типы брожения

Продукты брожения известны человеку с незапамятных времен, хотя истинная причина этого явления была установлена Л. Пастером только в 1861 г. Он открыл три основных типа брожения: спиртовое, молочнокислое и маслянокислое. Брожению подвергаются различные органические вещества, и в зависимости от их природы и свойств микроба можно получать те или иные продукты.

К настоящему времени наиболее полно изучены механизмы сбраживания углеводов. В. Н. Шапошниковым и его сотрудниками установлена двухфазность брожения углеводов. В первой фазе происходит интенсивный биосинтез веществ клетки из углеводов и в среде образуются окисленные продукты брожения.

Во второй фазе биосинтез клеточного материала замедляется, а в среде появляются более восстановленные продукты. Восстановленными продуктами брожения могут быть различные спирты, органические кислоты, ацетон, бутанол и другие вещества. Различают спиртовое, молочнокислое, маслянокислое, пропионовокислое и другие виды брожения.

Спиртовое брожение. Сбраживание углеводов микроорганизмами до этилового спирта и углекислоты составляет сущность спиртового брожения. Возбудителями спиртового брожения являются дрожжи - одноклеточные эукариотные микроорганизмы. Некоторые бактерии в анаэробных условиях также способны осуществлять спиртовое брожение, например, Sarcina ventriculi, Erwinia emylovora. Энергию получают путем сбраживания углеводов, при котором в среде накапливается этиловый спирт, уксусная и молочная кислота, выделяется углекислый газ, водород. Оба вида бактерий осуществляют разложение глюкозы до пировиноградной кислоты гликолитическим путем, далее следуют реакции декарбоксилирования пировиноградной кислоты до ацетальдегида и восстановление последнего до этилового спирта.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии образуют спирт из глюкозы, расщепляя ее по пентозофосфатному пути.

Выделенная из сока агавы бактерия Zymomonas mobilis вызывает спиртовое брожение глюкозы, разлагая ее по пути

Энтнера-Дудорова (КДФГ-путь). Образовавшийся пируват декарбоксилируется, затем восстанавливается в этиловый спирт и углекислый газ. Выход продуктов брожения не отличается от такового при брожении по гликолитическому пути, но энергии выделяется в два раза меньше, чем при гликолизе: на одну молекулу сбраженной глюкозы образуется одна молекула АТФ. Широкое практическое применение в производстве спирта микробиологическим путем имеют дрожжи. Это одноклеточные неподвижные микроорганизмы с овальной или эллипсоидальной формой клеток.

Дрожжи - аэробы, энергию получают в процессе дыхания, но в анаэробных условиях осуществляют спиртовое брожение, расщепляя углеводы по гликолитическому пути. В условиях аэрации процесс спиртового брожения подавляется и активируется дыхание. Подавление спиртового брожения кислородом получило название «эффекта Пастера». «Эффект Пастера» рассматривается как результат конкурирующего взаимодействия энергетических путей, в частности, гликолиза и дыхания, функционирующих у дрожжей. Одним из проявлений является конкуренция за АДФ и неорганический фосфат между субстратным и окислительным фосфорилированием. При понижении внутриклеточной концентрации АДФ и $Ф_н$ тормозится расщепление глюкозы и образование спирта.

Дрожжи широко распространены в природе. Они встречаются на фруктах, ягодах, растениях, в почве, воздухе. Дрожжи подразделяют на культурные и дикие. К культурным относятся те, которые имеют техническое применение (например, виноградные и хлебопекарные). Они характеризуются высокой бродильной способностью. Дикие дрожжи вовсе не обладают бродильными свойствами или они слабо выражены.

Возбудителями спиртового брожения являются дрожжевые грибки рода Saccharomyces. Сюда относятся все дрожжи, применяемые в промышленности для получения спирта. Дрожжи спиртового брожения делятся на расы верхнего и нижнего брожения (верховые и низовые).

Верховые дрожжи развиваются при доступе кислорода, образуя на поверхности слабую пленку. Брожение идет при температуре 20-24^0 С, сопровождается обильным выделением

углекислоты и образованием пены, дрожжевые клетки при этом выносятся на поверхность среды. К верховым принадлежат отдельные расы дрожжей Saccharomyces cerevisiae. В диком состоянии в природе они не встречаются.

Дрожжи нижнего брожения осуществляют этот процесс при более низкой температуре (4-10^0 С). Брожение протекает спокойнее и медленнее при образовании компактного осадка дрожжей. К низовым дрожжам относятся Sacch. ellipsoideus.

Спиртовое брожение используется для производства спирта, глицерина, различных вин, в том числе шампанского, пива и коньяка, а также в хлебопечении. Исходным сырьем для получения спирта служат углеводы различного происхождения (крахмалсодержащие продукты - картофель, злаки, отходы сахарной промышленности - меласса, содержащая 50-60 % сахарозы), широко используются также гидролизаты древесины, отходы целлюлозно-бумажной промышленности, так называемые сульфитные щелока.

В связи с отсутствием у низовых дрожжей фермента амилазы крахмал непосредственно не сбраживается. Поэтому предварительно производится осахаривание его так называемыми осахаривающими ферментами, к которым относятся α- и β-амилазы, декстриназа. Осахаривающие ферменты превращают крахмал в сахар мальтозу, сбраживаемый дрожжами. Источниками осахаривающих ферментов являются солод (пророщенное зерно) и препараты плесневых грибов родов Mucor и Aspergillus. В последние годы солод вытесняется более активными ферментными препаратами грибного происхождения.

Брожение обычно ведут в кислой среде при pH 4,0-4,5 (кислая среда подавляет развитие посторонней микрофлоры, особенно нежелательных масляно-кислых бактерий), оптимальной температуре 30^0 С и концентрации сахара 10-15 % (повышение содержания сахара затрудняет брожение, а при 30-35 % оно почти полностью прекращается).

Процесс спиртового брожения идет по пути Эмбдена-Мейергофа, описанного выше. Суммарно его можно выразить уравнением:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 28 \text{ ккал.}$$

В щелочной среде вместо этилового спирта образуется глицерин и уксусный альдегид:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_3H_5(OH)_3 + CH_3CHOH + CO_2$$
$$C_6H_{12}O_6 + 2Ф_н + 2АДФ \longrightarrow 2CH_3\text{-}CH_2OH + 2CO_2 + 2АТФ + 2H_2O$$

При спиртовом брожении образуется янтарная кислота и сивушные масла - смесь амилового, изоамилового, бутилового и других спиртов. Это продукты дезаминирования аминокислот, служащих источником азотистого питания дрожжей.

Брожение осуществляется в специальных аппаратах - ферментерах при постоянной температуре. Сначала среду аэрируют для стимуляции роста дрожжей, затем устанавливают анаэробные условия, благоприятствующие брожению. Брожение ведется до тех пор, пока концентрация образующегося спирта не подавит рост дрожжей (10-15 %). Полученная бражка поступает в перегонные аппараты, где производится отгонка спирта. При одноразовой перегонке получается спирт-сырец (этиловый спирт и летучие примеси). Он используется для технических целей. При дальнейшей очистке - фракционной дистилляции - получается спирт-ректификат, содержащий 95,6 %.

В настоящее время этиловый спирт получают также и синтетическим путем - из побочных продуктов крекинга нефти (этилена). Синтетический способ вытесняет биохимический, так как он обходится дешевле.

Молочнокислое брожение. Анаэробное превращение углеводов под действием микроорганизмов с образованием в среде значительных количеств молочной кислоты составляет сущность молочнокислого брожения. Этот тип брожения был изучен Л. Пастером в 1857 г.

Чистую культуру молочнокислых бактерий впервые выделил Д. Листер в 1877 г. из кислого молока.

Молочнокислые бактерии не составляют в морфологическом отношении однородную группу. Сюда входят грамположительные неспорообразующие палочки разной длины, относящиеся к роду Lactobacillus и кокки из родов Streptococcus и Pediococcus. Молочнокислые бактерии относятся к факультативным анаэробам.

Они неподвижны, весьма требовательны к питательным средам. Зависимость данных бактерий от наличия готовых органических веществ говорит о слабо развитых биосинтетических способностях. Многие из них нуждаются в аминокислотах, витаминах, азотистых основаниях. В качестве источников энергии молочнокислые бактерии используют сахара и спирты. В отношении углеводов у них наблюдается довольно выраженная специфичность: одни используют лактозу, другие мальтозу. Лактозу потребляют бактерии, развивающиеся в молоке и молочных продуктах, мальтозу - те, которые сбраживают растительные материалы.

По образующимся в процессе брожения продуктам, молочнокислые бактерии разделяются на две группы: гомоферментативные и гетероферментативные. К гомоферментативным относятся палочковидные бактерии рода Lactobacillus и стрептококки. Они образуют из сахара только молочную кислоту и не дают каких-либо побочных продуктов. К гетероферментативным относятся палочковидные бактерии рода Betabacterium и кокки рода Leuconostoc. И те, и другие являются обитателями растений. Помимо молочной кислоты, они образуют из сахара ряд других веществ: спирты, эфиры, уксусную кислоту, водород, углекислоту и др. Гетероферментативный стрептококк Str. diacetilactis дополнительно продуцирует ароматообразующее соединение ацетоин, или ацетилметилкарбинол, придающий молочнокислым продуктам приятный аромат.

Общая формула гомоферментативного молочнокислого брожения может быть представлена следующим уравнением:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 22{,}5 \text{ ккал.}$$

Гомоферментативные бактерии расщепляют глюкозу гликолитическим путем. Молочнокислое брожение для них является единственным способом получения энергии.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии не содержат основных ферментов гликолиза: альдолазы и триозофосфатизомеразы. Поэтому начальное расщепление глюкозы у них происходит по пентозофосфатному пути. Образующиеся в процессе расщепления фосфоглицериновый альдегид и ацетилфосфат

превращаются в разные конечные продукты брожения. Так, Leuconostoc mesenteroides помимо молочной кислоты образует этанол и углекислоту, а при сбраживании рибозы эта же бактерия продуцирует молочную кислоту, уксусную и углекислоту.

На молочнокислом брожении основано изготовление молочнокислых продуктов - простокваши, кефира, ацидофилина, кумыса, а также квашение капусты, силосование кормов и др. Для приготовления молочнокислых продуктов используется свежее высококачественное пастеризованное молоко или сливки, к которым добавляют свежую культуру соответствующих молочнокислых микроорганизмов. Последние активно размножаются, образуют молочную кислоту и тем самым подавляют развитие гнилостных бактерий, так как для них кислая среда является неблагоприятной. Например, для приготовления простокваши используется чистая культура «болгарской палочки» - Lact. bulgaricus. Она в отличие от других молочнокислых бактерий активнее образует молочную кислоту.

Для приготовления таких молочных продуктов, как кефир, кумыс, йогурт, используются не чистые культуры, а их ассоциации с дрожжами. Кефир, к примеру, готовят из молока, внося в него кефирные зерна, представляющие собой комочки свернувшегося казеина и содержащие симбиотический комплекс молочнокислых бактерий (Str. lactis, Lact. caucasicum), дрожжей (Torula kefiri и Torula ellipsoidea) и ряда других микроорганизмов, вызывающих пептонизацию молока. Ацидофилин готовят путем внесения в пастеризованное молоко Lactobacillus acidophilus и Str. lactis. Молочнокислые бактерии широко применяются также при приготовлении масла и различных видов сырья.

Молочнокислое брожение лежит в основе квашения овощей и заготовки силоса. Возбудителями процесса являются бактерии, которые находятся на поверхности растений. Это молочнокислые стрептококки и различные виды Betabacterium и Leuconostoc. На силос идет зеленая растительная масса - листья сахарной свеклы, кукурузы, люцерна, трава. Ее плотно укладывают в специальные резервуары - силосные башни или траншеи. Вначале в этой массе развиваются самые разнообразные микроорганизмы, в том числе молочнокислые и гнилостные бактерии. Но по мере сбраживания

углеводов, содержащихся в растениях, происходит накопление молочной кислоты, кислотность силоса повышается до губительной для гнилостных бактерий концентрации (pH ниже 4,5). Кроме того, в процессе активного роста микроорганизмов быстро используется кислород и создаются анаэробные условия. Все это приводит к прекращению развития большинства микроорганизмов, и в силосной массе начинают преобладать молочнокислые стрептококки и Leuconostoc. Последующий этап брожения осуществляют более кислотоустойчивые молочнокислые бактерии рода Lactobacillus.

Маслянокислое брожение. В отличие от спиртового и молочнокислого брожения маслянокислое брожение происходит в строго анаэробных условиях. Типичный возбудитель его Clostridium butyricum относится к облигатным анаэробам, широко распространен в почвах и сточных водах. Маслянокислое брожение вызывают и другие виды анаэробных бактерий. Все они споровые и относятся к роду Clostridium. В протоплазме клеток содержится гликоген и гранулеза. В качестве источника энергии маслянокислые бактерии используют различные углеводы, спирты и кислоты. Они могут также использовать и некоторые полисахариды - крахмал, декстрин, гликоген. При брожении в преобладающем количестве образуется масляная кислота, сопутствующими продуктами являются этиловый и бутиловый спирты, уксусная кислота, углекислота и водород.

Маслянокислое брожение протекает гликолитическим путем до образования пировиноградной кислоты. Затем следует ключевая реакция - разложение пирувата до ацетил-КоА и CO_2 с образованием восстановленного ферредоксина. Реакцию катализирует фермент пируват: ферредоксин-оксидоредуктаза. Синтез масляной кислоты начинается с конденсации двух молекул ацетил-КоА при участии фермента тиолазы. В результате образуется ацетоацетил-КоА, который через ряд промежуточных продуктов восстанавливается в бутирил-КоА. Масляная кислота получается при последующем переносе КоА с молекулы бутирил-КоА на ацетат:

Бутирил–КоА + Ацетат ⟶ Ацетил-КоА + Бутират (масляная кислота).

Образующийся ацетил-КоА может быть использован для синтеза АТФ. Маслянокислое брожение дает более высокий энергетический выход, чем спиртовое или молочнокислое: на 1 моль сброженной глюкозы 3,3 моля АТФ.

Некоторые клостридии, в частности C. acetobutyricum наряду с масляной кислотой образуют в значительных количествах бутанол, изопропанол, ацетон, т.е. способны осуществлять ацетоно-бутиловое брожение. При этом, вначале образуется масляная кислота, затем по мере подкисления среды индуцируется синтез ферментов, действие которых приводит к накоплению бутанола и ацетона. Так как данные продукты являются нейтральными растворителями, брожение, осуществляемое клостридиями, приобрело большое техническое значение. Маслянокислое брожение используется также для получения масляной кислоты, которая применяется в кожевенной промышленности. Исходным сырьем служат крахмалсодержащие продукты и отходы свеклосахарного производства.

В природных условиях маслянокислое брожение активно протекает на дне водоемов, содержащих отложения ила, и на дне болот, где нет доступа кислорода.

Пропионовокислое брожение. Образование пропионовой кислоты при брожении углеводов присуще бактериям рода Propionibacterium. Это грамположительные, неподвижные, не образующие спор палочковидные бактерии. В зависимости от условий развития клетки могут иметь булавовидную, вильчатую или разветвленную формы. Известно 8 видов пропионовокислых бактерий. Типовой вид - P. freudenreichii. Пропионовые бактерии отличаются от молочнокислых более совершенным конструктивным метаболизмом, в связи с чем могут расти на простой синтетической среде с аммонийным азотом при наличии в среде биотина и пантотеновой кислоты. Они обитают в рубце и кишечнике жвачных животных, участвуя в образовании жирных кислот. В воде и почве не обнаруживаются. Пропионовокислые бактерии используют в сыроделии и микробиологической промышленности для получения витамина B_{12}.

Пропионовые бактерии - аэротолерантные анаэробы. Энергию в основном получают при брожении углеводов, расщепление

которых осуществляют гликолитическим путем. Но кроме этого основного пути у некоторых видов выявлено наличие ферментов пентозофосфатного пути, цикла трикарбоновых кислот, электрон-транспортной цепи. Функционирование этих путей зависит от условий развития бактерий.

Образование пропионовой кислоты из пирувата происходит сложным путем (рис.7.5). В отличие от предыдущих типов брожения здесь имеет место усложнение молекулы пирувата за счет присоединения к ней CO_2. Присоединение углекислоты происходит путем карбоксилирования с образованием дикарбоновых кислот.

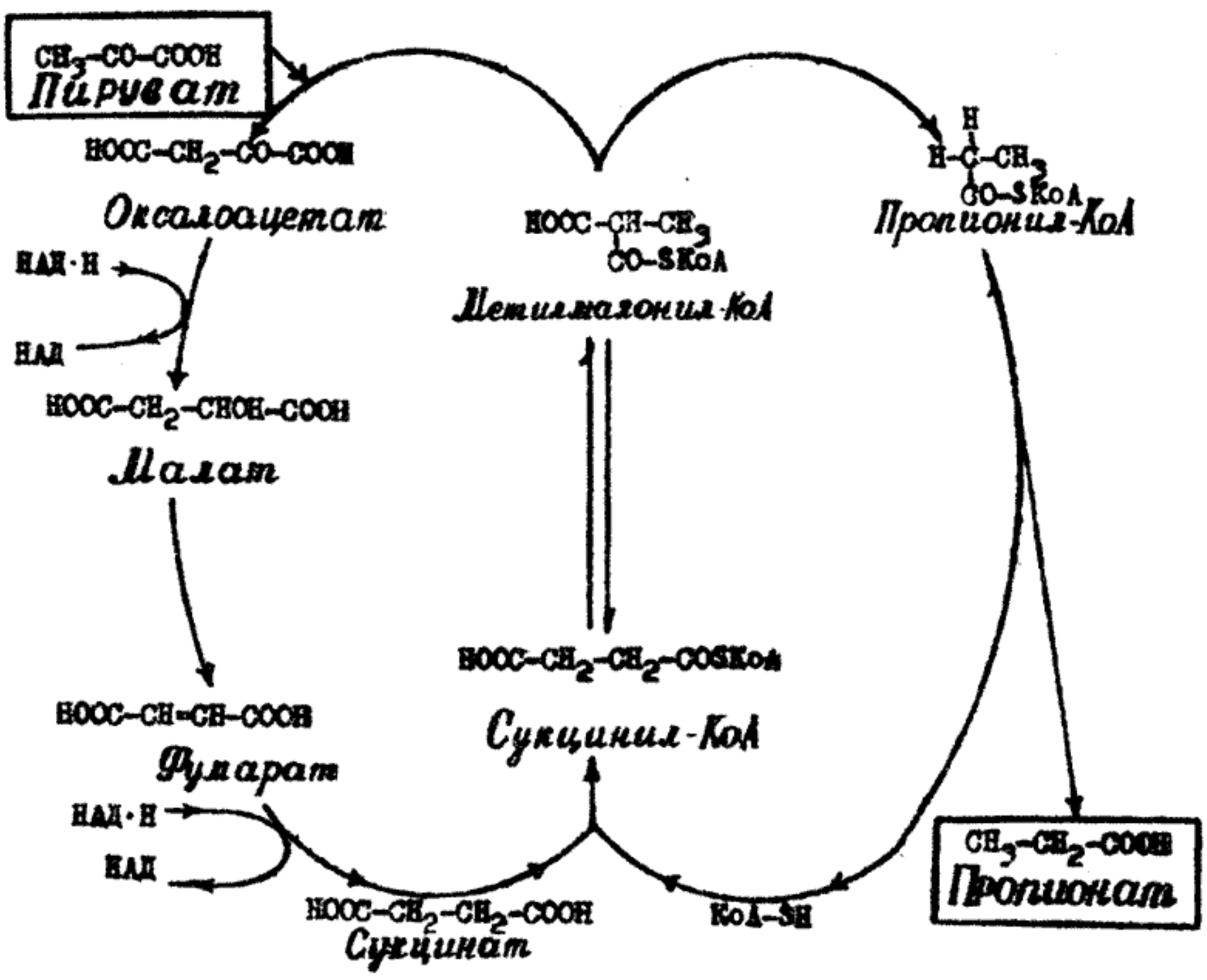


Рис. 7.5. Превращение пирувата в пропионат

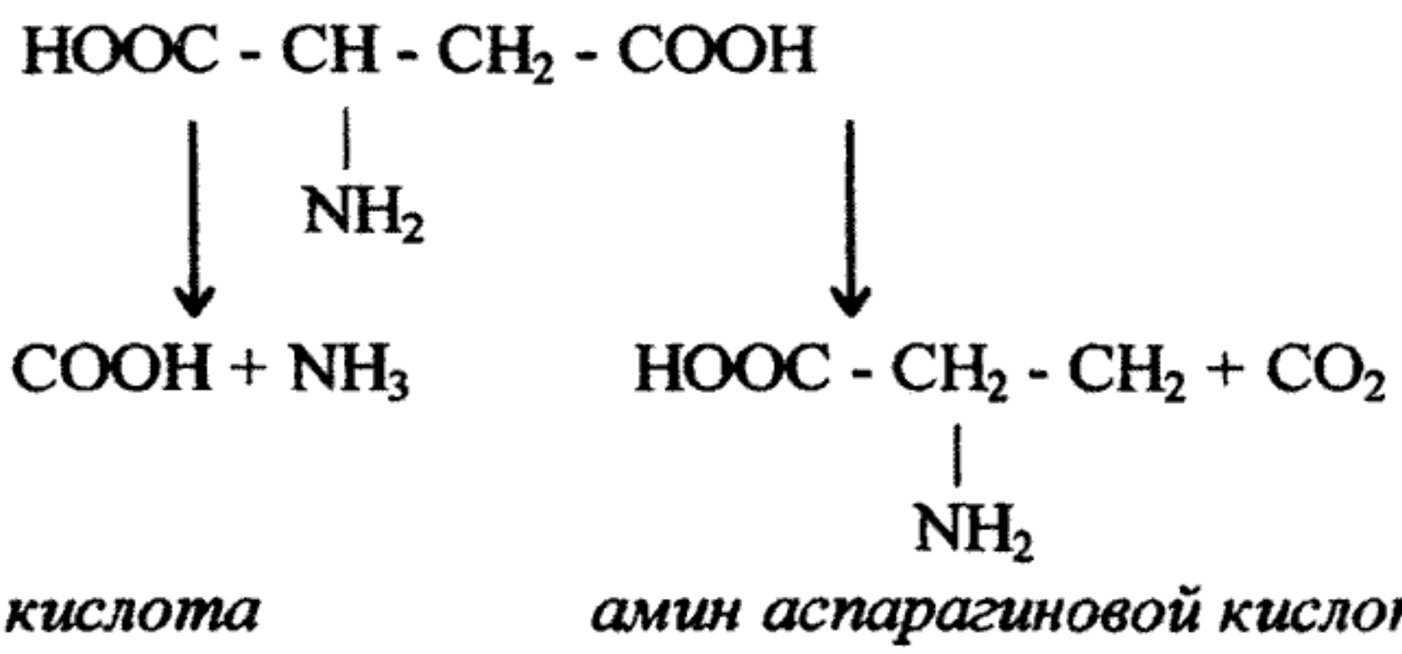
Эта реакция широко распространена среди всех гетеротрофных прокариот, а также растений и животных. Она получила название гетеротрофной ассимиляции углекислоты. Реакцию катализирует биотинзависимая карбокситрансфераза. На первом этапе образуется щавелево-уксусная кислота (ЩУК) и пропионилкоэнзим А. Затем ЩУК через яблочную и фумаровую кислоты восстанавливается до янтарной. Далее с помощью КоА-трансферазы осуществляется перенос КоА-группы с пропионил-КоА на янтарную кислоту, в

результате чего образуется сукцинил-КоА и пропионовая кислота. Сукцинил-КоА превращается в метилмалонил-КоА и снова вступает в реакции с пируватом, а пропионовая кислота выделяется из клетки и накапливается в среде.

7.2. АМИНОКИСЛОТЫ КАК ИСТОЧНИК ЭНЕРГИИ

Из азотсодержащих органических соединений наиболее доступны для микроорганизмов аминокислоты. Сами по себе аминокислоты не являются макроэргическими соединениями, но расщепление некоторых из них сопровождается синтезом АТФ или образованием пировиноградной кислоты, входящей в цикл трикарбоновых кислот. Определенные микроорганизмы обладают специальными механизмами для получения энергии за счет расщепления аминокислот.

Расщепление аминокислот. Аминокислоты ассимилируются бактериями как источник пластического материала или как источники энергии. Внутри клетки происходит расщепление аминокислот под действием эндоферментов - дезаминаз и декарбоксилаз. В результате этого может отщепляться или аминная NH_2 (процесс дезаминирования), или карбоксильная CO_2 (процесс декарбоксилирования) группы. Характер превращения аминокислот зависит главным образом от реакции среды в период роста бактерий. В кислой среде происходит декарбоксилирование, в щелочной - дезаминирование. Так, расщепление аспарагиновой кислоты происходит по следующей схеме:



Оптимум pH для декарбоксилаз лежит в пределах 4-5,5, а для большинства дезаминаз - в пределах 8-9. При декарбоксилировании

в связи с освобождением веществ, содержащих основные группы - амины, происходит нейтрализация среды; при дезаминировании - подкисление. На основании этого было высказано предположение, что обе системы ферментов действуют как механизмы нейтрализации среды, в результате чего pH сохраняется в физиологических пределах. При декарбоксилировании образуются амины соответствующих кислот по уравнению:

$$R\text{-}CHNH_2COOH \longrightarrow RCH_2NH_2 + CO_2$$

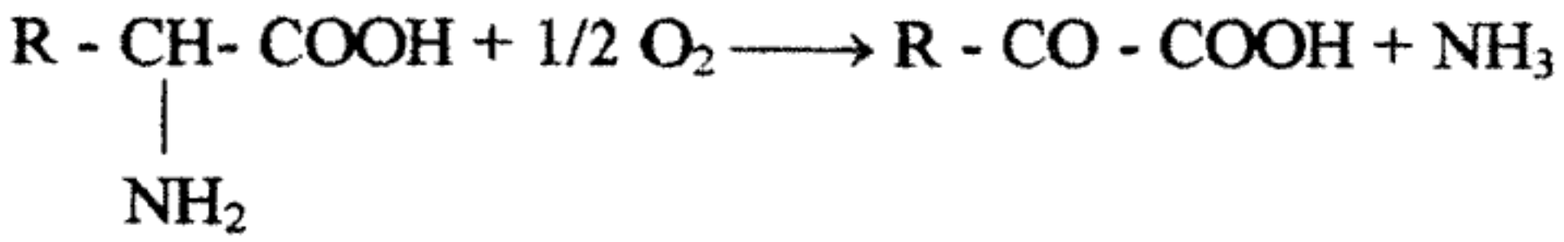
В настоящее время обнаружены декарбоксилазы почти для всех 20 аминокислот. Они характеризуются специфичностью катализируемых реакций. Специфичность определяет белковый носитель, так как простетическая группа (кофермент) одинаковая во всех декарбоксилазах. Она представляет собой пиридоксальфосфат (витамин B_6).

Декарбоксилазы бактерий действуют только на L-аминокислоты с образованием аминов. Функция аминов полностью не выяснена. Однако установлено, что некоторые из них играют роль ростовых факторов (например, β-аланин является ростовым фактором для дифтерийной палочки), другие участвуют в сложных обменных реакциях и могут служить источником энергии.

В распределении декарбоксилаз у различных видов бактерий закономерностей не наблюдается. Эти ферменты можно обнаружить в любом сочетании у различных видов. Есть предположение, что декарбоксилазы, как и дезаминазы, являются адаптивными ферментами.

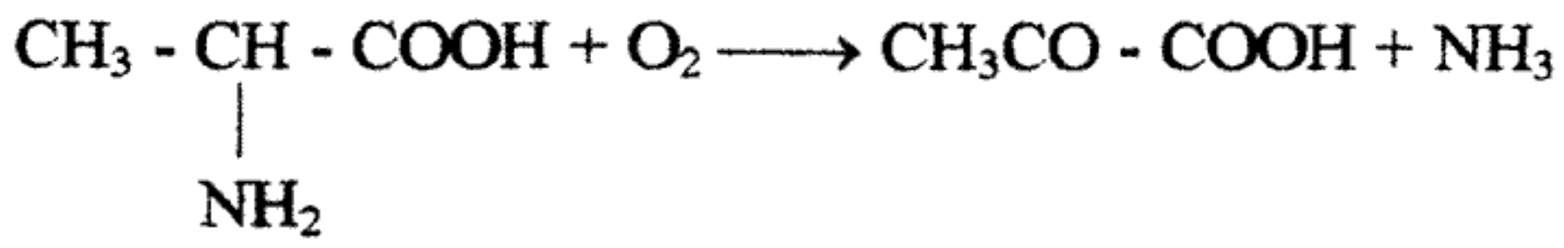
Благоприятные условия для образования декарбоксилаз создаются в конце логарифмической фазы размножения. Старые культуры характеризуются весьма слабой активностью.

Дезаминирование аминокислот сопровождается выделением NH_3 и осуществляется многочисленными и разнообразными реакциями. Разнообразие реакций определяется набором ферментов, присущих тому или иному микроорганизму. Различают несколько типов дезаминирования. У аэробов распространено окислительное дезаминирование, приводящее к образованию α-кетокислоты:



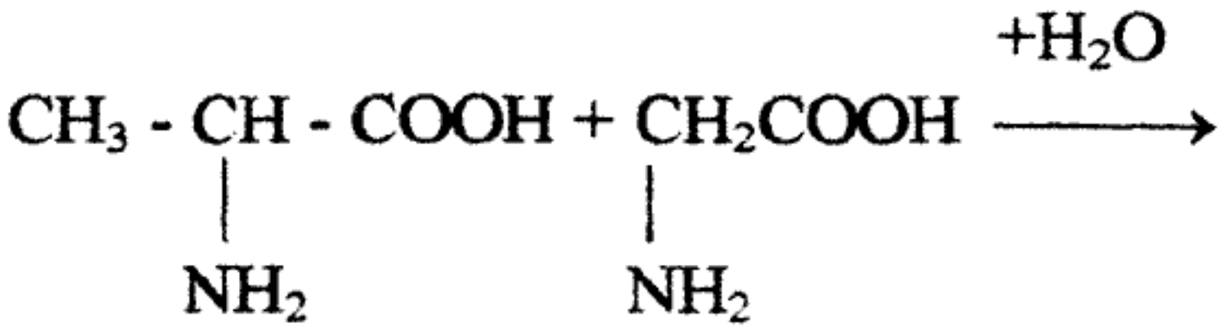
Оно осуществляется под влиянием оксидаз и дезаминаз. Некоторые из оксидаз в качестве акцептора электронов используют кислород, у других этот процесс связан с цепью транспорта электронов, в результате чего путем окислительного фосфорилирования происходит образование АТФ.

Ряд микроорганизмов производит дезаминирование аминокислот с образованием пировиноградной кислоты, которая включается в энергетический обмен одним из описанных выше путей. Так, для E. coli характерно образование пировиноградной кислоты из аланина:



Аналогичным образом эта бактерия потребляет и другие аминокислоты. Пировиноградная кислота образуется также при дезаминировании серина, глутамата. Продукты расщепления аминокислот включаются в ЦТК через ацетил-КоА, α-кето-глутаровую кислоту и сукцинил-КоА.

Микроорганизмы для своих жизненных процессов используют энергию, выделяемую при катаболизме продуктов дезаминирования. Но значительная часть энергии микроорганизмам может постановляться из смеси аминокислот, за счет сопряженных окислительно-восстановительных реакций между двумя соответствующими аминокислоты. Впервые эти реакции были описаны Стиклендом в 1934-1935 гг. в культурах анаэробных клостридиев. При этих реакциях одни аминокислоты играют роль доноров, а другие - акцепторов водорода. Например, реакция Стикленда между аланином и глицином:



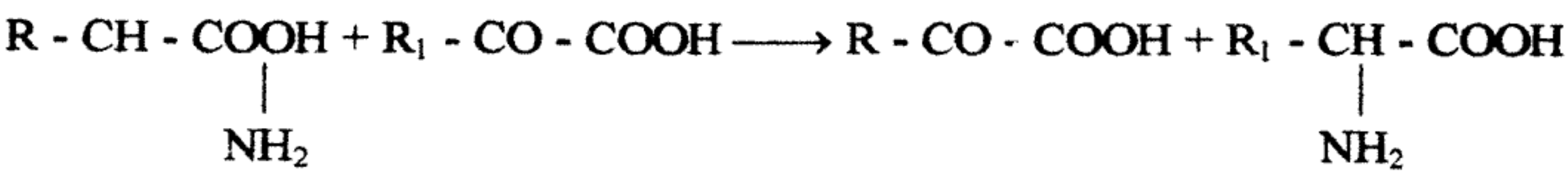
$$\longrightarrow CH_3COCOOH + CH_3COOH + NH_3$$

Образовавшаяся кетокислота декарбоксилируется, а если декарбоксилирование происходит в присутствии фосфата, то образуется макроэргическое фосфорное производное:

$$R - CO - COOH + H_3PO_4 \longrightarrow R - CO \infty PO_3H_2 + CO_2 + 2H$$

Данное производное может высвобождать накопленную энергию, образуя при этом соответствующую жирную кислоту.

Переаминирование. Сущность процесса переаминирования (трансаминирования) заключается в том, что аминогруппа α-аминокислоты перемещается в α-положение кетокислоты, т. е. происходит взаимодействие аминокислоты с кетокислотой, в процессе которого ферменты трансаминазы переносят аминогруппу с одной кислоты (аминокислоты) на другую (кетокислоту). Так, образуется новая аминокислота и кетокислота. Реакция идет по схеме:



В реакцию переаминирования легко вступают аланин и кетоглутаровая кислота. В результате образуются глутаминовая и пировиноградная кислоты. Последняя через ацетил-КоА вовлекается в цикл трикарбоновых кислот и окисляется до углекислоты и воды. Впервые эту реакцию описали А. Е. Браунштейн и М. Г. Крицман (1937-1938) для тканей животных. У бактерий трансаминазы впервые описаны Б. Лихштейном и Г. Коэном в 1944 г. Реакции переаминирования ими были обнаружены у бактерий различных родов: стрептококков, стафилококков, кишечной палочки, азотобактера, клостридиев. Они также получили бесклеточный

препарат глутаминаспарагинтрансаминазы и исследовали механизм реакции переаминирования:

$$HOOC - CH_2CH_2CHNH_2 - COOH + HOOC - CH_2CO - COOH \rightleftharpoons$$

глутаминовая кислота *щавелевоуксусная кислота*

$$\rightleftharpoons HOOC - CH_2CHNH_2 - COOH + HOOC - CH_2 - CH_2 - CO - COOH$$

аспарагиновая кислота *кетоглутаровая кислота*

Авторами было показано и то, что коферментом является пиридоксальфосфат.

Переаминирование широко распространено у бактерий и является весьма важным процессом биологического распада и синтеза аминокислот. Но не все бактерии обладают одинаковой способностью к расщеплению аминокислот. Многие из обычных грамотрицательных бактерий содержат ферменты, расщепляющие значительное количество аминокислот. Так, Proteus vulgaris, Aerobac. aerogenes, E. coli расщепляют свыше 13 аминокислот. Грамположительные кокки (стрептококки, стафилококки) расщепляют ограниченное количество аминокислот. Поэтому для них аминокислоты не являются существенным источником энергии.

7.3. ЛИПИДЫ КАК ИСТОЧНИК ЭНЕРГИИ

Липиды (по сравнению с углеводами и белками) - наиболее богатые потенциальные источники энергии. При биологическом окислении 1 г жира освобождается 9,3 ккал энергии, в то время как при окислении 1 г углевода или белка выделяется только 4,1 ккал. В основе получения энергии микроорганизмами при использовании липидов лежат многообразные катаболические реакции, приводящие к полному расщеплению молекулы липида и освобождению энергии. Способность микроорганизмов использовать липиды определяется наличием у них активных липолитических ферментов - липаз.

Липазы микроорганизмов мало привлекали к себе внимание, так как жиры в силу устойчивости молекул, за редким исключением, не входят в состав питательных сред и практически не используются для культивирования микроорганизмов.

Большинство бактерий легко осуществляет гидролиз глицеринов (сложных эфиров глицерина и жирных кислот) и в то же время с большим трудом разрушают высшие жирные кислоты (стеариновую, пальмитиновую и др.). А некоторые бактерии - Bact. stearothermophyllus, Achromobacter lipoliticum - обладают сильно выраженной липолитической активностью. Они могут приводить к большим потерям в пищевой промышленности вследствие разрушения ими липидов.

Исследования, проведенные с липазами стафилококка показали, что эти ферменты весьма активны в период интенсивного размножения бактерий.

Гидролиз фосфолипидов осуществляется фосфолипазами или лецитиназами. Они расщепляют фосфолипиды типа лецитина и фосфатидилхолина. Лецитиназы представляют собой истинные токсины бактерий Cl. welchii (газовой гангрены).

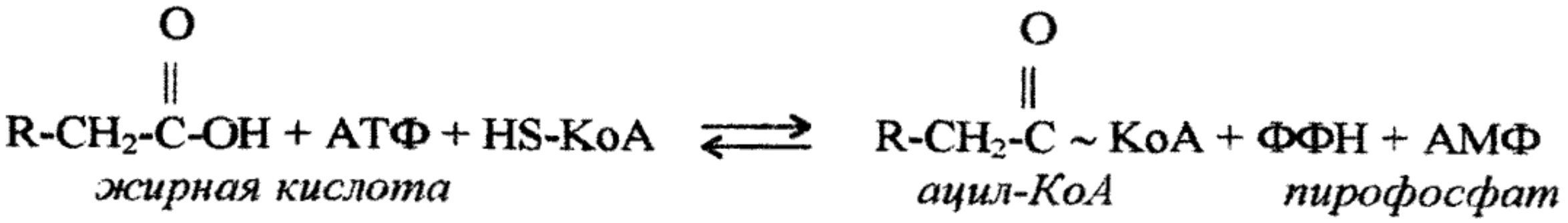
Наличие лецитиназ присуще широкому кругу микроорганизмов различных систематических групп. Они обнаружены у многих почвенных бактерий, особенно споровых форм, актиномицетов. Бактерии, содержащие лецитиназы, играют большую роль в освобождении фосфора из органических соединений - нуклеиновых кислот, фитина и лецитина.

Окисление жирных кислот осуществляется с образованием ацетил-КоА, который играет важную роль в превращении липидов. Он активирует и переносит различные кислотные остатки (ацилы), участвует в превращении углеродных атомов углеводов, жирных кислот, глицерина и аминокислот. В обобщенном виде этот процесс может быть представлен следующим образом. Под действием липаз происходит гидролиз сложных липидов на составляющие их спирты и жирные кислоты. Так, жиры гидролизуются на глицерин и соответствующие жирные кислоты. В дальнейшем расщепление глицерина и жирных кислот идет разными путями и сопровождается образованием АТФ.

Глицерин при участии специфической фосфоферазы сначала фосфорилируется, затем окисляется через фосфоглицериновую кислоту до фосфоглицеринового альдегида. Последний превращается гликолитическим путем в пировиноградную кислоту, которая в зависимости от видовой специфичности микроорганизма

может давать начало одному из описанных выше путей энергетического обмена.

Расщепление образовавшихся при гидролизе свободных жирных кислот происходит также довольно сложным путем. Сначала кислота активируется коэнзимом А, и при участии АТФ образуется ацильное производное жирной кислоты - эфир КоА и жирной кислоты:



Дальнейшее превращение кислоты состоит из ряда β-окислений (всегда окисляется атом углерода, находящийся в β-положении). Сущность этого окисления состоит в следующем. Активированная жирная кислота окисляется до β-ненасыщенного производного, которое через серию реакций дегидрогенирования и гидратации превращается в β-кетокислоту. При последующем окислении от β-кетокислоты отщепляется двууглеродное производное КоА - ацетил-КоА, на место кетонной группы присоединяется карбоксильная. Образуется новая жирная кислота, содержащая на два атома углерода меньше, чем исходная. Она 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. Последние включаются в цикл трикарбоновых кислот и окисляются до углекислоты и воды. Включение происходит путем связывания ацетильной части CH_3CO со щавелево-уксусной кислотой при образовании лимонной кислоты. КоА освобождается и опять соединяется с новыми молекулами жирной кислоты.

В результате расщепления жирных кислот через ацетил-КоА высвобождается значительное количество энергии, которая запасается в АТФ. Установлено, что при полном расщеплении высокомолекулярной жирной кислоты, например, пальмитиновой, образуется 136 молекул АТФ.

В связи с тем, что липиды неодинаковы по химическому составу, пути расщепления их также различны. Но каждый из них приводит к высвобождению энергии.

Двууглеродные соединения как источник энергии. В качестве источников энергии микроорганизмы могут использовать различные двууглеродные соединения, такие как уксусная и гликолевая кислоты, этиловый спирт и др. Активированная уксусная кислота в форме ацетил-КоА может непосредственно включаться в цикл трикарбоновых кислот и полностью окисляться. Гликолевая кислота и этиловый спирт предварительно окисляются до глиоксиловой кислоты, которая в свою очередь окисляется в цикле дикарбоновых кислот. Таким же путем некоторые микроорганизмы производят и окисление ацетата. Так как этот путь обязательно включает глиоксиловую кислоту, он получил название глиоксилатного цикла (рис.7.6). Для функционирования этого цикла необходимо наличие двух дополнительных ферментов - изоцитратазы и малатсинтазы. Изоцитратаза катализирует расщепление изоцитрата с образованием глиоксиловой кислоты,

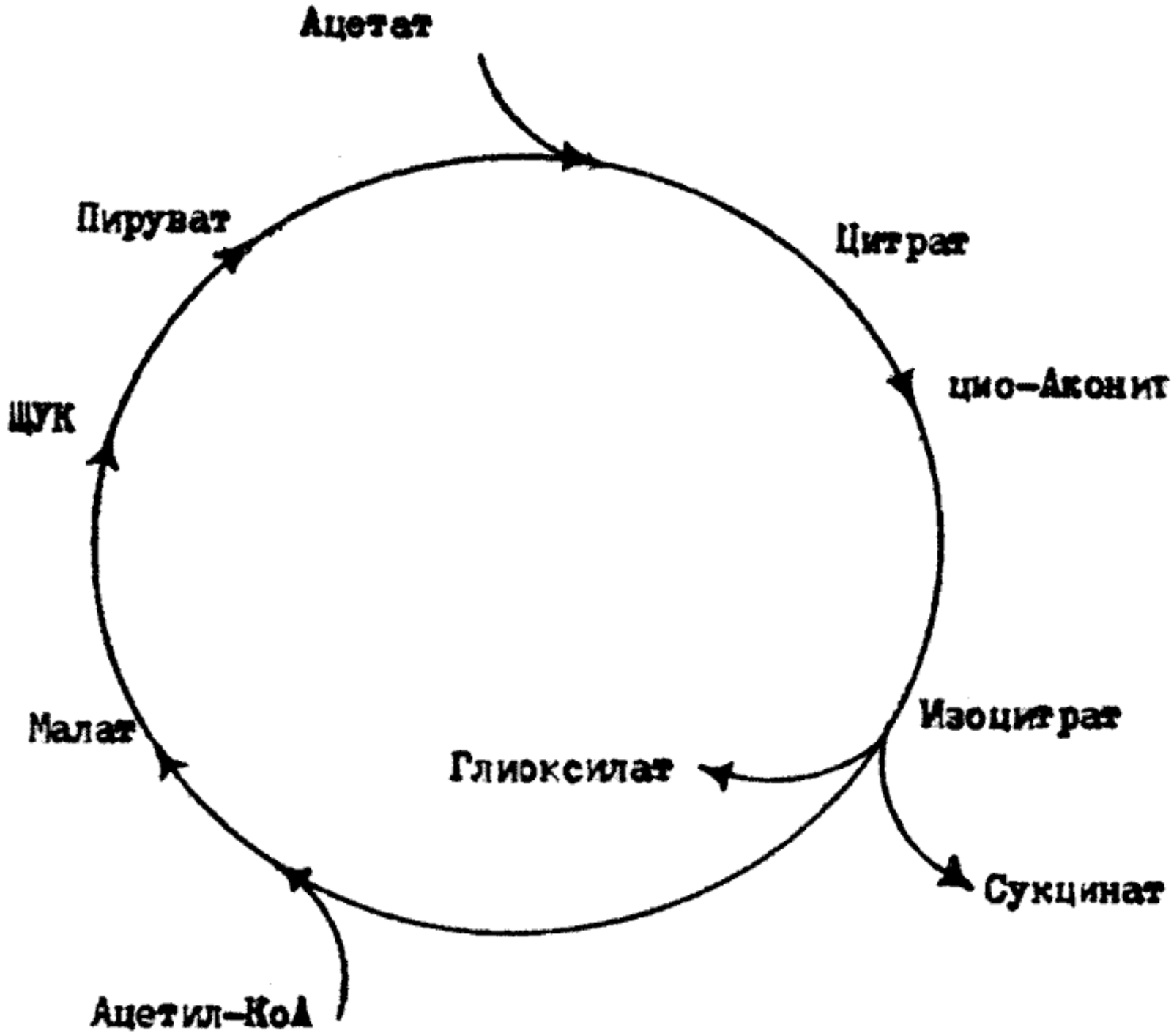


Рис.7.6. Глиоксилатный цикл

малатсинтаза - реакцию соединения глиоксиловой кислоты с ацетил-КоА в цикле дикарбоновых кислот. В результате этой реакции образуется яблочная кислота, которая затем окисляется в щавелево-уксусную и через фосфоенолпируват до пирувата.

Окисление глиоксиловой кислоты сопровождается образованием АТФ. Положительная роль цикла глиоксиловой кислоты состоит не только в образовании АТФ, но и в синтезе четырехуглеродных дикарбоновых кислот - янтарной, яблочной, щавелево-уксусной.

У бактерий рода Pseudomonas и E. coli установлено наличие фермента изоцитратсинтазы. Он катализирует расщепление изоцитрата с образованием глиоксилата и сукцината (янтарной кислоты). Сукцинат используется микроорганизмами для синтеза щавелевоуксусной (ЩУК) кислоты, что обеспечивает непрерывность реакций цикла трикарбоновых кислот. Глиоксилатный цикл восполняет промежуточные соединения цикла Кребса, потребляемые для биосинтеза. Поэтому этот цикл называется восполняющим или анаплеротическим.

7.4. БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Большая часть энергии, получаемой клеткой при реакциях катаболизма, расходуется на процессы биосинтеза органических соединений - процессы анаболизма. Универсальную роль в обеспечении клетки химической энергией играет АТФ. Он образуется при расщеплении органических соединений и расходуется при их синтезе, объединяя таким образом два взаимно противоположных процесса - катаболизм и анаболизм - в единое целое, составляющее сущность обмена веществ - метаболизма.

7.4.1. Фиксация углекислого газа и биосинтез углеводов

Исходным сырьем для синтеза углеводов является углекислота, которая фиксируется микроорганизмами разными путями. Большинство фотосинтезирующих прокариот фиксируют углекислоту тем же путем, что и высшие растения - через восстановительный пентозофосфатный цикл, или цикл Кальвина.

Только зеленые серобактерии рода Chlorobium фиксируют углекислоту иным, присущим только им путем - через цикл реакций восстановительного карбоксилирования органических кислот - цикл Арнона. В результате полного оборота цикла фиксируется 4 молекулы углекислоты, конечным продуктом является щавелево-уксусная кислота. При более коротком варианте цикла фиксируется 2 молекулы углекислоты и образуется ацетил-КоА. Конечные продукты цикла - щавелевоуксусная кислота и ацетил-КоА - поступают в клеточный метаболизм.

Фиксация углекислоты по циклу Арнона не имеет широкого распространения, ограничивается только одним родом Chlorobium.

Основным путем фиксации углекислоты является цикл Кальвина (рис.7.7). Он отличается от других путей тем, что в нем в результате ряда реакций синтезируется гексоза (фруктозо-6-фосфат). Реакции цикла катализируются разными ферментами, но специфическими, присущими только данному циклу, являются два из них: фосфорибулокиназа, фосфорилирующая рибулозо-5-фосфат при участии АТФ с образованием рибулозо-1,5-дифосфата, и рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза, катализирующая реакцию между рибулозо-1,5-дифосфатом и углекислотой, приводящей к образованию двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты.

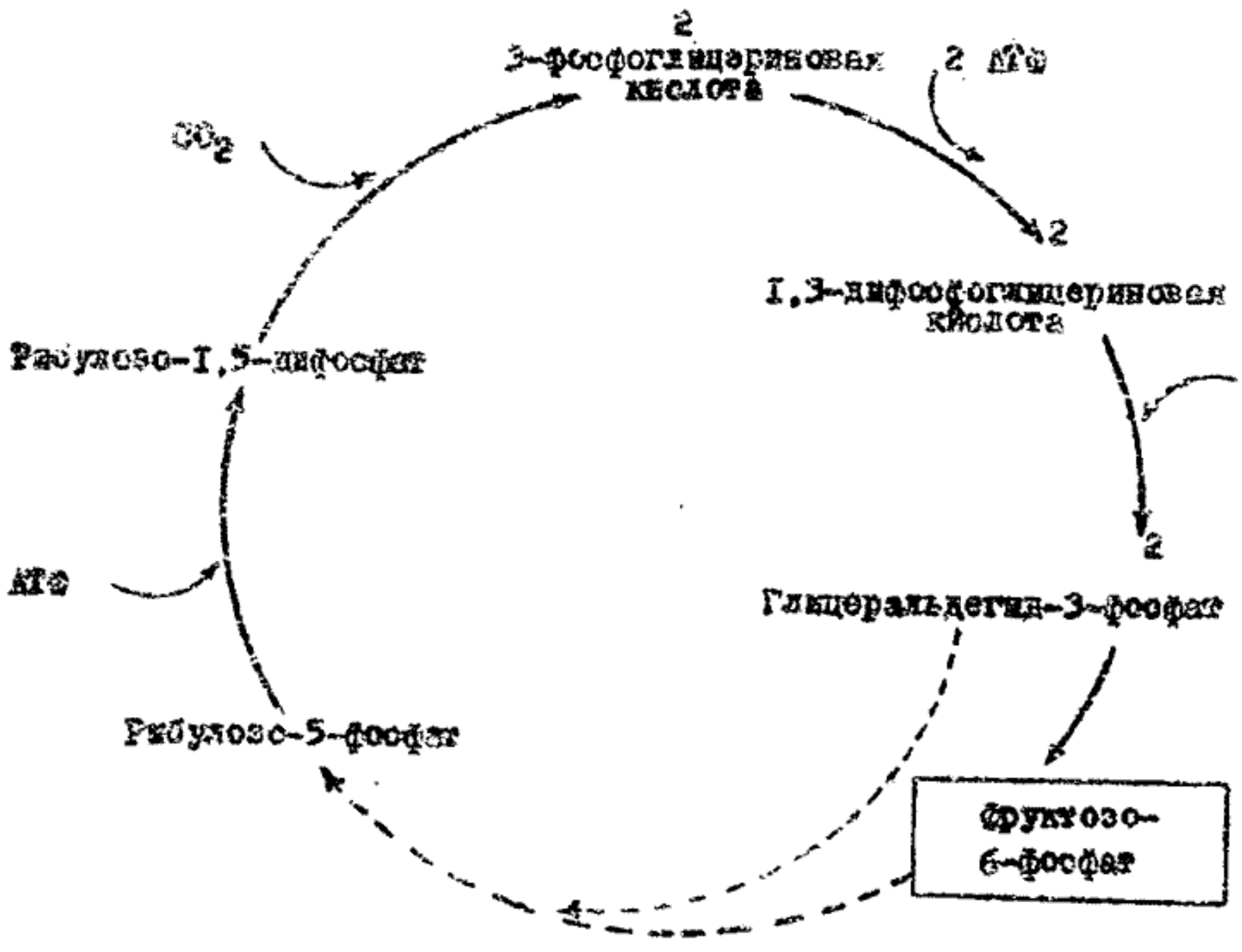


Рис. 7.7. Цикл Кальвина (сокращенно)

Таким образом, первым акцепторов углекислоты является рибулозофосфат, а первым продуктом фотосинтеза - фосфоглицериновая кислота. Последняя гликолитическим путем через ряд реакций, идущих в обратном направлении с образованием фосфоглицеринового альдегида и фосфодиоксиацетона, превращается в фруктозо-6-фосфат (путем конденсации двух триоз). Для синтеза одной молекулы гексозы используется шесть молекул углекислоты. Фосфоглицериновая кислота, образующаяся в процессе фотосинтеза, является предшественником всех моносахаридов. Подвергаясь различным превращениям, она служит источником образования фруктозы, глюкозы, галактозы, маннозы.

Аналогичным путем фиксацию углекислоты и синтез углеводов осуществляют хемосинтезирующие бактерии, используя для этих целей энергию АТФ, которая образуется в результате окисления неорганических веществ.

Наряду с образованием моносахаридов у фотосинтезирующих бактерий рода Chromatium при ассимиляции углекислоты в значительном количестве появляется аспарагиновая кислота.

Предполагается, что у этих бактерий, как и у высших растений, первичной является фосфоглицериновая кислота. Из нее образуется фосфоенолпировиноградная кислота, которая, карбоксилируясь, дает щавелевоуксусную кислоту. Последняя путем переаминирования превращается в аспарагиновую кислоту.

У гетеротрофных микроорганизмов известны другие пути фиксации углекислоты. Реакции между фосфоенолпируватом и углекислотой с образованием щавелевоуксусной кислоты (ЩУК):

$$\text{фосфоенолпируват} + CO_2 \longrightarrow \text{ЩУК} + \Phi_н$$

Карбоксилирование пирувата с образованием яблочной или щавелевоуксусной кислоты:

$$CH_3COCOOH + CO_2 + \text{АТФ} \rightleftarrows \text{ЩУК} + \text{АДФ} + \Phi_н$$

Карбоксилирование ацетил-КоА с образованием пирувата:

$$CH_3CO\text{-}S\ KoA + CO_2 + 2H \longrightarrow CH_3COCOOH + KoASH$$

Гетеротрофы могут синтезировать углеводы из пирувата и углерода C_2- и C_3- соединений.

7.4.2. Биосинтез полисахаридов

Моносахариды, образовавшиеся в результате фиксации углекислоты, служат источником синтеза полисахаридов, который осуществляется с помощью глюкозидных связей, возникающих между глюкозидным гидроксилом одного моносахарида и любой группировкой другого. (Гидроксильные группы, расположенные при первом углеродном атоме глюкозы и втором - фруктозы, в пираноидной форме называются глюкозидными гидроксилами). Для образования глюкозидной связи необходима энергия. Поэтому прежде всего происходит фосфорилирование глюкозы с превращением ее в глюкозо-1-фосфат при участии фермента фосфорилазы. Превращение идет в два этапа. Вначале в результате реакция между глюкозой и АТФ образуется глюкозо-6-фосфат:

$$\text{глюкоза} + \text{АТФ} \longrightarrow \text{глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ}.$$

Затем под действием фермента фосфоглюкомутазы глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат:

$$\text{глюкозо-6-фосфат} \rightleftharpoons \text{глюкозо-1-фосфат}.$$

Образовавшийся гексозофосфат и его аналоги идут на синтез полисахаридов. Это основной путь образования полисахаридов из простых сахаров. Бактерии дифтерии и некоторые стрептококки синтезируют полисахариды типа крахмала только из глюкозо-1-фосфата и не могут их синтезировать из нефосфорилированных сахаров.

Но многие бактерии обладают способностью синтезировать полисахариды из сахаридов без участия фосфатов. Например, Leuconostoc mesenteroides синтезирует декстран из сахарозы, причем

в состав декстрана входит только глюкоза, а фруктоза остается свободной:

$$(C_{12}H_{22}O_{11}) \longrightarrow (C_6H_{10}O_5)n + (C_6H_{12}O_6)$$
сахароза *декстран* *фруктоза*

Многочисленные бактерии синтезируют полисахариды, состоящие из многих типов простых сахаров. Например, Streptococcus faecalis синтезирует полисахарид, состоящий из галактозы, глюкозы, рамнозы и гексозамина.

В общих чертах сущность синтеза ди- и полисахаридов всех типов состоит в реакциях переноса остатков моносахаридов, соединенных глюкозидной и фосфатной связями, богатой энергией, с глюкозиддонора на акцептор. Донорами моносахаридов могут быть глюкозо-1-фосфат, различные глюкозиды и полисахариды; акцепторами - неорганический фосфат, моносахариды и полисахариды. Реакции синтеза полисахаридов в большинстве обратимы и идут с затратой энергии.

7.4.3. Биосинтез нуклеотидов

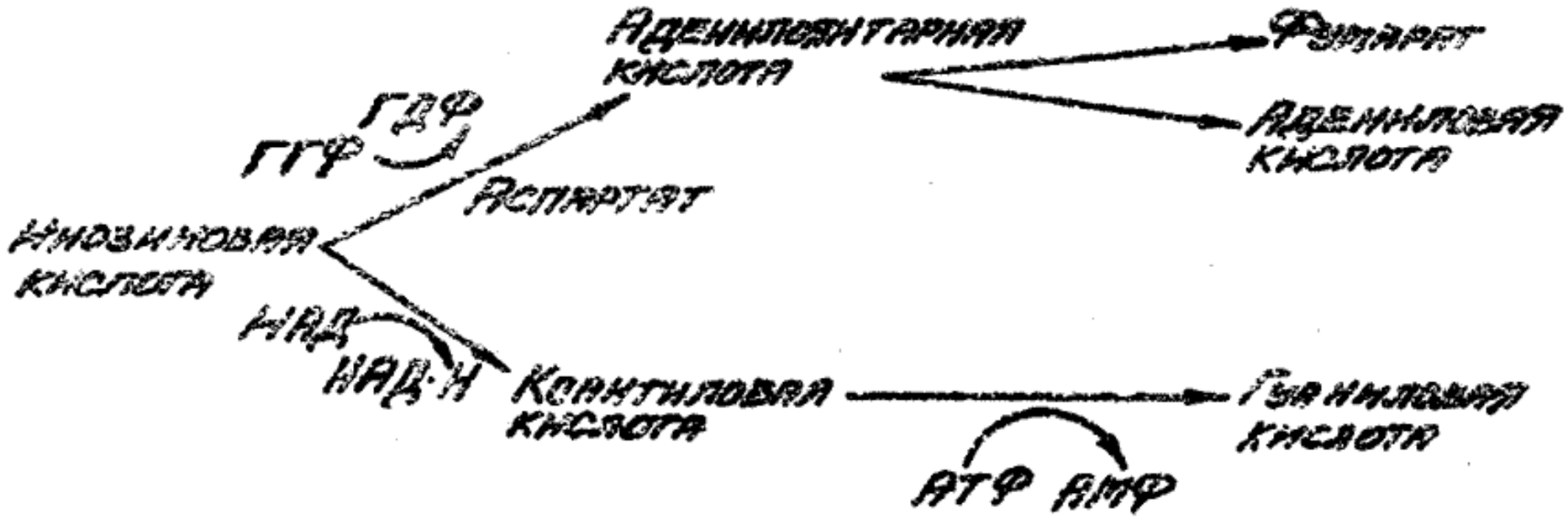
Нуклеотиды являются исходным материалом для синтеза нуклеиновых кислот. По химической природе они представляют собой сложные соединения, состоящие из азотистых оснований - производных пурина или пиримидина, углеводов пентоз и фосфорной кислоты.

Большинство микроорганизмов способны синтезировать нуклеотиды заново из низкомолекулярных соединений, а некоторые для этих целей используют готовые азотистые основания, образующиеся при распаде нуклеиновых кислот.

Пути биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов хорошо изучены. Большей сложностью отличается синтез пуриновых нуклеотидов. В нем используются рибозо-5-фосфат, глутамин и АТФ. В результате комплекса ферментативных реакций образуется инозиновая кислота, а из нее - пуриновый нуклеотид гипоксантин. Он служит исходным продуктом для синтеза других нуклеотидов - адениловой и гуаниловой кислот, которые

необходимы для синтеза РНК. Биосинтез данных кислот осуществляется в две стадии. При образовании гуаниловой кислоты на первой стадии инозиновая кислота при участии НАД окисляется в ксантозинфосфорную кислоту. На второй стадии эта кислота взаимодействует с глутамином (отщепляет аммиак) и за счет энергии АТФ синтезируется гуаниловая кислота (нуклеотид, содержащий гуанин).

При синтезе адениловой кислоты на первой стадии инозиновая кислота отнимает аммиак от аспарагиновой кислоты за счет энергии гуанизинтрифосфата (ГТФ). В результате образуется аденилоянтарная кислота. На второй стадии данная кислота распадается на фумаровую и адениловую кислоты (нуклеотид, содержащий аденин):



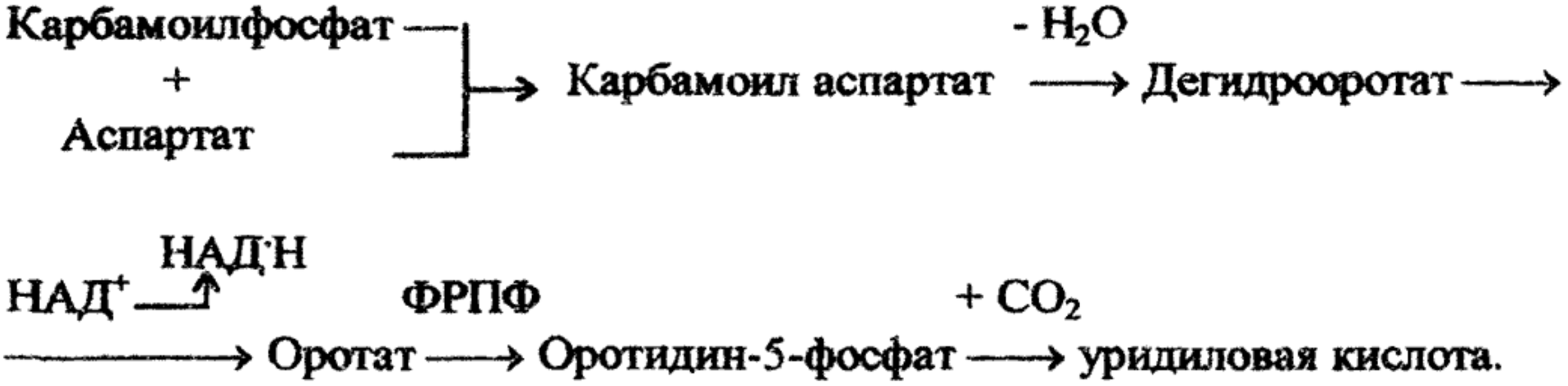
Синтез всех пиримидиновых нуклеотидов идет общим путем до образования уридиловой кислоты (нуклеотид, содержащий урацил). Первой стадией является образование карбамоилфосфата из аммиака и углекислоты:

$$NH_3 + CO_2 + АТФ \longrightarrow NH_2\text{-}C(=O)\text{-}O \sim P(=O)(OH)\text{-}OH + АДФ$$

карбомоилфосфат

Карбамоилфосфат соединяется с аспарагиновой кислотой, образуя карбамоиласпарагиновую кислоту, которая в результате дегидратации и окисления превращается в циклическое соединение -

оротовую кислоту. Последняя, конденсируясь с фосфорибозилпирофосфатом (ФРПФ), образует оротидин-5-фосфат. Оротидин-5-фосфат в свою очередь карбоксилируется и превращается в уридиловую кислоту:



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

Эти нуклеотиды полимеризуются в полинуклеотиды - молекулы ДНК или РНК. Реакции полимеризации катализируются ферментами ДНК- и РНК-полимеразами (см. гл. 2).

Синтез нуклеиновых кислот осуществляется только при наличии матрицы - молекулы ДНК в одно- или двуцепочечной форме.

Нуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты представляют собой сложные полимеры, состоящие из разного количества нуклеотидов (75-5 000 000). В состав нуклеотида входят азотистое основание пуринового или пиримидинового типа, сахар рибоза или дезоксирибоза и фосфатная группа. В зависимости от входящего в молекулу нуклеотида сахара различают рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды. Нуклеотиды, соединяясь между собой фосфодиэфирными связями, образуют полинуклеотиды, называемые соответственно рибонуклеиновыми (РНК) или дезоксирибонуклеиновыми (ДНК) кислотами.

Молекула ДНК содержит дезоксирибозу и основания - аденин, гуанин, тимин, цитозин. Согласно модели Уотсона-Крика молекула ДНК состоит из двух правозакрученных полинуклеотидных цепей, образующих одну двойную спираль. Пуриновые и пиримидиновые основания обращены внутрь спирали, а остатки фосфата и

дезоксирибозы находятся снаружи. Две цепи удерживаются вместе водородными связями между определенными парами оснований: аденин всегда спаривается с тимином, гуанин - с цитозином. Цепи двойной спирали взаимно комплементарны и служат матрицами при репликации ДНК.

Молекула РНК содержит сахар рибозу и основания - аденин, гуанин, цитозин, урацил. Прокариоты содержат три типа РНК: информационную (матричную) - иРНК, транспортную - тРНК, рибосомальную - рРНК. Причем имеется три типа рибосомальных РНК. Они различаются по числу входящих в их сотав нуклеотидов и коэффициенту седиментации. Это 23S-, 16S- и 5S-РНК. В рибосомах содержится по одной молекуле каждой из этих РНК.

По количественному содержанию в клетках преобладает рибосомальная РНК (у E. coli до 80 %), затем следует транспортная РНК (до 15 %) и меньше всего содержится информационной РНК (до 5 %).

Все три типа РНК участвуют в синтезе белка, выполняя строго определенные функции: иРНК служит матрицей для синтеза белка; тРНК - доставляет активированные аминокислоты к рибосомам; рРНК - основной компонент рибосом. Роль ее в синтезе белка пока точно не определена.

7.4.4. Биосинтез аминокислот

Большинство микроорганизмов, подобно высшим растениям, способны синтезировать все аминокислоты, входящие в состав клеточных белков. Исходным материалом для построения углеродных скелетов аминокислот служат промежуточные продукты обмена углеводов в реакциях гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Наиболее важными из них являются кетокислоты. Перевод азота в органические соединения осуществляется через аммиак. Нитраты, нитриты, молекулярный азот восстанавливаются до аммиака в результате ассимиляционной нитратредукции и включаются в состав органических соединений.

Некоторые аминокислоты образуются путем прямого аминирования кетокислот аммонием. Аминогруппы вводятся путем прямого аминирования или трансаминирования. Таким путем

происходит первичная ассимиляция аммиака и построение первичных аминокислот, которые служат источником аминных групп для образования других аминокислот путем переаминирования, т. е. переноса аминогрупп с аминокислот на кетокислоты. В реакциях прямого аминирования принимают участие глутаматдегидрогеназа и аланиндегидрогеназа. Так, α-кетоглутаровая кислота при участии глутаматдегидрогеназы реагирует с аммонием, образуя глутаминовую кислоту, аланиндегидрогеназа катализирует включение аммония в пировиноградную кислоту и образование аланина; аспартатаммиаклиаза катализирует синтез аспарагиновой аминокислоты:

$$HOOC\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}COOH + NH_3 + НАДФ \cdot H \rightleftharpoons$$

α-оксиглутаровая кислота

$$\rightleftharpoons HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}\text{-}COOH + H_2O + H^+ + НАДФ$$

глутаминовая кислота

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + NH_3 + НАД \cdot H \rightleftharpoons CH_3\text{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}\text{-}COOH + H_2O + НАД + H^+$$

пируват — *аланин*

$$HOOC\text{-}CH{=}CH\text{-}COOH + NH_3 \rightleftharpoons HOOC\text{-}CH_2\text{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}\text{-}COOH + H^+$$

соумаровая кислота — *аспарагиновая кислота*

Многие гетеротрофные бактерии образуют новые аминокислоты в основном через трансаминирование или переаминирование аминокислот, потребляемых из питательной среды. Важным в биосинтетических реакциях является превращение одних аминокислот в другие: например, глутамата в аргинин и пролин; аспарагиновой кислоты в лизин, метионин, треонин; треонина в глюкокол и т. д.

Особенностью биосинтеза аминокислот является наличие общих метаболических путей. Всего выделяют шесть таких путей и соответсвенно им все 20 аминокислот основного набора разделяют на шесть биосинтетических семейств (табл.3). Из них только гистин имеет самостоятельный путь биосинтеза.

Пути биосинтеза аминокислот приводят также к образованию иных азотсодержащих соединений, таких как полиамины, пурины, фолиевая кислота и другие вещества, необходимые для клетки.

Таблица 3

Особенности биосинтеза аминокислот

Предшественник	Метаболический путь образования предшественника	Аминокислоты с общими путями метаболизма
Щавелевоуксусная кислота	цикл трикарбоновых кислот реакции карбоксилирования	аспарагиновая кислота аспарагин лизин метионин треонин изолейцин
Кетоглутаровая кислота	цикл трикарбоновых кислот	глутаминовая кислота глутамин аргинин пролин
3-фосфоглицериновая кислота	гликолиз цикл Кальвина	серин глицин цистеин
Пировиноградная кислота	гликолиз путь Энтнера-Дудорова	аланин валин лейцин
Фосфоенолпировиноградная кислота + эритрозо-4-фосфат	гликолиз окислительный пентозо-фосфатный путь	триптофан тирозин фенилаланин
5-фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ	окислительный пентозофосфатный путь	гистидин

7.4.5. Биосинтез белков

Аминокислоты, синтезированные внутриклеточно или потребленные из внешней среды, полимеризуются в молекулу белка. Механизм полимеризации довольно сложный и осуществляется в несколько этапов при непосредственном участии всех видов нуклеиновых кислот, которые играют решающую роль в биосинтезе белка. В ДНК закодирована информация о структуре каждого типа белка, характерного для определенного организма. Различные участки ДНК функционально неоднородны, и одна ее молекула может определять синтез большого числа функционально и химически различных белков клетки. Участок ДНК (несколько пар нуклеотидов), определяющий синтез одного типа белка, обозначается как ген. Ген передает информацию особой РНК, которая синтезируется на нем как на матрице и называется информационной, или матричной, РНК (мРНК). При синтезе мРНК копируется нуклеотидная последовательность информации, закодированной в ДНК, называемая транскрипцией. Процесс перевода нуклеотидной последовательности мРНК в последовательность аминокислот в полипептиде называется трансляцией. Таким образом, синтез полипептида включает два процесса - транскрипцию и трансляцию:

$$\text{ДНК} \xrightarrow{\text{транскрипция}} \text{мРНК} \xrightarrow{\text{трансляция}} \text{полипептид}$$

Включение конкретной аминокислоты в синтезируемую пептидную цепь определяется комбинацией трехсоседних нуклеотидов в молекуле мРНК - триплетом.

Триплеты ДНК называются кодонами. Большинство аминокислот кодируется несколькими триплетами. Это значит, что генетический код вырожден (табл.4).

Таблица 4

Генетический код

Первая буква	Вторая буква			
	У	Ц	А	Г
У	УУУ Фен[1]	УЦУ Сер	УАУ Тир	УГУ Цис
	УУЦ Фен	УЦЦ Сер	УАЦ Тир	УГЦ Цис
	УУА Лей	УЦА Сер	УАА (нет)[2]	УГА (нет)[2]
	УУГ Лей	УЦГ Сер	УАГ (нет)[2]	УГГ Три
Ц	ЦУУ Лей	ЦЦУ Про	ЦАУ Гис	ЦГУ Арг
	ЦУЦ Лей	ЦЦЦ Про	ЦАЦ Гис	ЦГЦ Арг
	ЦУА Лей	ЦЦА Про	ЦАА Гли	ЦГА Арг
	ЦУГ Лей	ЦЦГ Про	ЦАГ Гли	ЦГГ Арг
А	АУУ Иле	АЦУ Тре	ААУ Асн	АГУ Сер
	АУЦ Иле	АЦЦ Тре	ААЦ Асн	АГЦ Сер
	АУА Иле	АЦА Тре	ААА Лиз	АГА Арг
	АУГ Мет	АЦГ Тре	ААГ Лиз	ААГ Арг
Г	ГУУ Вал	ГЦУ Ала	ГАУ Асп	ГГУ Гли
	ГУЦ Вал	ГЦЦ Ала	ГАЦ Асп	ГГЦ Гли
	ГУА Вал	ГЦА Ала	ГАА Глу	ГГА Гли
	ГУГ Вал	ГЦГ Ала	ГАГ Глу	ГГГ Гли

Фен - фенилаланин
Лей - лейцин
Иле - изолейцин
Мет - метионин
Вал - валин
Сер - серин
Про - пролин
Тре - треонин
Ала - аланин
Тир - тирозин
Гис - гистидин
Гли - глицин
Асн - аспарагин
Лиз - лизин
Асп - аспарагиновая кислота
Глу - глутаминовая кислота
Цис - цистеин
Три - триптофан
Арг - аргинин
Сер - серин

Примечания: 1. Обозначения аминокислот; 2. Бессмысленные кодоны - вызывают преждевременную терминацию синтеза белка.

Все молекулы мРНК содержат сигналы начала и конца кодируемого ими белка. Матричная РНК связывается с малой субчастицей рибосомы, объединяя группу рибосом в полисомы.

Синтез белка у всех организмов происходит на рибосомах (рис.7.8). Доставку аминокислот к рибосомам осуществляют транспортные РНК (тРНК). Каждая аминокислота доставляется к рибосомам специфичной для нее тРНК.

Первым этапом синтеза белка является активирование

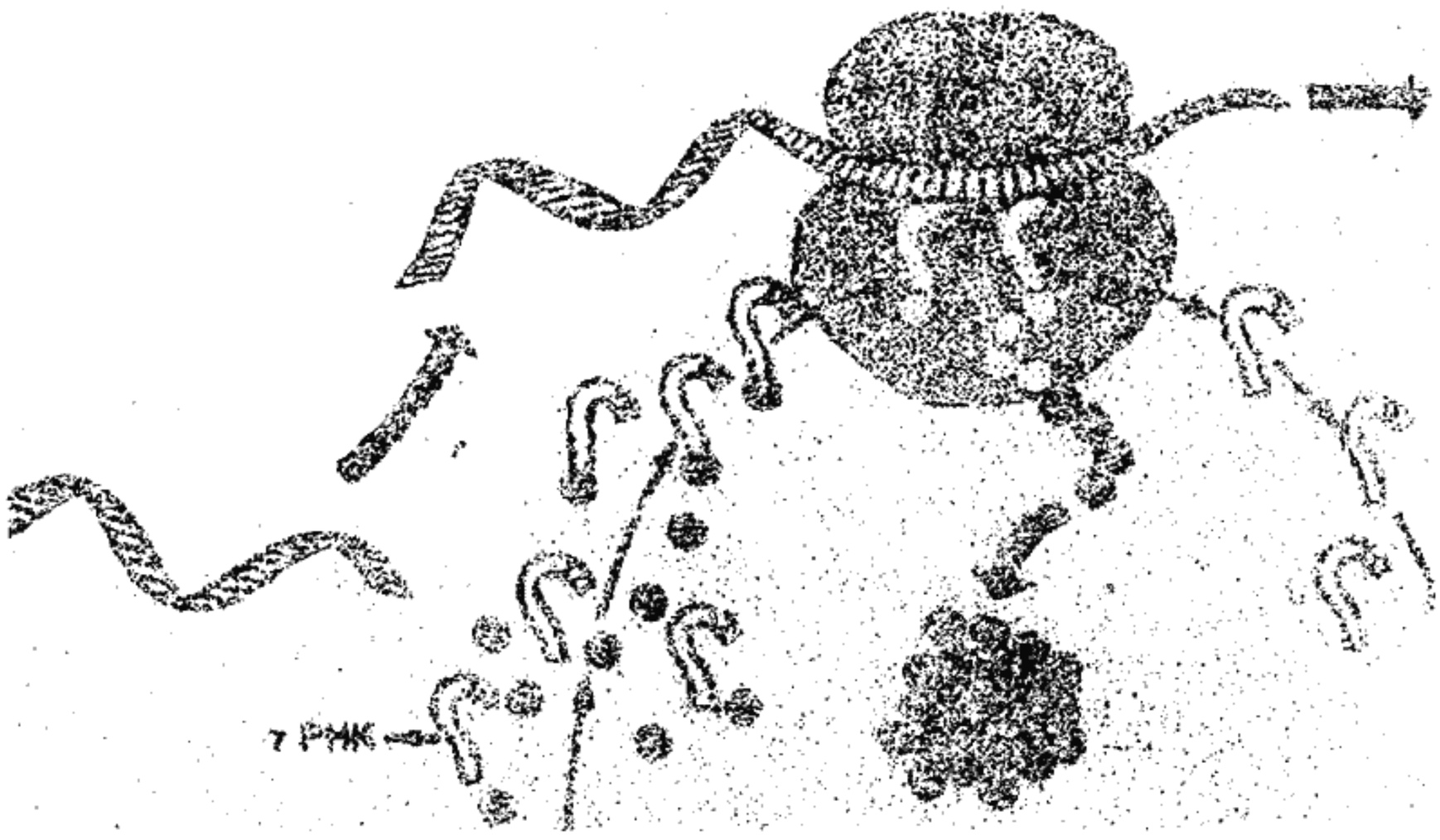


Рис. 7.8. Схема биосинтеза белка

аминокислот и образование аминоацил - тРНК. Этот процесс катализируется специфичными для каждой аминокислоты ферментами аминоацил - тРНК-синтетазами при участии АТФ в соответствии со следующим уравнением:

$$R\text{-}CHNH_2\text{-}COOH + АТФ \longrightarrow R\text{-}CH\text{-}NH_2\text{-}CO \sim АМФ + PP$$

пирофосфат

Транспортные РНК переносят аминокислоты к рибосомам, где они пептидными связями соединяются в пептидную цепь.

Перенос аминокислот к рибосомам посредством тРНК необходим, потому что сами по себе аминокислоты не способны узнавать кодоны в мРНК. Их узнают тРНК благодаря наличию в составе своей молекулы антикодонов. Кроме того, присоединение аминокислоты к рибозному остатку тРНК активирует карбоксильную группу аминокислоты и она способна к образованию пептидной связи. Узнавание кодона антикодоном (тРНК) контролируется рибосомами. Рибосомы движутся вдоль мРНК в направлении 5′— 3′, считывая кодоны путем присоединения к ним соответствующей аминоацил-тРНК. С каждым присоединением аминокислоты рибосома передвигается на один триплет вдоль мРНК, «считывая» шаг за шагом всю информацию.

Когда рибосома доходит до последнего триплета, то после присоединения соответствующей ему аминокислоты к растущей полипептидной цепи синтез белка прекращается.

Процесс трансляции, а следовательно, и образования полипептидной цепи, очень сложен. В нем различают три стадии: инициацию, элонгацию и терминацию.

Инициация синтеза всех белков начинается со связывания N-формил-метионил – тРНК с пептидильным центром (П) 30S-субчастицы рибосомы, которая присоединена к инициирующему триплету мРНК (АУГ или ГУГ). Затем нужная аминоацил-тРНК подходит к аминоацильному центру (А) 50S-субчастицы рибосомы и образуется первая пептидная связь. Таким образом, стадия инициации включает все реакции, обеспечивающие формирование пептидной связи между первыми двумя аминокислотами.

Далее следует стадия элонгации. Она включает реакции связывания соответствующих аминоацил-тРНК, образование пептидных связей и транслокацию. Пептидная цепь растет в направлении от Н-концевой аминокислоты к С-концевой, т. е. от аминокислоты со свободной аминогруппы к аминокислоте со свободной карбоксильной группой.

На стадии терминации полностью синтезированный полипептид освобождается от концевой тРНК. Рибосомы отделяются от мРНК и диссоциируют на исходные субчастицы. Терминацию синтеза белка осуществляют так называемые факторы освобождения. Это белки (RF_1–1, RF–2), способные узнавать терминирующие кодоны (УАГ, УДА, УГА). Связывание фактора освобождения с терминирующим кодоном активирует пептидилтрансферазу и она гидролизует связь между полипептидом и тРНК.

На рибосомах синтезируется белок первичной структуры, под которой понимают последовательность аминокислот в пептидной цепи. После завершения синтеза полипептидная цепь свертывается, приобретая вторичную и третичную структуру, а в ряде случаев объединяется с другими полипептидными цепями и в результате образуется белок четвертичной структуры. Синтез белка происходит с расходованием большого количества энергии. Только для

образования одной пептидной связи затрачивается количество энергии, эквивалентное 4 молекулам АТФ.

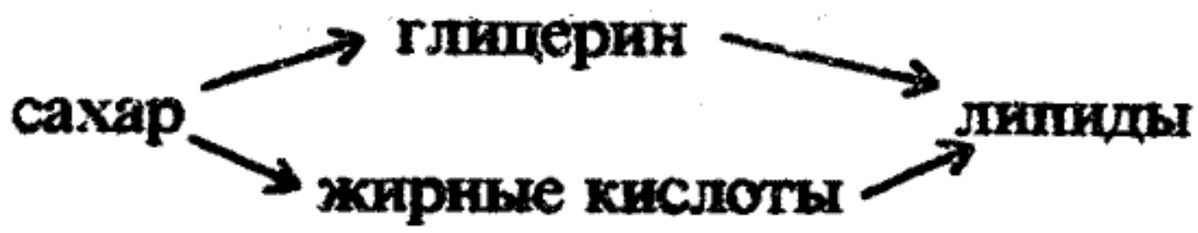
7.4.6. Биосинтез липидов

Микроорганизмы способны осуществлять биосинтез как сложных, так и простых липидов, которые входят в состав клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, являются запасными веществами, компонентами пигментных систем и цепей электронного транспорта.

Источником для синтеза липидов микроорганизмами служат углеводы, спирты, органические кислоты. Кроме них, необходимо наличие в среде фосфатов для образования фосфорилированных предшественников биосинтеза.

Образованию липидов предшествует синтез эфиров жирных кислот и коэнзима А. Затем следуют реакции конденсации жирных кислот с глицерином, приводящие к появлению липидов. Пути синтеза липидов сложные, реакции катализируются многими ферментами и протекают с затратой значительных количеств энергии. Например, на синтез только стеариновой кислоты из глюкозы затрачивается 945,7 кал.

Глюкоза может служить также источником глицерина:

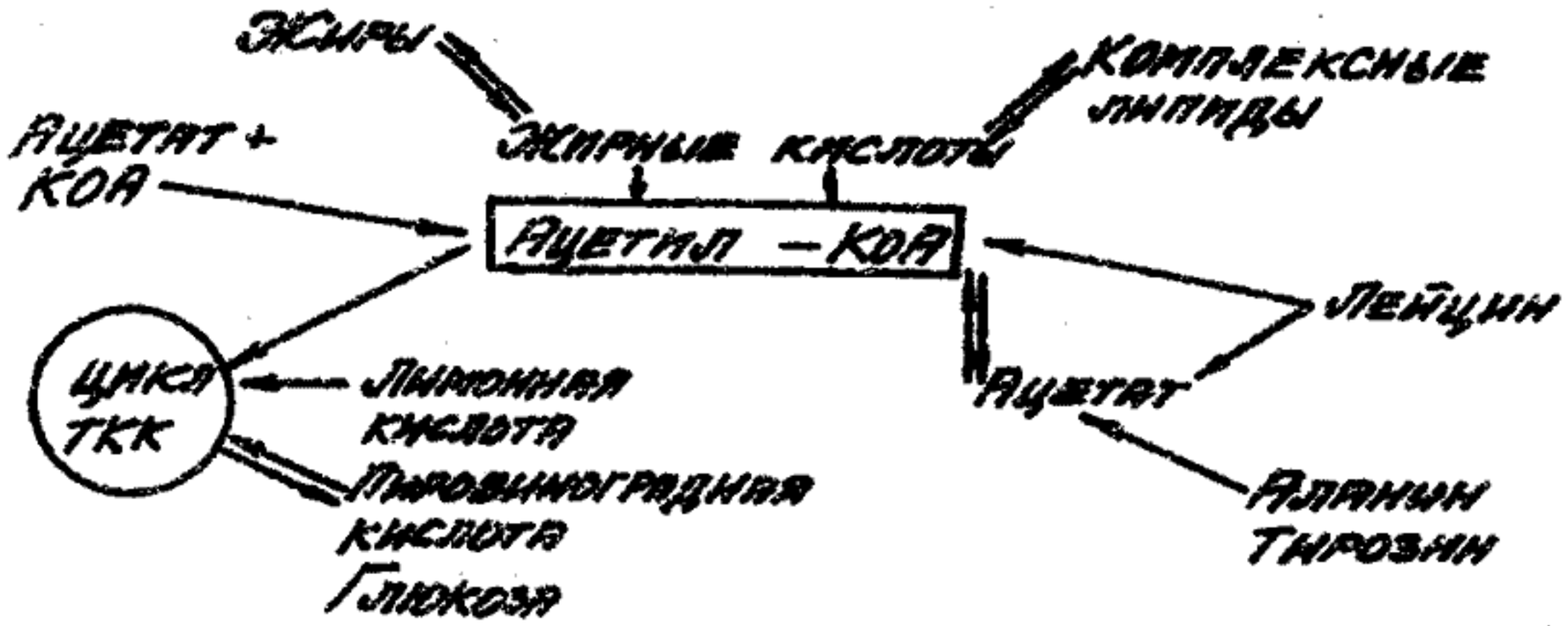


Глицерин получается в процессе анаэробного расщепления углеводов путем восстановления глицеринового альдегида. Жирные кислоты образуются из промежуточных продуктов распада углеводов, главным образом уксусной кислоты, уксусного альдегида, пировиноградной кислоты и этилового спирта. Важнейшей из них является уксусная кислота:

$$2CH_3COOH \longrightarrow CH_3COCH_2COOH \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH$$

уксусная кислота — *ацетоуксусная кислота* — *масляная кислота*

Но не сама уксусная кислота участвует в биосинтезе липидов, а ее производное - ацетилкоэнзим А, который является источником ацетильных радикалов и занимает центральное положение в метаболизме липидов:



Макроэргическая тиоэфирная связь ацетил-КоА при гидролизе высвобождает 8200 кал. Данная энергия используется для переноса ацетильных остатков, необходимых для биосинтеза жирных кислот. Ацетилкоэнзим А за счет различных органических кислот при помощи ряда циклических процессов - конденсирования, гидрогенезации и дегидратации - обеспечивает образование длинных цепей жирных кислот, являющиеся компонентами липидов в клетках эубактерий.

У цианобактерий выявлены полиненасыщенные жирные кислоты, имеющие две и более двойных связей, для образования которых аэробным бактериям необходим молекулярный кислород.

$$CH_3\text{-}(CH_2)_{14}\text{-}CO \sim S\text{-КоА} + O_2 + НАДФ \cdot H_2 \longrightarrow$$

пальмитил-КоА

$$\longrightarrow CH_3\text{-}(CH_2)_5\text{-}CH = CH\text{-}(CH_2)_7\text{-}CO \sim S\text{-КоА} + 2H_2O + НАДФ^+$$

пальмитолеил-КоА

Второй путь введения двойной связи в молекулу кислоты при ее синтезе осуществляется у облигатно анаэробных и некоторых аэробных эубактерий в результате реакции дегидратации.

Синтез фосфолипидов состоит из нескольких этапов. Исходный субстрат фосфодиоксиацетон (промежуточный продукт гликолитического пути) восстанавливается до 3-фосфоглицерина к

которому присоединяются два остатка жирных кислот с образованием фосфатидной кислоты. Происходит активирование ее с помощью ЦТФ и присоединение к фосфатной группе серина, инозита, глицерина приводят к синтезу фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и фосфатидилглицерина.

7.5. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА

Взаимосвязь и последовательность метаболических процессов в клетке обусловлена наличием сложной системы регуляции. Регуляторные механизмы обеспечивают приспособление микроорганизмов к условиям среды, экономичное потребление питательных веществ, предотвращают избыточный синтез метаболитов. Поскольку все реакции в клетке осуществляются при участии ферментов, то регуляция метаболизма сводится к регуляции синтеза и активности ферментов. Механизмы регуляции действуют при участии низкомолекулярных соединений и клеточных метаболитов, которые образуются в клетке, а также поступают в нее из окружающей среды. Существенную роль в этом играют аллостерические белки. Это особый класс белков, содержащих два активных центра. Среди них различают аллостерические ферменты и регуляторные аллостерические белки, не обладающие ферментативной активностью, но регулирующие синтез ферментов.

7.5.1. Механизмы регуляции синтеза ферментов

Ферменты разделяют на конститутивные и индуцибельные. Конститутивными называются ферменты, синтезируемые с одинаковой скоростью и содержащиеся в клетке в постоянной концентрации независимо от условий роста культуры. К таковым относятся ферменты гликолиза. Индуцибельными называются ферменты, синтезируемые только в ответ на присутствие в среде необходимого для клетки субстрата - индуктора. Количество индуцибельных ферментов может изменяться в зависимости от конкретных физиологических условий роста.

Регуляция синтеза ферментов осуществляется путем индукции, репрессии и аттенуации.

Индукция синтеза ферментов. Индуцибельный синтез ферментов в клетке идет только до тех пор, пока в среде присутствует индуктор. При этом фермент синтезируется заново и одновременно в большинстве клеток культуры. Индукторами синтеза ферментов являются многие субстраты, служащие питательными веществами. К индуцибельным относится большинство гидролитических ферментов.

Классическим примером индуцибельных ферментов является β-галактозидаза E. coli, гидролизующая лактозу на галактозу и глюкозу. При выращивании E. coli на среде с лактозой клетки этой бактерии содержат множество молекул β-галактозидазы. При замене лактозы глюкозой в клетках обнаруживаются единичные молекулы этого фермента. Если клетки снова поместить в среду, содержащую только лактозу, то в них происходит интенсивный синтез β-галактозидазы - индуцибельный фермент.

Одновременно с β-галактозидазой в клетках E. coli синтезируется β-галактозидпермеаза, необходимая для переноса лактозы в клетки, и β-галактозидтрансацетилаза, физиологическая роль которой пока не выяснена.

Механизм индукции β-галактозидазы был изучен французскими учеными Ф. Жакобом и Ж. Моно, разработавшими модель оперона. Генетическими элементами модели оперона являются: регуляторный ген, оператор, набор структурных генов, промоторный участок. Они локализованы в хромосоме и все вместе, за исключением регуляторного гена, образуют одну функциональную единицу - оперон. Так, лактозный оперон (рис.7.9) E. coli включает три структурных гена - z, y, a, кодирующие синтез трех ферментов - β-галактозидазы, β-галактозидпермеазы и β-тиогалактозид-трансацетилазы. Рядом расположен ген-оператор (O), который выполняет функцию пускового механизма, контролируя работу структурных генов. По соседству с ним находится промотор (P) для связывания РНК-полимеразы и инициации транскрипции. Регуляторный ген (R) кодирует синтез репрессора. Репрессор - аллостерический белок, один центр его служит для связывания с оператором, другой - с субстратом-индуктором (в данном примере с аллолактозой, которая образуется из лактозы и является фактическим индуктором β-галактозидазы).

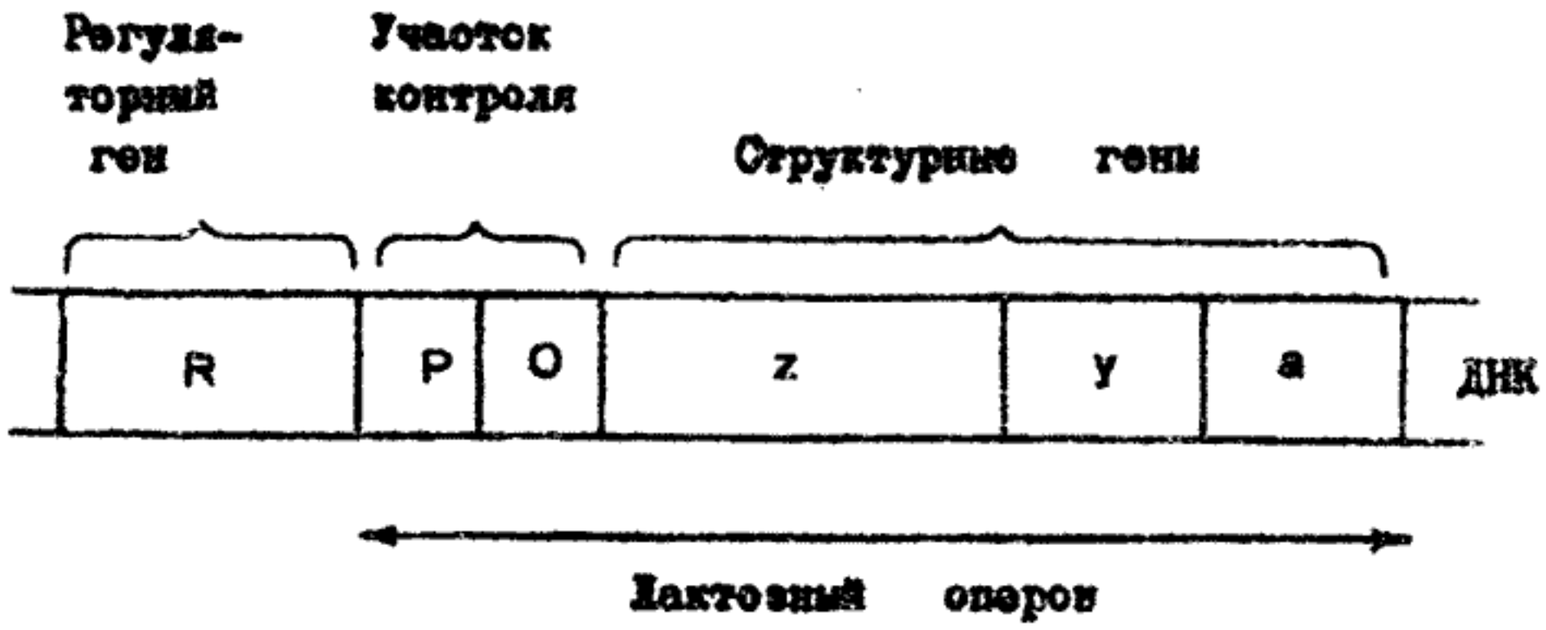


Рис. 7.9. Карта лактозного оперона E. coli

При отсутствии в среде лактозы репрессор активен в свободном состоянии и, связываясь с оператором, предотвращает возможность присоединения РНК-полимеразы к промотору и в результате структурные гены не транскрибируются в мРНК и синтез ферментов не происходит. Когда в клетку поступает лактоза, то образовавшаяся аллолактоза связывается с белком-репрессором. Конформация белка при этом меняется так, что приводит к разрыву связи с оператором. При свободном операторе начинаются транскрипция мРНК и синтез ферментов катаболизма лактозы. Аналогичным путем регулируется синтез и других индуцибельных ферментов.

Катаболитная репрессия. Синтез ферментов регулируется не только путем индукции, но и путем репрессии. Различают два вида репрессии: катаболитную и репрессию конечным продуктом.

Наличие катаболитной репрессии было установлено при изучении явления диауксии, обнаруженной Моно при анализе роста Bac. subtilis на среде, содержащей глюкозу и арабинозу в качестве источника энергии и углерода. Вначале клетки потребляли только глюкозу, а затем по ее исчерпании - арабинозу. Такое же явление наблюдалось и у E. coli: активно усваиваемая глюкоза подавляла потребление других сахаров. Это явление было названо катаболитной репрессией. Сущность ее заключается в том, что легкоусваиваемый клеткой источник энергии подавляет синтез ферментов катаболизма других менее доступных субстратов. Так, на среде, содержащей глюкозу и лактозу, клетки E. coli сначала потребляют глюкозу. Несмотря на наличие в среде индуктора

лактозного оперона (лактозы) структурные гены не функционируют и ферменты катаболизма лактозы не синтезируются. Транскрипция генов лактозного оперона начинается при крайне низкой концентрации глюкозы в среде. Изучение механизма катаболитной репрессии показало, что она связана с уровнем содержания в клетках циклического АМФ, который необходим для транскрипции лактозного оперона. Циклический АМФ (эффектор) связывается с белковым активатором катаболизма (БАК), или катаболитным активатором, которым является позитивно-регуляторный аллостерический белок, но в отсутствие циклического АМФ он неактивен. Образующийся комплекс (цАМФ + БАК) взаимодействует с участком промоторной области лактозного оперона и обеспечивает присоединение к промотору РНК-полимеразы и инициацию транскрипции (рис.7.10). Этот тип регуляции получил название позитивной.

Катаболитная репрессия функций лактозного оперона глюкозой при наличии в среде лактозы может быть снята при внесении в среду циклического АМФ. Это соединение выполняет только регуляторную функцию. Наличие в клетках глюкозы понижает внутриклеточную концентрацию циклического АМФ. Известно, что содержание его в клетках определяется активностью аденилатциклазы - фермента, катализирующего образование цАМФ из АТФ:

$$\text{АТФ} \longrightarrow \text{цАМФ} + \text{пирофосфат}$$

Аденилатциклаза связана с цитоплазматической мембраной и активна в том случае, если компоненты системы транспорта глюкозы в клетку фосфорилированы. Обычно это имеет место тогда, когда в клетке глюкозы нет или низкое содержание и ее надо транспортировать через мембрану. При наличии же глюкозы в достаточном для клетки количестве степень фосфорилирования системы транспорта снижается за счет фосфорилирования молекул поступающей глюкозы и соответственно снижается активность аденилатциклазы. Это приводит к уменьшению количества цАМФ и развитию в клетке катаболитной репрессии.

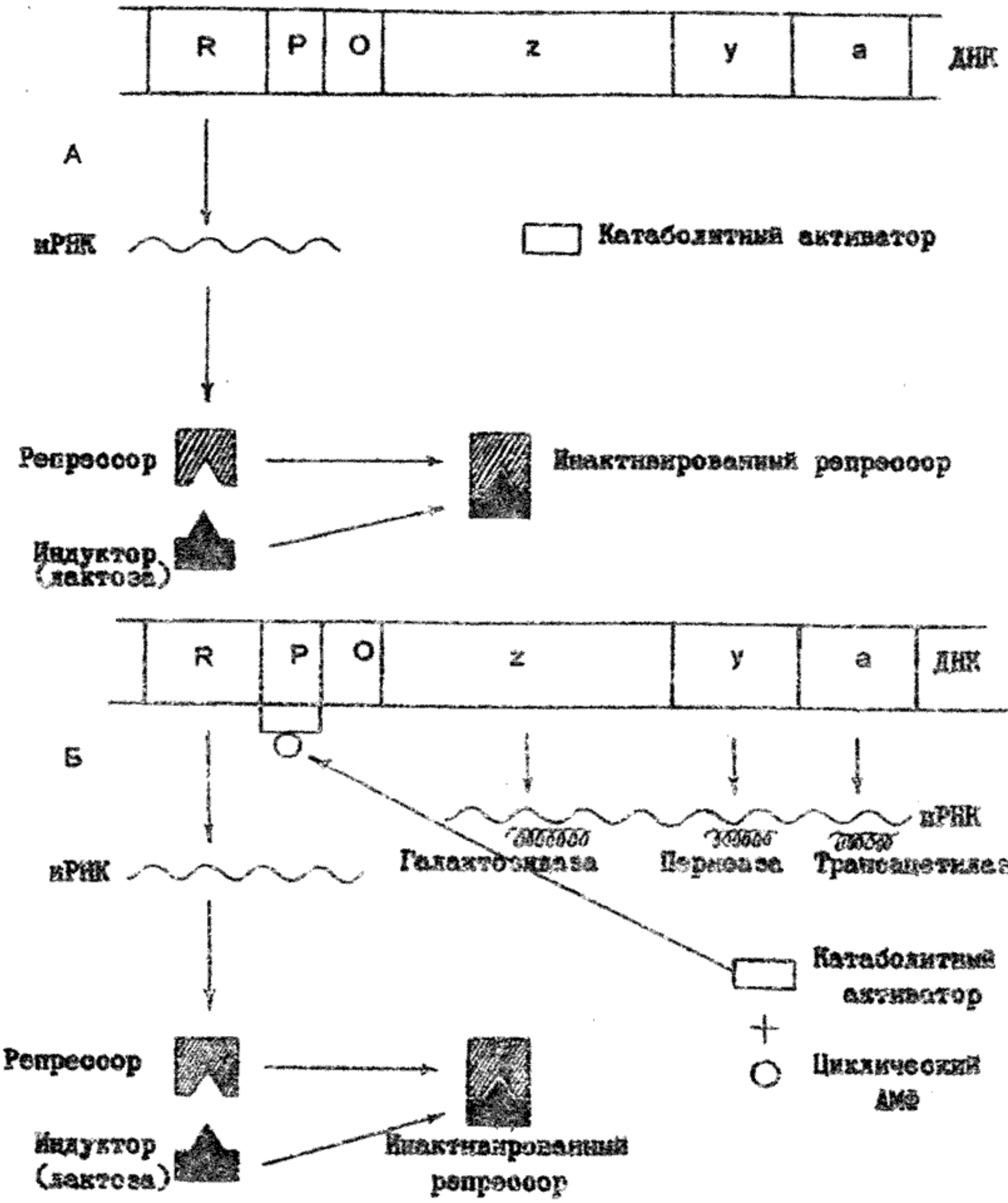


Рис. 7.10. Регуляция синтеза фермента на уровне транскрипции: *А - ген-регулятор /R/ образует репрессорный белок, связывающийся с оператором /O/ и закрывающий промотор /P/; транскрипции структурных генов /z,y,a/ не происходит; Б - в присутствии индуктора образуется неактивный репрессор, не способный связываться с оператором; промотор открыт, происходит транскрипция.*

Таким образом, глюкоза сама по себе не вызывает катаболитную репрессию, а через систему своего транспорта регулирует концентрацию цАМФ. Последний, связываясь с

катаболитным активатором, образует универсальный комплекс, индуцирующий синтез ферментов, находящихся под контролем катаболитной репрессии.

Изучение работы лактозного оперона показало, что регуляция его функций может быть двоякой: негативной и позитивной. Негативная регуляция осуществляется на уровне взаимодействия репрессора с индуктором, позитивная - на уровне взаимодействия системы белкового катаболитного активатора и циклического АМФ с промотором.

У триптофанового оперона открыт еще один регуляторный компонент - аттенюатор (от аттенуация - ослабление). Это участок ДНК, который регулирует транскрипцию триптофанового оперона и синтез триптофана.

В триптофановом опероне промотор и оператор отделены от структурных генов участком длиной 166 нуклеотидов. Это - лидерная последовательность, которая в свою очередь содержит ослабляющую последовательность, или аттенюатор. Он расположен между 123-150 нуклеотидами. На аттенюаторе около 90 % РНК-полимераз прекращают транскрипцию, не доходя до структурных генов. Это имеет место при высокой концентрации триптофана в клетке. Понижение уровня триптофана приводит к ослаблению действия аттенюатора и РНК-полимераза осуществляет полную транскрипцию оперона. В результате осуществляется синтез ферментов триптофанового пути и образование продукта (триптофана). Отсюда был сделан вывод, что транскрипция триптофанового оперона регулируется участком контролируемой терминации, называемым аттенюатором.

Репрессия конечным продуктом. Синтез большинства ферментов анаболизма находится под контролем механизма репрессии конечным продуктом. Сущность его состоит в том, что по мере накопления в клетке конечного продукта биосинтеза снижается скорость синтеза ферментов, катализирующих его образование. Например, если выращивать кишечную палочку на минимальной среде, то ферменты, участвующие в биосинтезе аргинина, находится в необходимом для клетки количестве и аргинин синтезируется по мере надобности. Если же в среду внести готовый аргинин (20 мг/л),

то синтез ферментов, участвующих в его образовании, прекращается (репрессируется).

Изучение механизма репрессии синтеза ферментов конечным продуктом показало, что структурные гены многих ферментов анаболизма организованы в хромосоме также в виде оперона. Когда конечный продукт накапливается в клетках выше нужного уровня, он взаимодействует с белком репрессором, активируя его. Активированный репрессор присоединяется к операторному участку и блокирует инициацию транскрипции мРНК. Синтез ферментов прекращается. Таким образом, конечный продукт действует как компрессор. При его отсутствии репрессор неактивен. Хотя гены, кодирующие биосинтез ферментов одного метаболического пути, могут быть расположены в разных участках хромосомы, все равно, образование данных ферментов регулируется одним конечным продуктом. Так, в клетках кишечной палочки гены, кодирующие ферменты биосинтеза аргинина, локализованы в разных участках хромосомы, но все они репрессируются одним и тем же комплексом -- белок-репрессор + аргинин. Более сложной является регуляция синтеза ферментов путем рапрессии конечным продуктом в разветвленных путях анаболизма. Как и при регуляции активности, синтез ферментов регулируется так, что каждый конечный продукт может репрессировать образование ферментов только «своего» пути биосинтеза. В разветвленных путях биосинтеза может иметь место и мультиферментная репрессия, аналогичная таковой регуляции активности ферментов.

7.5.2. Механизмы регуляции активности ферментов

Конечные продукты биохимических реакций оказывают регулирующее действие не только на синтез, но и на активность ферментов, катализирующих данные реакции. Чувствительностью, или сродством к конечному продукту обладают аллостерические ферменты. Они обычно находятся в начале биосинтетического пути или в местах разветвления нескольких путей, занимая ключевые позиции. В отличие от других ферментов аллостерические ферменты содержат не только каталитически активный центр, предназначенный для связывания с субстратом, но дополнительно

имеют второй центр - регуляторный (аллостерический). Их может быть несколько на одной молекуле фермента. Регуляторный центр выполняет функцию связывания молекулы конечного продукта называемого эффектором, или модулятором.

Каталитическая активность аллостерического фермента меняется в результате связывания с ним эффектора: в случае понижения - называется отрицательным, или ингибитором, в случае повышения - носит название положительного, или активатора. Отрицательными эффекторами, как правило, являются конечные продукты метаболизма, положительными - субстраты данного фермента.

Ингибирование по типу обратной связи. Подавление активности первого фермента биосинтетического пути конечным продуктом носит название ингибирования по типу обратной связи, или ретроингибирования. Примером может служить регуляция активности фермента L-треониндезаминазы, осуществляющего первый этап в биосинтезе L-изолейцина (рис.7.11). Данная аминокислота синтезируется из L-треонина, включая пять ферментативных реакций. Первый фермент на пути биосинтеза L-треониндезаминаза ($Ф_1$) является аллостерическим. Активный центр его связывается с эффектором, которым является L-изолейцин - конечный продукт биосинтеза. При накоплении L-треонина в необходимом для клетки

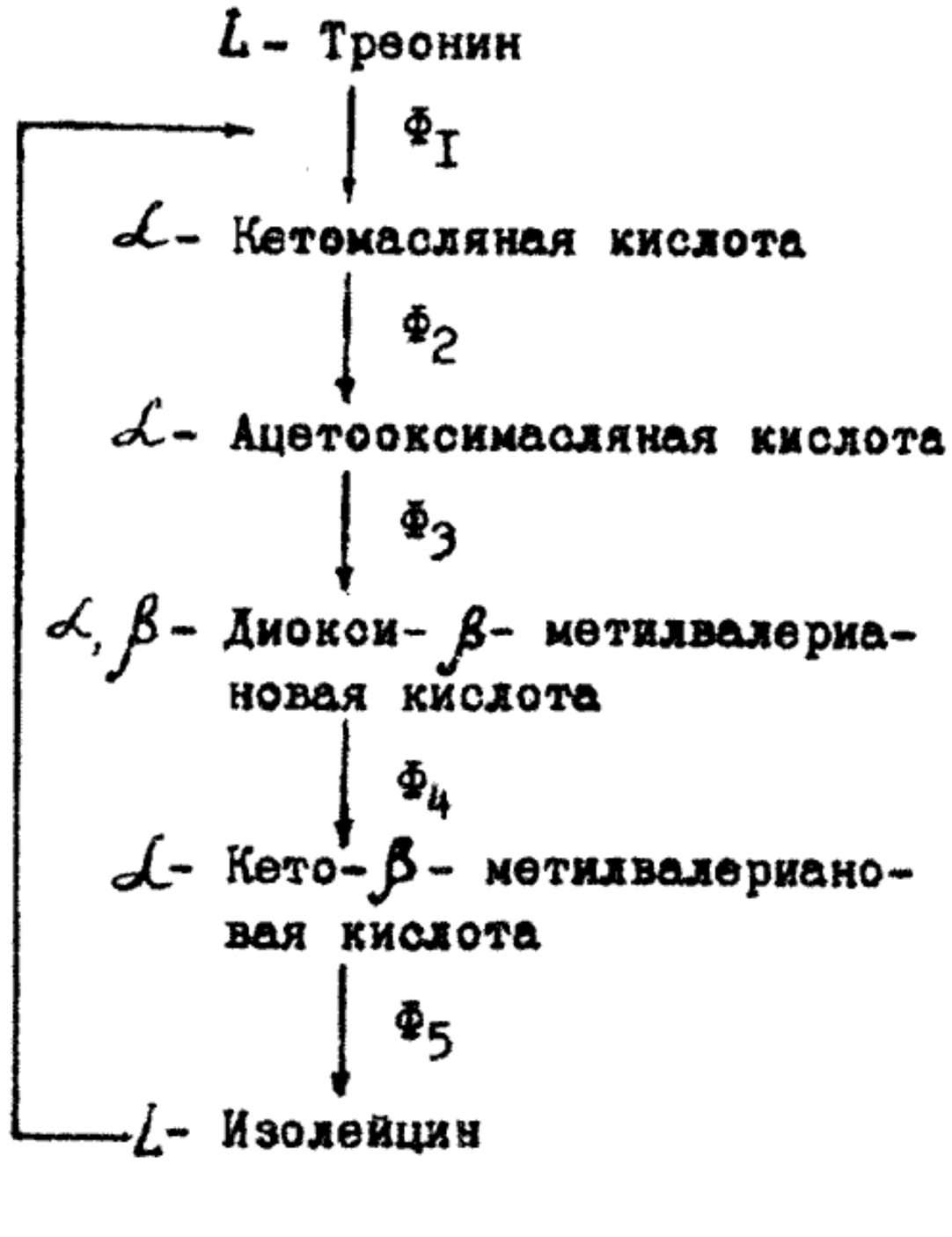


Рис. 7.11. Регуляция биосинтеза L-изолейцина по механизму отрицательной обратной связи: *$Ф_1$ - треониндезаминаза; $Ф_2$-$Ф_5$ - ферменты биосинтеза L-изолейцина. Стрелкой показано ингибирование треониндезаминазы L-изолейцином*

количестве L-изолейцин связывается с регу-ляторным центром фермента и синтез L-треонина прекращается. Этот механизм ингибирования позволяет быстро привести в соответствие скорость синтеза конечного продукта с потребностями клетки.

В отношении разветвленных биосинтетических путей существует несколько модификаций механизмов контроля путем ретроингибирования. Они сводятся к тому, что в регуляции принимает участие все конечные продукты этих путей. Если первый этап биосинтеза катализируется одним ферментом, то на поверхности его молекулы имеется несколько аллостерических центров и каждый из конечных продуктов связывается с соответствующим ему центром («своим» центром). При этом, может связываться один продукт, но если он не меняет активности фермента, то с аллостерическими центрами связываются все конечные продукты каждого из разветвлений основного пути. Это мультивалентное ингибирование.

Наиболее распространенным типом регуляции ферментативной активности в разветвленных биосинтетических путях является регулирование активности изоферментов. Наличие в изоферментах разных регуляторных центров позволяет конечным продуктам независимо друг от друга ингибировать активность того или иного фермента.

Механизм аллостерического ингибирования активности ферментов состоит в том, что конечный продукт биосинтетического пути, связываясь с регуляторным центром, вызывает конформационное изменение структуры ферментного белка. В результате этого субстратный центр становится неактивным и фермент теряет сродство к субстрату, каталитическая активность резко снижается.

Ковалентная модификация. Активность некоторых ключевых ферментов регулируется путем ковалентной модификации их структуры. Ковалентное изменение структуры фермента метаболического пути происходит в реакции, катализируемой специальным модифицирующим ферментом - модификатором. Под воздействием фермента-модификатора определенная химическая группировка ковалентно связывается с ферментом, катализирующим биосинтез того или иного продукта. В результате

фермент переходит в неактивную форму. Отщепление этой группировки возвращает ферменту активное состояние.

У бактерий пока обнаружены две системы ковалентной модификации: активность глутаминсинтетазы у E. coli, у бактерий рода Rhizobium регулируется путем аденилирования–деаденилирования и активность цитратлиазы у фототрофных бактерий рода Rhodopseudomonas - путем ацетилирования-деацетилирования. Присоединение аденильной и ацетильной группы к ферментам глутаматсинтетазе и цитрат-лиазе соответственно резко снижает их активность.

В заключение следует отметить, что индукция синтеза ферментов и катаболитная репрессия является основными механизмами, регулирующими катаболитические пути, которые обеспечивают клетку энергией и исходными материалами для процессов биосинтеза.

Анаболитические пути регулируются аллостерическим ингибированием, репрессией синтеза и активности ферментов продуктами метаболизма и в некоторой степени - ковалентной модификацией ферментов.

Глава 8

ПРОКАРИОТЫ. ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ

Царство Procaryotae представлено высшими таксонами (отделы, классы). В основу деления на отделы положено строение клеточной стенки. Названия и краткая характеристика отделов и классов приведена в таблице 5.

Царство Procaryotae объединяет множество разнообразных микроорганизмов. Это разнообразие выражается в морфологии и структурной организации, в физиологических и биохимических функциях, которые определяют их участие во всех биогеохимических процессах, имеющих место на нашей планете.

Среди прокариот есть автотрофы и гетеротрофы, психрофилы и термофилы, аэробы и анаэробы, галофилы, азотфиксаторы и другие микроорганизмы с уникальными свойствами.

8.1. ОТДЕЛ I. GRACILICUTES

В состав отдела входят грамотрицательные фототрофные и нефототрофные бактерии, не образующие спор. Подвижные организмы осуществляют движение с помощью жгутиков или скольжением. Среди них известны облигатные аэробы и анаэробы, факультативные анаэробы, сапрофиты и патогены.

Все микроорганизмы отдела Cracilicutes подразделяются на три класса: класс Scotobacteria объединяет индифирентные к свету нефототрофные бактерии; классы Anoxyphotobacteria, Oxyphotobacteria включают фототрофные бактерии.

8.1.1. Фототрофные бактерии

Это довольно обширная группа преимущественно водных прокариот, способных поглощать энергию света, преобразуя ее в биохимически доступную энергию (АТФ) и восстановительную силу [НАД(Ф)H_2], т. е. осуществлять фотосинтез. К фотобактериям относятся: пурпурные и зеленые бактерии (класс Anoxyphotobacteria),

Таблица 5

Высшие таксоны царства Procaryotae (Murray, 1984)

Отдел I Gracilicutes*	Отдел II Firmicutes	Отдел III Tenericutes	Отдел IV Mendosicutes
Прокариоты с разной морфологией, грамотрицательные Клеточные стенки имеют наружную мембрану, внутренний слой из пептидогликана. Размножение в основном бинарным делением, почкованием, в одной группе - множественным делением. Спор не образуют. Подвижные и неподвижные формы. Передвигаются с помощью жгутиков или скольжением. Аэробные, анаэробные или факультативно анаэробные формы. Отдел подразделяется на 3 класса, объединяющие нефотосинтезирующие (Scotobacteria) и фотосинтезирующие (Anoxyphotobacteriae, Oxyphotobacteria) организмы	Организмы с грамположительной клеточной стенкой. Размножаются в основном бинарным делением. Некоторые образуют эндоспоры. У других споры на гифах или в спорангиях. Подвижные и неподвижные формы. Аэробы, анаэробы, факультативно анаэробные формы. Отдел включает 2 класса: Firmibacteria (кокки, палочки, неветвящиеся нити) и Thallobacteria (ветвящиеся формы).	Грамотрицательные прокариоты без клеточной стенки, и не синтезируют предшественников пептидогликана. Клетки окружены ЦПМ, плеоморфны. Размножение бинарным делением, почкованием, фрагментацией. Могут быть сапрофитами, паразитами или патогенами. Прокариоты представлены классом Mollicutes.	Грамотрицательные и грамположительные коккковые, палочковидные и нитевидные микроорганизмы. Многие плеоморфны. Большинство имеют клеточную стенку без пептидогликана, построенную из белковых макромолекул или гетерополисахаридов. Большинство - строгие анаэробы, имеют жгутики, способны жить в экстремальных условиях. Объединены в класс Archaeobacteria.

** Термины образованы от латинских слов: cutes - кожа; gracilis - тонкий; firmus - крепкий, прочный; tener - мягкий; mendosus - ошибочный.*

цианобактерии и прохлорофиты (класс Oxyphotobacteria). Организмы каждой группы характеризуются наличием определенного типа хлорофиллов и каротиноидных пигментов, их локализацией в клетке и особенностями фотосинтеза (табл.6,7).

Таблица 6

Пигменты фотосинтезирующих бактерий

Бактерии	*Светособирающий пигмент*		*Пигмент реакционного центра*	*Особенности фотосинтеза*
	хлорофиллы	*основные каротиноиды*		
Пурпурные бактерии	бактериохлорофилл *a* или *b*	алифатические или арильные	бактериохлорофилл *a* или *b*	без выделения O_2
Зеленые бактерии	бактериохлорофиллы *a+c, a+d, a+e*	Арильные и алициклические	Бактериохлорофилл *a*	- « -
Цианобактерии	Хлорофилл *a*	Алициклические	Хлорофилл *a*	С выделением O_2
Прохлорофиты	Хлорофиллы *a+b*	Алицикличекие	Хлорофилл *a*	- « -

Таблица 7

Локализация фотосинтетического аппарата в клетках прокариот

Компоненты фотосинтетического аппарата	*Пурпурные бактерии*	*Зеленые бактерии*	*Цианобактерии*	*Прохлорофиты*
Светособирающие пигменты	ЦПМ и ее производные	Хлоросомы и ЦПМ	Фикобилисомы, тилакоиды	Тилакоиды
Фотохимические реакционные центры и электронтранспортные системы	ЦПМ и ее производные	ЦПМ	Тилакоиды	Тилакоиды

Пурпурные и зеленые бактерии содержат особые типы хлорофиллов, не встречающиеся у других фототрофных организмов. Они получили названия бактериохлорофиллов (гл. VI). К настоящему времени описано пять типов бактериохлорофиллов: *a*, *b*, *c*, *d*, *e*. Они различаются по структуре и спектральным свойствам. Большинство пурпурных бактерий содержит бактериохлорофилл *a*, максимум поглощения которого лежит в области 830-890 нм. У отдельных представителей этой группы бактерий (Rhodopseudomonas virides, Thiocapsa pfennigii и другие) обнаружен хлорофилл *b* с максимумом поглощения в области 1020-1030 нм. Основными пигментами зеленых бактерий являются бактериохлорофиллы *c*, *d*, *e*, главный максимум которых находится в диапазоне длины волн 750-760, 720-740, 710-720 нм соответственно. Кроме них в клетках этих же бактерий присутствует небольшое количество (5-10 %) бактериохлорофилла *a* с максимумом поглощения при 810 нм у зеленых серных бактерий и 808 и 868 нм у зеленых несерных.

Пурпурные и зеленые бактерии осуществляют аноксигенный фотосинтез, т. е. фотосинтез не сопровождается выделением кислорода. Это нашло свое отражение в названии класса данных бактерий.

Цианобактерии и прохлорофиты содержат те же типы хлорофиллов, что и растения. Но у цианобактерий имеется только хлорофилл *a*, у прохлорофитов - *a* и *b*. Помимо хлорофилла цианобактерии содержат красные и синие пигменты - фикобилипротеины: фикоцианин, фикоэритрин, аллофикоцианин, отсутствующие у других прокариот. Они определяют сине-зеленый цвет цианобактерий. Эти пигменты, а также подавляющее большинство молекул хлорофилла и каротиноиды ответственны за поглащение света и распределение энергии: они улавливают свет и передают энергию хлорофиллу реакционного центра (табл. 6). Фикобилипротеины локализованы в особых структурах - фикобилисомах, расположенных на внешней поверхности тилакоидов. У цианобактерий и прохлорофитов, подобно растениям, фотосинтез протекает с выделением кислорода - оксигенно. Однако, многие цианобактерии в зависимости от условий способны и к

аногсигенному фотосинтезу, хотя продуктивность последнего значительно ниже, чем кислородного.

Цианобактерии. Это наиболее древняя группа автотрофных микроорганизмов. До 60-х годов XX в. Цианобактерии относились к водорослям, составляя самостоятельный отдел Cyanophyta – сине-зеленые водоросли. Установление у них прокариотного типа клеточной организации послужило основанием для пересмотра их систематического положения и включения в царство Procaryotae.

По морфологии цианобактерии представляют весьма разнородную группу, объединяющую одноклеточные, многоклеточные и колониальные формы. Вегетативные клетки имеют сферическую, цилиндрическую и изогнутую формы. Некоторые одноклеточные организмы живут в виде одиночных клеток (Synechococcus, Synechocystis), у других клетки объединены в колонии (Gloeobacter, Gloeocapsa). Многим цианобактериям присущ скользящий тип движения. Размножение происходит в основном бинарным делением в одной или разных плоскостях и лишь отдельные виды размножаются множественным делением. Это редко встречающийся особый способ размножения. Он характерен для одноклеточной цианобактерии Dermocarpa. Перед размножением клетка сильно увеличивается в размерах, а затем быстро и многократно делится на множество мелких дочерних клеток. По окончании деления стенка материнской клетки разрывается и дочерние клетки освобождаются. Другой представитель одноклеточных цианобактерий Myxosarcina размножается поочередно то бинарным, то множественным делением.

Многоклеточные цианобактерии имеют нитчатую форму. Нити состоят из отдельных клеток, которые сообщаются друг с другом через тонкие клеточные стенки - плазмодесмы. Цепочки таких соединений клеток часто окружены слизистым чехлом и носят название трихома. Трихом является единой функциональной системой. У одних цианобактерий трихом простой однорядный (Anabaena), у других - разветвленный (Stigonema). Нитчатые цианобактерии размножаются фрагментацией трихомов, прорастанием акинет и с помощью гормогониев (см. гл. 4).

Для азотфиксирующих цианобактерий характерна дифференциация трихома на специализированные клетки: баеоциты

и гормогонии, служащие для размножения, акинеты - для выживания в неблагоприятных условиях, гетероцисты - для азотфиксации. Гетероцисты образуются из вегетативных клеток в разных участках трихома. Образование их сопровождается структурными и функциональными перестройками вегетативных клеток, направленными на поддержание высокой активности азотфиксирующего фермента нитрогеназы - на защиту его от токсического действия молекулярного кислорода. Это достигается формированием утолщенной клеточной стенки и деградацией II-й фотосистемы, с действием которой связано разложение воды и выделение кислорода. Поэтому в гетероцистах кислород не образуется и извне также не может проникать из-за наличия толстой клеточной стенки. Таким образом, в гетероцистах создаются условия, благоприятные для фиксации молекулярного азота. В вегетативных клетках этот процесс не происходит. В связи с этим образование гетероцист рассматривается как эволюционное приспособление цианобактерий к фиксации молекулярного азота в аэробных условиях.

Преобладающее большинство цианобактерий осуществляют растительный тип фотосинтеза, для которого характерно использование воды в качестве донора электронов и выделение молекулярного кислорода. Образующиеся в процессе фотосинтеза АТФ и НАДФ $\cdot H_2$ используются клеткой для ассимиляции углекислого газа. Основным путем, по которому цианобактерии ассимилируют углекислый газ, является цикл Кальвина. В отличие от цикла Арнона, который функционирует у зеленых серобактерий, акцептором углекислого газа в цикле Кальвине является активированная молекула пентозы. В результате 6 оборотов цикла Кальвина из фиксированной двуокиси углерода образуется 1 молекула глюкозы. В обобщенном виде этот процесс может быть представлен следующим уравнением:

$$6CO_2 + 18АТФ + 12НАД(Ф)\cdot H_2 \longrightarrow$$
$$\longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 18Ф_Н + 18АДФ + 12НАД(Ф)^+$$

Обладая способностью к фотосинтезу и фиксации молекулярного азота, цианобактерии неприхотливы к содержанию в среде сложных питательных веществ. Они способны развиваться при минимальном содержании простых минеральных соединений. Это обусловливает их широкое распространение в природе - почвах разных типов, водоемах, на скальных породах.

Прохлорофиты (пор. Prochlorales) - симбиотические одноклеточные фототрофные прокариоты. Представлены единственным родом и видом - Prochloron didemni. В названии, предложенном первооткрывателем их Р. А. Левиным (1975), отражена возможная связь прохлорофитов с эукариотными зелеными водорослями р. Chlorophyta. Как и цианобактерии, прохлорофиты осуществляют фотосинтез с выделением кислорода. Фотосинтетический аппарат представлен стопками (или парами) тилакоидов, в которых содержатся хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды. Фикобилипротеиды и фикобилисомы, характерные для цианобактерий, у прохлорофитов не обнаружены. Фиксацию углекислого газа осуществляют через цикл Кальвина, образуя в качестве конечного продукта полисахарид, аналогичный гликогену цианобактерий.

Прохлорофиты имеют сферическую форму клетки размером от 6 до 25 мкм, грамотрицательны, неподвижны. Размножаются бинарным делением. Они являются облигатными внеклеточными симбионтами морских животных - колониальных асцидий. В чистой культуре без симбиотнта прохлорофиты не развиваются. Полагают, что прохлорофиты обеспечивают своих хозяев продуктами фотосинтеза, роль асцидий в этом симбиозе неизвестна. Прохлорофиты рассматриваются как возможные предшественники хлоропластов фотосинтезирующих эукариот.

8.1.2. Хемолитотрофы и метилотрофы

Пурпурные бактерии (род Rhodospirillum) - преимущественно водные одноклеточные организмы. Клетки сферические, палочковидные, изогнутые или извитые, длиной от 1 до 20 мкм, шириной от 0,3 до 6 мкм. Размножаются в основном бинарным делением и только отдельные виды - Rhodopseudomonas и

Rhodomicrobium - почкованием. Движение осуществляют с помощью одного или пучка полярно расположенных жгутиков. Перитрихиальное жгутикование имеют только бактерии одного вида - Rhodomicrobium vannielii. Есть и неподвижные организмы среди пурпурных бактерий.

Пурпурные бактерии осуществляют анаэробный фотосинтез без выделения кислорода. В качестве доноров электронов используют восстановительные соединения серы (в основном сероводород), молекулярный водород или органические вещества. Ассимиляцию углекислого газа осуществляют через цикл Кальвина. Все представители пурпурных бактерий обладают способностью фиксировать молекулярный азот.

По использованию доноров электронов при фотосинтезе и механизмам окисления сульфидов пурпурные бактерии разделяются на несерные пурпурные бактерии и серные пурпурные бактерии.

Пурпурные несерные бактерии являются фотоорганогетеротрофами. В качестве доноров электронов и источников углерода для фотосинтеза используют простые органические соединения (см. гл. 7). Способы получения энергии у них разнообразные: фотосинтез, аэробное и анаэробное дыхание, брожение.

Пурпурные несерные бактерии обитают в пресных озерах и других водоемах при пониженных концентрациях либо полном отсутствии сульфидов, которые оказывают на данные бактерии токсическое действие.

Пурпурные серобактерии являются фотолитоавтотрофами. Они могут развиваться на средах, где единственным источником углерода является углекислый газ и донором электронов - сульфид. Некоторые виды могут использовать также молекулярную серу, водород, сульфит и тиосульфат. Поэтому типичным местообитанием пурпурных серобактерий являются богатые сульфидами водоемы. Окисление сульфидов они осуществляют в анаэробных условиях через стадию образования элементарной среды, которую временно откладывают внутри клетки в виде гранул. Затем окисляют ее до сульфата. Способность к фотоассимиляции органических соединений у пурпурных серобактерий более ограничена, чем у несерных, и сводится в основном к потреблению уксусной кислоты.

Единственным фактором роста, в котором нуждаются пурпурные серобактерии, является витамин B_{12}.

В зависимости от интенсивности света, концентрации сульфида, температуры, pH пурпурные бактерии могут развиваться или в виде отдельных клеток, или в виде неподвижных клеточных агрегатов, заключенных в слизь.

Зеленые бактерии (род Chlorobium) составляют небольшую группу фототрофных бактерий, отличающихся от внешне сходных цианобактерий по пигментному составу и механизму фотосинтеза, протекающего без выделения кислорода. Различают зеленые серные бактерии и зеленые несерные бактерии.

Зеленые серобактерии - одноклеточные и неподвижные организмы палочковидной, сферической, яйцевидной и звездообразной формы. Размеры клеток 0,3-1,2 × 0,5-2,7 мкм. Они являются строгими анаэробами и облигатными фотолито-автотрофами, т. е. развиваются в чисто минеральных средах. В качестве доноров электронов используют сероводород и другие восстановительные неорганические соединения серы или водорода. Образующаяся при окислении сероводорода элементарная сера откладывается вне клетки, затем окисляется до сульфата. Основным источником углерода является углекислота, которая фиксируется через восстановительный цикл карбоновых кислот - цикл Арнона. Суммарную реакцию фотосинтеза зеленых серобактерий можно представить в следующем виде:

$$CO_2 + 2H_2S \longrightarrow CH_2O + H_2O + 2S$$

По физиологическим свойствам и пищевым потребностям зеленые серобактерии весьма сходны с пурпурными серными бактериями. Они также нуждаются в витамине B_{12}, в качестве источника серы используют сульфид, обладают способностью фиксировать молекулярный азот, фотосинтез не сопровождается выделением кислорода. На общность метаболических процессов указывает их совместное развитие в одних и тех же природных условиях - в освещенной, богатой сероводородом анаэробной зоне водоемов. Но в то же время эти две группы бактерий четко различаются по типу пигментов, структуре фотосинтезирующего

аппарата, механизмам фиксации углекислого газа (табл. 8). Пурпурные бактерии содержат основные бактериохлорофиллы *a* и *b*, которые локализованы в хроматофорах везикулярного, тубулярного или ламеллярного типов, окруженные двойной мембраной, связанной с ЦПМ клетки. Зеленые бактерии в качестве главных компонентов фотопигментов содержат бактериохлорофиллы *c*, *d* или *e* и небольшое количество хлорофилла *a*. Пигменты расположены в особых структурах - хлоробиум-везикулах, или хлоросомах, находящихся под ЦПМ и прикрепленных к последней с помощью одинарной белковой мембраны, окружающей хромосомы. Кроме того, ни один вид зеленых серобактерий не может использовать в качестве единственного или основного источника углерода органические соединения. Отдельные виды могут потреблять уксусную кислоту, но только при наличии в среде сероводорода и углекислого газа.

Таблица 8

Основные различия между прокариотами родов Rhodospirillum и Chlorobium

Признак	*Rhodospirillum*	*Chlorobium*
Локализация пигментов антенны	ЦПМ и ее производные	Хлоросомы и ЦПМ
Пигмеенты антенны	Бактериохлорофилл *a* или *b*	Бактериохлорофилл *a* + *c*, *a*+ *d*, *a*+ *e*
Пигменты реакционного центра	Бактериохлорофилл *a* или *b*	Бактериохлорофилл *a*
Механизм фиксации углекислого газа	Цикл Кальвина	Цикл Арнона или цикл Кальвина
Отложение окисленной серы	Внутри или вне клетки	Вне клетки
Подвижность	С помощью жгутиков	Скольжением

Зеленые несерные бактерии - нитчатые организмы, у которых палочковидные клетки объединены в длинные трихомы - до 300 мкм. Они обладают скользящим типом движения. По метаболизму имеют сходство с несерными пурпурными бактериями. Они также являются факультативными аэробами, способными к гетеротрофному (и фототрофному) росту. В качестве донора электронов могут использовать разнообразные органические соединения: сахара, спирты, органические кислоты. Эти же вещества при развитии бактерий в темноте служат для них источниками энергии и углерода. На свету бактерии получают энергию в процессе фотосинтеза, в темноте - в процессе дыхания. Поэтому в темноте они могут развиваться только в аэробных условиях за счет окисления органических веществ. В анаэробных условиях в темноте даже при наличии органических веществ эти бактерии не развиваются. На свету они могут развиваться как в аэробных, так и в анаэробных условиях. При использовании сероводорода в качестве донора электронов образующаяся сера откладывается вне клетки. В отличие от зеленых серобактерий зеленые скользящие бактерии не способны фиксировать молекулярный азот, ассимиляцию углекислоты осуществляют в цикле Кальвина (зеленые серобактерии - в цикле Арнона). Состав пигментов, их локализация и тип фотосинтеза соответствуют таковым у зеленых серобактерий. В природных средах бактерии Chloroflexus часто развиваются в тесных ассоциациях с цианобактериями, образуя оранжевые и зеленые пленки. Особенно это характерно для термофильных бактерий C. aurantiacus, выделенных из терминальных источников с температурой 45-75^0 C, образующих смешанные популяции с термофильными цианобактериями рода Synechococcus.

Способность фототрофных бактерий утилизировать солнечную энергию и использовать ее для процессов биосинтеза обеспечивает им преимущества перед гетеротрофными бактериями при использовании их в качестве продуцентов биомассы и биологически активных веществ. Биомасса их может служить источником высококачественного кормового и пищевого белка. Помимо биомассы фототрофные бактерии продуцируют аммиак и водород (горючий газ), осуществляют очистку сточных вод,

промышленных газов, трансформацию различных соединений, способствуют биодеградации токсических веществ. Все это указывает на многообразие путей практического использования фототрофных бактерий в биотехнологии.

8.1.3. Грамотрицательные хемогетеротрофы

К скотобактериям (Scotobacteria) относятся индифферентные к свету грамотрицательные, не образующие спор бактерии. По морфологии организмов и разнообразию физиологических групп это самый обширный класс в царстве Procaryotae. Он включает все виды хемолитотрофных бактерий, близких к ним по физиологии - метилотрофных и значительную часть хемогетеротрофных видов.

Хемолитотрофные бактерии получают необходимую для жизнедеятельности энергии за счет окисления неорганических субстратов. В зависисмости от окисляемого субстрата они делятся на несколько физиологических групп (табл.9).

Таблица 9

Физиологические группы хемолитотрофных бактерий

Группы	*Окисляемый субстрат*	*Окисляемый продукт*	*Представители*
Нитрифицирующие бактерии:			
Первая фаза нитрификации	NH_3	NH_2	**Nitrosomonos europoea**
Вторая фаза нитрификации	NO_2^-	NO_3^-	**Nitrobacter winogradskyi**
Серобактерии	H_2S, S, $S_2O_3^{2-}$	SO_4^{2-}	**Beggiatoa alba**
Железобактерии	Fe^{2+}	Fe^{3+}	**Sphaerotilus natans**
Водородные бактерии	H_2	H_2O	**Paracoccus denitrificans**

Хемолитотрофные бактерии разнообразны по морфологии и физиологии, широко распространены в природе и играют ведущую роль в круговороте биогенных элементов.

Метилотрофные бактерии получают энергию и углерод в ходе метаболизма одноуглеродных соединений, содержащих метильную группу. Это типичные облигатные метилотрофы. Наряду с ними существуют и факультативные метилотрофы, которые кроме C_1-соединений используют также C_2-C_6-соединения (табл.10).

Таблица 10

Метилотрофные бактерии

Группа	*Род*	*Форма клеток*	*Метаболизируемые соединения углерода*
Облигатные метилотрофы	Methylosinus	Палочки с полярно расположенными жгутиками; образуют экзоспоры	Метан, диметиловый эфир, метиловый спирт
	Methylocystis	Неподвижные палочки, экзоспор не образуют	
	Methylomonas	Палочки с полярно расположенными жгутиками	
	Methylobacter	Палочки и кокки, образуют цисты	
	Methylococcus	Неподвижные кокки	
Факультативные метилотрофы	Hyphomicrobium	Палочки с заостренными концами, образуют гифы и почки	Метиловый, этиловый спирты; муравьиная кислота, уксусная и β-оксимасляная кислоты, метиламины
	Pseudomonas (не все виды)	Палочки с полярно расположенными жгутиками	
	Mycobacterium	Палочки, иногда ветвящиеся	

Как видно из таблицы 10, круг соединений, метаболизируемых метилотрофами, невелик.

Род Pseudomonas объединяет палочковидные, неспорообразующие подвижные бактерии с полярно расположенными жгутиками. Клетки имеют вид прямых или слегка изогнутых палочек размером 1,0-0,5 × 1-4 мкм. В большинстве своем - строгие аэробы, развиваются в широком диапазоне температур - от 4 до 43^0 С. Многие псевдомонады не нуждаются в факторах роста. Они обладают редкой способностью использовать широкий круг источников питания - до 150 наименований природных и синтетических соединений. Уникальной особенностью псевдомонад является способность потреблять ароматические соединения, такие, как бензоат, фенол, нафталин, камфору, салицилат, не утилизируемые другими бактериями. Они могут также разлагать некоторые токсические соединения, в том числе пестициды, содержащие в своем составе хлор, фтор, ртуть. Некоторые псевдомонады, как Ps. saccharophila, Ps. facilis, являются факультативными хемолитотрофами, в качестве источника энергии используют водород или углекислый газ, другие - способны к денитрификации, т. е. добывают энергию путем восстановления нитратов, например, Ps. denitrificans, Ps. stutzeri.

Характерным свойством псевдомонад является утилизация сахаров по пути Энтнера-Дудорова, т. е. через образование 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконовой кислоты (КДФГ-путь). Среди прокариот псевдомонады являются уникальными гетеротрофами, так как неизвестно ни одного природного или полученного путем химического синтеза соединения, которое не потреблялось бы этими бактериями. Наряду с потреблением псевдомонады способны и к биосинтезу различных соединений. Высокой биосинтетической способностью отличаются флуоресцирующие псевдомонады: Ps. fluorescens, Ps. aeruginosa, Ps. putida. Многие виды синтезируют ряд (более 30) антибиотиков активных в отношении грибов, грамположительных и грамотрицательных бактерий. По способности продуцировать эти биологически активные вещества они уступают только актиномицетам. Практическое применение уже получил антибиотик пирролнитрин, продуцируемый разными

видами бактерий рода Pseudomonas (Ps. purrocinia, Ps. aureofaciens, Ps. acidula и др.).

Пирролнитрин обладает высокой антифунгальной активностью, а также оказывает бактерицидное действие на сальмонеллы, кишечную палочку, золотистого стафилококка и др. Применяется для лечения дерматомикозов. В 1976 г. из Ps. sorbistini nov. sp. выделен комплекс антибиотиков аминогликозидов - сорбистины. Они характеризуются широким спектром действия: подавляют рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе бактерий, резистентных к другим аминогликозидам.

Почти все представители рода Pseudomonas обладают способностью к синтезу бактериоцинов. Большой интерес представляют псевдомонады для технической микробиологии и биотехнологии как продуценты органических кислот, аминокислот, ферментов. Ряд штаммов уже используется для получения пировиноградной, глюконовой, α-кетоглутаровой кислот, глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, гидролитических ферментов - липазы, эстеразы и др. Псевдомонады заслуживают внимания и как продуценты белка на одноуглеродных соединениях - метане, метаноле, формальдегиде, которые они могут использовать как единственные источники углерода и энергии.

Бактерии рода Pseudomonas - обширная группа микроорганизмов, которые повсеместно распространены в природе: почве, морских и пресных водах, илах, сточных водах. Среди них много сапрофитов, но есть также виды, патогенные для человека и животных (Ps. aeruginosa, Ps. mallei) и для растений (Ps. syringae, Ps. solanacearum).

Фенотипическое сходство с бактериями рода Pseudomonas имеют бактерии рода Xanthomonas. Характерным признаком бактерий рода Xanthomonas является образование желтых внутриклеточных пигментов - бромированных производных арилоктанов, не обнаруженных у других видов бактерий. Входящие в состав рода Xanthomonas бактерии являются патогенными для растений.

Род Azotobacter составляют крупные подвижные клетки, склонные к изменению морфологии от палочковидной до

кокковидной в зависимости от возраста культуры. Для азотобактера характерно образование покоящихся форм цист, которые устойчивы к высушиванию и обеспечивают выживание азотобактера в почве в периоды ее пересыхания. Азотобактер - свободноживущий азотфиксатор, который в отличие от всех других азотфиксирующих бактерий производит азотфиксацию в аэробных условиях. Азотфиксирующий ферментный комплекс нитрогенеза защищается от токсического действия молекулярного кислорода благодаря высокой интенсивности дыхания.

С азотобактером сходны бактерии рода Azomonas, но они не образуют цисты и основным местообитанием их является вода.

Бактерии рода Beijerinckia распространены в тропических кислых почвах. Они также не способны к образованию цист.

Род Rhizobium (клубеньковые бактерии) - подвижные, не образующие спор палочковидные бактерии. Обитают в почве или корневых клубеньках бобовых растений, с которыми у них сложились симбиотические взаимоотношения. Находясь в клубеньках растений, они активно фиксируют молекулярный азот. В свободном состоянии (в почве или питательной среде) азотфиксирующая способность клубеньковых бактерий выражена слабо. Для проявления ее необходимо обеспечить эти бактерии подходящими источниками углерода, преимущественно пентозами, промежуточными соединениями цикла Кребса и минимальными количествами связанного азота. До 1975 г. вообще отрицалась способность клубеньковых бактерий в чистой культуре связывать молекулярный азот. В качестве источника углерода и энергии клубеньковые бактерии потребляют широкий круг органических соединений: углеводы, спирты, органические кислоты и их соли. Источником азота, кроме молекулярного, служат нитраты, соли аммония, аминокислоты, азотистые основания. В зависимости от условий аэрации нитраты могут служить не только источником азота, но и акцептором электронов. В анаэробных условиях большинство видов клубеньковых бактерий осуществляют редукцию нитратов, только R. lupini не обладают нитратредуктазной активностью. Классификацию клубеньковых бактерий производят по растению-хозяину, на котором бактерии образуют клубеньки.

Клубеньковые бактерии - аэробы, но способны расти при пониженном парциальном давлении кислорода (менее 0,01 атм). Оптимальная температура роста 25-30^0 С, пределы pH 5,0-8,5.

Отношения между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями определяются как мутуализм, когда оба симбионта извлекают выгоду из сожительства: растение получает азот, клубеньковые бактерии - углеродсодержащие вещества и минеральные соли.

Бактерии рода Agrobacterium по морфологическим и культуральным свойствам сходны с клубеньковыми бактериями. Но в отличие от последних агробактерии не способны фиксировать молекулярный азот, вызывают образование галлов, или опухолей на стеблях и корнях растений разных семейств. Типичный представитель рода A. tumefaciens индуцирует образование корончатых галлов более чем у 40 семейств. Бактерии внедряются в ткань растений через повреждения и вызывают разрастание стебля.

Род Caulobacter включает бактерии оригинальной формы с уникальным жизненным циклом. Эти бактерии образуют нитевидные клеточные выросты - простеки, которые представляют собой выпячивание клеточного содержимого, соединенного с цитоплазмой клетки. На конце выроста содержится клейкое вещество, с помощью которого каулобактер прикрепляется к твердому субстрату или клеткам других микроорганизмов. Клетки каулобактера имеют палочковидную форму с одним полярно расположенным жгутиком. Размножаются бинарным делением. При этом образуются две неодинаковые дочерние клетки: одна из клеток несет простеку (стебелек), другая - жгутик. Клетка, несущая простеку, неподвижна; сразу после деления на противоположном простеке полюсе формируется жгутик, и клетка снова может делиться таким же способом. Клетка, снабженная жгутиком, претерпевает морфологические преобразования: теряет жгутик и на его месте образует стебелек. Затем прикрепляется к субстрату и переходит в вегетативную фазу.

Бактерии рода Asticcacaulis отличаются от бактерий рода Caulobacter субполярным расположением жгутика и простеки. Стебельковые бактерии группы каулобактера встречаются как в пресной, так и в морской воде. Развиваются в основном за счет

потребления веществ, секретируемых другими микроорганизмами, к которым они прикреплены. В торфяниках и илах обнаружены бактерии звездообразной формы, получившие название Stella gumosa.

Спирохеты. Это сравнительно небольшая группа одноклеточных микроорганизмов, имеющих спирально извитую форму. Название получили за форму клетки (от лат. spira - изгиб). Спирохеты относятся к пор. Spirochaetales, включающему 8 родов: Spirochaetae, Serpulina, Cristispira, Treponema, Brachyspira, Borrelia, Leptospira, Leptonema. Клетки спирохет очень тонкие (0,1-0,6 мкм) и длинные (5-50 мкм) и разделяются на три основные структуры: протоплазменный цилиндр (тело клетки), аксиальную (опорную) нить - аксостиль и трехслойную наружную оболочку. Аксиальная нить состоит из отдельных фибрилл, число которых у разных видов различно: у трепонем и лептоспир - 4, у кристиспир больше 100, у боррелий - до 18. Каждая из фибрилл закрепляется в протоплазменном цилиндре. Химический состав аксиальной нити аналогичен составу жгутиков эубактерий. В структуре клетки спирохет различают клеточную стенку (в отличие от клеточных стенок эубактерий она эластична и не обладает ригидностью), цитоплазматическую мембрану, нуклеоид и мезосомы. Эндоспор, капсул и жгутиков спирохеты не образуют. Размножаются поперечным делением клетки.

Извитая форма клеток спирохет поддерживается натянутой аксиальной нитью, которая у лептоспир и трепонем находится между наружной оболочкой и протоплазменным цилиндром, у кристоспир она винтообразно обвивает клетку в виде тонкой каймы, образуя килевидные выступы - кристы. Если аксиальная нить разрывается, то клетка выпрямляется и принимает форму тонкой длинной нити. Движение спирохет осуществляется за счет сокращения фибрилл аксиальной нити, форма движения винтообразная. Среди спирохет есть сапрофитные формы (род Spirochaetae), обитающие в иловых застойных водах при пониженном содержании кислорода, и патогенные для человека и животных. Так, спирохета Borrelia recurrentis - возбудитель возвратного тифа, Treponema pallidum (бледная спирохета) - сифилиса.

Спириллы и другие изогнутые бактерии. Спиральную форму в несколько завитков имеют бактерии *родов Spirillum и Azospirillum*. Форма клетки обеспечивается наличием ригидной клеточной стенки. На одном или обоих полюсах клетки спириллы имеют пучок жгутиков, обладают большой подвижностью. Источником углерода и энергии служат отдельные аминокислоты и органические кислоты, углеводы почти не используются. Физиологическим свойством спирилл является склонность к микроаэрофильности. Несмотря на облигатную аэробность они предпочитают среды с низким содержанием кислорода (в 2-7 раз ниже, чем содержится в воздухе). Представителем является Spirillum volutans, вид с очень крупными клетками - до 60 мкм в длину, которые при доступе воздуха не развиваются в чистой культуре.

Бактерии рода Spirillum - сапрофиты, распространены в загрязненных пресных и морских водах; Azospirillum - являются компонентами микробных сообществ различных типов почв, ризосферы и ризопланы растений. Азоспириллы обладают высокой азотфиксирующей активностью, за что род получил название Azospirillum. Фиксацию азота они осуществляют в широком диапозоне pH (5,4-8,5) и температуры (10-40^0 С). На питательных средах образуют пигментированные колонии красного, розового или желтого цвета.

Изогнутые или спиральные клетки имеют бактерии рода Campylobacter, патогенного для животных. Факультативные аэробы. Энергию получают за счет дыхания или брожения. Среди вибрионов есть патогенные виды - Vibrio cholerae - возбудитель азиатской холеры. Бактерии других родов, как и большинство вибрионов, сапрофиты - обитатели почвы, пресных и морских вод.

Род Bdellovibrio представляют бактерии слегка изогнутой формы, размером 0,3-0,45 мкм в диаметре и 0,8-1,2 мкм в длину. Бактерии снабжены одним полярно расположенным, одетым чехлом жгутиком (рис. 8.1), являются облигатными паразитами других, в основном грамотрицательных, бактерий. Типичным представителем служит Bdellovibrio bacteriovorus, что в переводе с латинского означает пиявка, пожирающая бактерий (bdello - пиявка, vorus - пожирающий).



Рис. 8.1. Бактерия-паразит Bdellovibrio bacteriovorus

Бделловибрион обладает необычным циклом развития, включающим множественное деление. При столкновении с клеткой-жертвой бделловибрион прикрепляется своим безжгутиковым концом к клеточной стенке жертвы, начинает быстро вращаться вокруг своей оси (скорость вращения около 100 об/с) и в результате пробуравливает клеточную стенку. При этом клетка-жертва округляется, а паразит через отверстие проникает в периплазматическое пространство, где происходит его развитие. Жгутик в процессе проникновения теряется. Одновременно в клетку-жертву может внедряться несколько бделловибрионов. При внутриклеточном развитии питание паразита осуществляется за счет веществ, поступающих из протопласта клетки-жертвы. Растущая клетка паразита удлиняется, приобретает форму длинной нити. Затем происходит множественное деление нити: она сегментируется на множество вибрионоподобных клеток со жгутиком каждая. Число таких клеток может достигать 20-50 в зависимости от размеров клетки-жертвы. Цикл внутриклеточного развития длится около 4 ч. За это время клетка разрушается и паразит освобождается. Бделловибрионы обладают высокой протеолитической активностью. В качестве источников углерода и энергии используют пептиды и аминокислоты, которые расщепляются в процессе дыхания через цикл трикарбоновых кислот. К потреблению углеводов они не способны. Жирные кислоты клетки-жертвы могут прямо включать в липиды, а также превращать в нужные для себя соединения. Кроме типового вида B. bacteriovorus известно еще два вида - B. stolpii и B. starri, названные в честь их первооткрывателей H. Stolp, M. Starr (1962). Бделловибрионы широко распространены в почвах, сточных водах, пресных и морских водах.

Миксобактерии и цитофаги слизеобразующие скользящие бактерии, относящиеся соответственно к порядкам Myxobacteriales и Cytophagales.

Это грамотрицательные, палочковидные или веретено-образные бактерии. Клетки часто вытянуты и заострены на концах, длина их колеблется в пределах 0,7-10 мкм.

Клетки миксобактерий не имеют типичной ригидной клеточной стенки. Клеточная стенка у них тонкая, эластичная, поэтому при движении они могут изгибаться, меняя форму тела. Движение миксобактерий осуществляется по типу скольжения и возможно только на твердом субстрате.

Многие миксобактерии образуют плодовые тела, которые могут быть ярко окрашенными в оранжевый или другой цвет. Плодовые тела имеют разную форму и размеры: от микроскопического бугорка до сложных деревоподобных структур (рис. 8.2). Они представляют собой скопление слизи с погруженными в нее покоящимися укороченными клетками (цисты). После периода покоя при наличии влаги слизь размягчается, клетки высвобождаются и делятся поперечным делением (перетяжкой).

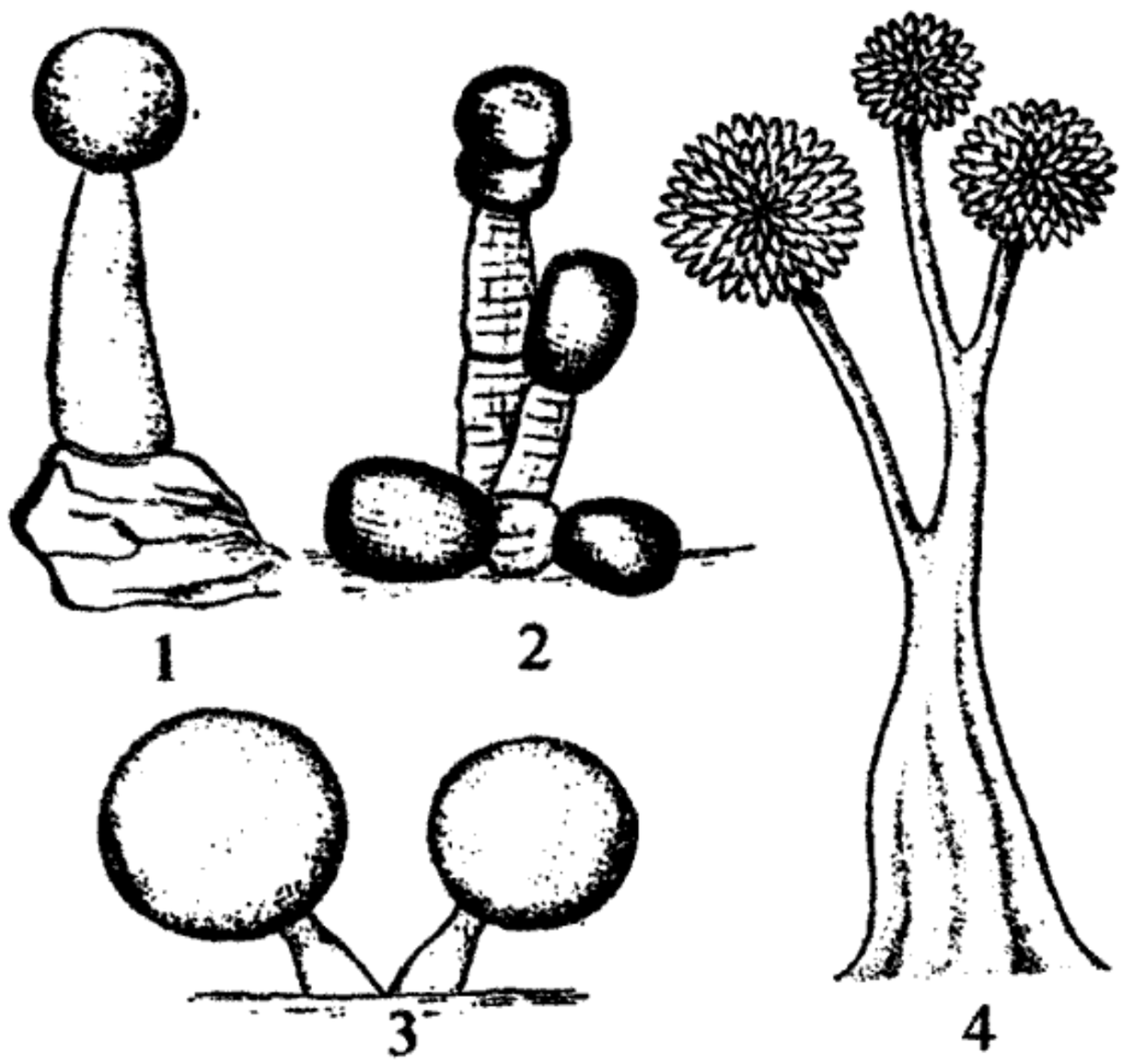


Рис.8.2.Миксобактерии:
1,3 - Myxococcus; 2 - Podangium; 4 - Chondromyces

Цикл развития миксобактерий состоит из двух стадий: стадии роения, или псевдоплазмодия, и стадии плодоношения, или образования цист. В стадии роения миксобактерии размножаются и выделяют слизистый матрикс (желатинообразную массу), в котором живут и передвигаются клетки. Продолжительность данной стадии 7-8 дней. Для стадии плодоношения характерно образование скоплений клеток в различных точках матрикса. Эти скопления возвышаются над

субстратом, образуя иногда округлые колонии, иногда же слизистый матрикс неравномерно выпячивается, ветвится и дает сложное плодовое тело.

Преобладающее число миксобактерий - сапрофиты. Они распространены в почве, навозе, на разлагающейся древесине, в иле водоемов.

Представители рода Polyangium - активные разрушители целлюлозы. Бактерии рода Myxococcus живут в почве за счет других бактерий, вызывая их лизис выделяемыми литическими ферментами.

Цитофаги в отличие от миксобактерий не образуют плодовых тел. Но главным отличием морфологически сходных этих двух групп бактерий являются нуклеотидный состав ДНК. Содержание ГЦ у цитофаг 30-50 %, у миксобактерий значительно выше - 67-71 %. Группа цитофаг включает три рода: Cytophaga, Sporocytophaga, Flexibacter. Организмы первых двух родов обитают в почве и вызывают активное расщепление целлюлозы. Некоторые виды рода Cytophaga встречаются как в почве, так и в морской воде. Они вызывают гидролиз хитина и агара.

Представители рода Flexibacter распространены в почве, пресной и морской воде. Среди них есть виды, патогенные для рыб. Так, F. columnaris часто является причиной массовой гибели рыб в рыборазводных прудах.

Энтеробактерии (от греч. entero - кишечник) - своим названием обязаны тому, что большинство видов их является постоянным обитателем кишечного тракта позвоночных. Клетки палочковидной формы, подвижные и неподвижные. Движение осуществляют с помощью полярно или перитрихально расположенных жгутиков. Энтеробактериям свойственна факультативная анаэробность. В анаэробных условиях энергию получают путем сбраживания углеводов, в аэробных - путем кислородного дыхания. Причем в качестве субстратов дыхания могут использовать разнообразные органические соединения. Для энтеробактерий характерно осуществление брожения смешанного типа, при котором образуются молочная, янтарная, уксусная и муравьиная кислоты, этиловый спирт (или углекислый газ) и водород.

Экологически среди энтеробактерий можно выделить три группы: бактерии нормальной микрофлоры млекопитающих и возбудителя кишечных инфекций (роды Escherichia, Salmonella, Shigella), эпифитные и фитопатогенные бактерии (род Erwinia), обитатели воды и почвы (роды Enterobacter, Proteus, Serratia). Все они составляют кишечную группу бактерий.

Род Escherichia - типичный представитель E. coli (кишечная палочка), входит в состав нормальной микрофлоры кишечного тракта человека и позвоночных животных. Вызываает заболевания в исключительных случаях - при ослаблении защитных функций организма.

E. coli - подвижная палочка, размером 1,1-1,5 - 2,0-6,0 мкм. Хорошо растет на простых питательных средах. Сбраживает углеводы, спирты, некоторые кислоты. Ацетат может использовать как единственный источник углерода, но цитрат использовать не может. Отличительным признаком кишечной палочки от других энтеробактерий является способность быстро (в течение 48 ч) сбраживать лактозу с образованием кислоты и газа, а также образовывать индол из триптофана. E. coli не нуждается в дополнительных факторах роста. На питательных средах она синтезирует все необходимые аминокислоты.

E. coli широко используется в санитарной бактериологии как индикатор на загрязнение среды фекалием.

В тесном генетическом родстве с родом Escherichia находятся бактерии родов Shigella и Salmonella. Основным отличительным признаком их является патогенность. Бактерии рода Shigella являются возбудителями дизентерии, разные виды сальмонелл (S. typhi, S. paratyphi) - возбудители брюшного тифа; S. typhimurium, попадая в пищевые продукты, является причиной пищевых токсикоинфекций.

Сальмонеллы - подвижные палочки, снабжены перитрихально расположенными жгутиками, шигеллы подвижностью не обладают. Большинство штаммов сальмонелл сбраживают углеводы с образованием кислоты и газа, только S. typhi никогда не образует газ. Шигеллы сбраживают углеводы только с образованием кислоты (без газа).

К энтеробактериям, патогенным для человека и животных, относятся бактерии рода Jersinia, ранее входившие в состав рода Pasteurella. По биохимическим свойствам они сходны с шигеллами. Отдельные виды (J. pestis) неподвижны. Род Jersinia включает всего три вида, которые являются возбудителями заболевания грызунов, а J. pestis может передаваться от грызунов к человеку и вызывать острое инфекционное заболевание - бубонную чуму. Последняя характеризуется высокой смертностью и относится к группе особо опасных инфекций.

Род Erwinia составляют фитопатогенные и сапрофитные эпифитные бактерии, насчитывающие более 60 видов. Это очень гетерогенная группа, представители которой сходны с другими энтеробактериями не только по морфологии и биохимическим свойствам, но проявляют некоторую способность к гибридизации ДНК, т. е. находятся в определенном генетическом родстве. На основании биохимических критериев род Erwinia разделяют на три подгруппы: E. amylovora, E. carotovora, E. herbicola, названия которым даны по типовым видам.

Бактерии, входящие в состав первой подгруппы, используют ограниченный набор сахаров (ни один вид не использует мальтозу, целлобиозу, лактозу), нуждаются в факторах роста, что не присуще другим бактериям этого рода. Так, характерный представитель группы E. amylovora испытывает большую потребность в никотиновой кислоте, другие виды развиваются на средах, содержащих дрожжевой экстракт. Бактерии этой подгруппы являются возбудителями ожогов и некротических заболеваний плодовых деревьев.

Подгруппа E. carotovora (типовой вид E. carotovora) отличается от других тем, что представители ее обладают способностью синтезировать пектолитические ферменты, которые активно разрушают пектины растений, способствуя этим самым распространению бактерий внутри растений. E. carotovora поражает многие растения, вызывая мягкую гниль корнеплодов.

Бактерии группы E. herbicola (типовой вид E. herbicola) не образуют пектолитических ферментов, являются типичными сапрофитами. В основном обитают на поверхности листьев

Некоторые антимикробные вещества получили широкое практическое применение для подавления роста патогенных микробов. Они называются дезинфицирующими веществами, а прием использования их - дезинфекцией. Наибольшее практическое применение находит хлорная известь (0,5-5 %-ные водные растворы), йод (2 %-ный раствор), двухлористая ртуть, или сулема (1:1000), фенол и его производные (1-5 %-ные растворы), этиловый и изопропиловый спирты (70 %-ные растворы).

клетках позвоночных и членистоногих - клещей, блох, вшей. Наиболее изучены два рода: Rickettsia и Coxiella.

Риккетсии были открыты в 1909 г. американским ученым Гонардом Риккетсом при изучении заболевания пятнистой лихорадки Скалистых гор. Годом позже, работая в Мексике, он установил, что сходный микроорганизм вызывает заболевание - сыпной тиф.

Изучение риккетсий было продолжено чешским ученым Станиславом Провачеком, который, так же как и Г. Риккетс, погиб от сыпного тифа, и бразильским ученым Д. Роха-Лима, предложившим объединить этих неизвестных возбудителей в род Rickettsia (в честь первооткрывателя), а возбудителю сыпного тифа дал видовое название по фамилии чешского исследователя.

Возбудитель сыпного тифа Rickettsia prowazekii паразитирует в клетках эпителия кишечника вшей.

Род Coxiella назван именем американского ученого Г. Кокса, открывшего его. Представители этого рода отличаются от предыдущего меньшими размерами и способностью проходить через бактериальные фильтры. Они являются возбудителями гриппоподобного заболевания, поражающего дыхательные пути, известного под названием лихорадки Q (от англ. Query - неясный, неопределенный). Это заболевание распространено по всему земному шару.

Риккетсии родов Bartonella и Anaplasma паразитируют в эритроцитах человека и других позвоночных, являются одной из причин анемии (малокровие).

Наряду с патогенными известны и непатогенные риккетсии, адаптированные к существованию в членистоногих в основном в качестве симбионтов. Например, организмы рода Symbiotes обитают в мицетомах клопов, рода Blattabacterium - в мицетомах брюшного жирового тела тараканов. Риккетсии не культивируются на синтетических питательных средах. Их можно выращивать в желточном мешке куриных эмбрионов и в культуре клеток.

Хламидии представлены одним родом Chlamidia, имеют сферическую форму клетки, размер которой зависит от стадии развития. Размножаются только в цитоплазме клетки хозяина, и так

называемой цитоплазматической вакуоли, которая образуется в результате инвагинации ЦПМ.

Инфекционной формой являются мелкие клетки, диаметром 0,2-0,5 мкм, называемые элементарными тельцами. После проникновения в клетку хозяина они увеличиваются в размерах, превращаясь в крупные сферические клетки (0,8-1,5 мкм) - инициальные тельца. Последние делятся дроблением на дочерние клетки. Цикл завершается преобразованием дочерних клеток в элементарные тельца: уменьшаются размеры клеток, уплотняется ядерный материал, формируется трехслойная клеточная стенка. После разрушения клетки хозяина элементарные тельца проникают в новые клетки и цикл развития повторяется. Некоторое время они могут сохранять жизнеспособность вне клетки хозяина, затем инфицировать его. В отличие от риккетсий хламидии не передаются через беспозвоночных, а непосредственно переходят от одного позвоночного хозяина к другому. Существенным отличием хламидий от риккетсий является также неспособность синтезировать макроэргические соединения, в первую очередь АТФ. В связи с этим их назвали «энергетическими паразитами». Хламидии паразитируют в организме различных позвоночных, в том числе и человека, вызывая инфекционное заболевание - трахому (воспаление слизистой оболочки глаз), пситтакоз, или попугайную болезнь (воспаление дыхательных органов, передающееся человеку от больных попугаев).

8.2. ОТДЕЛ II. FIRMICUTES

В состав отдела входят грамположительные бактерии разнообразной морфологии: кокки, палочки, ветвящиеся или искривленные клетки. У одних формируются эндоспоры, у других споры находятся на гифах или в спорангиях, а некоторые - аспорогенные. Размножаются бинарным делением и спорами. Большинство организмов неподвижны. У подвижных представителей этот процесс осуществляется только за счет жгутиков, которые всегда многочисленны и расположены по всей поверхности клетки - перитрихиально. Иной тип расположения жгутиков, как и иные формы движения, отсутствует. Среди

бактрейий данного отдела нет автотрофных фото- и хемосинтезирующих видов. Все являются хемогетеротрофами.

Отдел Fermicutes состоит из двух классов: Firmibacteria и Thallobacteria.

8.2.1. Класс Firmibacteria

Характерными представителями данного класса являются грамположительные спорообразующие палочковидные бактерии, аспорогенные палочки и кокки, нитчатые многоклеточные бактерии.

Спорообразующие бактерии (сем. Bacillaceae).

Семейство Bacillaceae включает обширную группу эубактерий, образующих термоустойчивые эндоспоры. Преимущественно все представители этого семейства являются грамположительными палочками. Исключение составляет род Sporosarcina, клетки которого имеют форму кокка, но образуют споры (S. ureae). Наибольшее значение имеют два рода: Bacillus и Clostridium.

К роду Bacillus относятся аэробные, грамположительные палочки, большинство из них подвижны. Споры образуются в центре клетки, клетка при этом сохраняет прежние размеры и форму. В качестве запасных дыхательных веществ в клетках бацилл откладываются капельки жира. Бациллы нетребовательны к источникам питания, хорошо растут на обычных органических средах. Большинство их являются сапрофитами, широко распространены в природе, особенно в почвах, богатых органическими веществами (Bac. cereus, Bac. subtilis, Bac. megaterium, Bac. mycoides).

Патогенными свойствами обладают Bac. anthracis - возбудитель сибирской язвы, Bac. thuringiensis - возбудитель болезни насекомых и др. Характерным для Bac. thuringiensis является образование в спорангиях рядом со спорой кристаллов белкового токсина, известных как пароспоральные тельца. К токсину чувствительны личинки многих видов бабочек и мух. Этот вид бацилл используется для приготовления энтомопатогенных

препаратов. Некоторые виды бацилл используются как продуценты антибиотиков (Bac. brevis, Bac. subtilis и др.).

К роду Clostridium относятся облигатно анаэробные спорообразующие палочки. В отличие от бацилл у них при образовании спор происходит утолщение клетки. Споры располагаются центрально или терминально. В зависимости от этого клетка может иметь форму веретена - клостридиальный тип, или барабанной палочки - плектридиальный тип (рис. 8.3). Бактерии рода Clostridium получают энергию за счет масляно-кислого брожения.

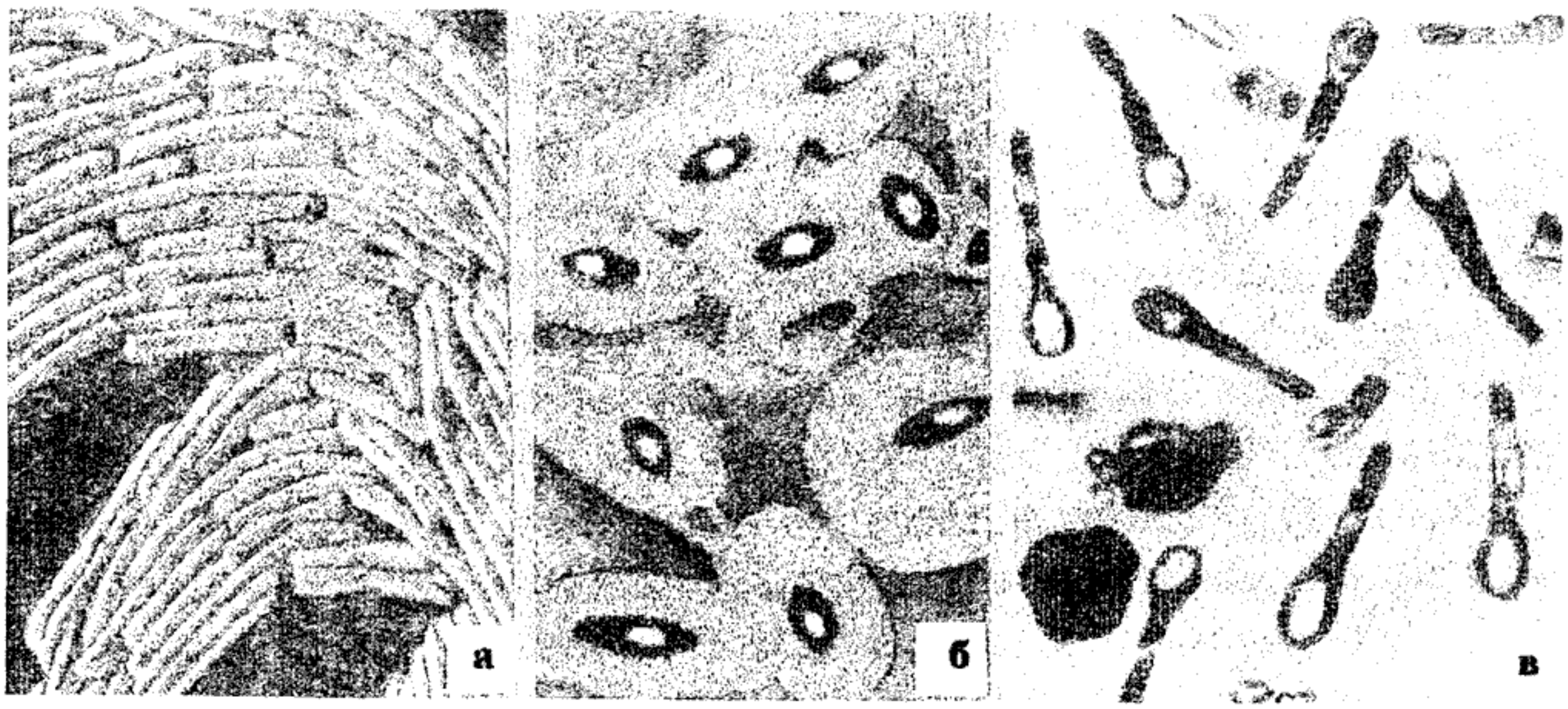


Рис.8.3. Спорообразующие бактерии:
а - бациллы; б - клостридии; в - плектридии

Возбудителями классического масляно-кислого брожения являются Cl. butyricum, Cl. pasteurianum, Cl. rubrum и др. В качестве основных продуктов образуют масляную и уксусную кислоты, углекислый газ, водород. Другие представители рода осуществляют ацетонобутиловое брожение, при котором кроме масляной кислоты образуются нейтральные продукты: ацетон, бутиловый, этиловый, изопропиловый спирты. Это характерно для бактерий Cl. acetobutylicum, Cl. felsineum, Cl. sporogenes и др. Сбраживаемыми субстратами могут служить различные органические соединения, в зависимости от которых клостридии подразделяют на ряд физиологических групп: сахаролитические, сбраживающие простые

углеводы, крахмал, пектин, целлюлозу (Cl. felsineum, Cl. pasteurianum). Отличительной особенностью бактерий этой группы является способность фиксировать молекулярный азот. Вторую группу составляют протеолитические клостридии, которые используют в качестве субстратов белки, пептиды, аминокислоты (Cl. putribicum, Cl. sporogenes, Cl. botulinum и др.). В отдельную группу выделяют пуринолитические клостридии, сбраживающие гетероциклические азотсодержащие соединения - пурины и пиримидины (Cl. acidiurici, Cl. cylindrosporum).

По сравнению с бациллами клостридии более требовательны к составу питательных сред. Большинство из них, особенно патогенные виды, нуждаются в сложных органических средах. К патогенным относятся Cl. tetani - возбудитель столбняка. Он выделяет сильнодействующий токсин, поражающий дыхательные нервные центры. Cl. botulinum - возбудитель пищевых, часто смертельных отравлений. Спора его располагается в конце клетки, которая имеет вид теннисной ракетки. Cl. botulinum - широко распространен в почве. Образуемый им токсин является самым сильным биологическим ядом. В почве также часто встречается возбудитель газовой гангрены Cl. perfringens. Он не обладает подвижностью. Это один из редких представителей по данному признаку.



Рис. 8.4. Выросты на споре почвенной бациллы

Наряду с патогенными формами среди клостридий встречается много сапрофитов (рис. 8.4). Некоторые из них (Cl. pasteurianum) обладают способностью фиксировать молекулярный азот; другие (Cl. butyricum) используются для промышленного получения продуктов брожения: масляной кислоты, бутанола, ацетона. Анаэробные бациллы применяются при мочке льна, конопли и других прядильных растений.

Аспорогенные палочковидные бактерии - небольшая группа бактерий, характерными родами которой явля-

ются молочнокислые бактерии рода Lactobacillus и нитчатые многоклеточные бактерии, представленные одним родом Caryophanon.

Бактерии рода Lactobacillus - палочки разной длины: от длинных и тонких до коротких типа коккобацилл. Характеризуются сложными пищевыми потребностями: нуждаются в витаминах, аминокислотах, избирательны в отношении пептидов, производных нуклеиновых кислот и сбраживаемых углеводов. Так, многие виды не ферментируют арабинозу, рибозу, рафинозу, маннит, сорбит и др. Энергию получают за счет гомоферментативного или гетероферментативного молочнокислого брожения (см. гл. 7). Представители рода Lactobacillus широко распространены в природе: на растениях, в воде, почве, содержатся в молоке и молочных продуктах, в ротовой полости и кишечнике позвоночных.

Род Caryophanon представлен одним видом C. latum. Это многоклеточная бактерия крупных размеров - около 4 мкм толщиной и 40 мкм длиной. Бактерии имеют вид длинных нитей (трихомов), состоящих из дисковидных уплощенных клеток, которые отделены друг от друга поперечными стенками (рис. 8.5). Строгие аэробы, выделенные из коровьего навоза, встречаются в почве.

Аспорогенные кокки - бактерии сферической формы. Они образуют разные сочетания клеток и в зависимости от этого носят названия диплококков, стрептококков, стафилококков, сарцин (см. гл.4).

В составе группы различают три семейства: Micrococcaceae, Streptococcaceae, Peptococcaceae.

Семейство Micrococcaceae представляют три рода: Micrococcus, Staphylococcus, Planococcus. Клетки бактерий рода Micrococcus сферические, 0,3-3,5 мкм в диаметре, встречаются

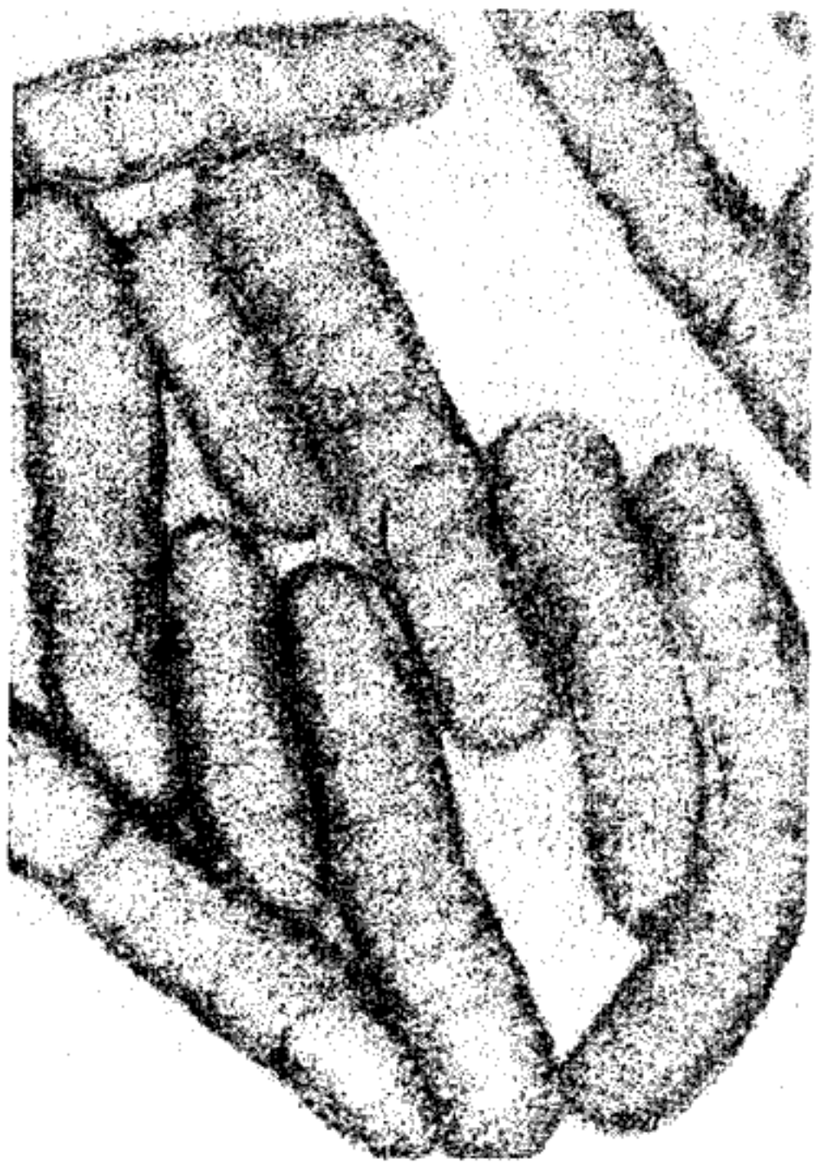


Рис. 8.5. Многоклеточная бактерия Caryophanum

поодиночке и в виде неправильных скоплений. Непритязательны к источникам питания: используют различные углеродсодержащие соединения, могут расти на средах с глутаминовой кислотой, используя ее как единственный источник углерода, азота и энергии. Аэробы обитают в почве, пресных водах, на коже человека.

Организмы рода Staphylococcus образуют гроздевидные скопления клеток. Факультативные анаэробы обладают дыхательным и бродильным метаболизмом. Используют многие углеводы. При развитии в аэробных условиях нуждаются дополнительно в аминокислотах и витаминах. Среди стафилококков есть патогенные виды (S. aureus). Обитают на кожных покровах и слизистых оболочках человека и теплокровных животных, встречаются в воздухе и почве.

Бактерии рода Planococcus в отдичие от предыдущих кокков являются строгими аэробами, обитают в морской воде.

В семейство Streptococcaceae объединены факультативные анаэробные хемогетеротрофы со сложными пищевыми потребностями и бродильным типом метаболизма. По продуктам брожения они относятся к молочнокислым бактериям: роды Streptococcus, Pediococcus, Aerococcus - к гомоферментативным, род Leuconostoc - к гетероферментативным. Наряду с этим, среди рода Streptococcus отдельные виды (S. pyogenes, S. pneumoniae) - патогенные, вызывают эндокардит, ангину, менингит. Так называемый гемолитический стрептококк является возбудителем скарлатины.

Семейство Peptococcaceae составляют облигатно анаэробные кокки с бродильным типом метаболизма. Среди продуктов брожения молочная кислота не образуется, чаще накапливаются низшие жирные кислоты - пропионовая, масляная, реже янтарная. Характерными родами являются Peptococcus и Sarcina. Представители первого рода распространены в ротовой полости, дыхательных путях и желудочном тракте человека и животных, второго - в воздухе, почве, на поверхности растений. Бактерии рода Sarcina отличаются от других представителей группы кокков тем, что деление клеток происходит в трех перпендикулярных плоскостях и в результате образуются двуслойные пакеты из 8 или более клеток. Один из видов (S. ventriculi) синтезирует целлюлозу,

которая входит в состав внешнего слоя клеточной стенки. Другие прокариоты, за исключением Acetobacter xylinum, не способны синтезировать данный полисахарид.

8.2.2. Класс Thallobacteria

К данному классу принадлежат эуактиномицеты и родственные им организмы - коринеформные бактерии и проактиномицеты. По структуре клетки они сходны с грамположительными бактериями, однако отличаются от последних по морфологии. У эуактиномицетов клетка многократно ветвится, образуя мицелий, у коринеформных бактерий наблюдается слабо выраженная тенденция к ветвлению, у проактиномицетов образуется рудиментарный мицелий на ранней стадии развития.

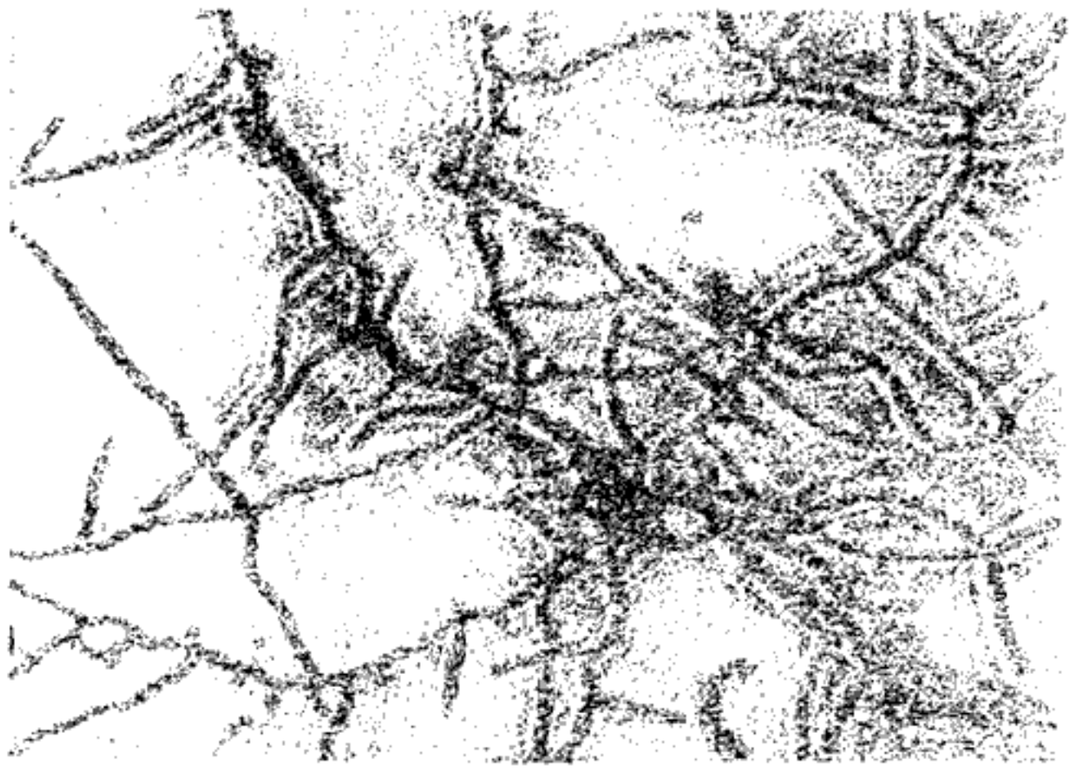


Рис.8.6. Морфология актиномицетов (капиллярная микроскопия)

Эуактиномицеты, как истинные актиномицеты, - неподвижные грамположительные бактерии, которые развиваются исключительно в виде мицелия. В большинстве случаев мицелий не имеет перегородок, т. е. представляет собой одну разветвленную ценоцитную (многоядерную) клетку (рис. 8.6). При росте на плотных средах эуактиномицеты образуют воздушный и субстратный мицелий. Благодаря последнему колонии прочно врастают в среду (рис. 8.7).

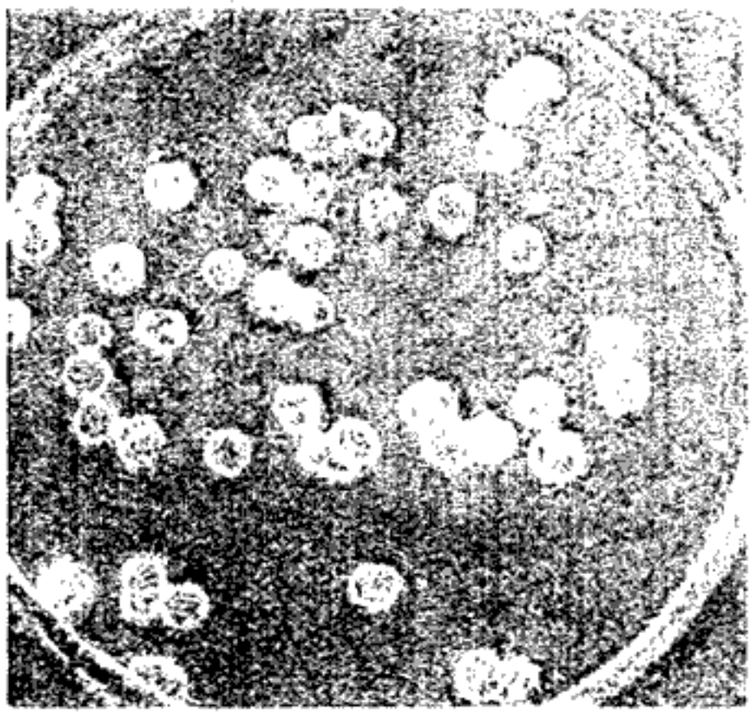


Рис.8.7. Колонии актиномицетов на агаризованной среде

Наиболее крупным и типичным родом эуактиномицетов является род Streptomyces, содержащий более 500 видов. Размножаются спорами, которые формируются по одной или цепочками на верхушках гиф. Развитие стрептомицетов начинается с прорастания спор. В разных

участках споры вырастают от 1 до 4 гиф. Они удлиняются, ветвятся и разрастаются в мицелий, из которого формируются плотные компактные колонии. Этот мицелий называется субстратным, или первичным. Он врастает в среду и создает основу колонии. На поверхности колонии развивается более рыхлый воздушный, или вторичный мицелий. Гифы его покрыты гидрофобным чехлом, имеют большие толщину и светопреломляемость по сравнению с гифами субстратного мицелия. Споры формируются только на спорулирующих гифах (спороносцах) воздушного мицелия. Образование их может идти путем фрагментации или сегментации. В обоих случаях вначале происходит репликация одного или более нуклеоидов, и они равномерно располагаются вдоль гифы. Вокруг них обосабливается цитоплазма, и каждый обособленный участок покрывается инвагинирующей цитоплазматической мембраной. Образуются проспоры. При фрагментационном способе проспоры покрываются второй собственной оболочкой, превращаясь в зрелые споры. Оболочка спорангия некоторое время сохраняется, окружая споры. Затем она распадается и освобождаются цепочки спор. В соответствующих условиях они прорастают и дают начало новым организмам.

Существует и другой способ спорообразования у актиномицетов - сегментационный. Он отличается от предыдущего тем, что сразу после образования проспоры следует формирование поперечных перегородок, разделяющих спороносец на ряд равномерных клеточек - спор. При созревании спор спороносец распадается на отдельные сегменты - споры.

Разные представители стрептомицетов различаются по форме и расположению спороносцев. Они могут быть прямые, спиралевидные, изогнутые, иметь мутовчатое, последовательное или супротивное расположения. Поверхностная структура спор у разных видов неодинакова. Споры бывают гладкие и с разными выростами в виде шипиков, ворсинок. Эти морфологические признаки используются в классификации актиномицетов.

Все стрептомицеты - облигатные аэробы. Они нетребовательны в отношении питательных веществ, не нуждаются в факторах роста, преимущественно сапрофиты. Стрептомицеты хорошо распространены в почвах разных типов и играют большую

роль в минерализационных процессах. Их наличие обусловливает специфический запах влажной почвы. Из S. griseus было выделено масло, названное геосмином, обладающее таким запахом. В отличие от эубактерий стрептомицеты хорошо развиваются при низкой влажности почвы. Поэтому в почвах засушливых климатических зон они численно преобладают над всеми микроорганизмами.

Повсеместное распространение актиномицетов рода Streptomyces связано с наличием у них активных ферментных систем, позволяющих разрушать и использовать самые разнообразные соединения. Так, у актиномицетов выявлена способность продуцировать такие гидролитические ферменты как протеазы, амилазы, кератиназы, хитиназы, активные окислительно-восстановительные ферменты группы полифенолоксидаз, обеспечивающие расщепление устойчивых фенольных соединений, входящих в состав гумуса. Некоторые актиномицеты осуществляют трансформацию полициклических соединений - стероидов - в биологически активные соединения - стероидные гормоны (преднизолон, кортизон). Среди стрептомицетов особенно много продуцентов антибиотиков. Например, Str. aureofaciens - продуцент тетрациклина, Str. griseus - продуцент стрептомицина, Str. venezuelae - продуцент хлорамфеникола и др. Одновременно с образованием тетрациклина Str. aureafaciens синтезирует также витамин B_{12} и его аналоги. Витамины группы В способны продуцировать почти все стрептомицеты. Многие из них образуют каротиноидные пигменты, черно-коричневые меланины и сине-фиолетовые антоцианы.

Стрептомицеты - типичные почвенные микроорганизмы. Среди них известны единичные фитопатогенные виды, вызывающие паршу картофеля (Str. scabies).

Актиномицеты рода Streptosporangium отличаются по механизму спорообразования. Верхушки гиф воздушного мицелия раздуваются в шарообразные, одетые чехлом спорангии, диаметром до 20 мкм. Несущая спорангий гифа врастает в него, спирально завивается внутри и от нее отшнуровываются неподвижные споры, которые освобождаются при разрыве чехла.

У актиномицетов рода Actinoplanes споры также образуются внутри спорангиев, но споры подвижные, движение осуществляется

с помощью пучка жгутиков. В отличие от предыдущего рода виды Actinoplanes не образует воздушного мицелия. Местообитанием их являются пресные водоемы, изредка встречаются они и в почве.

Актиномицеты рода Micromonospora так же как и представители рода Actinoplanes, не образуют воздушного мицелия. Колонии состоят из ярко окрашенного субстратного мицелия. На поверхности их развиваются разветвленные, не покрытые чехлом гифы. На верхушках гиф образуется только по одной споре. При спорообразовании происходит изменение цвета колонии. Представители рода Micromonospora - облигатные аэробы, за исключением видов, выделенных из содержимого кишечника термитов, которые являются единственными представителями анаэробных эуактиномицетов. Микромоноспоры распространены в почве, гниющем иле и пресной воде. Они разлагают целлюлозу, хитин, ксилан и некоторые другие полисахариды.

Коринеформные бактерии - сборная группа бактерий с тенденцией к образованию слабо разветвленных или искривленных клеток. В состав группы входят роды Corynebacterium, Arthrobacter, Propionibacterium.

К роду Corynebacterium относятся бактерии с неправильной и изменчивой формой клеток. В развивающейся культуре одновременно могут находиться клетки палочковидной, конусообразной и булавовидной формы. Размеры клеток 0,3-0,5 × 1,0-5,0 мкм. Неподвижны. Размножаются бинарным делением. Сразу после деления дочерние клетки, имеющие булавовидную форму, претерпевают внезапное «защелкивающее» («разламывающее») перемещение, которое приводит к характерному их расположению под углом друг к другу.

Коринебактерии - факультативные аэробы. Энергию получают за счет дыхания или брожения. Основным конечным продуктом при сбраживании сахаров является пропионовая кислота. Большинство представителей коринебактерий имеют сложные пищевые потребности, например, C. diphteriae нуждается в витаминах группы В.

Среди коринебактерий имеются сапрофиты и виды, патогенные для человека, животных и растений. Типовым видом сапрофитных коринебактерий является C. glutamicum - продуцент

глутаминовой кислоты. Большинство штаммов C. diphteriae непатогенны, являются нормальными обитателями дыхательных путей. Но после заражения их специфическим бактериофагом приобретают способность вызывать дифтерию, т. е. приобретают патогенное свойство. Это свойство обусловлено тем, что фаг, внедрившись в геном клетки, индуцирует образование дифтерийного токсина. Другие виды этого рода патогенны для растений. C. sepedonicum - возбудитель черной кольцевой гнили картофеля; C. betae - вызывает пятнистость листьев свеклы. Коринебактерии широко распространены в почве, пресных водоемах, на овощах и фруктах.

Род Arthrobacter включает облигатно аэробные бактерии, способные «защелкиваться» после деления. У них больше выражена способность к образованию кокковидных клеток. Рост сопровождается последовательной сменной формы клеток: в экспоненциальной фазе клетки имеют неправильную палочковидную форму; переход в стационарную фазу сопровождается превращением палочковидных клеток в кокковидные. Образование последних происходит или в результате постепенного укорачивания палочек, или же вследствие последовательного отделения от них укороченных кокковидных клеток. Образовавшиеся кокки превращаются в покоящиеся формы - артроспоры. При перенесении в свежую питательную среду происходит прорастание их в палочковидные или слабоветвящиеся клетки и цикл развития повторяется. Прорастание осуществляется путем образования ростков, которых может быть от одного до четырех на клетку. У большинства артробактерий полный цикл развития (кокк - палочка - кокк) завершается в течение 1-2 сут. Артробактерии отличаются от коринебактерий по составу клеточной стенки. Они не синтезируют арабиногалактана и миколовых кислот, образуют множество химических типов пептидогликанов.

По своим пищевым потребностям артробактерии имеют сходство с псевдомонадами. Большинство видов может использовать в качестве источников углерода и энергии широкий круг разнообразных органических соединений: углеводы, спирты, карбоновые кислоты, пектины, лигнин. Они способны разлагать

такие субстраты, как пластмассы, углеводороды, пестициды, алкалоиды. Некоторые виды нуждаются в факторах роста.

Многообразна биосинтетическая деятельность артробактерий. Они активно продуцируют аминокислоты, ауксины, внеклеточные полисахариды и пигменты. Это послужило основанием для использования их в микробиологической промышленности как продуцентов биологически активных веществ - предшественников нуклеиновых кислот, свободных аминокислот, таких как гистидин, триптофан, серин и др., протеолитических ферментов, внеклеточного белка. С помощью ауксотрофных мутантов артробактерий на парафиновых и газообразных углеводородах (этан, бутан, пропан) осуществляется промышленное получение L-глутаминовой кислоты (продуценты Art. paraffineus, Art. simplex), L-лизина (продуценты Art. paraffineus, Art. citreus и др.), диаминопимелиновой кислоты (продуценты Art. globiformis, Art. roseoparaffineus и др.).

Бактерии рода Arthrobacter широко распространены в природе. Особенно богаты ими почвы, где они выполняют важную роль в процессах минерализации органических веществ.

Род Propionibacterium представлен аэротолерантными анаэробами, осуществляющими пропионовокислое брожение (см. гл. 7).

Группа проактиномицетов характеризуется более выраженным мицелиальным типом развития, хотя он имеет временный и часто ограниченный характер. Размножение происходит преимущественно путем фрагментации мицелия на короткие палочковидные клетки. Характерными представителями группы являются роды Mycobacterium, Nocardia и др.

Микроорганизмы рода Mycobacterium временно образуют рудиментарный мицелий, который быстро распадается на тонкие, иногда разветвленные палочки. Микобактерии грамположительны, неподвижны и, в отличие от коринебактерий, не «защелкиваются» после деления, являются кислотоустойчивыми. Последнее свойство обусловлено высоким содержанием сложных липидов (эфиров миколовой кислоты) в клеточной стенке, которые придают поверхности клетки сильную гидрофобность.

Микобактерии - облигатные анаэробы, энергию получают в процессе дыхания. Среди них есть патогенные и сапрофитные формы. Патогенные характеризуются замедленным ростом, нуждаются в факторах роста. К ним относится возбудитель туберкулеза (M. tuberculosis), возбудитель проказы (M. leprae). Сапрофитные микобактерии широко распространены в почвах, нетребовательны в отношении источников питания. Некоторые из них используют парафины и ароматические углеводороды. Для микобактерий характерно образование желтых или оранжевых каротиноидных пигментов.

Род Nocardia составляют организмы с более выраженной способностью к образованию мицелия. Некоторые из них формируют хорошо развитый субстратный (реже - воздушный) мицелий, который затем распадается на укороченные палочки. Размножение происходит фрагментацией мицелия. Большинство нокардий является почвенными микроорганизмами и участвует в расщеплении устойчивых органических соединений. Отдельные виды - патогенны для животных.

8.3. ОТДЕЛ III. TENERICUTES

Отдел представлен одним классом Mollicutes[8], в который выделены микоплазмы - прокариотные микроорганизмы, не имеющие ригидной клеточной стенки. Они неспособны синтезировать пептидогликан и его предшественников, нечувствительны к пенициллину и его аналогам, а также к другим антибиотикам - ингибиторам синтеза клеточной стенки. С отсутствием клеточной стенки связан полиморфизм микоплазм. Культура одного вида может одновременно содержать клетки разной формы: крупные шаровидные или грушевидные, иногда с нитевидными отростками, мелкие зерна (элементарные тельца), клетки неправильной формы, спиралевидные, тонкие разветвленные или неразветвленные нити (рис. 8.8). Из-за отсутствия ригидной

[8] От латинских слов: mollia - гибкий, cutes - кожа.

клеточной стенки клетка микоплазм пластична, может вытягиваться в тончайшие структуры и проходить через поры бактериальных фильтров. Размеры клеток, как и форма, непостоянны: крупные сферические тела достигают 10 мкм в диаметре, «элементарные

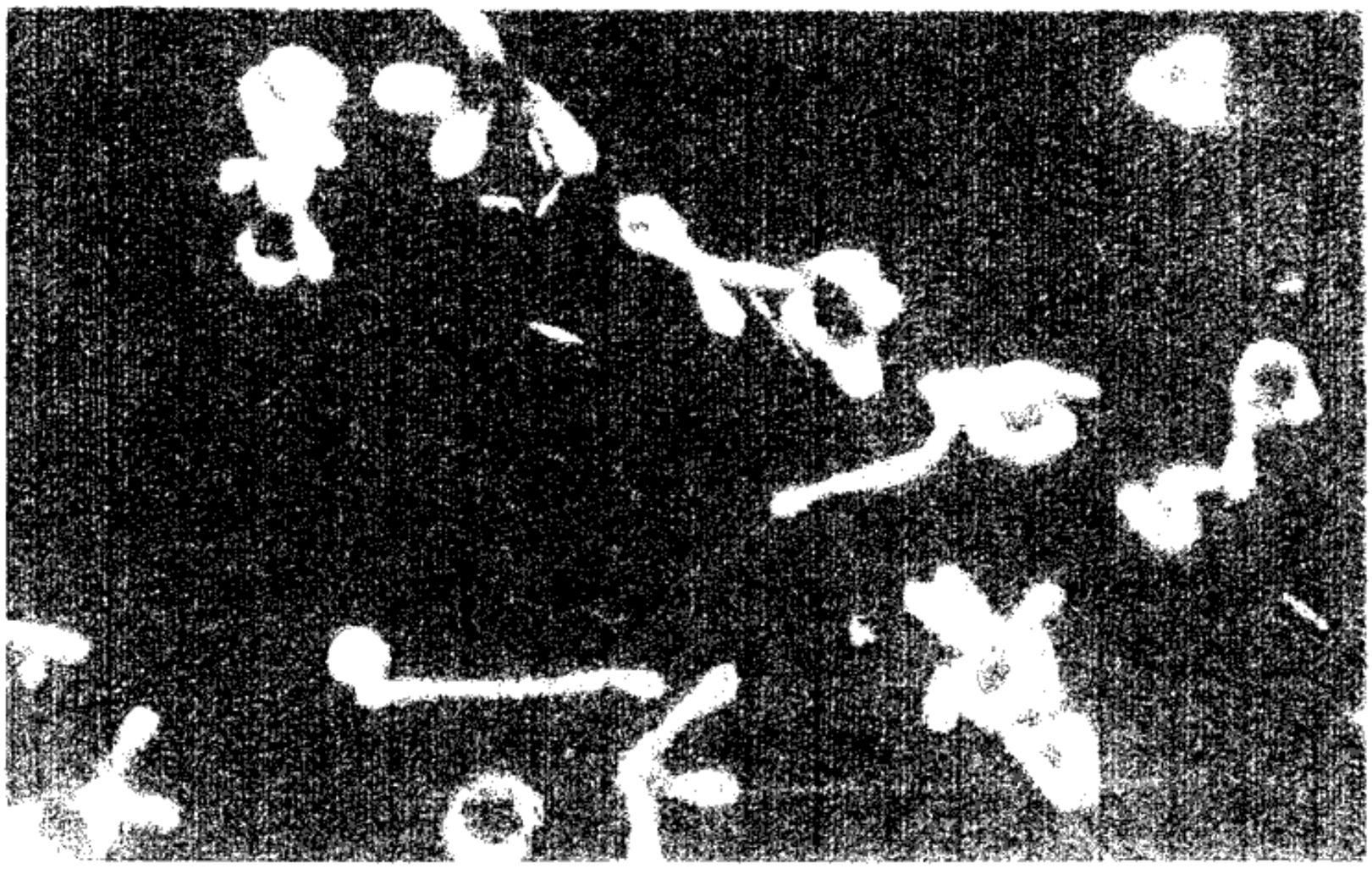


Рис. 8.8. Микоплазмы (электронная микрофотография)

тельца» - 0,1-0,2 мкм, нитчатые формы 0,3-0,4 мкм в диаметре и до 40 мкм в длину. Размножаются бинарным делением и почкованием. На твердых питательных средах образуют характерные колонии: центральная часть колонии непрозрачная, частично погружена в среду, край тонкий, просвечивающийся. Колонии очень мелкие - 0,5-2,0 μM в диаметре.

Микоплазмы имеют прокариотический тип клеточной организации. Снаружи клетка окружена прочной и эластичной цитоплазматической мембраной, толщиной 7,5-9,0 нм, внутри находится цитоплазма, содержащая рибосомы и нуклеоид. Нуклеоид представлен кольцевой хромосомой, состоящей из молекулы двунитчатой ДНК. Репликация ДНК проходит по полуконсервативному механизму, т. е. так же, как и у других прокариот. Однако, ДНК-полимераза микоплазм, осуществляющая репликацию, отличается функционально от ДНК-полимераз других прокариот. Подобно таковым эукариот, она не обладает 3′ - 5′-экзонуклеазной функцией. Это лишает микоплазмы механизмов фотореактирования и темновой репарации повреждений ДНК ультрафиолетом. Данная особенность характерна для паразитов,

развивающихся в других организмах и защищенных от непосредственного воздействия ультрафиолета.

Особенностью микоплазм является малая величина генома - 0,5-1,0 × 10^9 дальтон и низкое содержание ГЦ-пар - от 23 до 41 М%. По объему генетической информации микоплазмы занимают промежуточное положение между E. coli и Т-фагами.

Микоплазмы характеризуются сложными пищевыми потребностями. Многие из них растут только на средах, содержащих сыворотку крови, гидролизаты и отвары дрожжей, экстракт из органов животных (печень, сердце). Некоторые нуждаются в готовых нуклеотидах как предшественниках для синтеза ДНК и РНК. Высокие требования большинства микоплазм к составу питательных сред обусловлены паразитическим образом жизни, при котором их обмен веществ зависит от метаболизма организма-хозяина. Известны сапрофитные микоплазмы.

Многим микоплазмам присуща высокая потребность в холестерине, что не характерно для других прокариот. Это вещество у них включается в ЦПМ, повышая ее эластичность и прочность. Кроме того, стерины принимают участие в транспорте питательных веществ и удалении продуктов обмена через мембрану. Холинэстераза микоплазм действует как пермеаза илитрансаминаза у других прокариот.

Признак стеринзависимости используется для классификации микоплазм.

8.3.1. Характеристика таксонометрических групп класса Mollicutes

Первый представитель класса Mycoplasma mycoides был открыт французскими учеными А. Нокаром и В. Ру в 1898 г. в плевральной жидкости коров, больных плевропневмонией. Вскоре подобные микроорганизмы были обнаружены у других животных - овец, коз, собак, крыс, а также у человека, и им было дано общее название PPLO (от англ. Pleuropneumonia-like organisms - плевропневмониеподобные организмы). В 1967 г. описаны микоплазмы - возбудители заболеваний растений. Теперь известно около 200 видов таких заболеваний. Обнаружены сапрофитные

микоплазмы в почве и сточных водах, симбионты грибов, насекомых, птиц. В горячих источниках выделены термоацидофильные микоплазмы - термоплазмы, которые по совокупности молекулярно-биохимических свойств отнесены к архебактериям.

Класс Moliccutes по своим свойствам очень гетерогенная группа микроорганизмов, разделенная на три семейства: Mycoplasmataceae, Acholeplasmataceae и Spiroplasmataceae.

Семейство Mycoplasmataceae представлено двумя родами: Mycoplasma и Ureaplasma. Различия между ними состоят в способности организмов рода Ureaplasma разлагать мочевину. Все представители данного семейства являются истинными микоплазмами, характеризуются предельно малой величиной генома - $0,5 \times 10^9$ дальтон, что в 4 раза меньше генома E. coli; испытывают высокую потребность в холестерине, нуждаются в сложных питательных веществах. Они являются хемоорганогетеротрофами. Энергию получают путем брожения или дыхания. У них функционируют ЦТК и дыхательная цепь.

Некоторые из представителей семейства подвижны, движение осуществляется по типу скольжения. Подвижные организмы имеют необычную для молликутов форму клеток: на поверхности мембраны содержатся терминальные структуры в виде пузырьков (M. gallisepticum) или шиповидных выростов (M. pneumoniae). Эти структуры обеспечивают сцепление микоплазм с поверхностью агара или другого увлажненного субстрата и являются ведущей частью клетки во время движения. Движение клеток рода Mycoplasma возможно только на увлажненных поверхностях; в жидкой среде и на сухих поверхностях они неподвижны. Потеря способности к образованию терминальных структур приводит к потере подвижности и вирулентности.

Большинство представителей рода Mycoplasma является высокоспециализированными паразитами человека, животных, насекомых и растений.

Патогенные микоплазмы взаимодействуют с рецепторными участками мембраны клетки-хозяина, вначале прикрепляются к ней специфическими участками собственной мембраны (так называемые места прикрепления), затем происходит слияние

мембран микоплазмы и клетки хозяина. Формируется особый тип глубокого взаимодействия паразита и хозяина на клеточном уровне, приводящий к развитию патологического процесса. В таком состоянии микоплазмы получают из клетки-хозяина все необходимые для развития вещества, а также непосредственно влияют на функции его генетического аппарата. Полагают, что микоплазмы причастны к развитию некоторых злокачественных заболеваний.

Семейство Acholeplasmataceae содержит одноименный род Acholeplasma. Организмы данного рода не нуждаются в холестерине, но при наличии его в среде потребляют и включают в мембрану подобно клеткам рода Mycoplasma. Ахолеплазмы имеют в 2 раза больший геном, чем организмы предыдущего семейства. Он равен 1×10^9 дальтон. Они содержат ряд гидролитических ферментов (лактатдегидрогеназу, дифосфатальдолазу), способны к синтезу жирных кислот из ацетата. В связи с этим менее требовательны к составу питательных сред. У одного из представителей A. laidlawie выявлено два типа вирусов: бактериофаги и вирусы, сходные с вирусами человека и животных. Поражение прокариот вирусами, типичными для высших организмов, - необычное явление, представляющее общебиологический интерес.

В состав рода Acholeplasma входят свободноживущие сапрофитные микоплазмы и паразиты млекопитающих и птиц.

Семейство Spiroplasmataceae представлено одним родом Spiroplasma. Первый представитель семейства Spiroplasma citri был выделен в 1971 г. из листьев цитрусовых растений. Отличительным признаком спироплазм является наличие среди разнообразных морфологических клеток спиралевидных нитей. Величина генома составляет 1×10^9 дальтон. Спироплазмы нуждаются в холестерине, но только на первых этапах развития. В дальнейшем у них индуцируется синтез каротиноидов (типа нейроспорина), которые в мембранах спироплазм (и ахолеплазм) выполняют те же функции, что и холестерин у микоплазм: обеспечивают прочность и эластичность мембраны, транспорт питательных веществ и удаление продуктов обмена. Спироплазмам присущи те же свойства, что и другим представителям класса Mollicutes. Но в

отличие от других микоплазм спироплазмы обладают активной подвижностью, которая обеспечивается наличием дополнительного белкового фибриллярного слоя, непосредственно подстилающего мембрану. Этот слой обеспечивает не только подвижность, но и спиралевидную форму клеток. Он имеется у всех спироплазм. Но у подвижных форм он жестко прикреплен к мембране посредством актиноподобного белка, названного «спиралином». У подвижных форм спиралин составляет около 22 % от суммы всех мембранных белков. У неподвижных - этот белок отсутствует. Для спироплазм характерно вращательное движение вследствие сокращения отдельных фибрилл. Так как спироплазмы являются внутриклеточными паразитами, то подвижность позволяет им менять места обитания путем перехода из одной клетки хозяина в другую и увеличивать шансы на выживаемость. У спироплазм обнаружены вирусы, сходные с бактериофагами. Вопрос существования и адсорбции бактериофагов у микроорганизмов, лишенных клеточной стенки, на которой расположены рецепторы для их прикрепления, представляет значительный интерес, но пока он не решен. Большинство известных спироплазм является возбудителями заболеваний растений.

8.4. ОТДЕЛ IV. MENDOSICUTES

Отдел представлен одним классом Archaebacteria, объединяющим группу бактерий с уникальными свойствами. Эти бактерии получили название архебактерий. Впервые они стали известны в 1977 г., благодаря работам американских ученых К. Вуза и Г. Фокса по изучению молекулярно-биохимических свойств компонентов клеток разных видов бактерий. Ведущую роль в их открытии сыграл анализ состава и последовательности нуклеотидов 16S рРНК. Определение степени гомологии рибосомальных РНК выявило большую неоднородность среди бактерий. К архебактериям отнесены метанобразующие, аэробные сероокисляющие, анаэробные серовосстанавливающие, крайне галофильные бактерии и термоацидофильные микоплазмы. Они имеют ряд общих свойств: отсутствие мурамовой кислоты в клеточной стенке; наличие специфических липидов в составе

мембран; наличие особых кофакторов, отсутствующих у других организмов; специфические транспортные и рибосомальные РНК, необычные высокоспециализированные экологические ниши.

Архебактерии имеют прокариотический тип клеточной организации, но клетки состоят из макромолекул (липидов, полисахаридов, белков), многие из которых являются уникальными и не синтезируются другими микро- и макроорганизмами. Полагают, что архебактерии являются одной из самых древних форм жизни и составляют самостоятельную эволюционную линию прокариот.

Морфология клеток архебактерий беднее, чем эубактерий. Среди них нет мицелиальных, стебельковых и трихомных форм. Преобладают шаровидные и цилиндрические клетки, а также необычные плоские клетки, имеющие вид пластинок и коробочек разнообразной геометрической формы, сходные с кусочками битого стекла. Такие формы присущи только архебактериям.

По строению клетки архебактерии существенно не отличаются от грамположительных эубактерий. Нуклеоид представлен молекулой ДНК, расположенной непосредственно в цитоплазме. Поверхность клетки покрыта клеточной стенкой, под которой находится ЦПМ. Многие виды архебактерий имеют жгутики и фимбрии бактериального типа, у некоторых обнаружены газовые вакуоли и запасное вещество - гликоген. Принципиальные отличия архебактерий от эубактерий заключаются в биохимическом составе клеточных структур и макромолекул, в механизме некоторых молекулярных процессов. Одним из них является отсутствие муреина. В состав клеточной стенки архебактерий входят кислые полисахариды, белки или псевдомуреин, который в отличие от муреина не содержит мурамовой кислоты и в пептидных мостиках отсутствуют Д-аминокислоты. Вместо мурамовой кислоты в состав псевдомуреина входит талозоминуроновая кислота. Мембранные липиды архебактерий не содержат глицериновых эфиров жирных кислот, а состоят из особых дифитанильных и дибифитанильных глицериновых эфиров (простые эфиры глицерина и фитола). У некоторых видов архебактерий липиды представлены дибифитанил-глицерольными тетраэфирами, образующими однослойную липидную мембрану, в то время как во

всех биологических мембранах липиды располагаются в виде бимолекулярного слоя. Полагают, что монослойные липидные мембраны обладают повышенной жесткостью. Это обеспечивает прочное крепление жгутиков и их функционирование у ацидофильных термоплазм, лишенных клеточной стенки.

Архебактерии отличаются от других организмов по нуклеотидному составу и первичной структуре рибосомальных и транспортных РНК. Коэффициент сходства (S_{AB}), характеризующий подобие сравниваемых организмов (по гомологии рРНК) показал, что архебактерии очень сильно отличаются по составу и последовательности нуклеотидов рибосомальных РНК от всех других бактерий. Так, для близкородственных эубактерий S_{AB} равен 1,0; для очень далеких организмов (разных классов) - 0,2; для архебактерий и эубактерий S_{AB} равен 0,1. Таким образом, по показателю S_{AB} архебактерии в одинаковой мере далеки как от эубактерий, так и от эукариот. Существенные отличия имеются и в организации генетического аппарата архебактерий. Прежде всего это малый размер генома. Так, для Methanobacterium thermoautotrophicum он равен $1,1 \times 10^9$, для Thermoplasma acidophila $0,8 \times 10^9$, что составляет меньше 0,5 генома E. coli. Только у галобактерий геном имеет большие размеры - $2,5 \times 10^9$. Вторая особенность генома архебактерий - наличие в нем многократно повторяющихся нуклеотидных последовательностей, что характерно для хромосомной ДНК эукариот. Третья особенность - наличие в генах, кодирующих тРНК, интронов (вставочных последовательностей), которые также содержатся только в генетическом аппарате эукариот. Архебактерии имеют более сложную структуру аппаратов трансляции и транскрипции. Фермент ДНК-зависимая иРНК-полимераза, осуществляющий процесс транскрипции у архебактерий, состоит из 9-12 субъединиц, у эубактерий - из 4-8 субъединиц. РНК-полимеразы архебактерий подобно таковым эукариот не ингибируются рифампицином, стрептолидигином и α-аманитином, активность их стимулируется силибином.

Структурное и функциональное сходство РНК-полимераз архебактерий и эукариот дает основание предположить, что данные ферменты эукариот, возможно, имеют архебактериальное

происхождение, или архебактерии и эукариоты эволюционировали от общего предка.

Рибосомы архебактерий содержат больше белка, чем рибосомы эубактерий, причем белки характеризуются большей кислотностью по сравнению с белками рибосом эубактерий.

Некоторые архебактерии, в частности метанобразующие, синтезируют специфические кофакторы, не встречающиеся у других существ, например, кофермент М (2-меркаптоэтанол-сульфоновая кислота), хромофорные факторы - F_{430} (никельсодержащий тетрапиррол) и F_{342} (структура пока не изучена).

Архебактериям присущи уникальные физиологические свойства. Так, галобактерии обладают уникальным механизмом фотосинтеза, способны к аэробному и анаэробному дыханию. Архебактерии родов Sulfolobus и Thermoplasma способны развиваться как за счет аэробного дыхания, так и брожения. Однако, наиболее распространенной формой энергетического метаболизма архебактерий является анаэробное дыхание, при котором акцептором электронов являются преимущественно сера и одноуглеродные соединения, реже нитраты и другие вещества.

Особенностью конструктивного метаболизма архебактерий является отсутствие цикла Кальвина. Основным путем автотрофной фиксации углекислого газа является восстановительный путь карбоновых кислот в различных его модификациях, присущий к некоторым эубактериям (Chlorobium limicola и др.).

Архебактерии неспособны использовать сложные высокомолекулярные соединения. Среди них не обнаружено продуцентов активных гидролитических ферментов, что, возможно, является одной из причин отсутствия патогенных и паразитических форм.

8.4.1. Таксономические группы архебактерий

К классу Archaebacteria относится пять таксономических и физиологических групп, включающих значительное количество родов и видов архебактерий (табл.11).

Таблица 11

Группы архебактерий

Группа	Род	Год описания	Физиологические особенности
Метанообразующие	Methanobacterium Methanococcus Methanosarcina Methanospirillum Methanogenium Methanomicrobium Methanobrevibacter Methanoplasma Methanolobus Methanothermus Methanococcoides	1936 - « - - « - 1976 1979 - « - - « - 1981 1982 - « - 1983	Образуют метан из H_2 + CO_2; ацетат, формиат, метанол. Строгие анаэробы. Автотрофы и гетеротрофы. Мезо- и термофилы. Нейтрофилы (pH 6,0-7,0). Имеются галофилы.
Аэробные сероокисляющие	Sulfolobus	1972	Окисляют серу в качестве источника энергии. Факультативные автотрофы. Аэробы. Термофилы, оптимальная t 70-80^0 C. Ацидофилы (pH 3,0).
Анаэробные серовосстанавливающие	Thermoproteus Desulfurococcus Thermophilum Thermococcus Thermodiscus Pyrodiction	1981 - « - 1982 1983 - « - - « -	Восстанавливают серу до H_2. Строгие анаэробы. Автотрофы, гетеротрофы. Экстремальные термофилы (85 - 105^0 C). Ацидофилы и нейтрофилы.
Галобактерии	Halococcus Halobacterium «Квадратная бактерия» Haloarcula	1935 1957 1980 1983	Экстремальные галофилы, факультативные фототрофы. Аэробы и факультативные анаэробы.
Термоацидофильные микоплазмы	Thermoplasma	1970	Гетеротрофы. Термофилы (60^0 C). Ацидофилы (pH 1-2). Аэробы.

Метанобразующие бактерии. Самая многочисленная группа архебактерий. Морфология клеток разнообразная: короткие и длинные палочки, спириллы, кокки и сарцины. Строение клетки типично для архебактерий. Облигатные анаэробы, спор не образуют. Бактерии большинства видов неподвижны, подвижные формы имеют полярные жгутики.

Метанобразующие архебактерии - высокоспециализированная физиологическая группа, которая не потребляет углеводы, белки или другие сложные органические вещества. Источником энергии служат процессы окисления молекулярного водорода, окиси углерода, метанола, муравьиной и уксусной кислот, акцептором электронов является углекислота, которая восстанавливается до метана. Последний является основным продуктом метаболизма всех метанобразующих бактерий. Одни из них (Methanobacterium) образуют метан при окислении водорода, формиата, другие (Methanosarcina) - путем сбраживания ацетата, метанола. В природных средах метанобразующие бактерии развиваются в ассоциации с другими микроорганизмами, выполняя функцию конечного звена в трофической цепи - превращают продукты брожения этих микроорганизмов в метан. Основные места обитания: торфяные болота, ил на дне водоемов, очистные сооружения сточных вод, пищеварительный тракт животных.

Аэробные сероокисляющие бактерии. Группа немногочисленная, представлена одним родом Sulfolobus, состоящим из трех видов: S. acidocaldarius, S. brierley, S. solfataricus. Клетки имеют сферическую, дольчатую или лопастную формы размером 0,8-2,0 мкм. Грамотрицательны, неподвижны и не образуют спор. На поверхности клетки имеются пилеобразные отростки, обеспечивающие прикрепление бактерий к кристаллам серы или другим твердым субстратам. При развитии на среде с серой клетки Sulfolobus бывают в свободном состоянии одиночные и в виде гроздевидных скоплений, а также прикрепленные к частицам серы в виде обрастаний, активно растворяющих эти частицы и окисляющие серу до H_2SO_4. Структура клетки архебактерий рода Sulfolobus в основном сходна с таковой других архебактерий. Различия касаются биохимического состава липидов и рибосомных белков. В клетках Sulfolobus и Thermoplasma

обнаружены разветвленные алкилбензолы. У существующих организмов такой тип соединений найден впервые. Ранее алкилбензолы были известны только как составные компоненты сырой нефти, сланцев и других осадочных пород. Это дает основание предполагать, что изопреноидные соединения алкилбензолы, являющиеся важной составной частью нефти, сланцев и др., были синтезированы архебактериями и близкими к ним организмами, процветавшими в архейскую эру.

Рибосомы клеток Sulfolobus аналогично рибосомам других архебактерий диссоциируют на 30S и 50S субъединицы и содержат 23S, 16S и 5S рРНК. Общее количество белков в рибосоме 61-64 типа. Среди них преобладают белки с основными свойствами в отличие от метаногенных и галофильных архебактерий, в рибосомах которых содержится больше кислых белков.

Бактерии рода Sulfolobus - экстремальные термофилы. Верхний температурный предел их жизнедеятельности достигает 90^0 С, температурный оптимум - 70-87^0 С, минимум - 50-60^0 С. Температура роста находится в прямой зависимости от кислотности среды. Наиболее высокие температурные оптимумы характерны для высоких значений pH (3,0-4,5), при понижении pH до 1,5-2,0 оптимум температуры роста понижается до 70^0 С. Все виды Sulfolobus являются экстремальными ацидофилами, способными расти при pH 1,0-5,9. При повышении pH до 7,0 клетки отдельных видов (S. brierley) лизируются.

В отношении кислорода все виды Sulfolobus являются аэробами. Однако, в условиях дефицита кислорода могут существовать как факультативные анаэробы, используя в качестве акцептора электронов окисное железо. Окисление серы бактериями S. acidocaldarius и S. brierley может осуществляться в анаэробных условиях также в присутствии молибдената натрия, который является акцептором электронов.

Все известные виды Sulfolobus являются факультативными автотрофами. В минеральной среде они развиваются как хемолитотрофы, используя углекислый газ в качестве источника углерода, а минеральную серу или сульфиды в качестве источников энергии. В то же время разные виды Sulfolobus в качестве источников энергии и углерода могут использовать широкий спектр

органических субстратов. Лучшими из них являются дрожжевой экстракт, пептон, гидролизат казеина, а также сахара: глюкоза, сахароза, рибоза при концентрации 0,1-0,2 %.

Архебактерии рода Sulfolobus являются аборигенами высокотермальных кислых источников вулканического происхождения. В практическом плане в настоящее время привлекает внимание S. brierley, способный выщелачивать металлы при высоких температурах из таких трудноокисляемых сульфидов, как пирит (FeS_2), халькопирит ($CuFeS_2$) и молибденит (MoS_2). При температуре 60^0 С S. brierley может извлекать из молибденитового концентрата до 6,6 мг молибдена на 1 л раствора в день. Эти бактерии могут быть использованы также для удаления серных компонентов из каменного угля.

Анаэробные серовосстанавливающие бактерии. Открытые в начале 80-х г. XX в. анаэробные серовосстанавливающие бактерии составляют довольно многочисленную группу архебактерий, представленную 6 родами, которые объединены в новый порядок Thermoproteales.

Наряду с палочковидными и сферическими клетками в составе данной группы имеются клетки с нарушенной симметрией. Они содержат выросты разной формы и длины (род Pyrodiction). По структуре клетки не отличаются от других архебактерий. Все известные виды являются облигатными анаэробами и экстремальными термофилами. Например, выделенный из придонных морских горячих источников Pyrodiction occultum активно развивается в средах при температуре выше 100^0 С, оптимальной является температура 105^0 С, при 80^0 С рост данной бактерии прекращается.

Основной формой энергетического метаболизма является анаэробное дыхание. Донором электронов для большинства представителей родов Thermoproteus, Thermodiscus, Pyrodiction является водород, акцептором - элементарная сера, которая при этом восстанавливается до сероводорода. Архебактерии родов Desulfurococcus и Thermococcus способны использовать в качестве доноров электроны и энергию белка.

Основным местообитанием серовосстанавливающих архебактерий являются гидротермальные источники, в которых они вызывают активное восстановление серы.

Галобактерии. В состав группы входит 4 рода экстремально галофильных (солелюбивых) архебактерий (см. табл.11). Морфология клеток разных родов неодинакова. К роду Halococcus относятся грамотрицательные неподвижные кокки, к роду Halobacterium - подвижные палочки с полярно расположенными жгутиками. Бактерии рода Haloarcula и «квадратная бактерия» (род не определен, так как в чистой культуре бактерии не выделены) имеет форму плоских квадратных пластинок и коробочковидных клеток. Для них характерна типичная архебактериальная структура клетки со всеми ее особенностями.

Галобактерии обладают уникальным механизмом фотосинтеза, способны к аэробному дыханию, а некоторые штаммы - к брожению и нитратному дыханию. Уникальность фотосинтеза галобактерий состоит в том, что он происходит без участия хлорофилла, - так называемый фотосинтез бесхлорофильного типа. Поглощение квантов света осуществляется пурпурным пигментом каротиноидной природы бактериородопсином. Это белок, ковалентно связанный с каротиноидом C_{20} - ретинолем. Пигмент содержится в ЦПМ. Под действием света происходит обесцвечивание бактериородопсина (сложное фотохимическое превращение), сопровождающееся высвобождением протонов. Между наружной и внутренней сторонами мембраны создается градиент концентрации протонов, который поддерживается весь период освещения. Это приводит к тому, что в освещенных клетках синтезируется АТФ без переноса электронов в транспортной цепи. К настоящему времени это пока единственный пример превращения световой энергии в энергию химических связей АТФ, без участия электрон-транспортной цепи.

Таким образом, благодаря наличию бактериородопсина галобактерии способны синтезировать АТФ с помощью механизма фотофосфорилирования, в котором не участвуют хлорофилл-содержащие реакционные центры, как это происходит у всех других фотосинтезирующих организмов.

Галофильные архебактерии характеризуются сложными пищевыми потребностями. В качестве источников энергии и углерода они предпочитают использовать аминокислоты. Обычно их культивируют в средах, содержащих пептон.

Галобактерии обитают в средах с высокой концентрацией хлористого натрия: соленые моря, озера, рассол. Минимальная концентрация хлористого натрия, при которой возможен их рост, составляет от 2 до 2,5 М, оптимальная - 4-5 М. Они могут расти также в насыщенном растворе хлористого натрия - 5,2 М. Кроме хлористого натрия для развития галобактерий необходимы ионы магния (0,1-0,5 М) и калия (0,025 М). Высокая концентрация соли обеспечивает структурную целостность и жесткость клетки, активность и стабильность ферментов и рибосом, которые функционируют эффективно только в растворах с почти насыщающими концентрациями (см. гл. 8).

Термоацидофильные микоплазмы. Группа представлена единственным родом и видом Thermoplasma acidophila. Первые представители термоплазм, выделенные в 1970 г. из саморазогревающейся массы скоплений каменного угля, были отнесены к микоплазмам на основании отсутствия клеточной стенки, плеоморфизма и культуральных свойств. Однако проведенное позже изучение структуры макромолекул ДНК, РНК, липидов показало их несоответствие с аналогичными макромолекулами других микоплазм и тождественность с таковыми архебактерий. В связи с этим, термоацидофильные микоплазмы отнесены к архебактериям в 1980 г.

Клетки термоплазм по форме варьируют от сферических (0,3-2,0 мкм) до нитевидных. В отличие от других архебактерий, термоплазмы не имеют клеточной стенки. Клетки окружены трехслойной мембраной, толщиной 10-12 нм, имеют жгутики, сходные с бактериальными. Термоплазмы характеризуются самым малым размером генома - $0,8 \times 10^9$ дальтон. Уникальной особенностью их является связь ядерной ДНК с гистоноподобными белками, что присуще только эукариотным организмам.

Термоплазмы - гетеротрофы со сложными пищевыми потребностями. Рост их происходит в жидких солевых средах, содержащих дрожжевой экстракт и глюкозу. Энергию получают как за

счет аэробного дыхания, так и за счет брожения. Облигатные термоацидофилы. Температурный оптимум культивирования соответствует 60^0 С, а оптимум pH лежит в пределах 1,0-2,0. Название термоплазм учитывает эти две особенности - Thermoplasma acidophila. Естественным местообитанием их служат саморазогревающиеся отходы каменного угля и кислые терминальные источники.

Глава 9

ВИРУСЫ

Вирусы известны науке с 1892 г. благодаря работам русского ученого Д. И. Ивановского по изучению мозаичной болезни табака. Им было установлено, что возбудителем этой болезни является мельчайший «микроб», проходящий через самые мелкопористые бактериальные фильтры и не способный расти на лабораторных питательных средах. Название «вирус» предложено голландским ученым М. Бейеринком, который подтвердил результаты опытов Д. И. Ивановского и считал, что причиной болезни табака является «жидкое заразное начало» - contagium vivum fluidum, или вирус (от лат. virus - яд). В последующие 20-25 лет были открыты вирусы ящура (1898), саркомы Рауса (1911), бактерий (1915-1917). Таким образом, к началу XX в. стали известны вирусы растений, животных и бактерий.

9.1. СВОЙСТВА И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ВИРУСОВ

Вирусы представляют собой биологически активные *структуры неклеточного строения,* занимающие промежуточное положение между живой и неживой природой. Одно из важных свойств вирусов, не позволяющее относить их к полноценным живым существам, - это *отсутствие самостоятельного обмена веществ* - важнейшего свойства живой материи. Вирусы в свободном состоянии представляют собой безжизненные, инертные частицы, отождествляемые с веществом (а не существом). Биологическая активность вирусов проявляется только в зараженных ими клетках. Вирусы - облигатные внутриклеточные паразиты. Но в отличие от паразитов клеточного строения (бактерии, грибы) вирусы паразитируют на генетическом уровне. Не имея собственного метаболизма, они внедряют в клетку хозяина свой генетический материал, который направляет метаболизм клетки на репродукцию вирусных частиц. Так как для репродукции вирусов нужны не только метаболиты клетки, но и функционирующая метаболическая система, вирусы не могут

размножаться вне клетки даже на самых сложных по составу питательных средах.

Как оказалось, отличием вирусов от клеточных организмов служит и наличие только одного типа нуклеиновых кислот - либо ДНК, либо РНК. Это тоже в значительной мере определяет неполноценность вируса как живого организма.

Вместе с тем вирусы обладают определенными свойствами, которые ставят их в один ряд с живыми существами. Вирусы состоят из структуры упорядоченных макромолекул белка и нуклеиновой кислоты, а отдельные из них (вирусы животных, фаги бактерий рода Pseudomonas) содержат липиды и углеводы. Вирусы подобно живым существам клеточной природы обладают способностью к изменчивости и передаче наследственных свойств потомству. Для них характерно явление саморепродукции, т. е. размножения, но этот процесс происходит только за счет энергетических ресурсов и обмена веществ клетки. Таким образом, вирусы представляют своеобразный мир специфических внутриклеточных паразитов. Лишенные собственной системы метаболизма, вирусы в процессе эволюции приспособились к подчинению и использованию метаболизма инфицированной клетки. По сравнению одного из крупнейших вирусологов Андре Львова, «вирус - это вирус», т. е. вирусы являются единственными в своем роде «существами», не похожими ни на растений, ни на животных, ни на клеточные микроорганизмы.

Вирусы следует рассматривать как неклеточную форму существования живой материи, обладающую собственным геномом и способностью к саморепродукции в клетках живых организмов. Структурные и функциональные отличия вирусов от всех известных микроорганизмов состоят в том, что: 1) вирусы не имеют клеточного строения; 2) лишены собственных систем метаболизма; 3) не способны к росту и размножению путем бинарного деления; 4) содержат только один тип нуклеиновой кислоты; 5) для синтеза собственных компонентов используют энергетические и белоксинтезирующие системы клетки-хозяина.

Вирусам присущи две качественно разные формы существования - внеклеточная и внутриклеточная. Внеклеточная форма представлена в виде покоящейся инфекционной частицы -

вириона; внутриклеточная может быть в виде реплицирующейся молекулы нуклеиновой кислоты, или нуклеиновой кислоты, включенной в геном клетки-хозяина и образующей комплекс «вирус-клетка».

Происхождение вирусов неизвестно, хотя вопрос этот имеет большое значение для решения многих актуальных задач современной биологии: происхождение жизни, установление возможных форм живых существ неклеточной структуры и происхождение клеточных организмов, развитие и изменчивость микроорганизмов и др. До настоящего времени о происхождении вирусов существуют лишь гипотезы.

Наиболее распространенными являются гипотезы экзогенного и эндогенного происхождения вирусов по отношению к клетке-хозяину. Согласно *экзогенной гипотезе,* вирусы произошли от древнейших доклеточных форм и в процессе эволюции приспособились к паразитированию в первичных одноклеточных организмах, а в дальнейшем эволюционировали вместе со своим хозяином. Если это действительно так, то следует считать, что первыми появились вирусы бактерий, затем вирусы многоклеточных организмов - растений и животных.

Сторонники *эндогенной гипотезы* считают, что вирусы произошли из генетического материала клеток-хозяев. Это выщепившиеся самостоятельные гены, которые, проникнув в клетку хозяина, направляют ее биосинтетическую деятельность на свое собственное воспроизведение. Основанием для такого предположения служит принципиальное сходство вирусов с некоторыми генетическими элементами клетки, в частности, с *F*-фактором. С. Лурия и Дж. Дарнелл (1970) считают, что вирус есть не что иное, как часть клетки, т. е. ее компоненты, обладающие достаточной степенью независимости для того, чтобы передаваться от клетки к клетке. Не исключено также, что вирусы - это регрессивные формы патогенных бактерий, у которых в результате паразитизма предельно упростился химический состав и ферментативный аппарат. Вполне допустимо, что РНК- и ДНК-содержащие вирусы имеют разное происхождение.

Вирусы широко распространены в природе и причиняют огромный вред человечеству. Паразитируя в клетках живых

организмов, они вызывают различные заболевания. Вирусы являются возбудителями гриппа, оспы, кори, полиомиелита и других заболеваний у человека; ящура у коров и коз; орнитоза у птиц, а также служат причиной образования некоторых злокачественных опухолей. Весьма многочисленны вирусы заболеваний растений. Это различные мозаики, полосатости и курчавости листьев, некрозы и пятнистости, желтухи и самые разнообразные поражения цветов, плодов и фруктов. В настоящее время известно более ста заболеваний человека, имеющих вирусную природу, а количество вирусных заболеваний растений и животных значительно больше. Вирусами поражаются и микроорганизмы.

9.1.1. Морфология и размеры вирусов

Форма и размеры вирусов весьма разнообразны (рис. 9.1). Различают сферическую, цилиндрическую, нитевидную, икосаэдрическую, булавовидную и другие формы. Сферическая форма характерна для вируса гриппа, герпеса, саркомы Рауса, цилиндрическая - для большинства вирусов растений. Например,

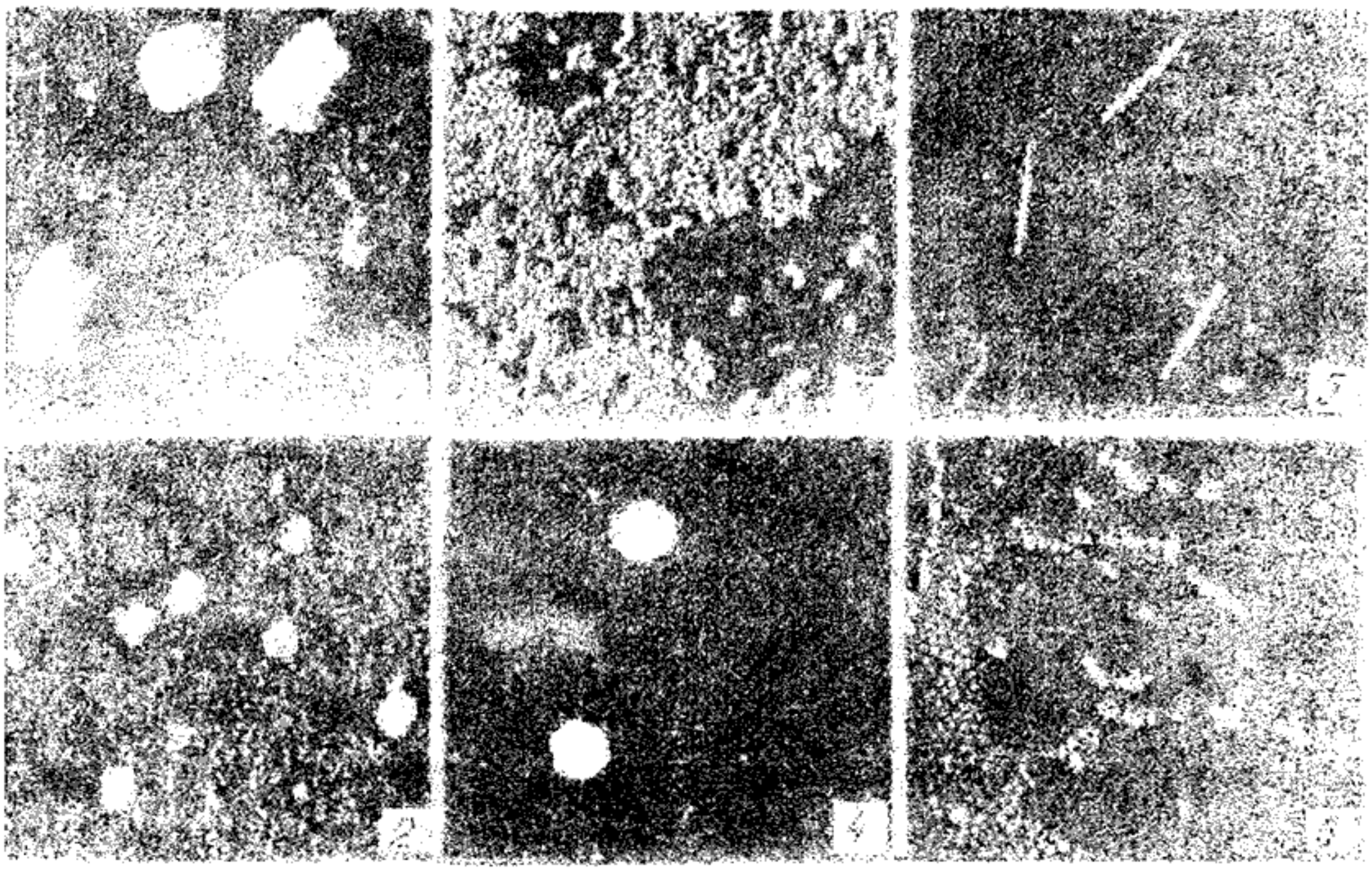


Рис. 9.1. Морфология вирусов животных и растений: *1 - вирус осповакцины; 2 - гриппа; 3 - вирус полиомиелита; 4 - радужный вирус долгоножки; 5 - вирус табачной мозаики; 6 - вирус карликовой кустистости*

вирус табачной мозаики (ВТМ) имеет форму прямого цилиндра длиной до 250 нм, шириной 20 нм. Нитевидная форма свойственна некоторым вирусам растений и бактерий, булавовидная - в основном вирусам бактерий. Форма определяется типом симметрии.

По размерам различают крупные, средние и мелкие вирусы. Некоторые из них, например вирус осповакцины, по величине приближается к бактериям - 250-300 нм. К крупным вирусам относится вирус бешенства - до 150 нм. Самые мелкие - вирус ящура, полиомиелита, желтой мозаики турнепса - не превышают 10-30 нм. К вирусам средних размеров относятся: вирус гриппа (80-120 нм), саркомы кур (70 нм), Т-четные фаги кишечной палочки (75-150 нм).

9.1.2. Строение и химический состав вирусов

Зрелая частица вирусов носит название вирион. У просто организованных вирусов вирион включает два компонента: нуклеиновую кислоту и белок. Нуклеиновая кислота составляет внутреннее содержимое вириона, а белок образует наружную оболочку - капсид (от греч. capsa - футляр). Вирионы сложно организованных вирусов на поверхности капсида имеют дополнительную внешнюю оболочку - суперкапсид липопротеидной природы.

Капсид вирионов состоит из белковых субъединиц - капсомеров. Число их в капсидах различных вирусов неодинаковое, но постоянное для вирусов одной и той же группы. Оно определяется общим количеством белковых субъединиц, входящих в состав капсида, и характером капсомеров. Например, при наличии в капсиде 60 белковых субъединиц, где каждый капсомер состоит из 4 субъединиц, т. е. тетрамеров, число капсомеров будет равно 15 (60 : 4). Сложные изометрические капсиды (капсиды, имеющие форму многогранника, например, икосаэдра) как правило образованы капсомерами двух типов - пентамерами, расположенными в вершинах икосаэдра, и гексамерами, заполняющими его треугольные грани. Так, капсид аденовирусов имеет 252 капсомера, из которых 12 пентамеров и 240 гексамеров. Размер капсида определяет размер вириона. Например, капсид вируса полиомиелита

имеет 60 капсомеров, вируса герпеса - 162 капсомера, вируса табачной мозаики - около 2000 капсомеров.

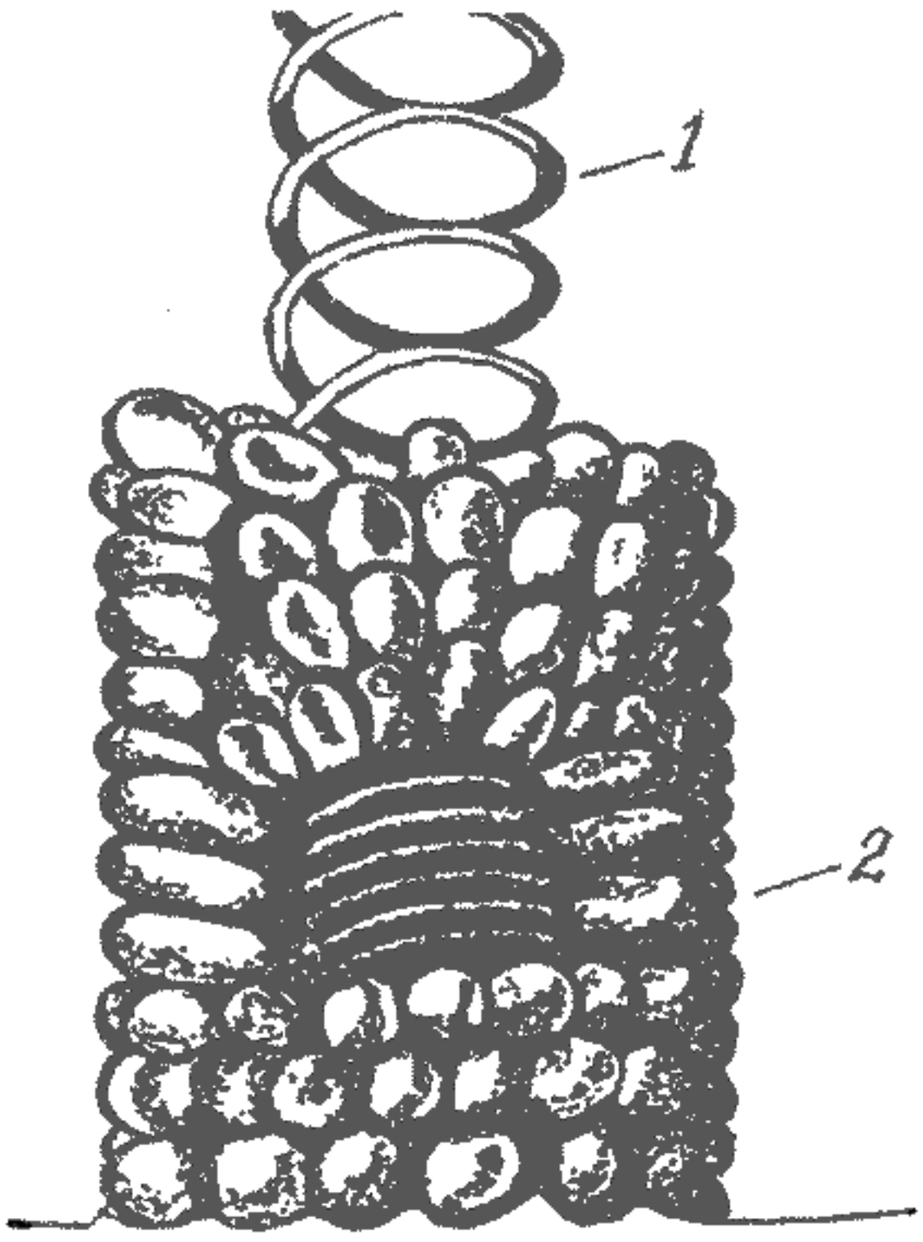


Рис.9.2. Модель структуры вируса табачной мозаики: *1 - РНК; 2 - белковые субъединицы*

Вирионы большинства вирусов характеризуются симметричной укладкой капсомеров в капсиде. Особенность укладки капсомеров определяет тип симметрии. Он может быть спиральный, кубический или смешанный. При спиральном типе капсомеры располагаются в виде спирали вокруг винтообразно уложенной нуклеиновой кислоты (рис. 9.2). Такой тип симметрии имеют цилиндрические и нитевидные вирусы. При кубическом типе симметрии капсомеры располагаются по граням капсида и приобретают форму икосаэдра (двадцатигранника). Этот тип симметрии имеют вирусы полиомиелита, ящура, некроза табака. Смешанный тип симметрии характерен для сложных вирусов: гриппа, кори, некоторых фагов.

Капсид вирионов выполняет защитную функцию - предохраняет нуклеиновую кислоту вируса от действия нуклеаз и физических факторов, а также определяет хемосорбцию вируса на поверхность клетки хозяина. Эту функцию он выполняет благодаря наличию в его составе рецепторов, комплементарных рецепторам заражаемой клетки.

Химический состав вирусов несложный. Большинство из них включают только нуклеиновую кислоту и белок. Как уже отмечалось, вирусы содержат лишь один тип нуклеиновой кислоты - ДНК или РНК. И тот и другой тип является носителем наследственной информации, выполняя таким образом функции генома. Вирусы отличаются от клеточных организмов наличием уникальных форм нуклеиновых кислот - двуспиральной РНК (вирусы некоторых опухолей растений) и односпиральной ДНК

(мелкие и нитчатые фаги). Нуклеиновым кислотам вирусов присущ ряд специфических особенностей. Молекулы их могут быть линейными и кольцевыми, непрерывными и фрагментированными (рис. 9.3, 9.4). Так, вирионы всех РНК-содержащих вирусов и большинства ДНК-содержащих обладают линейными молекулами нуклеиновой кислоты. Кольцевую форму ДНК имеют вирусы папилломы, полиомы фаг ∅X174. У данного фага молекула ДНК линейна, но после проникновения в клетку она замыкается в кольцо. Это обусловлено наличием «липких» (комплементарных) одноцепочечных концов, которые воссоединяются, и ДНК замыкается в кольцо. Образование кольца предшествует интеграции ДНК фага в геном клетки.

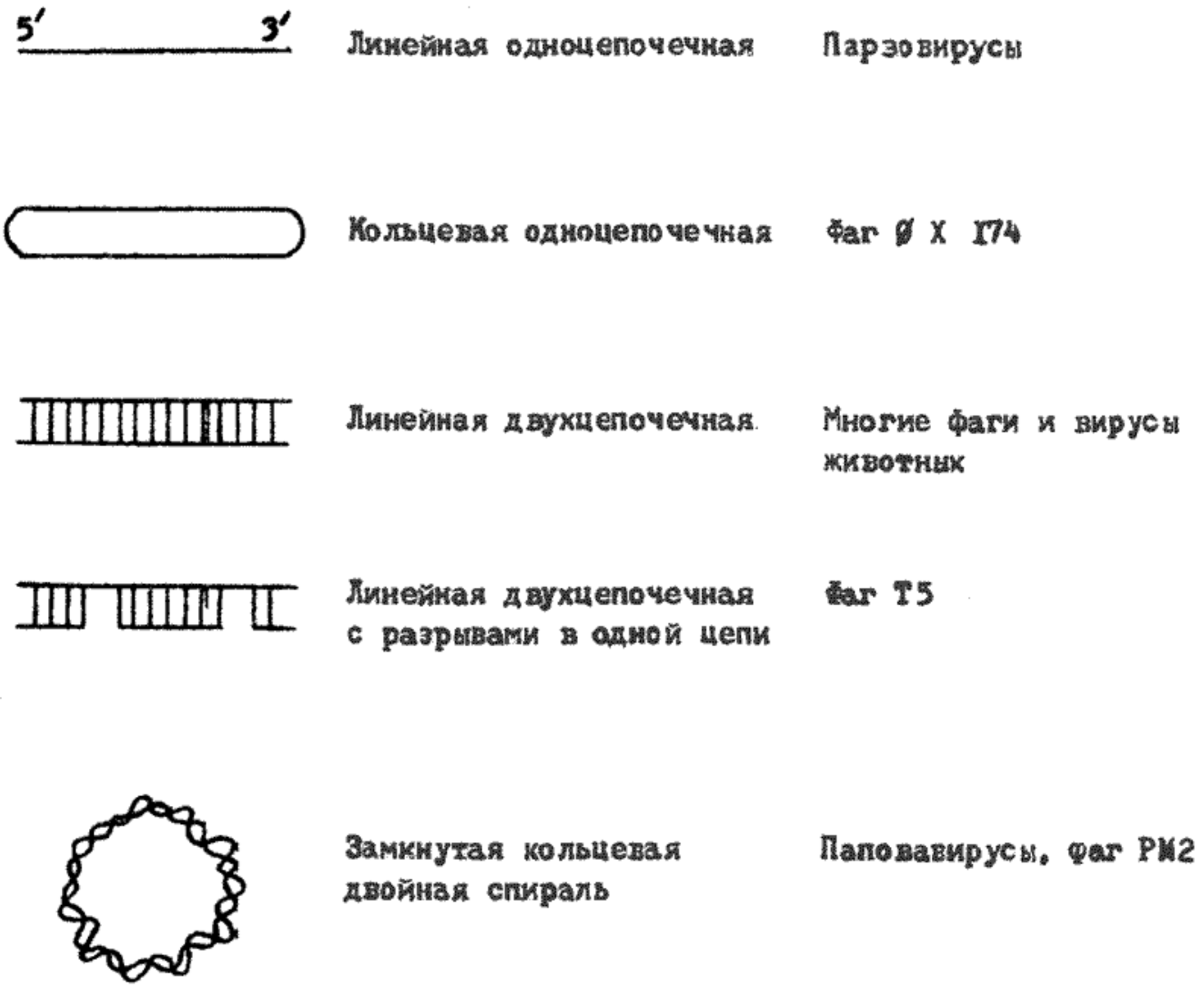


Рис. 9.3. Различные формы молекул вирусной ДНК



Рис. 9.4. Различные формы молекул вирусной РНК

ДНК ряда вирусов (фаг PM2, вирус мозаики цветной капусты) способна к суперспирализации, что обеспечивает упаковку значительного количества ДНК в капсид небольшого объема.

ДНК вирусов характеризуется большим разнообразием концевых участков (рис.9.5). Это различные типы избыточной последовательности нуклеотидов, концевые повторы (повторение в конце молекулы нуклеотидов ее начального фрагмента) прямых и инвертированных (перевернутых в обратном направлении). Различия в повторяющихся последовательностях нуклеотидов на концах молекул ДНК играют определенную роль в инициации транскрипции и репликации ДНК.

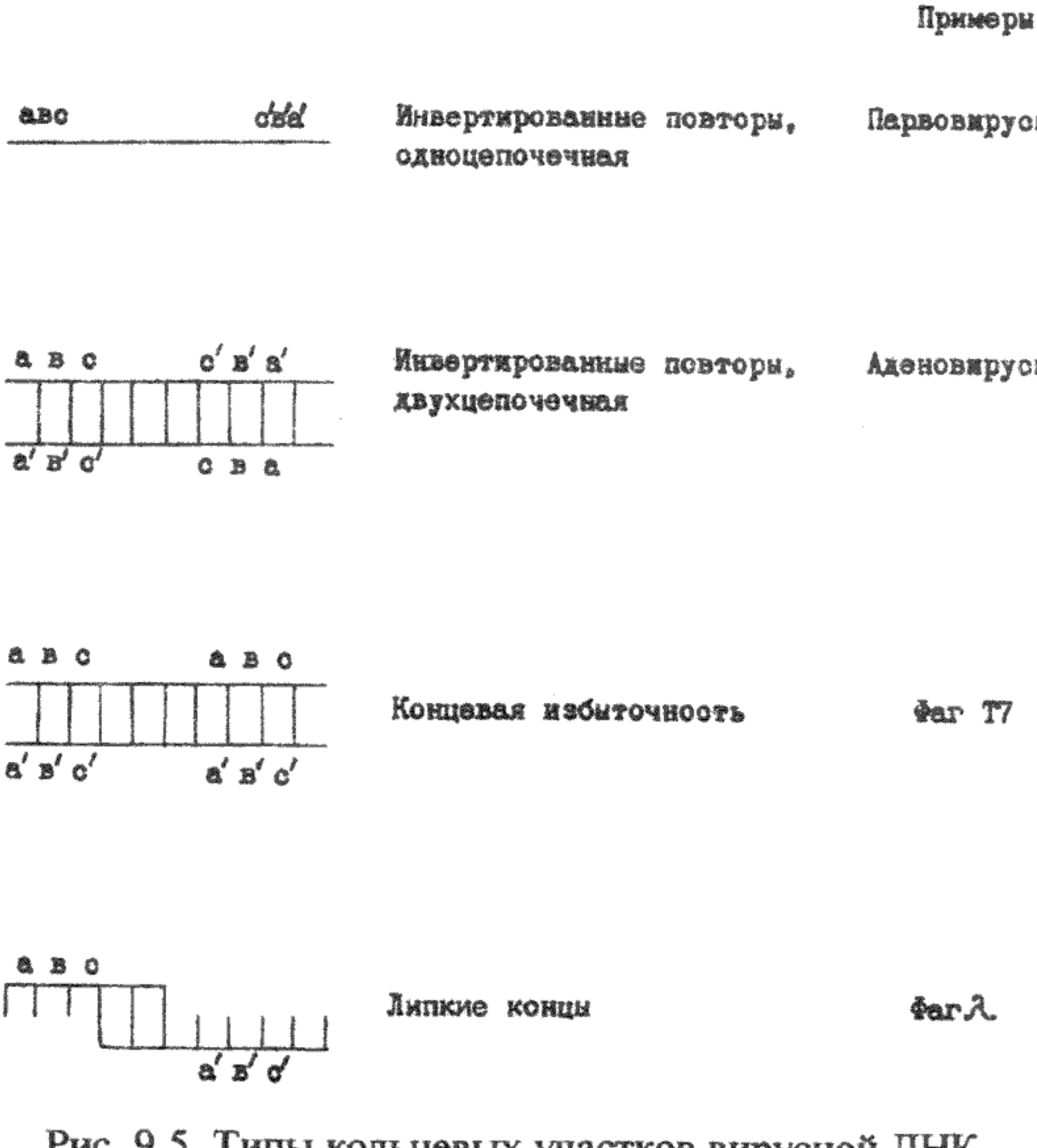


Рис. 9.5. Типы кольцевых участков вирусной ДНК

ДНК вирусов, в частности бактериофагов, содержит заметные количества нетипичных оснований. Например, ДНК Т-четных фагов вместо цитозина содержит 5'- оксиметилцитозин, часто гликозилирован. Присоединение остатка глюкозы к гидрокси-

метилцитозину препятствует разрушению ДНК фага ферментами клетки хозяина. Метилирование фаговой ДНК также защищает ее от действия бактериальных рестриктаз, которые расщепляют чужеродную ДНК. Существуют большие различия в размерах вирусных ДНК. Так, молекулярная масса ДНК фага кодирует только 9 белков. У Т-четных фагов, вирусов осповакцины и герпеса масса ДНК до $2{,}5 \cdot 10^8$ дальтон. Она может кодировать более 100 белков (у фага T_4 уже идентифицировано более 100 генов).

У некоторых РНК-содержащих вирусов выявлены сегментированные одноцепочечные и двухцепочечные молекулы РНК (см. рис. 9.4). Причем, у одних вирусов все фрагменты РНК находятся в одной частице (некоторые реовирусы, миксовирусы, ретровирусы), у других - в разных частицах. Такие вирусы, нуклеиновая кислота которых «распределена» по нескольким частицам, называются ковирусами (комплементарные многокомпонентные вирусы). Представителями являются вирус мозаики коровьего гороха, мозаики люцерны, погремковости табака и другие. Например, РНК вируса мозаики коровьего гороха состоит из двух фрагментов, каждый из них находится в разных частицах. По отдельности ни одна частица не обладает инфекционностью, так как из-за отсутствия полного генома не способна к репродукции. Информация, необходимая для образования полноценных вибрионов, распределена между молекулами РНК обеих частиц. Поэтому для репродукции вируса необходимо, чтобы в одну и ту же клетку попали обе частицы. У вируса мозаики огурца фрагменты РНК распределены в трех частицах, и для репродукции его необходимо наличие в клетке всех трех частиц.

Вирусы содержат неодинаковые в функциональном отношении геномные одноцепочечные РНК. Одни из них могут выполнять функцию информационной РНК и служить матрицей для трансляции. Такой тип РНК получил название «плюс»-цепь. Другой тип вирусных одноцепочечных РНК, так называемые «минус»-цепи, в трансляции непосредственного участия принимать не могут. Матрицей для трансляции у таких вирусов служит комплементарная «минус»-цепи информационная РНК.

Вирусы, содержащие «минус»-цепи, при инфицировании клетки привносят в нее фермент РНК – зависимую РНК-полиме-

разу, который в клетке отсутствует. Известны так называемые вирусы-сателлиты, которые отличаются крайне низким содержанием нуклеиновой кислоты, и репродукция их полностью зависит от других неродственных вирусов. Примером может служить вирус-сателлит полноценного вируса некроза табака. Это очень мелкий дефектный вирус, РНК которого содержит всего 1200 нуклеотидов, что достаточно только для кодирования белка капсида. Самостоятельно он не способен к репродукции. Размножение его происходит только в том случае, если в этой же клетке растения находится его «помощник» - вирус некроза табака. Последний индуцирует образование РНК-полимеразы и других компонентов, необходимых для репликации РНК вируса-сателлита.

В 1971-1973 гг. выявлены новые, еще более мелкие инфекционные агенты - возбудители болезней растений, названные вироидами. Это «голые», т. е. лишенные белковой оболочки, небольшие кольцевые молекулы одноцепочечной РНК с молекулярной массой 10^5 дальтон. Их «геном» содержит 300-400 нуклеотидов, что достаточно только для кодирования белка с молекулярной массой 10000. Однако несмотря на низкое содержание генетической информации, вироиды реплицируются в клетке самостоятельно (не нуждаются в помощниках). Репликация их происходит в ядре инфицированной клетки при помощи ее же активированных ферментов. Вироиды являются возбудителями болезней картофеля, огурцов, цитрусовых, кокосовых пальм и других растений.

Белки всех исследованных вирусов относятся к глобулинам и состоят из обычных L-аминокислот. Среди них преобладают кислые дикарбоновые аминокислоты. Особенностью вирусных белков является высокая устойчивость к действию протеолитических ферментов. Это обусловлено структурными особенностями свободных концевых амино- и карбоксильных групп в пептидных цепях. Большинство концевых аминогрупп ацетилировано, а карбоксильные находятся в замаскированном состоянии благодаря особому расположению пептидных цепей. Вирусные белки обладают высокой устойчивостью к действию физических и химических факторов. Различают две группы белков, синтез которых кодируется вирусным геномом: структурные белки - входят

в состав вирусной частицы, неструктурные белки - обслуживают процесс внутриклеточной репродукции вируса, но в состав вирусных частиц не входят. Структурные белки в свою очередь делятся на капсидные и суперкапсидные. К капсидным относятся белки, образующие капсид, а также геномные белки и ферменты, входящие в состав капсида. Геномные белки ковалентно связаны с концом вирусной нуклеиновой кислоты и участвуют в регуляции функций генома. Геномные белки выявлены в составе капсида аденовирусов и др.

У некоторых сложно устроенных вирусов в составе капсида имеются ферменты транскрипции и репликации нуклеиновых кислот – РНК- и ДНК-полимеразы, ферменты, модифицирующие концы иРНК.

Суперкапсидные белки являются гликопротеидами, располагаются в суперкапсиде, формируя «шипы» на поверхности вирусной частицы. Они выполняют функцию рецепторов, осуществляя распознавание адекватных клеточных рецепторов, необходимых для адсорбции вируса на клетке. Эти гликопротеиды получили название вирусных прикрепительных белков.

Второй функцией суперкапсидных гликопротеидов является участие в слиянии вирусной и клеточной мембран, в процессе, обеспечивающем проникновение вируса в клетку.

К неструктурным белкам относятся предшественники вирусных белков, которые отличаются от других белков нестабильностью в зараженной клетке в силу быстрого нарезания их на структурные белки. К этой же категории белков относятся ферменты синтеза нуклеиновых кислот – РНК- и ДНК-полимеразы, ферменты, модифицирующие вирусные белки, - протеиназы и протеинкиназы, белки-регуляторы. Типы структурных и неструктурных белков вирусов разной сложности организации показаны на рис. 9.6.

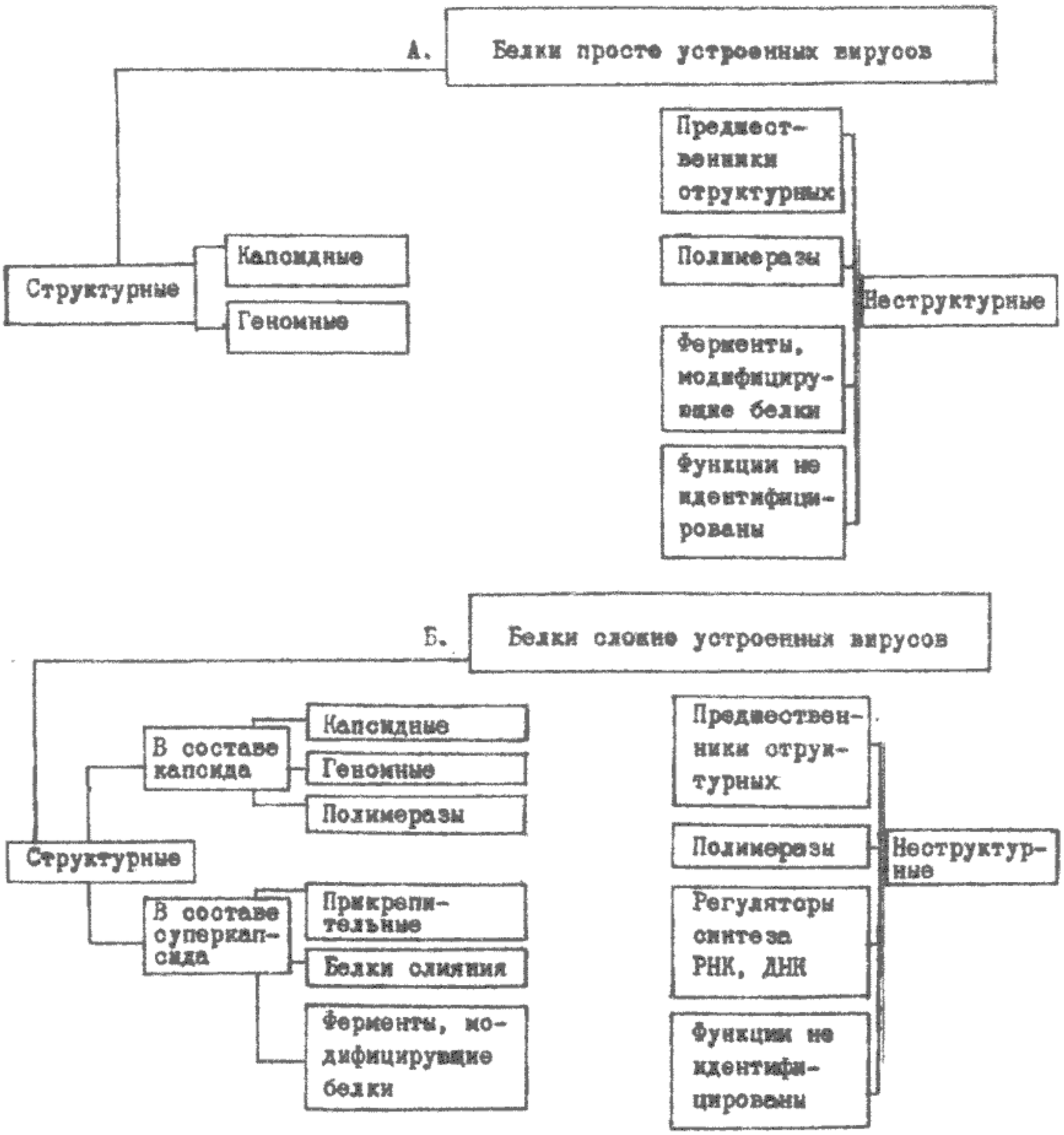


Рис. 9.6. Белки просто и сложно устроенных вирусов

Кроме белка и нуклеиновой кислоты сложно организованные вирусы содержат липиды и углеводы. Липиды входят в состав суперкапсида, формируя его липидный бислой, в который погружены суперкапсидные белки. Липиды происходят из мембран клеток-хозяев. Они стабилизируют структуру вирусной частицы. Обработка вирусной частицы липазами приводит к деградации и потере инфекционности.

Углеводы входят в состав гликопротеидов сложно организованных вирусов. Как и липиды, они имеют клеточное происхождение. Углеводный компонент гликопротеидов обеспечивает

сохранение конформации белковой молекулы, защищает ее от действия протеаз.

9.1.3. Формы взаимодействия вируса с клеткой

Взаимодействие вируса с клеткой может выражаться в двух формах: продуктивной и интегративной. Продуктивная форма взаимодействия проявляется в образовании вирусного потомства. При этом клетка может либо погибнуть, образовав большое количество вирусных частиц (литический цикл развития), либо продолжать расти, размножаться, продуцировать вирионы.

Интегративная форма взаимодействия выражается во включении генома вируса в геном клетки-хозяина. При этом вирусная нуклеиновая кислота может реплицироваться в составе клеточной ДНК без образования вирусного потомства. Это характерно для умеренных фагов, вызывающих лизогенизацию бактерий. Некоторые вирусы животных также способны к интеграции с геномом клеток-хозяев.

После внедрения вирусного генетического материала внутрь клетки вирионы перестают существовать как организованные структуры. Во взаимодействие с клеткой вступает вирусная нуклеиновая кислота. Инфекционность свободной нуклеиновой кислоты при этом снижается или исчезает полностью. Это явление (утрата инфекционности и, как результат, - скрытое состояние вируса) получило название эклипса, а период времени между адсорбцией вириона и появлением в клетке новых вирусов называется фазой эклипса. Процессы, происходящие в клетке, после внедрения в нее вирусной нуклеиновой кислоты, зависят от природы вируса и, в первую очередь, - от типа нуклеиновой кислоты. Если геном вируса представлен ДНК, то при продуктивной инфекции вирусная ДНК служит матрицей для собственной репликации и для синтеза вирусной РНК, которая необходима для образования вирус-специфических белков. Если же геном вируса состоит из РНК, то молекулы РНК выполняют двоякую матричную функцию: обеспечивают синтез новых копий вирусных РНК, кодируют синтез новых вирусных белков. В репликации вирусного генома могут совместно участвовать и клеточные, и вирусные ферменты. Набор

клеточных ферментов может пополняться за счет ферментов, привносимых вирионом (ретровирусы, вирус осповакцины) в клетку, или вновь синтезируемых под влиянием генов вириона.

В случае продуктивной инфекции, ведущей к образованию и освобождению новых вирусных частиц, вслед за репликацией нуклеиновой кислоты начинается синтез вирионных белков. В результате синтеза накапливается фонд предшественников, которые служат исходным материалом для образования капсидов. Далее следуют процесс самосборки вирусных частиц и освобождение их из клетки.

Основными механизмами освобождения вирионов из клетки является лизис клеток-хозяев, либо отпочковывание вирионов вместе с участками мембраны инфицированных клеток. Последний способ присущ вирусам, имеющим липопротеидную мембрану. Клетка при этом сохраняет жизнеспособность и может длительное время продуцировать вирусное потомство.

9.1.4. Принципы классификации вирусов

Классификация вирусов основана на свойствах вирионов, из которых ведущими являются признаки, характеризующие нуклеиновую кислоту, способ репродукции, антигенные свойства. В целях классификации используются следующие характеристики: 1) тип нуклеиновой кислоты, ее молекулярная масса, число нитей в ней; 2) способ репродукции, или стратегия вирусного генома; 3) особенности структурной организации генома - наличие внешней оболочки, симметрия капсида, размер капсида, и число капсомеров в нем; 4) круг восприимчивых хозяев; 5) патогенность и образование внутриклеточных включений; 6) антигенные свойства. На основании перечисленных признаков вирусы делятся на семейства, подсемейства, роды и типы.

Согласно существующей классификации вирусы объединены в самостоятельное царство Vira. По типу нуклеиновой кислоты, содержащейся в вирионе, вирусы подразделяют на ДНК- и РНК-содержащие. Дальнейшая классификация на семейства и роды исходит из совокупности перечисленных выше свойств вириона. Например, вирусы человека и животных по указанным критериям

распределены в 19 семейств, включающих 43 рода. В соответствии с кругом хозяев различают вирусы животных и человека, вирусы растений и вирусы бактерий.

9.2. БАКТЕРИОФАГИ

Вирусы бактерий носят название бактериофагов или просто фагов. Впервые явление бактериофагии в 1915 г. описал Туорт у стафилококков. Независимо от него, в 1917 г. Д'Эрелль сообщил об открытии литического агента в культуре дизентерийной палочки, выделенной от больных дизентерией людей при их выздоровлении. Он изучил биологические особенности этого агента, его взаимоотношение с бактериями и дал ему название бактериофаг, что означает «пожиратель бактерий».

Сразу после открытия бактериофагов и установления их высокой литической способности ученые занялись разработкой вопросов практического характера: использование бактериофагов для лечения и профилактики инфекционных заболеваний. Но терапевтический эффект применения бактериофагов не всегда был положительным, и с открытием антибиотиков интерес к ним как к лекарственным препаратам ослаб. Позже фаги заняли ведущее место в решении важных общебиологических проблем. Простота структурной организации фагов, высокий выход потомства в короткий промежуток времени, доступность работы с ними делают фаг весьма удобной моделью для изучения разнообразных вопросов молекулярной биологии. Они стали основным объектом генетических исследований, в первую очередь в области молекулярной генетики. На модели фага проведены классические исследования по изучению тонкой структуры гена, расшифровке наследственного кода, изучению механизма передачи наследственной информации, молекулярные основы мутационных процессов.

9.2.1. Структура бактериофагов

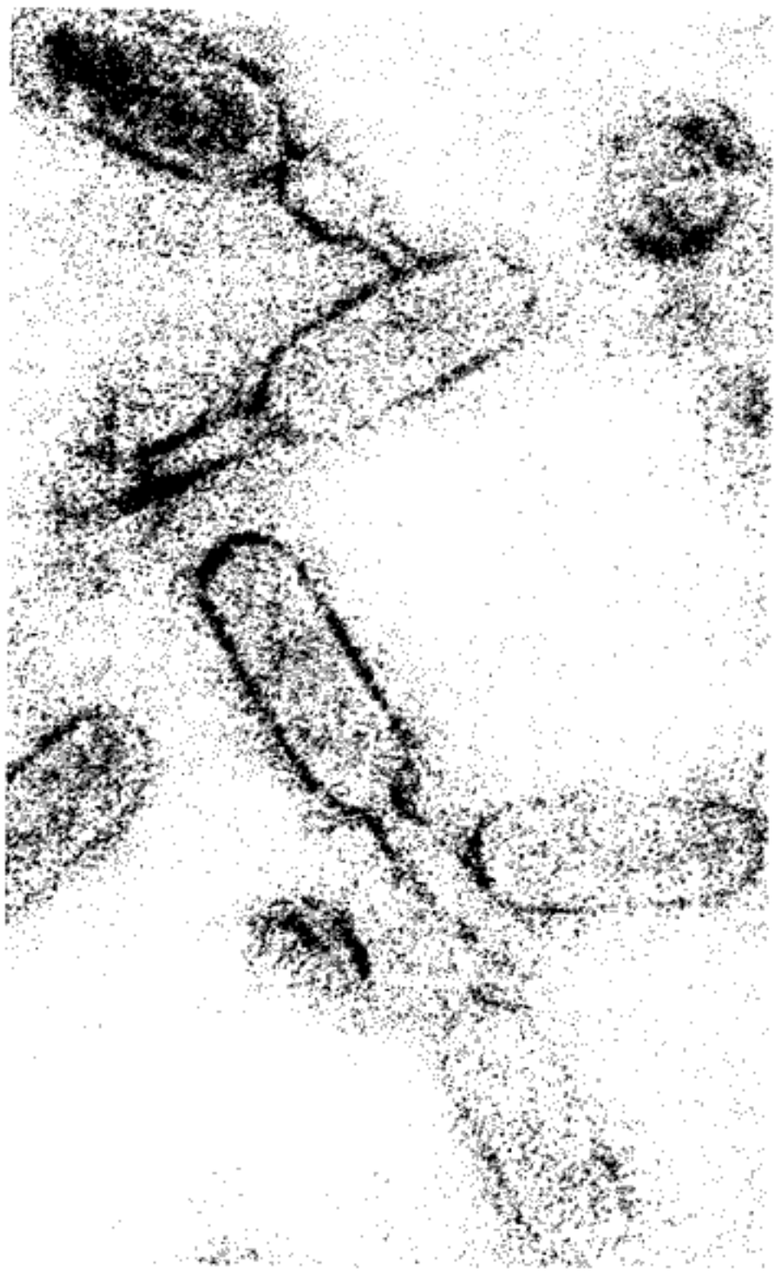


Рис.9.7. Морфология фагов с отростками

Изучение морфологии фагов началось с введения в практику биологических исследований электронного микроскопа. В 1941 г. Г. Руска впервые показал, что бактериофаги представляют собой частицы определенной формы (рис. 9.7). Дальнейшее изучение фагов позволило установить, что они более разнообразны по форме, чем вирусы животных и растений. Среди них есть фаги нитевидной формы с коротким и длинным отростками, с аналогами отростка и др. Размеры фагов от 20 до 200 нм.

Наиболее изученными являются фаги кишечной палочки, так называемые Т-фаги, которые разделяются на четные (T_2, T_4, T_6) и *нечетные* (T_1, T_3, T_5) фаги. Наиболее сложное строение наблюдается у Т-четных фагов. У них различают головку икосаэдрической формы и отросток (рис. 9.8). Отросток представляет собой сложную структуру, состоящую из наружного чехла, внутри которого проходит тонкая полая трубка - стержень. Чехол обладает способностью сокращаться. Отросток фага выполняет функцию канала, проводящего ДНК в бактериальную

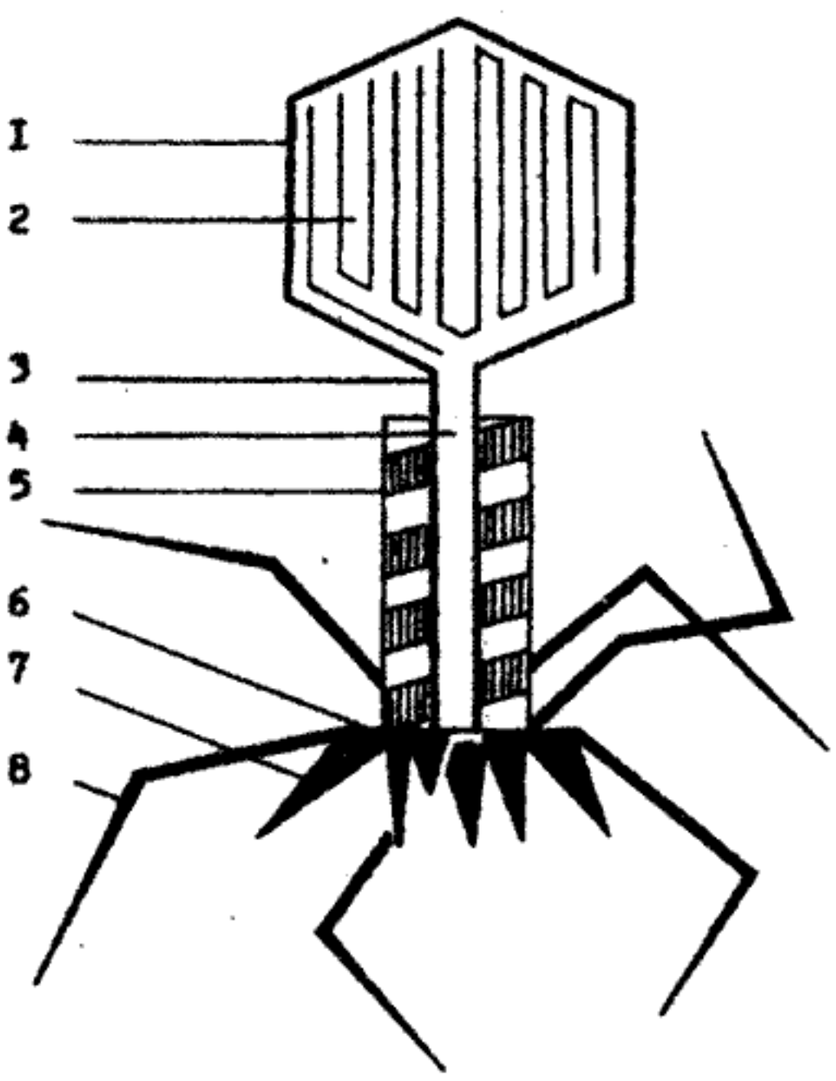


Рис. 9.8. Схема строения фага T_2: *1 - оболочка; 2 - нуклеиновая кислота; 3 - стержень; 4 - канал; 5 - чехол; 6 - базальная пластинка; 7 - шипы; 8 - нити*

клетку. Длина отростка фага T_2 около 110 нм. Отросток заканчивается базальной пластинкой, несущей выросты в виде шипов. От них отходят тонкие длинные нити. Базальная пластинка и нити участвуют в процессе адсорбции и прикрепления фага на бактериальной клетке.

Основными химическими компонентами фагов являются *белки и нуклеиновые кислоты.* Нуклеиновые кислоты составляют содержимое головки фага. Большинство фагов включает *двунитчатую* ДНК, но наряду с ними существуют фаги с *однонитчатой* ДНК. Это мелкие сферические и нитевидные фаги. Некоторые фаги содержат РНК (фаг 7S Ps. aeruginosa, MS2, R17 E. coli). Относительное содержание нуклеиновых кислот у фагов более высокое, чем в бактериальных клетках. Так, фаг кишечной палочки T_2 содержит 50-54 % ДНК, в то время как клетки этой бактерии - 5,2 %. Наиболее высокий процент нуклеиновой кислоты отмечается у фагов сложной структуры (30-50 %), у нитевидных фагов содержание ее значительно меньшее (11-14 %).

Фаги различаются между собой по химическому составу ДНК. Так, в ДНК некоторых фагов выявлено наличие нестандартных оснований. В ДНК Т-четных фагов вместо цитозина содержится 5-оксиметилцитозин. В ДНК фагов Xanthomonas oryrae содержится другое производное цитозина - 5-метилцитозин. В ДНК некоторых фагов Bac. subtilis тимин заменен 5-оксиметилурацилом.

Из белков состоит оболочка головки, чехол и стержень цилиндра, базальная пластинка, нити и шипы. Кроме этих структурных белков, в отростке фага обнаружены ферментные белки. В настоящее время доказано наличие в фаговых частицах *фермента лизоцима и АТФ-азы.* Различают структурный и свободный фаговый лизоцим. Структурный лизоцим отличается от свободного большим молекулярным весом и функционально. Структурный лизоцим проявляет свою активность в начале фаговой инфекции - растворяет снаружи клеточную стенку бактерий, на которой адсорбировался фаг. Свободный лизоцим лизирует клетку изнутри и способствует освобождению зрелых фаговых частиц, т. е. завершает процесс фаговой инфекции.

АТФ-аза содержится в чехле фагового отростка и обеспечивает его сокращение.

9.2.2. Взаимодействие фага с бактериями

Взаимодействие вируса с клеткой, приводящее к образованию самостоятельного биологического комплекса вирус - клетка и к размножению вируса, - сложный процесс, состоящий из ряда последовательных этапов: адсорбции, внедрения, размножения, или репродукции, созревания и освобождения (рис. 9.9).

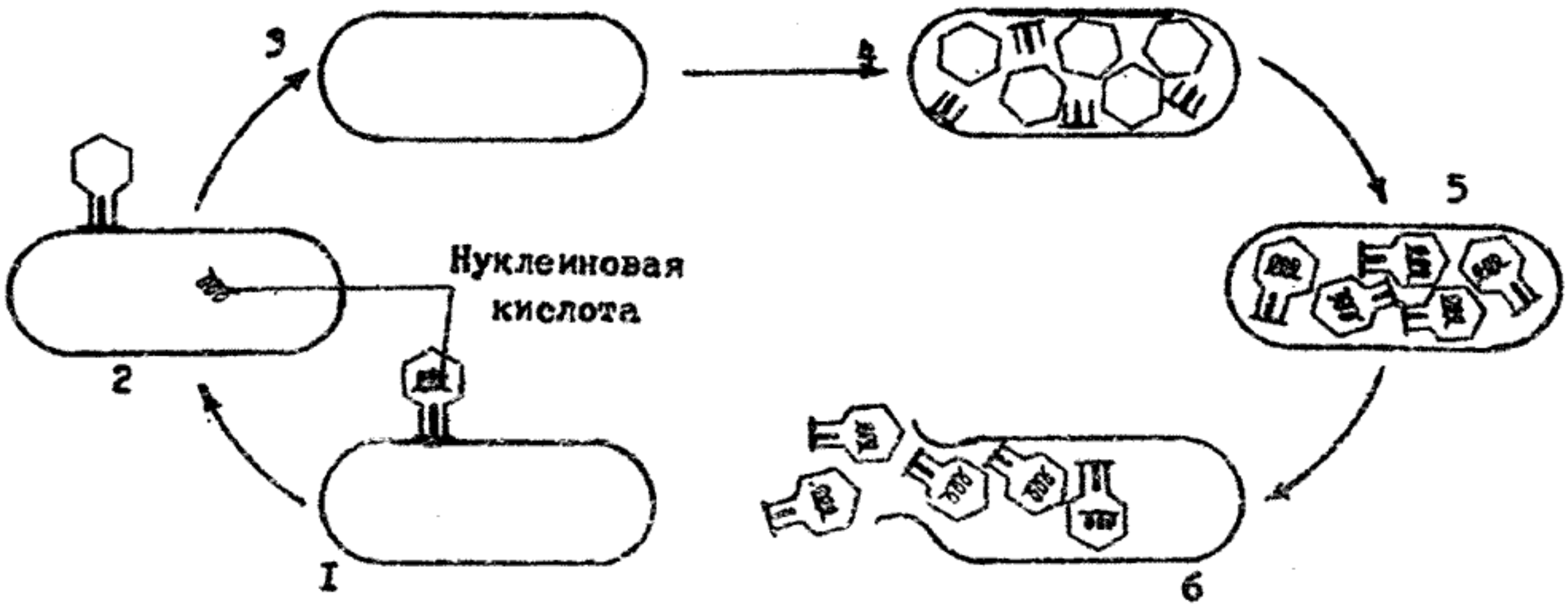


Рис.9.9. Схема взаимодействия вирулентного фага с клеткой: *1 - адсорбция; 2 - внедрение; 3 - начальный этап внутриклеточной репродукции; 4 - образование структурных компонентов фага; 5 - созревание фага; 6 - освобождение из клетки*

У некоторых бактериофагов существует два возможных пути, по которым может пойти их развитие при заражении чувствительных бактерий: они могут размножаться и лизировать клетки - литический путь развития, или их ДНК может включаться в геном зараженной клетки, не проявляя способности к размножению и лизису, - лизогенный путь развития. Начальные этапы литического и лизогенного путей не отличаются друг от друга.

Первый этап взаимодействия фага с бактериальной клеткой - *адсорбция*. Он осуществляется в результате случайных столкновений фага с бактериями и прикреплении его к клеточной поверхности. Адсорбция является высокоспецифическим процессом.

Каждый вид фага адсорбируется только на определенных бактериях и на определенных участках клеточной поверхности, так называемых фагочувствительных рецепторах. Это структуры, ответственные за связывание фага. Они расположены в наружных слоях клеточной стенки. Так, рецепторы для фагов T_2 и T_6 расположены в липопротеидном слое, для фагов T_3, T_7 и T_4 - в липополисахаридном слое клеточной стенки E. coli. Процесс адсорбции состоит из двух стадий: первая стадия неспецифическая. Она сводится к прикреплению фаговых частиц, обусловлена электростатическими силами и носит обратимый характер. Фаговые частицы могут быть удалены с поверхности клетки при перенесении ее в среду, неблагоприятствующую адсорбции, или при обработке ее антифаговой сывороткой. Вторая стадия - специфическая, необратимая - обусловлена образованием связей между рецепторами фага, расположенными на поверхности отростка, и соответствующими рецепторами клетки. Рецепторы фага, так же как и рецепторы клетки, - это определенные химические группировки поверхностных структур. В связи с наличием множества рецепторов на одной клетке может адсорбироваться большое количество фагов (например, на E. coli - до 300 фаговых частиц). На процесс адсорбции оказывают влияние как условия среды, особенно ее солевой состав, pH, так и физиологическое состояние клетки. В период интенсивного роста бактерий способность адсорбировать фаг увеличивается. За адсорбцией фага следует этап внедрения (инъекции) фаговой нуклеиновой кислоты в клетку. Процесс начинается с сокращения чехла отростка. Сокращение стимулируется базальной пластинкой, изменяющей свою конформацию под влиянием нитей отростка. При этом лизоцим, расположенный в области базальной пластинки, разрушает муреин клеточной стенки и внутренний стержень хвостового отростка проходит через разрыхленную клеточную стенку. Когда дистальный конец его достигает цитоплазматической мембраны, ДНК фага по каналу стержня впрыскивается в бактериальную клетку. Белковые пустые оболочки (тени фага) отрываются от клеточной стенки и разрушаются.

Третий этап - внутриклеточное размножение, или репродукция фага - заключается в синтезе компонентов вируса:

нуклеиновой кислоты и белков. Синтезируются они неодновременно, а раздельно в разных участках клетки, затем следует самосборка фаговых частиц.

С внедрением в клетку фаговой ДНК происходит перестройка метаболизма клетки в направлении синтеза компонентов фаговых частиц. Сразу после инъекции фаговой ДНК прекращается синтез бактериальных ДНК, РНК и белка, начинается синтез фагов нуклеиновой кислоты и белков. При этом, РНК-полимераза клетки транскрибирует гены фаговой ДНК в информационную РНК фага. Она служит матрицей для синтеза «ранних» белков - фагоспецифических ферментов.

Крупные и сложно организованные после внедрения в клетку фаги индуцируют синтез по крайней мере трех типов ферментов: первый тип - это нуклеазы, функция их состоит в разрушении ДНК клетки-хозяина; ферменты второго типа катализируют образование предшественников синтеза нуклеиновых кислот фага. Третий тип ферментов - это ДНК-полимеразы, РНК-репликазы и транскриптазы. Они катализируют реакции, осуществляющие репликацию и экспрессию фагового генома. ДНК фага обнаруживается в клетке через 8-10 мин после заражения. В это время начинают синтезироваться структурные белки фага.

Четвертый этап - *созревание*. В этот период происходит сборка фаговой частицы, соединение ДНК фага с белковой оболочкой. Созревание начинается с уплотнения молекулы ДНК, ее конденсации и укладки. Вскоре на поверхности этой конденсированной ДНК начинают собираться молекулы субъединиц (капсомер) белковой оболочки фага и образуется капсид. К сформированной головке присоединяются отросток и его компоненты. Так образуется зрелая частица фага.

Отрезок времени с момента проникновения фаговой ДНК в бактериальную клетку и до полного созревания в ней частиц фага называется латентным, или скрытым, периодом. Каждая система бактерия–фаг имеет свой определенный латентный период. Для коли-дизентерийных фагов он составляет 15-20 мин, для фагов микобактерий - до 75 мин. В конце латентного периода под действием свободного лизоцима происходит растворение клеточной

стенки бактерий изнутри, клетка разрывается и потомство фага высвобождается в окружающую среду.

Фаги, которые в процессе взаимодействия с клеткой вызывают ее гибель, называются *вирулентными*. Наряду с ними существует другой тип фагов. Они также заражают бактериальную клетку, но не размножаются в ней автономно и не лизируют ее. Эти фаги называются *умеренными* или *симбиотическими*. В их взаимоотношении с клеткой отмечаются только первые два этапа: адсорбция и внедрение. После внедрения нуклеиновая кислота умеренного фага встраивается в хромосому бактерии и в течение длительного времени может реплицироваться вместе с ней и передаваться потомству. Фаг в интегрированном с хромосомой состоянии называют профагом.

Итак, различают три состояния фага: зрелый фаг (фаг находится вне клетки и способен к заражению чувствительных бактерий), профаг (ДНК фага включена в бактериальную хромосому), вегетативный фаг (фаг находится в клетке в состоянии размножения).

Бактериальные клетки, содержащие профаг, называются *лизогенными*, а процесс включения генома фага в геном бактерии - *лизогенизацией*, само же явление - *лизогенией*. Лизогения рассматривается как наследственное свойство бактерий продуцировать фаг. Иногда профаг спонтанно с частотой 10^3-10^5 может перейти в вегетативный фаг, т. е. происходит его размножение по типу вирулентного фага. В результате клетка лизируется и частицы фага высвобождаются и заражают новые бактерии.

Особенностью лизогенных бактерий является их иммунитет к заражению тем фагом, по которому они лизогенны, т. е. который содержится в них в состоянии профага. В основе иммунитета лежит образование в цитоплазме клетки особого вещества белковой природы - репрессора, препятствующего превращению профага в вегетативное состояние. Репрессор ингибирует репликацию и созревание фага. Синтез репрессора контролируется генами профага. Однако действие репрессора может быть снято путем обработки лизогенных бактерий специфическими агентами, которые либо взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, в том числе и с генетической областью профага, контролирующей синтез

репрессора, либо воздействуют непосредственно на молекулы репрессора и инактивируют их. И в том и в другом случае продукция фага лизогенными бактериями увеличивается. Данное явление называют индукцией фага, а агенты - индуцирующими. К индуцирующим агентам относятся ультрафиолетовые лучи (УФ), алкилирующие соединения, температура и др.

Индукция лизогенной культуры с образованием фагового потомства может происходить при конъюгации, если донорская клетка лизогенная, а реципиентная -нелизогенная. Это значит, что в реципиентной клетке отсутствует репрессор репликации фаговой ДНК. Поэтому сразу после переноса профага в составе хромосомы в реципиентную клетку и образования мерозиготы начинается индукция перенесенного профага в фаг и образование фагового потомства. Это явление получило название зиготной индукции.

Способность умеренных фагов к лизогенизации определяется способностью индуцировать синтез собственного репрессора.

Многие лизогенные культуры содержат по 2-4 умеренных фага, т. е. являются полилизогенными. Наличие таких культур известно среди актиномицетов, клубеньковых бактерий, некоторых споровых бактерий. В связи с тем, что при лизогенизации умеренный фаг, точнее его нуклеиновая кислота, включается в генетический аппарат клетки, в последней могут наблюдаться изменения некоторых свойств. Например, при лизогенизации фагом β палочка дифтерии приобретает способность образовывать токсин. Токсичность сальмонелл также связана с наличием в клетках определенных фагов. Изменения свойств бактерий, происходящие в результате лизогенизации клеток, получили название *лизогенной конверсии*. Эти изменения наблюдаются только до тех пор, пока в клетке есть профаг. Если клетка теряет профаг, она теряет и приобретенные свойства.

9.2.3. Бактериофаги, содержащие одноцепочечную ДНК

Наряду с фагами, геном которых представлен двухцепочечной ДНК, существует группа мелких фагов, содержащих одноцепочечную ДНК. Это фаг ∅X 174, имеющий симметричную икосаэдрическую форму, нитевидные фаги fd, f1, размножающиеся

только в мужских клетках E. coli, несущих половой фактор. Геном этих фагов представлен кальцевой молекулой одноцепочечной ДНК, размер которой 0,6 мкм, молекулярная масса 1,6-2,0 × 10^6 дальтон. Несмотря на очень маленький геном, эти фаги используют его весьма эффективно. Это обеспечивается наличием перекрывающихся генов. Так, у фага ∅X 174 одна из нуклеоидных последовательностей ДНК содержит информацию не одного, как обычно, а двух или трех генов (рис. 9.10). Ген Е расположен внутри гена Д (перекрывается), но считывание заключенной в них информации начинается с двух разных точек, отстоящих друг от друга на один нуклеотид. Считывание информации с гена начинается еще до окончания считывания с генов Д и Е.

Мелкие фаги используют перекрывание генов для того, чтобы в маленьком геноме вместить больше информации.

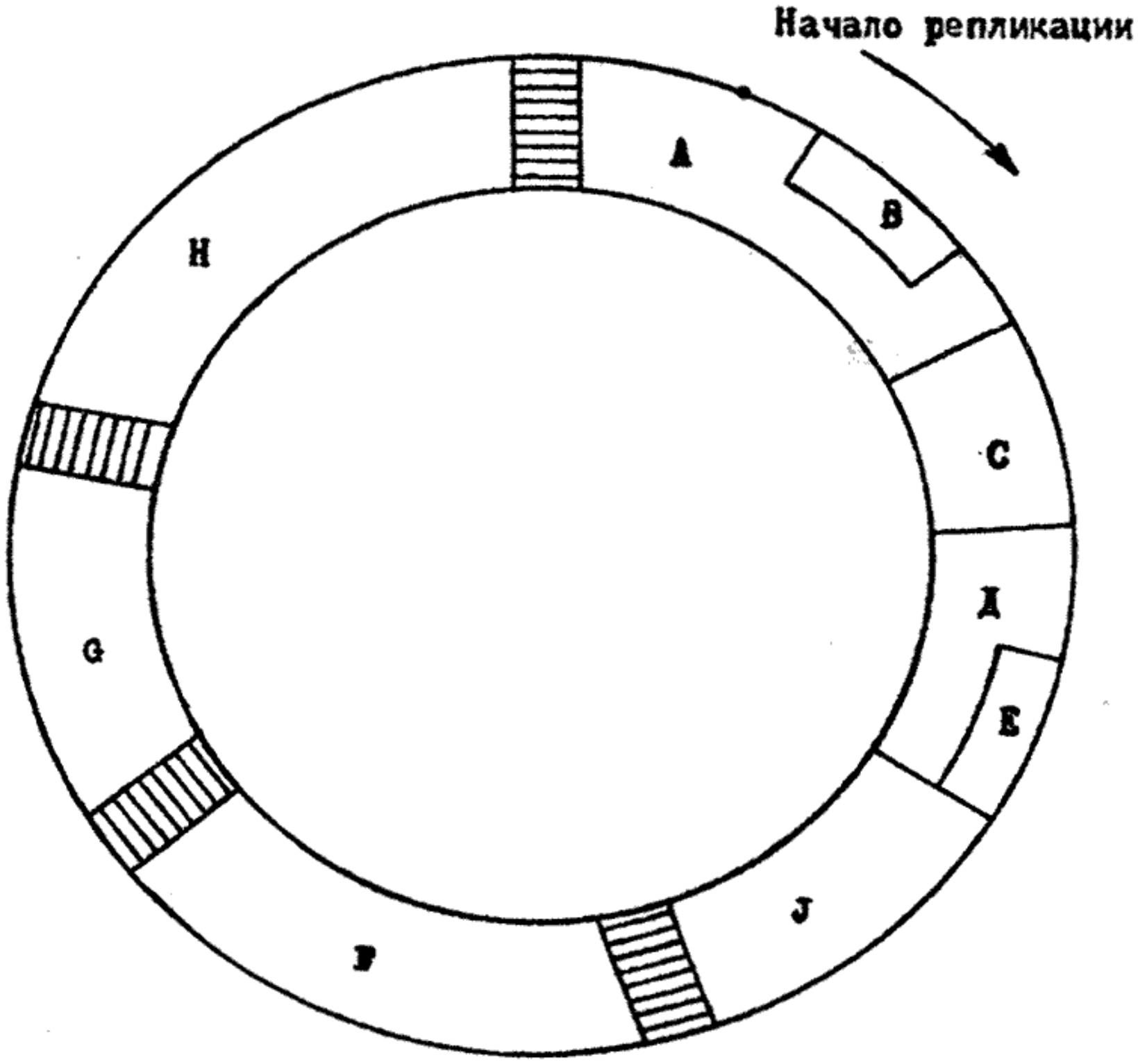


Рис.9.10. Генетическая карта фага ∅X174. Буквами обозначены гены, заштрихованные участки не транскрибируются

В процессе репликации фаговой одноцепочечной ДНК различают три этапа: вначале на фаговой ДНК-матрице образуется комплементарная ей минус-цепь. В результате формируется двухцепочечный промежуточный продукт, получивший название репликативной формы ДНК (РФ). Эта форма служит матрицей для синтеза ДНК вирионного потомства. На минус-цепи, которая является более эффективной матрицей, чем плюс-цепь, с участием ДНК-полимеразы и клеточных белков (E. coli) осуществляется синтез фаговой ДНК по механизму катящегося кольца. При этом синтезируются только одноцепочечные ДНК (плюс-цепи). Цепи включаются в белковые оболочки и формируются зрелые вирионы. Высвобождение их из клетки не сопровождается ее лизисом. Это обусловлено тем, что фаговые белки располагаются не в цитоплазме, а на ЦПМ. В период созревания фага его ДНК выталкивается из клетки и, проходя через мембрану, одевается белковой оболочкой. Так высвобождается из клетки потомство нитевидных фагов.

9.3. РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Вирусы животных, как и фаги, способны к репродукции (от англ. reproduce - воспроизводство). Во время репродукции синтез нуклеиновых кислот и белков вируса происходит разобщенно, в разных частях клетки, затем следует сборка вирионов. Такой способ репродукции получил название дизъюнктивного.

В репродукции вирусов животных, как и бактерий, четко выделяется ряд последовательных стадий.

I стадия - адсорбция. Процесс начинается с того, что между участками адсорбции (рецепторами) вириона и рецепторами, расположенными на поверхности клетки, образуются нековалентные связи. В результате вирион адсорбируется на поверхностных структурах клетки.

У разных вирусов рецепторы неодинаковы по своей природе и расположению на вирионе. Так, у аденовирусов рецепторами служат нити, расположенные на вершинах икосаэдра. У сложных вирусов, имеющих внешнюю оболочку, рецепторами являются многочисленные шипики и ворсинки, которыми усеяна поверхность оболочки.

На поверхности клеток животных и человека также имеются разные рецепторные участки. Например, рецепторную функцию для адсорбции миксовирусов выполняют мукопротеиды оболочек, для адсорбции пикорна- и арбовирусов – липопротеиды.

II стадия - проникновение вируса в клетку хозяина. В клетки животных и человека вирусы проникают разными путями. Одни из них - путем пиноцитоза (виропексиса), сущность которого состоит в том, что в месте адсорбции вируса происходит впячивание клеточной мембраны, образуется пиноцитарная вакуоль, захватывающая вирус и «переносящая» его внутрь клетки. Вирионы, имеющие внешнюю оболочку, сливаются с клеточной мембраной и так проникают в цитоплазму.

III стадия - освобождение вирусной нуклеиновой кислоты от капсида, или «раздевание» вируса. В отличие от вирусов бактерий, вирусы высших организмов целиком проникают в клетку. Но сразу же после их внедрения под действием протеолитических ферментов клетки-хозяина происходит разрушение капсида, т. е. раздевание вируса. Некоторые вирусы начинают освобождаться от капсида во время слияния вирусной и клеточной мембран, раздевание других происходит в специализированных структурах клетки - лизосомах, ядерных порах в ядерной мембране, структурах аппарата Гольджи. В результате раздевания освобождается внутренний компонент вируса, который способен вызвать инфекционный процесс.

IV стадия - репликация нуклеиновых кислот и синтез вирусных белков. Эти процессы имеют свои специфические особенности у ДНК- и РНК-содержащих вирусов (см. ниже).

V стадия - созревание или сборка вириона. Созревание вириона заключается в строго упорядоченном соединении вирусных белков и их нуклеиновых кислот. Этот сложный и необратимый процесс идет путем полимеризации белковых субъединиц и их упорядоченной укладки вокруг нуклеиновой кислоты с образованием капсида. Сборка одних вирусов, таких как пикорнавирусы, поксвирусы и большинство вирусов растений, осуществляется в цитоплазме клетки; другие же, такие как адено-, папова-, герпес- и миксовирусы, формируются в ядре. У просто организованных вирусов процесс самосборки, т. е. процесс самопроизвольного соединения вирусных нуклеиновых кислот и белков,

состоит в расположении упорядоченных соединений субъединиц белка вокруг нуклеиновой кислоты. Вначале формируются провирионы, которые в результате модификаций белков превращаются в вирионы. Сборка сложно устроенных вирусов осуществляется многоступенчато, в ней принимают участие клеточные структуры, ядерная и цитоплазматическая мембраны, куда независимо друг от друга прибывают все компоненты вирусной частицы. При выходе из клетки эти вирусы приобретают наружную оболочку - суперкапсид.

VI стадия - выход вирионов из клетки хозяина. После завершения сборки зрелые вирусные частицы покидают клетку. Этот процесс у разных вирусов осуществляется по-разному. Большинство просто устроенных вирусов (пикорна-, рео-, парво-, аденовирусы) освобождаются из клетки в результате разрушения мембраны, деструкции клетки. Сложно устроенные вирусы освобождаются путем почкования. Например, вирионы герпеса проникают в цито-плазматическую вакуоль и с ее помощью выводятся из клетки. При этом клетка некоторое время сохраняет жизнеспособность и продуцирует вирусное потомство.

ДНК-содержащие вирусы. Репликация генома ДНК-содержащих вирусов осуществляется ДНК-полимеразами как клетки-хозяина, так и вирусной частицы.

У вирусов с двухцепочечной ДНК генетическая информация реализуется тем же путем, что и у клеточных организмов:

$$\text{ДНК} \xrightarrow{\text{транскрипция}} \text{иРНК} \xrightarrow{\text{трансляция}} \text{белок}$$

Развитие вируса начинается с транскрипции ранних генов, ответственных за синтез ферментов («ранних» вирусных белков), необходимых для репликации вирусной ДНК.

Вирусы, репродукция которых происходит в ядре клетки, используют для транскрипции клеточную полимеразу (папововирусы, аденовирусы, вирусы герпеса). Другие же, как поксвирусы (вирусы оспы), иридовирусы (вирусы лягушек), репродукция которых осуществляется в цитоплазме, не могут использовать фермент, находящийся в ядре. Они содержат собственную ДНК-

полимеразу, которая в составе вириона проникает в клетку и участвует в транскрипции вирусного генома.

Образовавшаяся иРНК транслируется рибосомами клетки-хозяина в вирусоспецифические ферменты, обеспечивающие репликацию вирусной ДНК. В результате образуется «фонд» ДНК, используемый для формирования вирусных частиц. Репликация вирусной ДНК идет по обычному полуконсервативному механизму.

При репликации однонитевых ДНК вначале происходит образование двунитевых форм, которые являются промежуточными репликативными формами. В дальнейшем они служат матрицами для синтеза вирусных однонитевых ДНК.

РНК-содержащие вирусы. Репликация нуклеиновой кислоты РНК-содержащих вирусов имеет ряд особенностей, связанных с тем, что в клетках-хозяевах нет ферментов для синтеза РНК в РНК-матрице. Поэтому РНК-содержащие вирусы в целях обеспечения собственной репродукции должны нести генетическую информацию для синтеза РНК-зависимой-РНК-полимеразы (РНК-репликазы) и РНК-зависимой-ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы).

Репродукция РНК-содержащих вирусов также начинается с синтеза матричной РНК, которая транслируется рибосомами с образованием ферментов репликации и капсидных белков. В зависимости от принадлежности вируса к той или иной группе синтез мРНК может осуществляться разными путями. Известно четыре пути выражения генов РНК-содержащих вирусов (рис. 9.11).

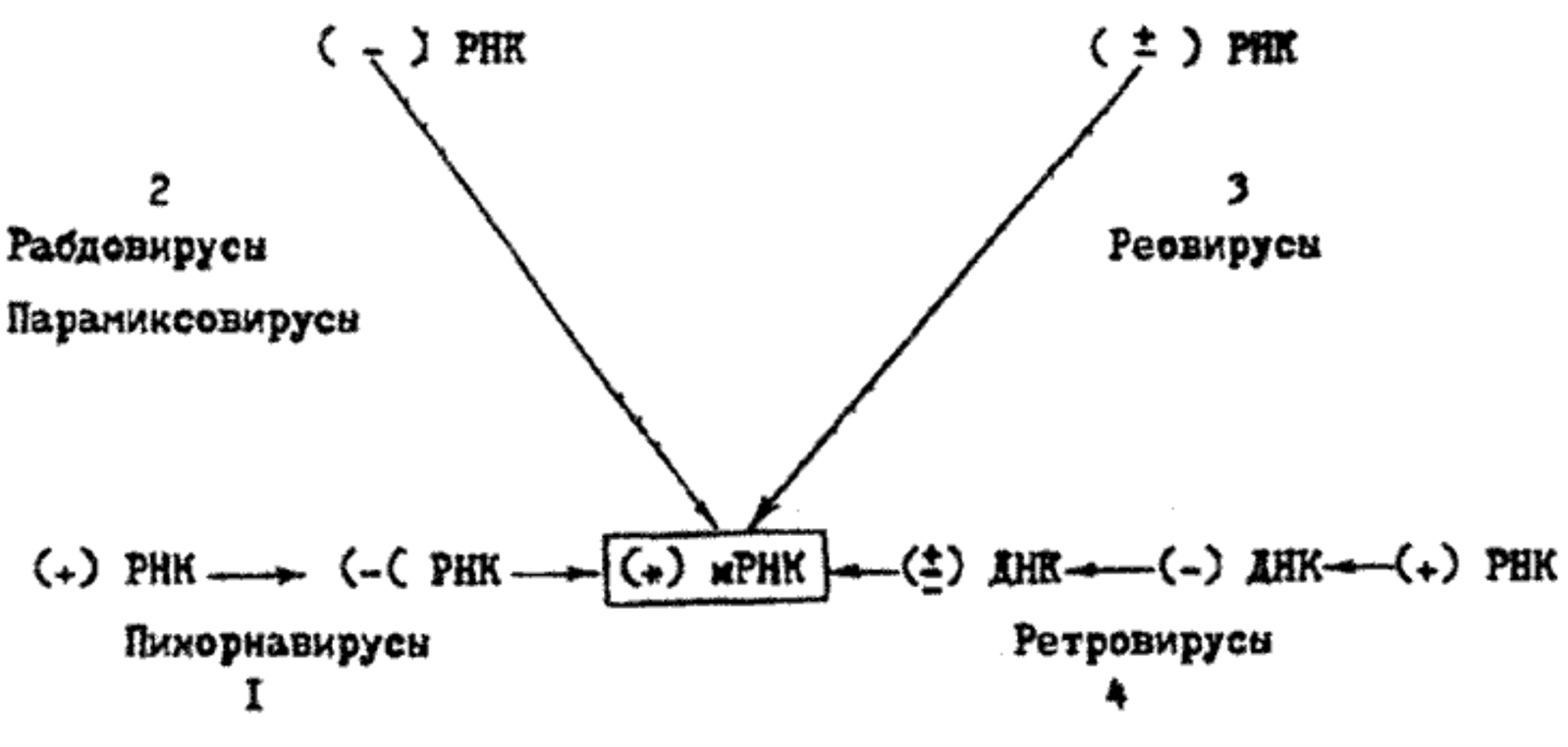


Рис.9.11. Пути выражения генов РНК-содержащих вирусов

Пикорнавирусы (от pico - маленький, RNA - рибонуклеиновая кислота) - группа мелких РНК-содержащих вирусов. Геном содержит одну молекулу одноцепочечной (+)РНК (плюс-цепь). Она окружена икосаэдрической белковой оболочкой.

Представителями являются вирус полиомиелита, риновирус (вызывает обычное простудное заболевание), вирус ящура. У пикорнавирусов РНК вириона выполняет роль матрицы для синтеза вирусного белка. Попав в клетку-хозяина, она освобождается из капсида и сразу транслируется рибосомами с образованием гигантского полипептида - предшественника вирусных белков. Этот полипептид разрезается протеазами клетки-хозяина на несколько вирусоспецифических белков, среди которых имеются белки капсида и РНК-репликаза. Этот фермент синтезирует (–) цепи РНК на матрице (+)РНК вириона. (–)РНК в свою очередь служит матрицей для синтеза множества (+) цепей, которые используются в синтезе белка или укладываются в капсиды и дают новые вирионы.

Рабдовирусы (от rhabdo -палочка) - группа крупных вирусов, напоминающих по форме пулю. Геном представлен одной молекулой одноцепочечной (–)РНК, которая уложена в спиральный капсид. Капсид покрыт двуслойной липидной мембраной. Представителями являются вирус везикулярного стоматита и вирус бешенства. В составе вириона содержится фермент РНК-репликаза. Одноцепочечная (–)РНК вириона не может служить матрицей для синтеза вирусных белков. Поэтому первым этапом экспрессии генов (–)РНК является синтез (+)РНК. Этот процесс осуществляет вирусная РНК-репликаза. В случае вируса везикулярного стоматита с геномной РНК вируса транскрибируется пять моноцистронных мРНК (моноцистрон - последовательность в ДНК, кодирующая один полипептид), которые транслируются рибосомами с образованием пяти вирусных белков, входящих в состав капсида, шипов, мембраны. Вирионная РНК-репликаза синтезирует также и длинную цепь (+)РНК, содержащую всю генетическую информацию вируса. Эта (+)РНК в свою очередь служит матрицей для синтеза (–)РНК, которые используются для формирования новых вирусных частиц.

Рабдовирусы входят в группу вирусов с негативным геномом. Такое название они получили за то, что РНК вирионов даже с высокой молекулярной массой не обладает инфекционностью. Это обусловлено тем, что рабдовирусы содержат минус-цепь РНК, которая в отсутствие РНК-репликазы не способна к репликации. Как отмечалось выше, этот фермент содержится в вирионе. Для

проявления инфекционности необходимо инфицирование клетки-хозяина целостным вирионом.

Реовирусы (от первых букв англ. слов respiratory enterie orphan, что означает энтеро-респираторный вирус-сирота, т. е. «не пристроенный» ни к какой болезни) - крупные, часто встречающиеся вирусы, но явных болезней не вызывают. Геном реовирусов состоит из 10 различных молекул двухцепочечных (+)РНК, заключенных в икосаэдрический капсид, не содержащий оболочки. РНК генома ассоциирована с белками. В вирионе также содержится РНК-репликаза. Проникнув в клетку-хозяина, вирион освобождается от капсида. Это активирует РНК-репликазу и она начинает транскрибировать все 10 молекул РНК в (+)мРНК). Транскрипция идет асимметрично - только с образованием (+)мРНК («минусовые» цепи не образуются). Исходные цепи (±)РНК разрушаются. Каждая из 10 вновь образованных мРНК дает при трансляции один белок. В итоге образуется 10 разных белков. Затем все 10 мРНК соединяются с некоторыми вирусными белками и образуют предшественник сердцевины вириона, в котором синтезируются комплементарные матричные РНК минус-цепи, в результате чего формируются двухцепочечные молекулы РНК вирусов этой группы.

Ретровирусы (от англ. reverse transcriptase - обратная транскриптаза) - РНК-содержащие опухолеродные вирусы. Это единственная группа из числа РНК-содержащих вирусов, представители которой способны вызывать рак. Известными представителями ретровирусов является вирус саркомы Рауса, открытый П. Раусом в 1911 г. при изучении этиологии опухоли соединительной ткани кур. Он показал, что приготовленный из опухоли бесклеточный экстракт, пропущенный через бактериальный фильтр, при введении здоровым цыплятам вызывает у них образование такой же опухоли. Было очевидно, что опухоль вызывается вирусом.

Геном ретровирусов представлен двумя одинаковыми молекулами одноцепочечной (+)РНК, которые заключены в капсид икосаэдрической формы. Капсид окружен оболочкой, состоящей из молекул гликопротеина, кодируемого вирусом, и двуслойной липидной мембраны, происходящей из мембраны клетки-хозяина. В

вирионе содержится специфический фермент, необходимый для репродукции вируса - обратная транскриптаза, открытая Теминым и Балтимором (независимо друг от друга) в 1970 г. Особенность этого фермента состоит в том, что он осуществляет обратную транскрипцию РНК → ДНК, т. е. синтезирует двуспиральную ДНК, используя в качестве матрицы (+)РНК вириона.

После проникновения вириона в клетку вирусная (+)РНК освобождается от оболочки. Затем обратная транскриптаза использует вирионную РНК как матрицу и синтезирует (–)цепь ДНК. Образуется гибридная молекула ДНК: одна цепь - РНК вириона, другая - вновь синтезированная цепь ДНК. Этот же фермент расщепляет цепь вирионной РНК в гибридной молекуле РНК-ДНК (рис.9.12). После этого обратная транскриптаза синтезирует вторую комплементарную цепь провирусной ДНК, матрицей служит оставшаяся первая цепь ДНК. Таким образом, обратная транск-

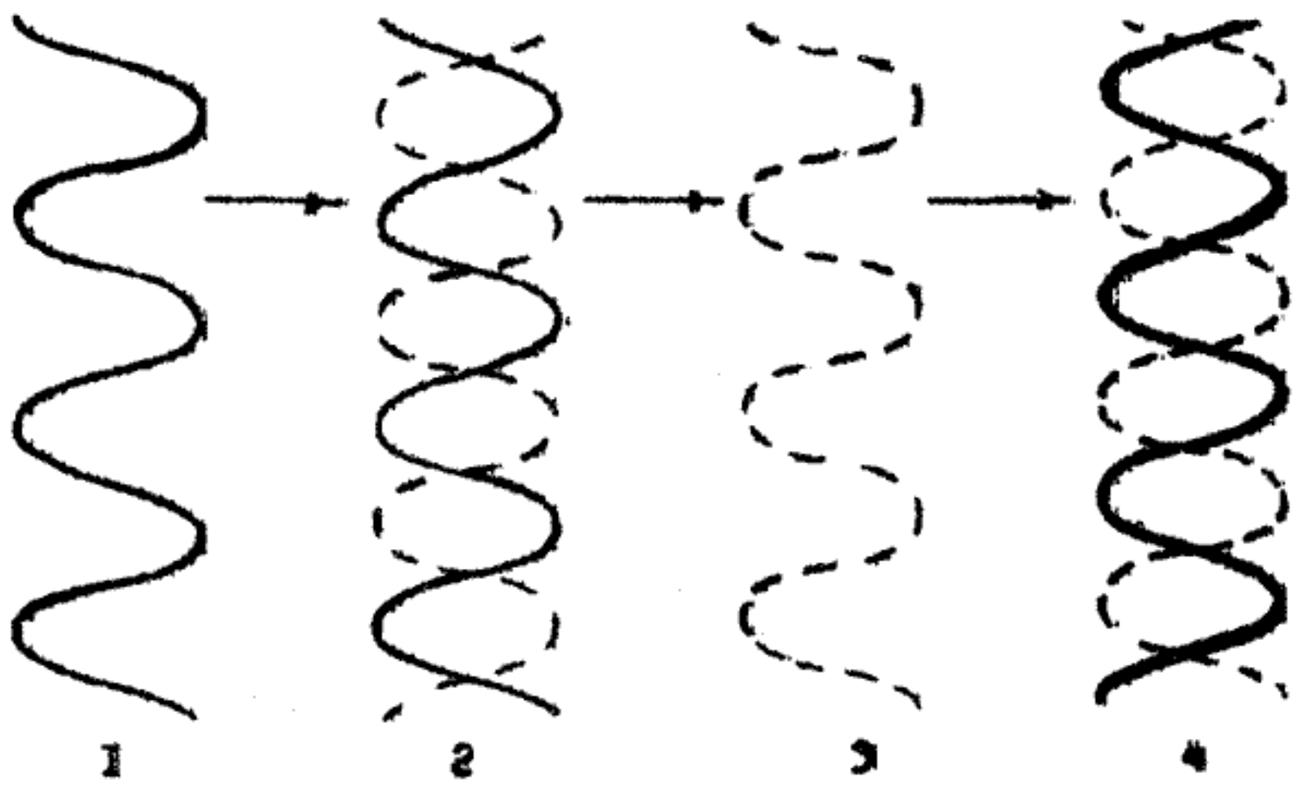


Рис.9.12. Синтез ДНК по РНК-матрице с помощью обратной транскриптазы: *1 - вирусная РНК; 2 - гибрид ДНК-РНК; 3 - ДНК-транскрипт вирусной РНК; 4 - двухцепочечная вирусная ДНК*

риптаза осуществляет три последовательные реакции: РНК-зависимый синтез ДНК, гидролиз РНК и ДНК-зависимый синтез ДНК. В результате образуется ДНК-содержащий провирус, который является промежуточной формой в репликации онкогенных вирусов. Образовавшаяся двуспиральная провирусная ДНК переходит в

кольцевую форму, проникает в ядро клетки и интегрирует с хромосомной ДНК. После интеграции начинается транскрипция ДНК-провируса, которая осуществляется РНК-полимеразой, ответственной за синтез мРНК в клетке. Первичным транскриптом является 35S РНК, считываемая с минус-цепи ДНК-провируса. Эта же РНК является и матрицей для синтеза вирионных белков.

Формирование вирионов происходит на клеточной мембране путем почкования. При этом, геномная РНК и вирусные белки перемещаются к плазматической мембране и включаются в нее. Затем часть измененной мембраны отпочковывается и образует новые вирусные частицы, которые могут инфицировать новые клетки. В отличие от инфекции онкогенными ДНК-содержащими вирусами продуктивная ретровирусная инфекция не является литической. Ретровирусы обычно не убивают клеток-хозяев. Их ДНК остается в геноме зараженной клетки, интегрированная - реплицируется вместе с клеточной ДНК, поэтому дочерние клетки наследуют вирусный геном. Такие вирусы называются эндогенными. Вирусная инфекция на уровне клетки и на уровне популяции носит хронический характер. При этом, зараженные клетки могут подвергаться морфологическим и физиологическим изменениям, модифицироваться, т. е. приобретать ряд новых наследственных свойств, в том числе и способность к неограниченному росту. Модифицированные клетки образуют очаги активно делящихся клеток, которые либо превращаются в опухолевые, либо являются стадией на пути превращения нормальной клетки в опухолевую. Но только немногие штаммы онкогенных вирусов способны вызывать трансформацию клеток. Большинство из них являются дефектными - несут повреждения в одном из генов генома.

Геном РНК-содержащих опухолевых вирусов, в том числе и вируса саркомы Рауса, содержит четыре гена.

Ген gag кодирует синтез внутренних белков - группоспецифических антигенов, ген pol кодирует обратную транскриптазу, ген env кодирует гликопротеиды оболочки, необходимые для прикрепления вируса к поверхности клетки-хозяина, ген src (онкоген) - отвечает исключительно за трансформацию клетки. Мутанты, лишенные гена src (от англ. sarcoma), могут нормально размножаться, но не способны вызвать трансформацию. В то же

время, используя лишь один ген src, можно вызвать трансформацию клеток и образование опухоли, т. е. большая часть вирусного генома в этом не принимает участия.

РНК-содержащие вирусы обладают более сильным трансформирующим действием, чем ДНК-содержащие, а в пределах группы РНК-содержащих ретровирусов - наиболее эффективны вирусы сарком. У них широкий круг хозяев и они трансформируют множество типов клеток (фибробласты, миобласты, эпителий радужной оболочки и другие).

Механизм действия продуктов опухолевых генов онкогенных вирусов еще не известен. Установлено, что продукт гена src вируса саркомы П. Рауса является протеинкиназой - ферментом, который, в отличие от других киназ, фосфорилирует белки не по треонину и серину, а по тирозину. Это одна из известных особенностей продукта, кодируемого геном src. Насколько значительна эта особенность в образовании опухолей - пока неизвестно.

К ретровирусам относится и возбудитель СПИДа - вирус иммунодефицита человека, или ВИЧ. Геном ВИЧ представлен РНК, причем, в зараженных клетках выявлено три класса вирусспецифических РНК с разной молекулярной массой.

Репликация РНК проходит через стадию образования ДНК-транскрипта, который интегрируется с геномом клетки. ВИЧ хорошо репродуцируется в Т-лимфоцитах человека.

9.4. ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ИММУНИТЕТ. ИНТЕРФЕРОН

Невосприимчивость организма к вирусным инфекциям составляет сущность противовирусного иммунитета. В отличие от бактериального вирусный иммунитет имеет свои особенности, обусловленные спецификой вирусов как возбудителей инфекционных заболеваний.

Различают гуморальный и клеточный противовирусный иммунитет. Гуморальный иммунитет обеспечивается нейтрализацией инфекционной активности вируса специфическими иммуноглобулинами - антителами, которые вырабатываются в макроорганизме в ответ на внедрение вируса. Нейтрализация осуществляется путем необратимых конформационных изменений

структуры белков вириона у сложно устроенных вирусов, в основном гликопротеидов, или путем блокады антителами вирусных прикрепительных белков. В последнем случае антитела связываются с антивирусной частицей и предотвращают таким образом прикрепление вирионов к рецепторам клетки.

Более важную роль при вирусных инфекциях играет клеточный иммунитет, который обеспечивают Т-лимфоциты. Они распознают зараженную вирусом клетку в организме и вызывают ее гибель (цитолиз). В результате организм освобождается от зараженных клеток, продуцирующих инфекционное вирусное потомство.

Весьма существенным в противовирусном иммунитете является действие макрофагов. Они участвуют в распознавании вируса, как антигена, регуляции пролиферации и дифференцировки лимфоцитов, принимают активное участие в разрушении и удалении из организма чужеродных антигенов. Цитотаксическая активность макрофагов носит неспецифический характер и проявляется на ранних стадиях инфекционного процесса.

Интерферон. Наряду с цитолитическим действием лимфоцитов и макрофагов к основным факторам, способствующим избавлению организма от вирусной инфекции, относится интерферон, открытый А. Айзексом и Ж. Линдеманом в 1957 г.

Интерферон (от лат. interfere - препятствовать) представляет собой группу низкомолекулярных белков с молекулярной массой 22×10^3 - 94×10^3 дальтон. Они продуцируются различными клетками макроорганизма и культурой клеток при инфицировании их любыми вирусами. Образование интерферона индуцируется вирусной нуклеиновой кислотой, причем, более активным индуктором является двухцепочечная РНК. Индукторами интерферона, кроме вирусов, могут быть многие микроорганизмы и их токсины, простейшие, экстракты из грибов, растений, а также некоторые синтетические соединения, такие как поликарбоксилаты, полисульфаты, декстраны и многие другие вещества.

Различают три типа интерферона человека: α-интерферон, или лейкоцитарный интерферон, который продуцируется лейкоцитами, обработанными индукторами, β-интерферон, или фибробластный

интерферон, который продуцируется фибробластами, γ-интерферон, или иммунный, продуцируется Т-лимфоцитами и является наиболее сильным, чем два предыдущих типа.

Интерферон не обладает вирусоспецифичностью. Он эффективен против самых разнообразных вирусов. Сам по себе он не влияет на репродукцию вирусов, а индуцирует образование и активность ферментов, которые разными путями ингибируют синтез белка. К таким ферментам относятся олигонуклеотид-синтетаза, эндонуклеаза и киназа. Принцип действия их показан на рис. 9.13. Олигонуклеотид-синтетаза образует 2,5-олигоаденилловую кислоту, которая активирует эндонуклеазу. Последняя осуществляет расщепление иРНК на нуклеотиды, предотвращая ее трансляцию и синтез вирусного белка.

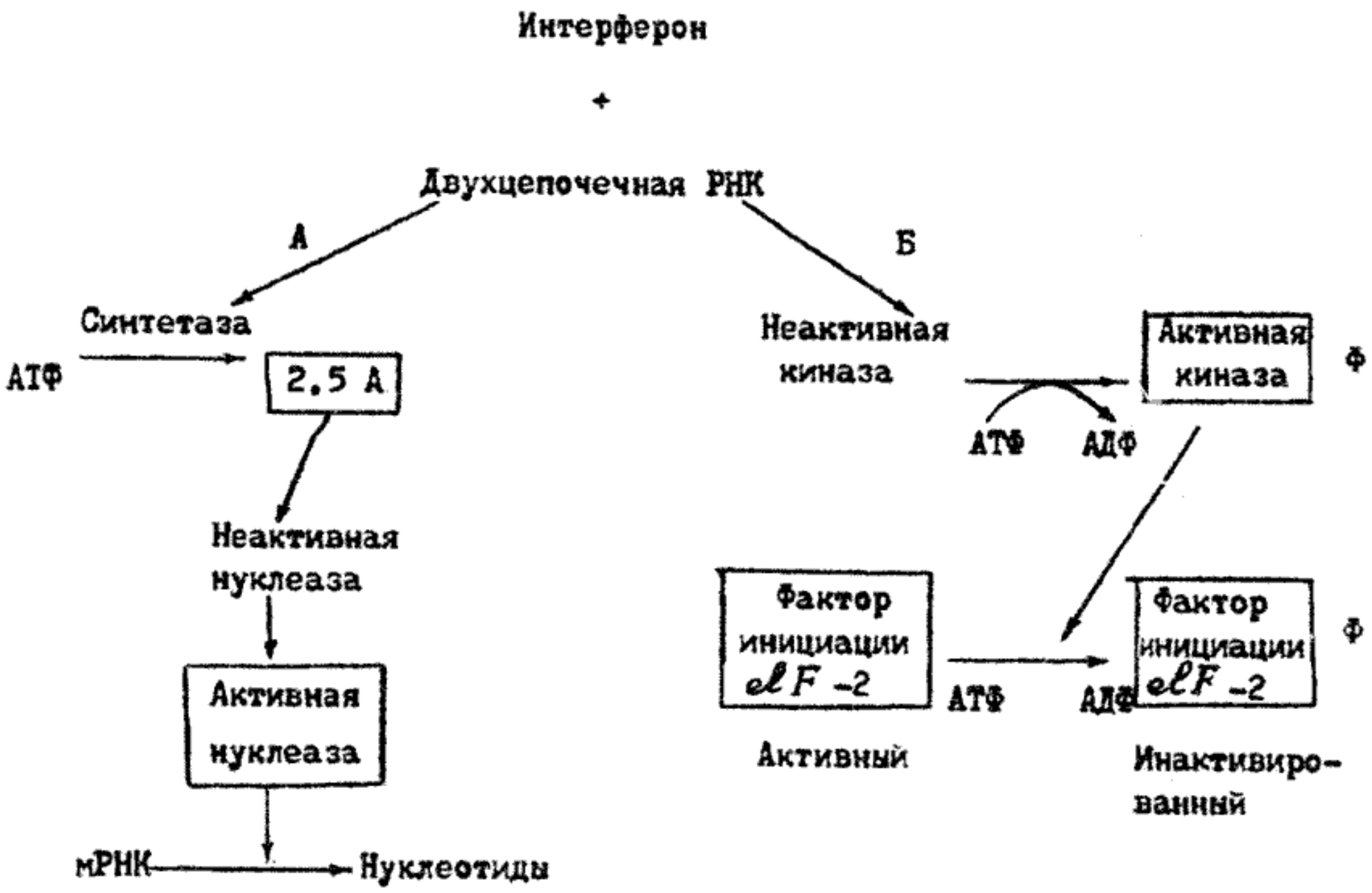


Рис.9.13. Схема ингибирующего действия ферментов, активированных интерфероном на синтез белка (А. Драйер, 1985): *А - расщепление матричной ДНК; Б - подавление инициации синтеза белка*

Действие активированной протеинкиназы выражается в том, что она инактивирует один из факторов (eIF-2) инициации синтеза вирусного белка путем его фосфорилирования. В результате

блокируется трансляция вирусных иРНК. Таким способом интерферон защищает клетки от репродукции в них вирусных частиц. Активация ферментов, блокирующих репродукцию вирусов, происходит не только в тех клетках, где образуется интерферон, но и в соседних, куда он диффундирует. Это препятствует распространению вируса в организме.

Блокирование интерфероном стадии инициации трансляции и разрушение вирусных иРНК обусловливают его универсальный механизм действия при инфекциях, вызванных вирусами с разным генетическим материалом.

Особенностью интерферона является его видотканевая специфичность. Например, человеческий интерферон активен только в организме человека и не проявляет своего антивирусного действия в организме животных, а интерферон, образующийся в клетках животных, не функционирует в организме человека. Это затрудняет производство препарата в значительных количествах.

Интерферон получают из лейкоцитов крови человека и клеток костного мозга. В настоящее время методами генной инженерии удалось перенести гены интерферона из лейкоцитов крови человека в клетки бактерии E. coli и таким путем сконструировать штамм кишечной палочки, продуцирующей лейкоцитарный интерферон.

Глава 10

ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

Генетика (от лат. geneticos - происхождение, рождение) - наука о наследственности и изменчивости организмов - изучает механизмы передачи генетической информации; анализирует механизмы, которые контролируют развитие и проявление переданной информации (свойств, или признаков); исследует закономерности изменения свойств организма.

Годом рождения генетики считается 1900-й, хотя основные законы генетики были открыты в 1865 г. Грегором Менделем, но в течение 35 лет они оставались неизвестными для биологов. На примере гороха он установил общие закономерности наследования признаков, сформулировал концепцию, согласно которой каждый признак контролируется родительскими генами, как материальной единицей наследственности, ответственными за передачу признаков из поколения в поколение, и заложил основы гибридологического анализа.

Исследования в области генетики микроорганизмов стали проводиться значительно позже, чем генетики макроорганизмов. Начало было положено в 40-х годах XX в. классическими экспериментами Г. Бидла и Э. Татума (США) по получению и анализу индуцированных мутаций у гриба Neurospora crassa. Результаты экспериментов позволили им сформулировать концепцию «один ген - один фермент», что послужило основой для развития биохимической генетики, изучающей механизмы генетического контроля клеточного метаболизма. Вскоре микроорганизмы заняли ведущее место в генетических исследованиях.

В короткий срок генетика микроорганизмов, как наука, внесла огромный вклад в понимание крайне запутанных представлений об изменчивости и наследственности. Весьма ценными явились доказательства идентичности генетических детерминант наследственности у всех живых существ, находящихся на разных ступенях организации. Сходство это выражается в химической природе детерминант, их организации, способах управления процессами развития всех свойств организма.

блокируется трансляция вирусных иРНК. Таким способом интерферон защищает клетки от репродукции в них вирусных частиц. Активация ферментов, блокирующих репродукцию вирусов, происходит не только в тех клетках, где образуется интерферон, но и в соседних, куда он диффундирует. Это препятствует распространению вируса в организме.

Блокирование интерфероном стадии инициации трансляции и разрушение вирусных иРНК обусловливают его универсальный механизм действия при инфекциях, вызванных вирусами с разным генетическим материалом.

Особенностью интерферона является его видотканевая специфичность. Например, человеческий интерферон активен только в организме человека и не проявляет своего антивирусного действия в организме животных, а интерферон, образующийся в клетках животных, не функционирует в организме человека. Это затрудняет производство препарата в значительных количествах.

Интерферон получают из лейкоцитов крови человека и клеток костного мозга. В настоящее время методами генной инженерии удалось перенести гены интерферона из лейкоцитов крови человека в клетки бактерии E. coli и таким путем сконструировать штамм кишечной палочки, продуцирующей лейкоцитарный интерферон.

заражении клеток растений изолированной нуклеиновой кислотой. Аналогичные результаты получены А. Корнбергом с сотрудниками (1963) при заражении клеток ДНК, синтезированной in vitro (вне организма) в специально разработанной ими бесклеточной системе, содержащей весь «строительный материал» и необходимые ферменты. В систему добавлялось небольшое количество той или иной ДНК, которая служила матрицей, определяющей структуру синтезируемой ДНК. В качестве ДНК-затравки использовалась ДНК фага кишечной палочки ФХ174. Полученная таким образом ДНК соответствовала по всем свойствам примененной фаговой ДНК. При заражении ею бактерий кишечной палочки наблюдалось формирование полноценных частиц фага ФХ174. Следовательно, искусственно синтезированная ДНК несла в себе всю генетическую информацию фага данного типа.

10.1. ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА БАКТЕРИЙ

Основной генетической структурой прокариотной клетки является *хромосома*. Она представляет собой гигантскую молекулу ДНК, замкнутую в кольцо (см. гл. 3). Хромосома содержит функционально неоднородные генетические детерминанты - гены и генетические регуляторные последовательности.

Ген - это структурная, функционально неделимая единица наследственной информации. По химической природе он представляет собой участок молекулы ДНК (хромосомы), включающей 1 000 - 1 500 пар нуклеотидов. Хромосома бактерий содержит около 3 500 - 5 000 генов. Они располагаются линейно на хромосоме. Место локализации каждого гена устанавливается скрещиванием бактерий и последующим генетическим анализом образовавшегося потомства. Схема, отражающая расположение генов на хромосоме, называется генетической, или хромосомной картой.

Все прокариоты, в отличие от эукариот, гаплоидны, т. е. генетический материал у них представлен одной хромосомой. Кроме генов, имеющих фиксированное расположение на хромосоме, известно большое количество их, распространенных среди

множества внехромосомных генетических структур, являющихся частью генома организма. Следует отметить, что чем сложнее организм, тем больше генетической информации он содержит. Например, у человека в среднем насчитывается 50 000 генов, у бактерий - около 5 000, у мелких РНК-содержащих фагов (MS2, P17) только 3 гена. Недавно открытые вироиды состоят из одной молекулы РНК, содержащей меньше нуклеотидов, чем требуется для одного гена (у РНК-содержащих вирусов гены представляют собой участки РНК, а не ДНК).

10.2. ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Биологические свойства каждого организма определяются его генетическим аппаратом, который состоит из дискретных структурных единиц - генов. Каждый ген детерминирует (определяет) развитие определенного свойства (признака) организма. Совокупность всех генов организма составляет его генотип, т. е. его генетическую конституцию. Однако в силу разных условий проявляться могут не все свойства, гены которых имеются в организме. Совокупность всех проявленных структурных и функциональных свойств организма составляет его фенотип. Генотип организма является его наследственной основой, а фенотип - выражение генотипа в конкретных условиях среды. В зависимости от условий особи одного генотипа могут характеризоваться разными фенотипическими признаками. Такие изменения, возникающие под влиянием внешних условий и не передающиеся потомству, называются фенотипическими, или модификационными.

Фенотипические изменения не затрагивают генотип, не наследуются, но контролируются и ограничиваются генотипом. Они носят временный характер, исчезая при устранении вызвавшего их фактора. Например, пигментация бактерий. Она зависит от условий среды: широко распространенный почвенный микроорганизм Azotobacter chroococcum, образующий в оптимальных условиях кислотности коричневый пигмент, в кислой среде (pH 4,5) не пигментируется. Но отсутствие способности к пигментообразованию проявляется лишь до тех пор, пока действует данный фактор (кислая среда). При перенесении этого же организма в нейтральную среду

происходит нормальное пигментообразование, т. е. восстанавливаются его прежние свойства.

К фенотипической изменчивости относится физиологическая адаптация - изменения, связанные с приспособлением популяции микроорганизмов к развитию в изменившихся условиях. Так, фотосинтезирующие несерные пурпурные бактерии на свету могут развиваться за счет минеральных веществ, используя для процессов жизнедеятельности энергию солнечного света. При помещении их в темноту клетки не погибают, а переключают свои механизмы (синтезируют индуцибельные ферменты) на получение энергии путем окисления органических веществ. Следовательно, в метаболизме клеток происходят физиологические изменения. При возвращении культуры в прежние условия, т. е. на свет, клетки опять начинают вырабатывать пигмент и развиваться за счет энергии света. Это свидетельствует о том, что вызванные определенными условиями среды изменения в физиологии фотосинтезирующих бактерий не затрагивает генетический аппарат, а связаны лишь с образованием и активностью адаптивных ферментов, информация о синтезе которых содержится в генетическом аппарате клеток.

У гетеротрофных бактерий физиологическая адаптация происходит при замене в питательной среде одного субстрата другим. Последний индуцирует синтез необходимых ферментов, и клетки начинают утилизировать этот основной субстрат. К примеру, при внесении в среду лактозы клетки E. coli начинают синтезировать β-галактозидазу, в то время как при развитии этой бактерии в обычном МПБ, где лактоза отсутствует, этот фермент не вырабатывается.

Характерной особенностью микроорганизмов является то, что при физиологической адаптации одновременно изменяются все клетки культуры. Таким образом, адаптация заключается в непосредственной реакции культуры на изменение условий среды.

В связи с тем, что фенотипические изменения не передаются по наследству, в эволюции микроорганизмов существенного значения они не имеют. Их роль сводится к обеспечению выживаемости микробных популяций в изменившихся условиях среды.

Изменениям подвержен также и генотип, ибо генетическая информация, закодированная в ДНК, не является абсолютно стабильной. Это так называемая *генотипическая изменчивость.* Она играет большую роль в эволюции организмов: если бы клетки не обладали способностью к изменению генотипа, то любое неблагоприятное условие привело бы к вымиранию вида. Например, появление в культуре бактериофага вызвало бы полную гибель ее, если бы гены, определяющие фагочувствительность, не подвергались изменениям и клетки в силу этого не приобрели свойство фагорезистентности. Следовательно, отсутствие абсолютной стабильности генетического материала является полезным свойством для сохранения вида. Появление измененного (нового) генотипа обеспечивает пластичность вида, создает новую норму реакции на изменившиеся условия среды.

В основе генотипической изменчивости лежат мутации и рекомбинации. Они происходят в структуре ДНК - в генетическом аппарате клетки - и проявляются в стабильном изменении какого-либо свойства. Биологическая роль мутаций состоит в том, что они являются источником наследственной изменчивости организмов.

10.2.1. Мутации

По определению де Фриза (1901), мутации (от лат. mutare - изменять) - это внезапные, скачкообразные изменения наследственных свойств. В современном понимании мутации представляют собой структурные изменения генов, приводящие к появлению нового признака. Мутации у микроорганизмов долгое время не признавались, и все изменения, в том числе и наследственные, истолковывались как прямое приспособление организма к среде (адаптация). Считалось, что изменчивость микроорганизмов определяется исключительно условиями среды и носит направленный характер. Основанием для таких утверждений служила слабая защищенность генетического материала микробных клеток от влияния среды.

Понадобились веские доказательства независимости мутаций от внешних факторов, т. е. доказательства их спонтанного (самопроизвольного) характера. Это было сделано рядом исследователей:

С. Луриа и М. Дельбрюком (1943), Г. Ньюкомбом (1949) и другими учеными, использовавшими для выявления мутантов метод реплик, предложенный Е. и Дж. Ледербергами (1952). С. Луриа и М. Дельбрюк изучали условия появления фагоустойчивых мутантов в культуре кишечной палочки, чувствительной к фагу (флуктуационный тест). Свежую бульонную культуру E. coli, предварительный анализ которой не выявил наличия фагоустойчивых мутантов, разводили до концентрации 10^3 клеток на 1 мл и делили на две части: в одну пробирку помещали 10 мл, а в 20 пробирок разливали по 0,5 мл. После инкубации в течение суток в термостате из каждой пробирки производился высев равных объемов культуры на агар, содержащий фаг. При этом предполагалось, что если фагоустойчивые мутанты возникают в результате контакта бактерий с фагом (гипотеза адаптации), то на всех чашках должно быть примерно одинаковое число колоний. Если же мутанты возникают спонтанно, то число их в каждой пробирке, содержащей по 0,5 мл культуры, а следовательно, и колоний на чашке будет разное. Это зависит от времени возникновения мутации: число мутантов будет большим там, где мутации произошли раньше, соответственно и колоний здесь будет больше. При анализе культуры из одной пробирки больших колебаний в числе фагоустойчивых клеток не должно наблюдаться.

Подсчет выросших фагоустойчивых колоний показал, что число колоний в пробах из разных пробирок (по 0,5 мл) сильно колебалось (флуктуировало), тогда как число их из пробы, взятой из одной пробирки (10 мл), было примерно одинаковым. Эти данные позволили заключить, что мутации фагоустойчивости происходили спонтанно, до контакта с фагом и в разное время развития культуры.

Аналогичные результаты были получены в еще более простом опыте Ньюкомба (перераспределительный тест). Культура кишечной палочки, чувствительная к фагу, высевалась на чашки с питательным агаром и инкубировались 6 ч (до появления микроколоний). Затем на ряде чашек производилось перераспределение (перерассев) колоний шпателем, остальные оставались нетронутыми (контроль). После этого все чашки засевались фагом, повторно инкубировались и подсчитывалось число колоний, выросших из

фагоустойчивых клеток. Оказалось, что на чашках, где было произведено перераспределение, оно было значительно большим, чем на контрольных. Если бы фагоустойчивые мутанты возникали только при контакте с фагом (прямая адаптация), то число колоний на опытах и контрольных чашках было бы примерно одинаковым. Если же они возникают самопроизвольно (спонтанно) до контакта с фагом, то в зависимости от времени их образования может появиться колония мутантных клеток, при перераспределении которых каждая из них даст колонию фагоустойчивых клеток. Поэтому на чашках, где было произведено перераспределение, число таких колоний оказалось значительно большим.

Результаты опытов Г. Ньюкомба, как и более ранние опыты С. Луриа и М. Дельбрюка, доказали спонтанность мутаций у микроорганизмов и несостоятельность гипотезы «прямой адаптации».

Мутации у микроорганизмов возникают ненаправленно, до воздействия селектирующего агента. В одной бактериальной культуре могут содержаться мутанты, устойчивые или чувствительные к разным агентам. Это легко выявить методом отпечатков, или реплик, исключающим всякий контакт клеток с селективным агентом. Сущность метода состоит в следующем. На цилиндр с диаметром, немного меньшим диаметра чашки Петри, закрепляется стерильный бархат (ворсом наружу). На него слегка накладывается матричная чашка (чашка, из которой производится пересев или «перепечатка» колоний), и в результате на ворсинках бархата остается часть клеток. Затем на бархатный штамп накладываются чашки-реплики (чашки, на которые пересеваются колонии) и клетки с ворса попадают на питательную среду. В зависимости от состава среды на ней могут развиваться не все колонии исходной чашки. Используя различные селективные среды, из колоний, выросших на матричной чашке, можно отобрать различные мутанты: фотоустойчивые, антибиотикоустойчивые, ауксотрофные. Но при этом надо одновременно производить пересев на селективную и полноценную среду и точно фиксировать место расположения колоний в чашке. Таким путем производится непрямой отбор мутантов.

Применение прямых и косвенных методов показало, что устойчивость бактерий к фагам, антибиотикам, ауксотрофность

мутагенными, а мутации, возникающие в результате их действия, - индуцированными.

Возможность искусственного индуцирования мутаций впервые была показана Г. А. Надсоном и Г. С. Филипповым (1925). Они первыми обнаружили мутагенное действие лучей Рентгена на дрожжи. Затем в 1927 г. Г. Меллер подтвердил мутагенность рентгеновских лучей и возможность индуцированного мутагенеза на дрозофиле. Позднее, в 1938 г., И. Раппопорт установил, что химические вещества также вызывают мутагенный процесс.

Мутагены по своей природе делятся на две большие группы: физические и химические. К физическим мутагенам относят рентгеновские лучи, α- и β-частицы, γ-лучи, испускаемые радиоактивными элементами, нейтроны, ультрафиолетовые лучи (УФ), низкие и высокие температуры; к группе химических мутагенов - азотистую кислоту, аналоги азотистых оснований, алкилирующие вещества и ряд других соединений. Это более «мягкие» мутагены, чем физические, они реже дают летальный эффект, так как действуют избирательно.

В основе механизма действия мутагенов лежит их прямое или косвенное влияние на ДНК или на ее предшественников - основания. Многие химические агенты изменяют состав оснований ДНК, вызывая тем самым ошибки при репликации. Например, азотистая кислота дезаминирует аденин, гуанин, цитозин. Аденин при этом превращается в гипоксантин и спаривается не с тимином, а с цитозином. В результате появляется пара не АТ, а ГЦ (пурин-аденин заменяется пурином-гуанином; пиримидин может заменяться другим пиримидином). Такого рода изменения, т. е. замена одного основания другим, одинаковым по типу, называются *транзициями*.

Алкилирующие агенты (например, этиленимин, азотные и серные аналоги иприта), являющиеся наиболее сильными мутагенами, обусловливают образование алкилированных производных азотистых оснований. Последние отщепляются от цепи ДНК, вследствие чего возникают бреши (пропуски). При репликации в это место могут вставляться несоответствующие им «неправильные» основания.

УФ-облучения приводят к образованию в ДНК димеров тимина (см. гл. 6).

Типы мутаций. Как спонтанные, так и индуцированные мутации являются результатом нарушения нуклеотидной последовательности в ДНК. Они могут затрагивать либо только один ген (генные мутации), либо большее количество генов (хромосомные мутации).

Если изменения происходят в одном нуклеотиде, мутации называются точковыми. Точковые мутации по характеру изменений в ДНК можно разделить на транзиции, трансверсии, мутации со сдвигом рамки (вставка лишнего нуклеотида или выпадение - делеции).

Как указывалось выше, простые замены, или транзиции, заключаются в замещении одной пары пурин-пиримидин на другую пару пурин-пиримидин, т. е. происходит замещение АТ на ГЦ или ГЦ на АТ. Это значит, что пурин в одной из цепей замещается другим пурином, а пиримидин в комплементарной цепи - другим пиримидином.

При *трансверсиях* (перекрестные замены) пара пурин-пиримидин замещается парой пиримидин-пурин. Трансверсии, как и транзиции, часто возникают спонтанно.

Мутации со сдвигом рамки, обусловленные вставкой или выпадением нуклеотида, нарушают нормальную последовательность «считывания» нуклеотидных триплетов. В процессе репликации ДНК в новообразованную комплементарную цепь «напротив» вставленного нуклеотида также включается лишний нуклеотид. При последующей репликации продолжают синтезироваться цепи с лишним основанием.

Делеции относятся также к мутациям со сдвигом рамки, но в отличие от последних обусловлены выпадением одного основания. Делеции могут возникать в результате гидролитического отщепления пуринового основания (например, при повышении температуры), а также под действием алкилирующих или дезаминирующих веществ, которые приводят к образованию азотистых оснований, неспособных к комплементарному спариванию.

На жизнеспособности клетки точковые мутации сказываются по-разному. Транзиции и трансверсии - сравнительно «мягкие» мутации, поскольку в худшем случае обусловливают замену только одной аминокислоты в соответствующей полипептидной цепи (а иногда в силу вырожденности генетического кода вообще не происходит аминокислотной замены). Дефектный белок с одной замененной аминокислотой функционально не отличается от нормального белка. Такие мутации, при которых не происходит функциональных изменений, называются *молчащими мутациями*. Вставки и делеции чаще всего летальны для клетки, так как вызывают неправильное считывание ДНК за пределом мутировавшего участка.

У микроорганизмов с точковыми мутациями наблюдаются обратные мутации, приводящие к возврату исходных свойств, т. е. к дикому типу. Обратные мутации могут происходить путем истинной реверсии, например восстановлением первоначальной пары оснований. Если прямая мутация произошла в результате замены АТ на ГЦ, то реверсия сводится к обратной замене ГЦ на АТ. Такие организмы называются *ревертантами*. Однако мутанты могут ревертировать к дикому типу и в результате вторичной мутации, произошедшей в другом, отдаленном от первой мутации, участке ДНК. Такая мутация может оказать подавляющее (супрессорное) действие на свойство, возникшее в результате первой мутации. Такие мутации называются *супрессорными*. В противоположность истинным реверсиям образовавшиеся таким путем ревертанты фенотипически отличаются от организмов дикого типа меньшей выраженностью исходных функций.

Мутации, возникающие в результате делений, чрезвычайно стабильны. У делеционных мутантов ни истинные, ни супрессорные реверсии невозможны.

Влияние мутаций на свойства фенотипа проявляется обычно через изменение структуры белка вследствие нарушений транскрипции или трансляции. По характеру изменений фенотипа различают морфологические, физиологические и биохимические мутации. К морфологическим относятся мутации, приводящие к видимым изменениям - формы клеток, колонии и пигментации; к физиологическим - мутации, влияющие на жизнеспособность,

скорость роста; к биохимическим - все мутации, нарушающие синтез и активность ферментов, вызывающие нарушения в метаболических путях. Результатом проявления биохимических мутаций является образование ауксотрофных мутантов, которые в отличие от микроорганизмов дикого типа - прототрофов - неспособны синтезировать необходимые для жизнедеятельности вещества - аминокислоты, витамины и т. д. К биохимическим мутациям относятся также все изменения, нарушающие синтез ферментов, участвующих в репликации ДНК, репарации повреждений, транскрипции и трансляции.

Некоторые генные мутации могут вызвать изменения сразу нескольких свойств организма. Они получили название плейотропных - множественных. Примером может служить мутация, инактивирующая фермент биосинтеза капсульного полисахарида бактерий. Следствием ее является потеря клеткой способности к образованию капсулы, изменение морфологии колоний и, в случае патогенных бактерий, потеря вирулентности.

Плейотропное действие мутация оказывает в том случае, когда затрагивает ген, продукт которого (белок) выполняет несколько функций.

Примером плейотропных мутаций является также мутация гена, кодирующего синтез одного из минорных оснований, входящих в состав транспортных РНК. В результате такой мутации при повышенной температуре синтезируются дефектные тРНК, что может привести к нарушению трансляции и гибели мутантных клеток.

Генные мутации являются причиной большинства изменений морфологических, физиологических и биохимических свойств микроорганизмов.

Репарация повреждений. Большинство повреждений ДНК, вызываемых физическими и химическими агентами, исправляются с помощью специальных механизмов репарации, направленных на восстановление целостности структуры ДНК. Действие механизмов репарации обеспечивается конструктивными и индуцибельными ферментами.

Лучше других изучены процессы репарации повреждений ДНК, вызванные действием УФ-облучения. Еще в 1949 г. было установлено, что освещение видимым светом (с длиной волны больше 400 нм) дрожжей, облученных летальной дозой УФ, восстанавливает их жизнеспособность на 25-50 %. Это явление получило название фотореактивации.

В основе фотореактивации лежит действие фермента дезоксириботидпиримидинфотолиазы, который связывается с пиримидиновым димером и, используя энергию поглощаемого света (наиболее эффективен голубой свет), расщепляет его на мономеры. Фотореактивация распространяется только на одну цепь ДНК, независимо от того, одно- или двухцепочечная молекула повреждена.

Более универсальным механизмом восстановления повреждений является темновая репарация. Она имеет место не только после УФ-облучения, но и после действия ионизирующей радиации, алкилирующих соединений и др. В отличие от фотореактивации темновая репарация не нуждается в энергии света. Сущность ее состоит в вырезании димеров и восстановлении целостности поврежденной нити. Поэтому темновую репарацию называют эксцизионной (эксцизия - вырезание). Темновая репарация имеет свою особенность - восстановление одноцепочечных повреждений происходит лишь в том случае, когда не

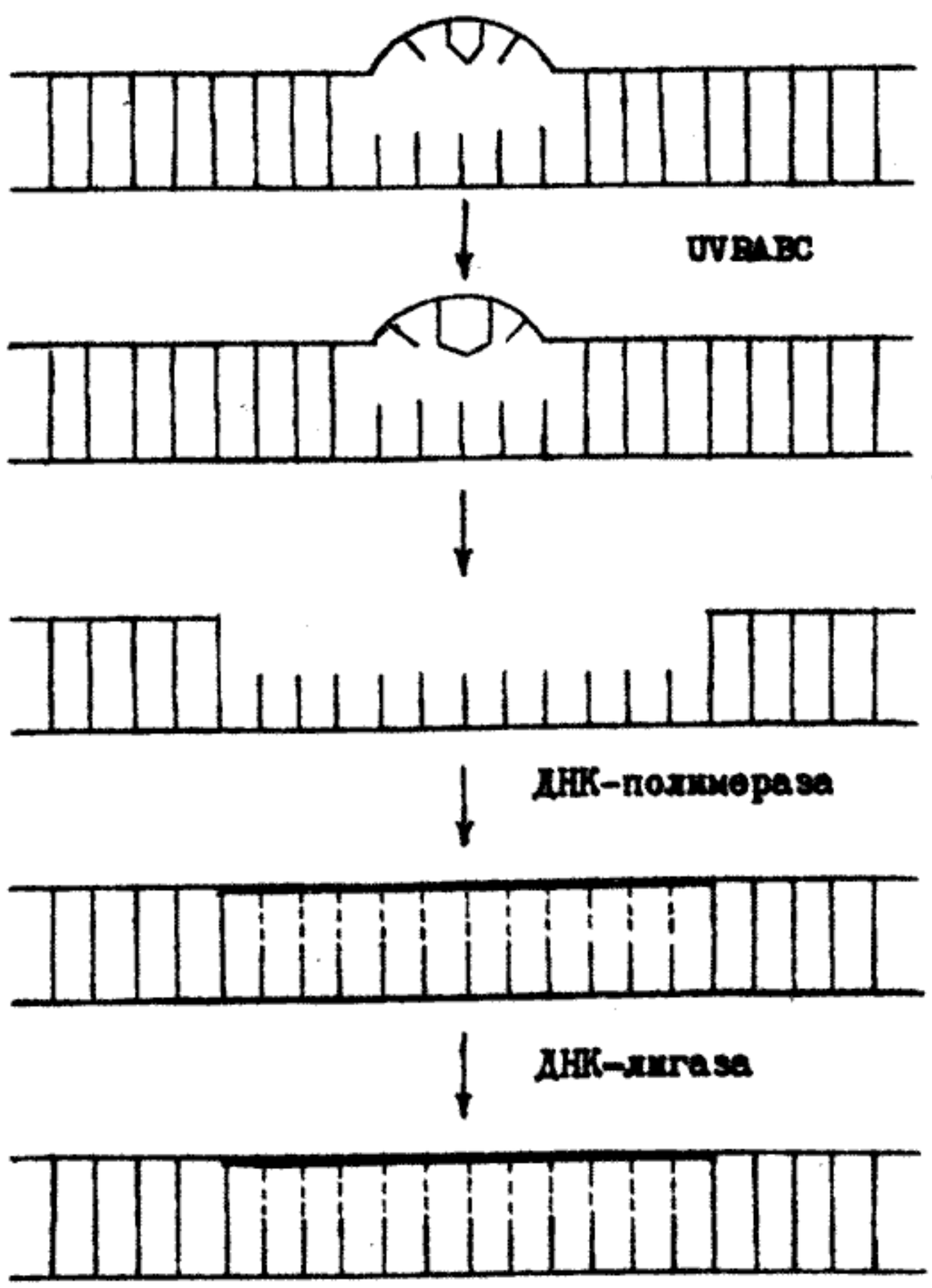


Рис.10.1. Репарация участка ДНК, содержащего димер тимина

повреждена комплементарная цепь. Двухцепочечные повреждения клетка не способна репарировать.

В темновой репарации ведущую роль играют четыре ферментативные реакции, которые определяют четыре этапа репарации (рис. 10.1).

На первом этапе эксцизионная нуклеаза UVRABC (от англ. ultraviolet radiation - UVR, A, B, C - обозначения белков, кодируемых генами UVR), обладающая эндонуклеазной активностью, «узнает» повреждения и надрезает нить ДНК по обе стороны вблизи пиримидинового димера. Затем, под действием этого же фермента надрезанный участок нити, включающий 12-13 нуклеотидов вместе с димером, удаляются. Образовавшаяся брешь заполняется фрагментом комплементарной нити ДНК, образующейся в ходе репаративного синтеза (ресинтеза). Эту реакцию катализирует ДНК-полимераза I, которая для синтеза необходимого фрагмента ДНК использует в качестве матрицы неповрежденную комплементарную цепь. Новосинтезированный фрагмент и неповрежденный остаток цепи соединяются ДНК-лигазой. Целостность молекулы ДНК восстанавливается.

Репарирующая способность клетки в значительной степени определяет исход первичных повреждений и, таким образом, резистентность клетки к облучению.

Мутанты, утратившие способность к темновой репарации, обладают повышенной чувствительностью к летальному действию ультрафиолета.

Изучение механизмов репарации генетического аппарата имеет общебиологическое значение. Не только микроорганизмы, но и клетки высших организмов - человека и животных - обладают репарирующими системами, которые способны восстанавливать повреждения, возникающие в результате действия радиации и других мутагенных факторов.

10.2.2. Практическое применение мутантов микроорганизмов

Получение новых форм микроорганизмов с наследственно закрепленными полезными свойствами имеет большое значение для

практической микробиологии. Такая возможность впервые была открыта Г. А. Надсоном. Он явился основоположником радиационной микробиологии. Еще в 1925 г. совместно со своим учеником Г. С. Филипповым, воздействуя лучами Рентгена на низшие грибы, он получил новые расы, отличающиеся морфологическими и физиологическими признаками, стойко сохраняющимися в ряде поколений.

Однако широкое признание исследования Надсона получили лишь в 40-х годах, когда в результате воздействия рентгеновскими и УФ-лучами на продуцент пенициллина - Pen. chrysogenum были получены штаммы, обладающие в 2 раза большей продуктивностью по сравнению с исходным штаммом. Дальнейшее применение мутагенных факторов в сочетании с тщательным отбором позволило в 100 раз повысить продуктивность гриба. Если самые продуктивные из диких штаммов Pen. chrysogenum в оптимальных условиях давали около 100 мкг/мл пенициллина, то мутантные штаммы этого гриба образуют до 100 000 мкг/мл пенициллина.

Кроме повышения биосинтетической способности продуцента, применение УФ-лучей дало возможность получить его беспигментный мутант. Это сыграло большую роль в пенициллиновой промышленности, так как существенно облегчило процесс химической очистки готового продукта.

Значительное увеличение продуктивности достигнуто при селекции других продуцентов антибиотиков, таких как Act. streptomycini - продуцент стрептомицина, Act. aureofaciens - продуцент хлортетрациклина и др.

В настоящее время почти все антибиотики вырабатываются путем применения мутантных штаммов. Успехи мутационной селекции продуцентов антибиотиков легли в основу разработки новых методов селекции других полезных форм микроорганизмов: продуцентов аминокислот, витаминов, ферментов.

Среди продуцентов аминокислот особое место занимает биохимический мутант продуцента лизина. Он синтезирует в 300-400 раз больше лизина, чем обычные естественные штаммы, в то время как самые лучшие из изученных природных штаммов в оптимальных условиях ферментации синтезируют не более 0,4-0,6 мг лизина на 1 мл среды.

Под действием УФ-лучей и радиоактивного кобальта были получены ауксотрофные мутанты Bac. subtilis и M. glutamicus, обладающие высокой способностью к биосинтезу данной аминокислоты (до 25 г/л). Широкое применение в производстве мутанта M. glutamicus (ауксотрофный по гомосерину) привело к значительному снижению себестоимости лизина, и его начали использовать в качестве добавки в растительные корма животных. Применение мутантов в производстве аминокислот микробиологическим методом вытесняет старые промышленные методы химического синтеза и выделения их из гидролизатов белков.

Индуцированные мутанты занимают ведущее место в разных отраслях микробиологической промышленности. Фундаментальные достижения теоретической генетики позволили в короткий срок добиться значительных успехов в области селекции промышленных микроорганизмов путем совершенствования традиционных методов получения мутантов в сочетании с методами генной инженерии.

10.3. РЕКОМБИНАЦИЯ У БАКТЕРИЙ

Наследственные изменения появляются не только в результате мутаций, но и вследствие рекомбинаций, т. е. изменения комбинации генов хромосомы или плазмиды. Рекомбинация имеет место в тех случаях, когда в реципиентную клетку проникает фрагмент чужеродной ДНК и взаимодействует с геномом этой клетки. Результатом взаимодействия является встраивание фрагмента ДНК в геном (ДНК) клетки и образование рекомбинантной молекулы ДНК, или рекомбинантной хромосомы.

Рекомбинация у бактерий происходит при трансформации, конъюгации и трансдукции. Эти три способа генетического обмена обеспечивают перенос ДНК из бактерии-донора в бактерию-реципиент. Фрагмент ДНК, поступающий от донорской клетки, называется экзогенотой, а геном реципиента - эндогенотой. При рекомбинации происходит обмен или интеграция экзогеноты с эндогенотой, образование рекомбинанта, а в последующем, при делении клетки, - рекомбинантного потомства. Рекомбинанты обладают признаками реципиентной и донорной клетки. Но так как в реципиентную клетку переносится и участвует в рекомбинации

лишь небольшая часть генетического материала (от одного до нескольких генов, то, во-первых, реципиентная клетка становится диплоидной (временно) только в отношении небольшой части своего генома - образуется неполная зигота - мерозигота (от лат. meros - часть); во-вторых, рекомбинанты сохраняют в общем генотип реципиента, приобретая лишь отдельные признаки донора.

У бактерий различают три типа генетической рекомбинации: 1 - общая гомологичная, 2 - сайт-специфическая, 3 - негомологичная.

При общей гомологичной рекомбинации ДНК донора рекомбинирует с ДНК реципиента путем реципрокного (взаимодополняющего) обмена. При этом взаимодействуют гомологичные участки ДНК, т. е. участки, имеющие одинаковую нуклеотидную последовательность. Двойные нити ДНК сближаются и обмениваются однонитевыми гомологичными участками, а затем в результате репликации образуется рекомбинантная молекула ДНК. Гомологичная рекомбинация контролируется геном rec A. Мутанты, дефектные по этому гену (rec$^-$), не способны к гомологичной рекомбинации.

Сущность сайт-специфической рекомбинации состоит в том, что фрагмент донорной двухцепочечной ДНК встраивается в строго определенный участок реципиентной ДНК. Например, фаг λ всегда включается в хромосому бактерий только между gal-опероном и биотиновой областью (геном bio). Это включение обеспечивает кодируемый фагом белок-интеграза. При участии данного белка кольцевая ДНК фага своим участком att^{8}B присоединяется к соответствующему участку att λ бактериальной ДНК, расположенному как раз между генами gal и bio. Затем путем разрыва и перекрестного воссоединения двойных нитей ДНК фага и клетки-хозяина (E. coli) осуществляется рекомбинация, т. е. ДНК фага включается в геном клетки-хозяина.

Рекомбинация по способу разрыва и перекрестного воссоединения нитей ДНК аналогична кроссинговеру у эукариот. В начале процесса в области генетической гомологии между фрагментом ДНК донора и хромосомой реципиента осуществляется синапс - спаривание. Затем в этом же участке происходит разрыв двойных нитей ДНК и их перекрестное соединение. Недостающие

сегменты ДНК для соединения нитей синтезируются ДНК-полимеразой клетки. Соединение концов нитей ДНК осуществляется: полинуклеотидлигазами, завершающими рекомбинацию. Образовавшаяся рекомбинантная эндогенота реплицируется и признаки наследуются в поколениях, а рекомбинантная экзогенота разрушается клеточной экзонуклеазой сразу после образования.

К негомологичной рекомбинации относят рекомбинационные процессы, происходящие между фрагментами ДНК, не имеющими заметной генетической гомологии. Как и сайт-специфическая рекомбинация, она осуществляется путем разрыва и перекрестного воссоединения ДНК, т. е. является интеграционной. Данный тип рекомбинации присущ транспозонам, вставочным последовательностям (JS-элементам) и фагу μ (мю).

Рекомбинация в природе играет существенную роль в эволюции бактерий, так как увеличивает число разнообразных комбинаций генов для естественного отбора.

10.4. МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА И ОБМЕНА ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У БАКТЕРИЙ

Бактерии подобно высшим организмам обладают способностью к обмену генетического материала, но существенно отличаются от последних способами передачи его от донорной клетки к реципиентной. Обмен генетического материала у бактерий имеет место при трансформации, конъюгации и трансдукции. Исторически у бактерий раньше других описано явление трансформации.

10.4.1. Трансформация

Трансформация (превращение, перестройка) - это изменение генома бактерии-реципиента под влиянием поглощенной из среды свободной ДНК, выделенной из бактерии-донора. Трансформацию может осуществлять только ДНК, включающаяся в геном реципиента. Ее источником могут быть свежеубитые бактерии или чистые препараты, экстрагированные из бактерий. Поэтому для

получения трансформантов реципиентные бактерии выращивают на средах, содержащих чистую ДНК или убитые клетки доноров.

Трансформация была открыта в 1928 г. английским ученым Ф. Гриффитсом. Он установил превращение бескапсульного пневмококка R-типа в капсульный вирулентный S-тип. Заражая мышей смешанной взвесью живых бескапсульных авирулентных пневмококков и убитых нагреванием капсульных вирулентных пневмококков, Ф. Гриффитс наблюдал гибель животных, из крови которых выделял наряду с бескапсульными и капсульные пневмококки. Автор пришел к заключению, что бескапсульные варианты приобрели способность образовывать капсулу под влиянием капсульных пневмококков, несмотря на то, что последние были мертвыми. Однако природу трансформирующего вещества Ф. Гриффитс не установил. Он считал, что ответственными за образование капсулы являются полисахариды капсульных пневмококков S-типа.

Опыты Ф. Гриффитса по трансформации капсулы у пневмококков подтвердились исследователями. Так, в 1931 г. М. Даусон и Р. Сиа описали аналогичную трансформацию in vitro, выращивая клетки R-типа в бульоне, содержащем клетки пневмококков S-типа, убитые нагреванием. Позднее С. Алловий (1933) показал, что такие же превращения R-типа в S-тип можно получить, использовав бесклеточные экстракты капсульных пневмококков.

Хотя трансформацию бескапсульных пневмококков наблюдали многие исследователи, природа трансформирующего агента оставалась неизвестной. И только в 1944 г. О. Эвери с сотрудниками выделил трансформирующее вещество из капсульных убитых пневмококков и исследовал его свойства. Оно оказалось чувствительным к ДНК-азе. Применение высокоочищенного препарата ДНК-азы показало, что он подавляет активность трансформирующего вещества. Это явилось неоспоримым фактом того, что трансформацию вызывает ДНК. Дополнительные доказательства были получены в опытах с использованием ДНК, максимально очищенной от примесей белка, полисахаридов и других клеточных компонентов. Эта ДНК проявила высокую активность: в разведении 1: 600 млн она способна была вызвать специфическую трансформацию.

Установление трансформирующей роли ДНК явилось решающим аргументом в пользу того, что генетическая информация находится в ДНК, а не в белке, как предполагали.

Возможность передачи признаков посредством ДНК от донорной к реципиентной клетке была показана и на других видах бактерий и бацилл: Rhizobium, Neisseria, Bac. subtilis.

Трансформирующей активностью обладает лишь высокомолекулярная ($M \geq 10^5$) двухцепочечная ДНК, хотя в геном реципиента включается только одна цепь, а другая разрушается ДНК-азой реципиентной клетки.

Бактериальные клетки различаются по способности к трансформации. Это зависит от их генетических способностей: от выделения ДНК-азы, образования капсулы, препятствующей проникновению ДНК, от состава среды, влияющей в свою очередь на физиологическое состояние клеток, и др.

Оптимальное физиологическое состояние клеток, в котором они способны к поглощению чужеродной ДНК, называется компетентностью. Компетентность обусловлена появлением на поверхности клетки особого антигена - фактора компетентности, который является низкомолекулярным белком и играет роль специфического ДНК-связывающего рецептора. Инициируют компетентность три белка: автолизин, ДНК-связывающий белок и эндонуклеаза I. В период развития компетентности происходят изменения структуры клеточной стенки, в результате чего стенка становится более пористой и проницаемой для ДНК.

Процесс трансформации разделяют на несколько стадий: 1) присоединение ДНК к поверхностным рецепторам реципиентной клетки; 2) проникновение ДНК в клетку; 3) превращение проникшей двухцепочечной ДНК в одноцепочечную; 4) рекомбинация проникшей ДНК с ДНК реципиента; 5) фенотипическое выражение поглощенного гена (или генов). На первой стадии трансформирующая двухцепочечная ДНК связывается с поверхностным рецептором компетентной клетки. В этот период она чувствительна к ДНК-азе. Затем, сразу после присоединения перед проникновением в клетку эндонуклеазы, находящиеся в периплазматическом пространстве клетки надрезают поочередно обе цепи ДНК с образованием более коротких фрагментов двухцепочечной ДНК ($5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ п. н.).

Эти фрагменты подвергаются действию экзонуклеаз, которые разрушают одну цепь ДНК. В клетку проникает фрагмент одноцепочечной ДНК. Для проникновения используется энергия трансмембранного потенциала ($\Delta\overline{\mu}_{н^+}$). Далее следует рекомбинация одноцепочечного фрагмента с двухцепочечной ДНК реципиента и образование трансформантов (рекомбинантов). Так как при трансформации передается небольшой фрагмент ДНК донора, то образующиеся трансформанты обычно обладают одним новым признаком. Иногда могут трансформироваться и два признака. Это имеет место в тех случаях, когда поглощенный фрагмент ДНК содержит тесно сцепленные гены или клетка трансформирована двумя фрагментами ДНК-донора. Частота трансформации более высока, если донором и реципиентом являются бактерии одного вида. Трансформация может иметь место и между бактериями разных видов, но с очень низкой частотой образования трансформантов. Так, частота трансформантов Haemophilus influensae, устойчивых к стрептомицину, при трансформировании бактерий ДНК, полученной из клеток этого же вида, составляет $1 \cdot 10^{-3}$, при трансформировании бактерий другого вида (H. suis) выход рекомбинантов в 10^4 раз ниже.

Путем трансформации передаются разные свойства: образование капсул, устойчивость к антибиотикам, способность к синтезу аминокислот, витаминов и др.

По своей природе к трансформации близка трансфекция. Это перенос генетической информации фага компетентным клеткам бактерий посредством ДНК, выделенной из частиц фага. В таких клетках, инфицированных фаговой ДНК, происходит развитие нормальных, полноценных фагов. Трансфекцию удалось осуществлять не только с помощью ДНК фагов, но и ДНК вирусов животных.

10.4.2. Конъюгация

Конъюгация (спаривание) - передача генетического материала от донорной к реципиентной клетке при их непосредственном контакте. Конъюгация осуществляется только между клетками разного пола. Пол у бактерий определяется наличием или

отсутствием полового фактора – F-фактора, который представляет собой кольцевую молекулу ДНК и относится к категории плазмид. Бактерии, которые содержат F-фактор, являются бактериями мужского типа и служат донорами генетического материала. Другие бактерии не имеют F-фактора - это бактерии женского типа. Они являются реципиентами генетического материала, передаваемого донорными штаммами.

Конъюгация прокариот является аналогом полового процесса эукариот.

Открытие конъюгации бактерий принадлежит Дж. Ледербергу и Е. Татуму (1946). Они использовали два ауксотрофных мутанта E. coli K-12, каждый из которых в отдельности не обладал способностью синтезировать две аминокислоты. Один был ауксотрофным по аминокислотам *A* и *B*, но синтезировал кислоты *C* и *D* $(A^-B^-C^+D^+)$, другой мутант был комплементарен $(A^+B^+C^-D^-)$. На минимальной среде эти мутанты раздельно не росли. При высеве смеси их на ту среду появлялись колонии, клетки которых обладали способностью синтезировать все 4 аминокислоты, т. е. это были генетические рекомбинанты двух реципрокно дефектных (взаимодополняющих) родительских клеток. Однако в этом опыте не исключалась возможность появления рекомбинантного потомства под влиянием веществ, обладающих трансформирующей активностью.

Наиболее убедительные доказательства образования генетических рекомбинантов в результате конъюгации были получены Б. Дэвисом. В одно колено *U*-образной трубки, разделенной стеклянным пористым бактериальным фильтром, помещался один ауксотрофный штамм бактерий, в другое - другой. Наличие пористого фильтра исключало физический контакт бактерий, но не препятствовало диффузии трансформирующих веществ из одного колена в другое. Спустя некоторое время из содержимого каждого колена производился высев бактерий на минимальную среду, однако ни в одном из них прототрофов не было обнаружено, т. е. рекомбинанты не образовывались. Когда же оба родительских штамма засевали в одно и то же колено трубки, что позволяло клеткам вступать в прямой контакт, рекомбинанты появлялись.

Наличие такого контакта между клетками удалось наблюдать в 1957 г. непосредственно с помощью электронного микроскопа (рис. 10.2). Позже было установлено, что конъюгирующие клетки соединяются через конъюгационный мостик, образованный половой ворсинкой F-пили донорной клетки.

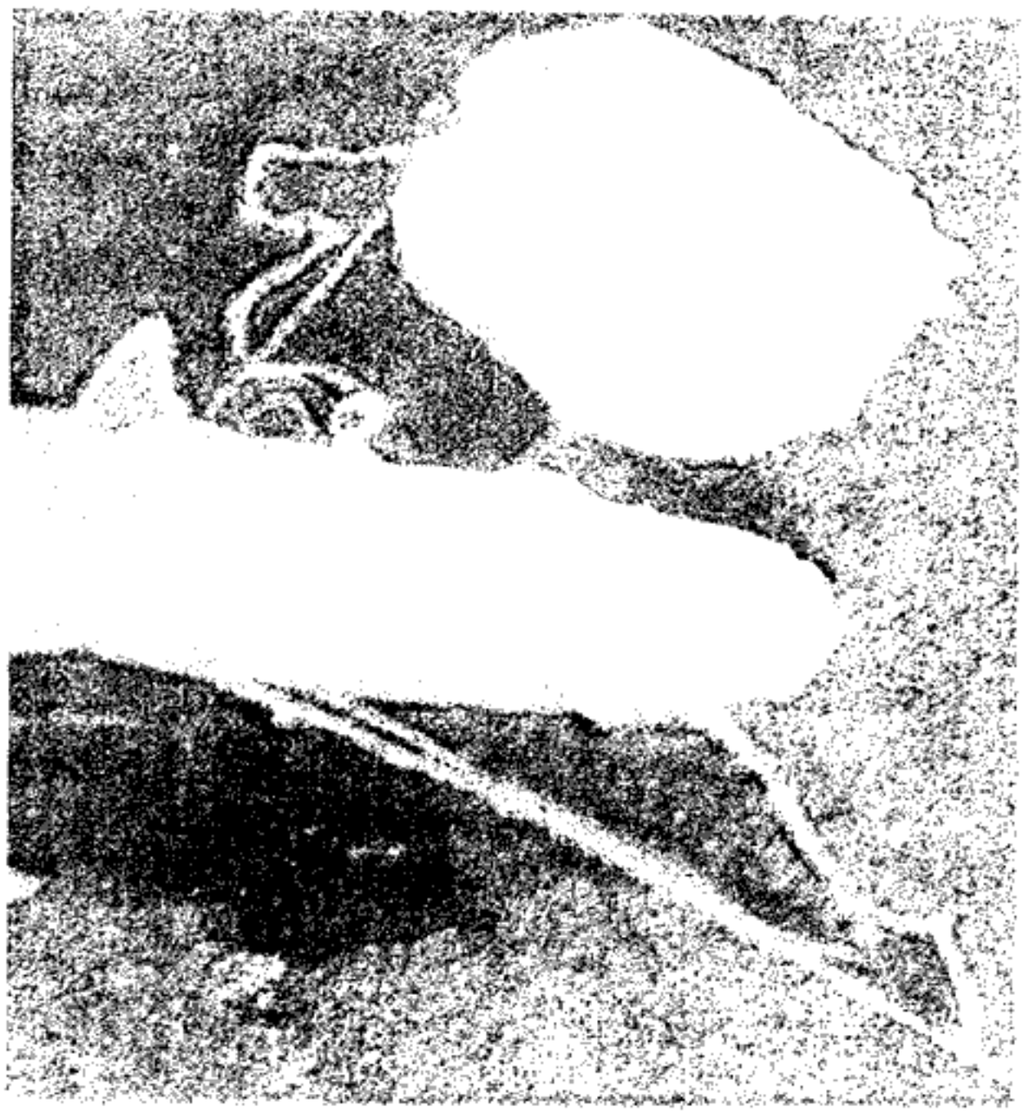


Рис.10.2.Конъюгация клеток E. coli

Сближению клеток способствует сокращение половой ворсинки или втягивание ее внутрь донорной клетки. Реципиентная клетка подтягивается к донорной до непосредственного контакта клеточных стенок. Репликация ДНК осуществляется по механизму «катящегося кольца» (рис. 10.3). Когда клетки вступили в контакт, в молекуле ДНК донорной клетки происходит одноцепочечный надрез, что создает условия для раскручивания двойной цепи. Одна из цепей, начиная с 5′-конца, передается в реципиентную клетку, другая остается в донорной. Одновременно с передачей происходит и репликация ДНК. По мере передачи и раскручивания цепи ферменты ДНК-полимеразы в донорной и реципиентной клетках одновременно синтезируют комплементарные цепи. Таким образом, от донора к реципиенту передается одна цепь, но в процессе передачи она

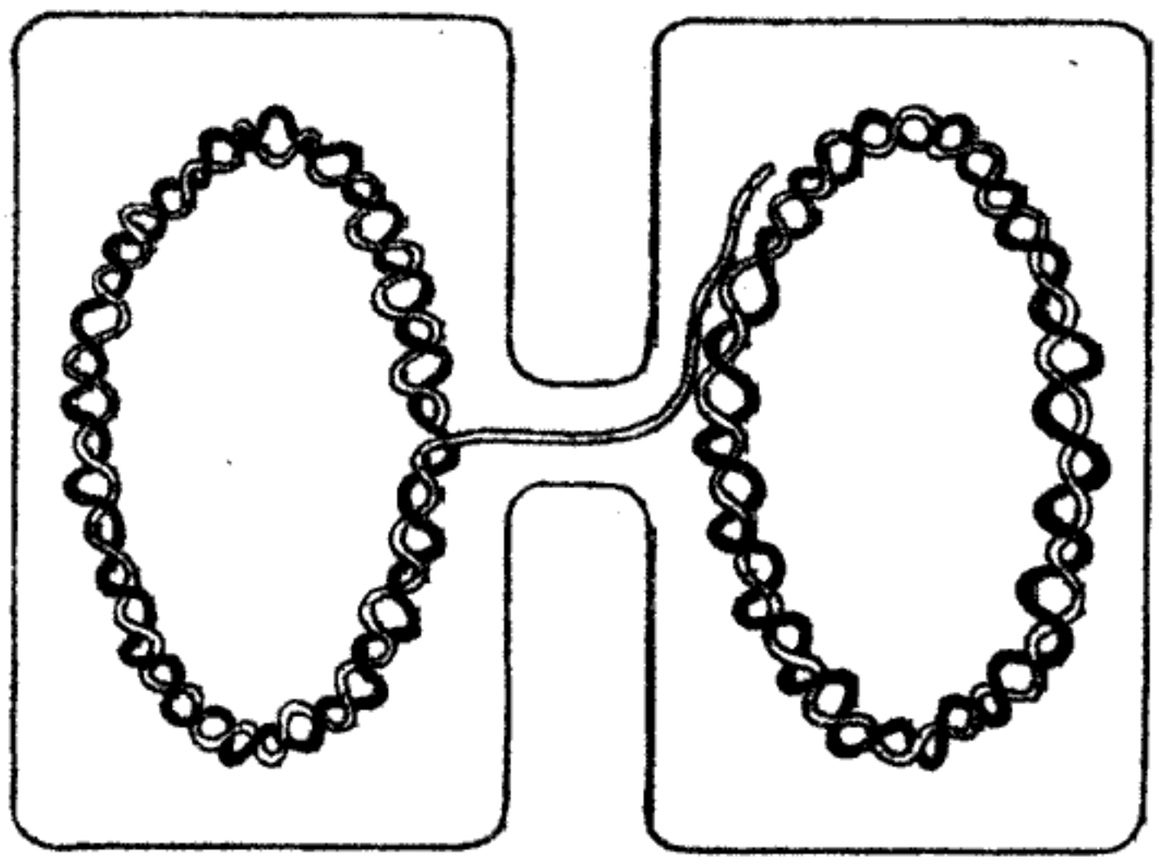


Рис.10.3. Передача ДНК от донорной клетки в реципиентную и репликация по механизму катящегося кольца (Дж. Уотсон, 1978)

достраивается и ковалентно замыкается в кольцевую структуру. Затем путем генетической рекомбинации она включается в хромосому реципиента, реплицируется и в результате деления клетки образуется рекомбинантное потомство. Анализ рекомбинантов показал, что клетка-донор передает реципиентной клетке лишь часть своего генома и только в редких случаях возможна передача его целиком. В связи с этим образуется мерозигота. Она содержит полный геном реципиента и лишь фрагмент генома донора.

Конъюгация - однонаправленный, или ассиметричный процесс, т. е. перенос генетического материала происходит в одном направлении - от донорной (мужской) клетки к реципиентной (женской).

10.4.3. Типы донорных клеток

В зависимости от состояния F-фактора и его положения в клетке различают три типа донорных клеток - F^+, Hfr и F′. В клетках первого типа F-фактор находится в свободном состоянии. При скрещивании их с реципиентными клетками происходит передача F-факторов и F^--клетки превращаются в донорные. F-фактор реплицируется и передается при скрещивании, независимо от репликации хромосомы клетки. Поэтому достаточно небольшого числа F^+-клеток в популяции, чтобы в короткий срок все F^--клетки превратились в донорные.

Второй тип донорных клеток происходит от F^+-клеток в результате включения F-фактора в бактериальную хромосому. Это осуществляется следующим образом. ДНК F-фактора, подобно бактериальной хромосоме, является кольцевой. В F-факторе содержится несколько участков, гомологичных (по нуклеотидной последовательности) ряду участков хромосомы. Эту гомологию обеспечивают IS-элементы, которые содержатся в F-факторе и хромосоме. Всего в F-факторе содержится одна копия IS2, две копии IS3 и транспозон Tn 1000, в хромосоме E. coli - до двенадцати копий IS2, шесть копий IS3 и в некоторых штаммах не меньше одной копии Tn 1000. Эти мигрирующие генетические элементы служат специфическими сайтами интеграции F-фактора в хромосому. По

одному из них может совершаться спонтанное спаривание (синапс) F-фактора и хромосомы. Затем путем кроссинговера F-фактор включается в последовательность хромосомы.

Так в процессе сайт-специфической рекомбинации, опосредованной IS-элементами, образуется штамм Hfr. Hfr-штаммы обладают той особенностью, что при скрещивании с F^--клетками передают им хромосомные маркеры (гены) с частотой, в 1000 раз большей, чем клетки F^+, т. е. в этом случае в потомстве обнаруживается гораздо больше рекомбинантов, чем при скрещивании F^+ и F^-. Отсюда их название Hfr, происходящее от начальных букв выражения High frequency of recombination, что в переводе с английского означает «высокая частота рекомбинации».

Характерным для данного типа клеток является и то, что образующиеся рекомбинанты почти всегда являются женскими, т. е. F-фактор передается чрезвычайно редко. Это обусловлено особенностями переноса хромосомы у Hfr-штаммов. Разрыв хромосомы и начало переноса определяются F-фактором. Перенос начинается всегда с проксимального О-конца (от англ. origin - начало) и идет в направлении, противоположном месту включения F-фактора.

Передача маркеров осуществляется последовательно по всей длине хромосомы. Последним передается F-фактор. Для передачи всей хромосомы необходимо 90-120 мин. Так как конъюгационный мостик непрочен (к тому же в процессе столь длительной передачи может нарушиться целостность хромосомы из-за ее хрупкости), F-фактор от Hfr-бактерий к F^--клеткам почти не передается.

Третий тип донорных клеток (F)′ происходит от Hfr-штаммов следующим образом: F-фактор может спонтанно отделяться от хромосомы, переходя в свободное состояние, унося при этом хромосомные маркеры. При конъюгации с F^--клетками F′-клетки с высокой частотой передают F-фактор. Кроме того, передаются и те хромосомальные маркеры, которые стали частью F-фактора. Это явление - перенос хромосомальных генов от донорной к реципиентной клетке F-фактором - получило название сексдукции. Клетки, в которых включился F-фактор, приобретают свойство донорных, но в отличие от F^+-клеток они способны передавать реципиентным клеткам не только F-фактор и собственную хромосому, но и те гены,

которые привнесены F-фактором, т. е. они обладают свойствами как F^+, так и Hfr-штаммами, за что и получили название промежуточных доноров.

10.4.4. Трансдукция

Трансдукция - это перенос генетического материала из одной бактериальной клетки в другую бактериофагом. Трансдукция была открыта в 1952 г. Н. Циндером и Е. Ледербергом на двух ауксотрофных мутантах Salmonella typhimurium. Опыт проводился в *U*-образной трубке, разделенной стеклянным ультратонким пористым фильтром. В одну часть ее помещали гистидин - зависимый штамм 2А, в другую - триптофан - зависимый штамм 22А. Спустя некоторое время в культуре штамма 22А появлялись прототрофы, синтезирующие триптофан. Было установлено, что штамм 22А содержал фаг (Р22), способный лизировать клетки штамма 2А. Проникая через стеклянный фильтр, фаг Р22 лизировал клетки штамма 2А. При этом высвобождался неизвестный агент, названный фильтрующимся. Этот агент проходил через фильтр и сообщал некоторым клеткам штамма 22А способность к синтезу триптофана. Поэтому при высеве культуры 22А на среду, не содержащую триптофан, появлялся рост этой культуры.

Изучение величины (по размерам пор фильтра), скорости седиментации, чувствительности к нагреванию этого фильтрующегося агента показало, что он идентичен таковыми фага Р22. На основании этого было сделано заключение, что содержащийся в культуре 22А фаг проходил через фильтр, инфицировал чувствительные к нему клетки штамма 2А и в процессе репродукции в состав своего генома включал фрагмент хромосомы бактерий этого штамма. Высвободившись из лизированных клеток, фаг проходил обратно в колено трубки, где были клетки штамма 22А. При инфицировании этих клеток фаг передавал им унесенный фрагмент хромосомы клеток штамма 2А, которые были независимы по триптофану. В результате интеграции этого фрагмента в хромосому клеток штамма 22А образовывались прототрофные рекомбинанты. В культуре штамма 2А прототрофы не появлялись, так как клетки лизировались.

Фаг может переносить гены, ответственные за различные свойства клетки: устойчивость к антибиотикам, токсинообразование, прототрофность. При трансдукции, как и при трансформации, переносятся только небольшие фрагменты ДНК - не более 1/100 длины бактериальной хромосомы.

Трансдуцирующими свойствами обладают только некоторые умеренные фаги, а именно: фаги, которые несут в составе своего генома фрагмент бактериальной хромосомы. Эти фаги дефектны: они не содержат полный набор собственных генов. Часть их генов остается в хромосоме бактерий (вместо взятых генов хромосомы).

Различают три типа трансдукции: общую, или неспецифическую, специфическую и абортивную.

Тип трансдукции определяется условиями формирования трансдуцирующих фагов.

Общая трансдукция осуществляется фагами, которые образуются в ходе литического цикла. При внутриклеточном размножении фага происходит разрушение бактериальной хромосомы и отдельные случайные фрагменты ее включаются в созревающие частицы фага. Размер включенного фрагмента определяется емкостью головки фага. Например, трансдуцирующий фаг P1 включает 2,3 % хромосомы E. coli, фаг P22, геном которого в 2,3 раза меньше, чем у P1 (следовательно, и емкость головки также меньше), включает 1 % хромосомы сальмонелл. У отдельных трансдуцирующих фагов вся их ДНК может быть заменена на бактериальную. Поэтому такие фаги могут переносить любые хромосомные гены и включаться в любой участок хромосомы реципиента. Фаги, обеспечивающие такую трансдукцию, могут переносить гены, контролирующие пищевые потребности бактерий, ферментативные свойства, устойчивость к лекарственным препаратам, серологические и вирулентные свойства, т. е. любые свойства донорной клетки.

Специфическая трансдукция осуществляется фагами, образовавшимися в результате индукции лизогенных бактерий (например, облучением их УФ), либо при спонтанном освобождении профага из хромосомы. В общих случаях формирующийся фаг при исключении из хромосомы может включать в свой геном только рядом расположенный сегмент хромосомы, оставив часть своего

генома в хромосоме. В отличие от фагов, осуществляющих общую трансдукцию, в геноме которых преобладает бактериальная ДНК, у фагов специфической трансдукции основную часть генома составляет фаговая ДНК. При лизогенизации чувствительных бактерий геном фага специфической трансдукции соединяется только с определенными участками і хромосомы бактерий, т. е. фаг имеет определенную точку прикрепления на хромосоме. Поэтому при освобождении такой фаг захватывает только рядом расположенную строго определенную область хромосомы бактерий и передает ее реципиентной клетке. Эта способность к специфической трансдукции была установлена у фага λ E. coli, который при лизогенизации клеток всегда фиксируется на бактериальной хромосоме рядом с генами, контролирующими ферментацию галактозы (галактокиназы и галактозилтрансферазы), и трансдуцирует их в клетку реципиента gal^-. При специфической трансдукции клетка-реципиент получает строго определенные гены.

Абортивная трансдукция происходит так же, как и неспецифическая, но фрагмент хромосомы донора, привнесенный фагом в реципиентную клетку, не включается в хромосому и не реплицируется, а располагается в цитоплазме клетки. Этот фрагмент при делении клетки передается только одной дочерней клетке, и только эта клетка несет новое свойство, контролируемое привнесенным геном донорной клетки.

Трансдукцию необходимо отличать от фаговой конверсии. При трансдукции любого типа изменения происходят лишь в тех инфицированных фагом клетках, в которые была внесена ДНК бактерий-доноров, т. е. которые были инфицированы трансдуцирующими фагами. Это весьма небольшое количество бактериальной популяции. Изменения, вызванные трансдуцирующими фагами, очень стойкие, передаются потомству и сохраняются даже тогда, когда клетка теряет фаг.

Фаговая, или лизогенная, конверсия - это изменения фенотипа (свойства клетки), обусловленные заражением клетки умеренным фагом. Изменения здесь вызывают гены фага. Они могут непосредственно контролировать синтез отдельного фрагмента или, взаимодействуя с бактериальными, приводить к изменению фенотипа клетки. Чаще всего фаговая конверсия затрагивает синтез

или активность ферментов, контролирующих образование клеточных компонентов, что сопровождается изменениями морфологии колоний. Так, лизогенизация шероховатых штаммов микобактерий приводит к образованию гладких колоний. Изменение испытывают все инфицированные фагом клетки (при трансдукции - одиночные). При фаговой конверсии изменения фенотипа бактерий сохраняются до тех пор, пока в клетке присутствует фаг.

10.5. ПЛАЗМИДЫ БАКТЕРИЙ

Кроме хромосомы, генетический материал у многих бактерий представлен внехромосомными наследственными структурами - плазмидами. Как и хромосома, плазмиды - суперспирализованные, ковалентно замкнутые кольцевые молекулы ДНК. Они способны автономно реплицироваться в цитоплазме клеток. Размеры плазмид разные. Самая мелкая из известных в природе плазмид - криптическая плазмида E. coli № 15 - составляет 1,5 мегадальтон, что позволяет ей кодировать всего лищь два белка средней величины. Плазмиды средних размеров составляют 50-70 мегадальтон (F-фактор). Известны и более крупные плазмиды. Например, плазмиды ризобий - размер около 600 мегадальтон, а также класс крупных плазмид псевдомонад.

В клетке плазмиды могут находиться в двух взаимно исключающих состояниях: автономном или интегрированном (включенном в хромосому). Плазмиды, способные к интеграции с хромосомой клетки-хозяина, называются эписомами.

Для осуществления интеграции плазмиды в хромосоме клетки должен существовать специфический сайт (участок нуклеотидной последовательности) интеграции. При наличии в плазмиде комплементарной нуклеотидной последовательности путем кроссинговера она включается в хромосому. Таким образом, способность плазмиды вести себя как эписома во многом определяется клеткой-хозяином - наличием в ее хромосоме соответствующих сайтов интеграции.

Свойствами эписом обладают разные плазмиды. Это половой фактор, ряд факторов колициногенности и факторов лекарственной устойчивости.

F-фактор (от англ. fertiliti - плодовитость) по размерам составляет 1,3-1,9 % бактериальной хромосомы, содержит около $5 \cdot 10^5$ нуклеотидных пар. В клетке может находиться в автономном или интегрированном с хромосомой состоянии. Наличие F-фактора придает клетке не только способность функционировать в качестве донора генетического материала, но обеспечивает иммунитет к заражению вторым F-фактором, детерминирует образование половых ворсинок - F-пилей, необходимых для осуществления конъюгации, а также адсорбции донорспецифических фагов; F-фактор мобилизует для конъюгативного переноса хромосомные гены и неконъюгативные плазмиды.

Col-факторы ответственны за образование клеткой бактериоцинов. Размер Col-факторов составляет $3 \cdot 10^4$ - $7 \cdot 10^4$ нуклеотидных пар. Подобно F-фактору Col-факторы придают клеткам свойства доноров, при этом может передаваться и Col-фактор. Особенностью Col-факторов является их потенциальная способность вызывать гибель клеток-хозяев. Обычно это связано с образованием клеткой бактериоцинов. Способностью к самостоятельному переносу обладают не все Col-плазмиды. Так, плазмиды Col E_1 и Col E_2 мобилизуются либо трансмиссибельными Col-плазмидами, либо F-фактором.

R-факторы (от англ. resistance - устойчивость) придают бактериальной клетке устойчивость к антибиотикам и другим лекарственным препаратам. Они также детерминируют образование половых ворсинок, но в то же время содержат гены репрессоров, регулирующих образование ворсинок. Поэтому в популяции R^+-клеток только немногие клетки образуют половые ворсинки (R-ворсинки) и являются активными донорами. Некоторые R-факторы, подобно F-фактору, способны обеспечивать перенос хромосомы (например, у E. coli). При конъюгации R-фактор с высокой частотой передается реципиентным клеткам. Причем, он может передаваться не только бактериям одного вида, но и разным видам. Результатом такого активного переноса R-фактора является нарастание числа лекарственно-устойчивых форм бактерий.

Механизм лекарственной устойчивости бактерий, детерминируемый плазмидными генами, отличается от механизмов, которые обеспечиваются хромосомными генами. Плазмидные гены

кодируют синтез ферментов, которые непосредственно инактивируют лекарственные препараты, а хромосомные гены устойчивости изменяют мишень действия лекарственного препарата на бактериальную клетку. Так, ген пенициллиназных плазмид (p^+) кодирует синтез фермента пенициллиназы (β-лактамазы) стафилококка. Фермент гидролизует β-лактамное кольцо, разрушая таким образом молекулу пенициллина. Многие штаммы бактерий могут содержать в клетке одновременно несколько плазмид, детерминирующих разные свойства.

По способности передаваться от одних клеток к другим путем конъюгации различают конъюгативные, или трансмиссивные, и неконъюгативные плазмиды. Конъюгативные плазмиды обладают собственными системами переноса. Они содержат tra-опероны, обьеспечивающие их перенос (от англ. transfer - перенос). К собственному переносу способны только крупные плазмиды, размером не менее 25 мегадальтон, например, F-факторы. Неконъюгативными являются мелкие, лишенные tra-генов плазмиды. К ним относятся некоторые колициногенные (Col E1, Col E2) и многие криптические плазмиды. Криптическими (скрытыми) называют плазмиды, у которых отсутствуют гены, кодирующие фенотипические признаки у бактерии-хозяина. Неконъюгативные плазмиды могут передаваться из одной клетки в другую совместно с конъюгативными или переноситься трансдуцирующими фагами.

В основу классификации плазмид положены их функциональные способности, т. е. кодируемые ими свойства бактерий-хозяев и особенности репликации. По функциональным способностям различают плазмиды лекарственной устойчивости, продукции бактериального синтеза токсинов гемолизинов, опухолеродные плазмиды, а также множество плазмид биодеградации. Последними особенно богаты бактерии рода Pseudomonas.

Благодаря наличию плазмид биодеградации псевдомонады способны катаболизировать необычные органические соединения, такие как камфора, толуол, нафталин, октан и использовать их в качестве единственного источника углерода. Ферменты, необходимые для расщепления каждого соединения, детерминируются плазмидными генами. Так, ферменты расщепления толуола кодируются «толуоловой плазмидой» (Tol-плазмида), ферменты

расщепления камфоры - «камфорной плазмидой» (CAM-плазмида), утилизации салицилата - SAL-плазмидой. Наличие разных плазмид обеспечивает бактериям явное преимущество в определенных условиях внешней среды.

Исходя из особенностей репликации, известные плазмиды классифицируют по группам несовместимости. Несовместимость означает неспособность двух плазмид стабильно существовать в одной клетке-хозяине. Несовместимыми являются обычно близкородственные плазмиды, характеризующиеся близкими размерами, гомологией ДНК, наличием одного сайта узнавания эндонуклеаз. Они относятся к одной группе несовместимости. Плазмиды энтеробактерий составляют 40 групп несовместимости, стафилококков - более 10 групп, столько же групп насчитывают плазмиды псевдомонад. Полагают, что несовместимость близкородственных плазмид обусловлена конкуренцией между ними за одно и то же место прикрепления на мембране для осуществления репликации. Совместимые плазмиды несут разные локусы, обеспечивающие прикрепление их к разным участкам мембраны и независимую друг от друга репликацию. Реплицируются только плазмиды, прикрепленные к мембране, а неприкрепленные элиминируются в процессе роста культуры.

Плазмиды не являются жизненно необходимыми для бактерий, развивающихся в обычных условиях. Но при изменении условий среды, например, замене источника питания или при появлении в среде бактерицидных веществ, присутствие плазмид в клетке может обеспечивать выживаемость не только отдельных бактерий, но в популяции в целом.

Плазмиды представляют большую ценность для генетических и молекулярно-биологических исследований. Они приобрели первостепенное значение в технике создания рекомбинантных молекул ДНК. В настоящее время плазмиды успешно используются как векторы (переносчики) генов в манипуляциях генетической инженерии, развитие которой связано с изучением плазмид.

10.6. МИГРИРУЮЩИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ (МГЭ)

В середине 70-х г. XX в. открыты подвижные генетические элементы. Они представляют собой сегменты ДНК, способные к транспозиции (перемещению) в пределах одного либо разных геномов. По степени сложности строения различают три типа мигрирующих генетических элементов: IS-элементы (от англ. insertion sequence - вставочные последовательности), транспозоны (Tn-элементы) и некоторые бактериофаги, в частности фаг $M_{ю}$.

Простейшими генетическими структурами, способными к транспозиции, являются IS-элементы. Размер их составляет в среднем 750-1500 пар нуклеотидов (п. н.). Они содержат только гены, обеспечивающие их собственное перемещение. В структуре IS-элементов различают центральную часть и ограничивающие (фланкирующие) концевые повторы. В центральной части расположены гены, кодирующие синтез белков, необходимых для транспозиции. Концевые участки представлены повторяющимися нуклеотидными последовательностями, длиной 8-40 п. н. Повторения имеют противоположную друг другу ориентацию и называются инвертированными (перевернутыми) повторами. Они служат отличительным признаком различных мигрирующих генетических элементов.

Структура концевых повторов определяет размеры дупликаций (удвоение) ДНК в местах внедрения IS-элементов. Так, IS1-элемент, обнаруженный в составе хромосомы E. coli-K12, состоит из 768 п. н., образующих на концах инвертированные повторы длиной по 30 п. н. каждый. Всякий IS-элемент имеет свою нуклеотидную последовательность и может в любой ориентации включаться в ДНК бактерий, плазмид и фагов, вызывая инактивацию отдельных структурных генов и, как следствие, мутации генома или нарушая регуляторные функции оперона. В бактериальной хромосоме может содержаться одновременно несколько копий одного и того же IS-элемента. Перемещение IS-элементов индуцирует разные виды хромосомных перестроек - дупликации, инверсии, делеции.

Транспозоны, или Tn-элементы - подвижные генетические элементы содержат гены фенотипических свойств бактерий и гены

собственной транспозиции. Они способны внедряться в разные участки хромосомы или во внехромосомные генетические структуры. Транспозоны отличаются от IS-элементов более сложной организацией, а некоторые содержат в своем составе IS-элементы.

Транспозоны разделяют на два класса: А и Б (рис. 10.4). Транспозоны класса А (Tn 5) в центральной части содержат структурные гены, которые детерминируют фенотипические свойства, например, устойчивость бактерий к антибиотикам, а гены транспозиции содержатся в составе концевых инвертированных повторов, которыми являются IS-элементы. У транспозонов класса Б (Tn 3) в центральной части содержатся не только гены фенотипических признаков, но и гены транспозиции. Концевые повторы их значительно короче и не могут выполнять функции транспозиции. Эти функции выполняют два гена центральной части. Различия между транспозонами класса А и класса Б состоят также в размерах образуемых дупликаций при внедрении их в плазмиды или хромосомы: первые образуют дупликации 9 нуклеотидных пар, вторые - только 5.

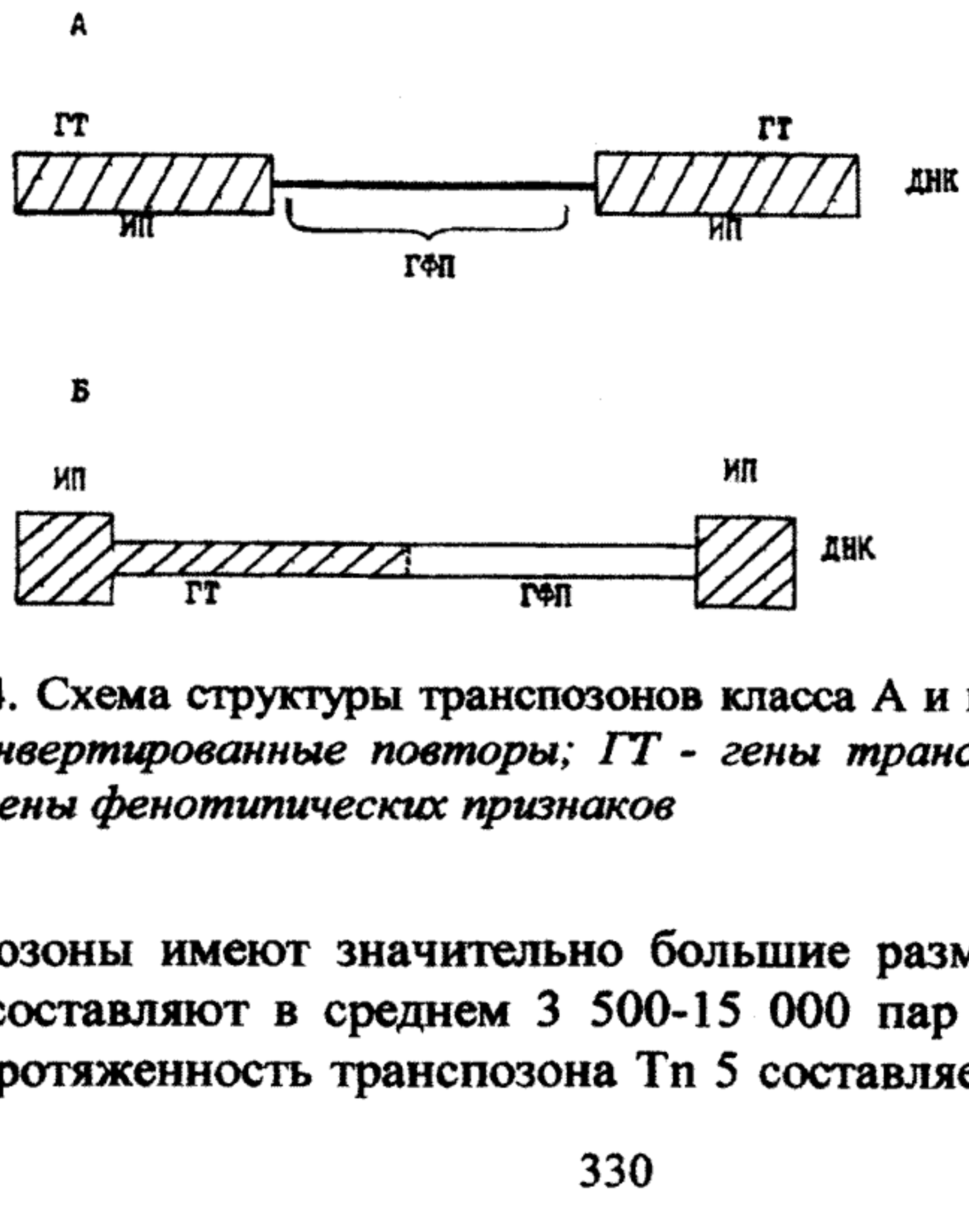


Рис.10.4. Схема структуры транспозонов класса А и класса Б:
ИП - инвертированные повторы; ГТ - гены транспозиций;
ГФП - гены фенотипических признаков

Транспозоны имеют значительно большие размеры, чем IS-элементы и составляют в среднем 3 500-15 000 пар нуклеотидов. Так, общая протяженность транспозона Tn 5 составляет 5 800 п. н.,

из них по 1 500 п. н. приходится на инвертированные концевые повторы. Tn 5 кодирует пять белков. Из них один белок кодирует центральная часть и по два белка - концевые повторы. Транспозон Tn 5 детерминирует устойчивость к канамицину, неомицину и другим родственным антибиотикам.

Следствием перемещения транспозонов, как и IS-элементов, могут быть различные хромосомные перестройки: делеции, инверсии, транслокации, дупликации. Помимо них, перемещение транспозонов между двумя различными репликонами (двумя плазмидами, или плазмидой и хромосомой) может вызывать слияние этих репликонов с образованием коинтегратов. Последующая сайт-специфическая рекомбинация приводит к разделению коинтеграта на два репликона с включением в каждый репликон по одной копии транспозона. Регуляция транспозиции осуществляется собственными генами МГЭ и хромосомными генами бактерий-хозяев.

Умеренный фаг $M_{ю}$, выделенный в 1963 г. из культуры холерного вибриона, также обладает свойствами МГЭ. Однако, в отличие от IS-элементов и транспозонов он не содержит на концах генома ни прямых, ни инвертированных нуклеотидных последовательностей. Концевые повторы фага $M_{ю}$ составляют фрагменты ДНК клетки-хозяина, в которой развивался фаг. ДНК клетки прикрепляется к геному фага при его размножении и теряется в ходе его интеграции в новый сайт. Уникальной способностью фага $M_{ю}$ является перенос генов бактерий в различные участки хромосомы или плазмиды клетки-реципиента. Фаг $M_{ю}$ осуществляет постоянную транспозицию в ходе всего литического цикла. Он не обладает специфичностью в отношении локуса хромосомы и может спонтанно внедряться в разные участки вдоль всей хромосомы, вызывая мутации хромосомных генов. За высокую активность индуцировать мутации он получил название $M_{ю}$ (от англ. mutator).

Несмотря на некоторые различия в структурной организации, общим свойством МГЭ является их способность внедряться во множество участков хромосомной или плазмидной ДНК, вызывая мутации и различные генные перестройки. МГЭ служат также специфическими сайтами внедрения плазмид в хромосомы. Через посредство МГЭ осуществляется рекомбинация между негомологичными ДНК. Временную область гомологии создают МГЭ,

включаясь в тот или иной участок хромосомной или плазмидной ДНК.

Мигрирующие генетические элементы, индуцируя генные и хромосомные перестройки, вносят существенный вклад в перераспределение генетической информации, обеспечивают бактериям селективные преимущества в определенных условиях существования, оказывают существенное влияние на развитие и эволюцию микробных видов.

10.7. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Идеи и методы, разработанные генетикой микроорганизмов, молекулярной генетикой и биохимией нуклеиновых кислот, составили научную основу для развития генетической инженерии - науки о конструировании организмов с заданными наследственными свойствами. Начало развития генетической инженерии относится к 1972 г. и связано с работами П. Берга и его сотрудников (США), сконструированных in vitro (вне организма) первую рекомбинантную (гибридную) молекулу ДНК. В состав молекулы входили гены разного происхождения: полный геном онкогенного вируса обезьян SV40, часть генома умеренного фага и гены галактозного оперона E. coli. Хотя эта молекула не была исследована на функциональную активность из-за опасения перенести онкогенные вирусы в организм человека, успешные эксперименты по ее созданию послужили основанием для активизации работ в области генетической инженерии.

Сущность генетической инженерии заключается в направленном конструировании рекомбинантных молекул ДНК in vitro с последующим введением их в живой организм. При этом, искусственно созданная молекула ДНК становится составной частью генетического аппарата реципиентного организма и придает ему новые генетические свойства. Рекомбинантные молекулы ДНК с заданными свойствами получают путем объединения двух или более фрагментов ДНК (генов) разного происхождения, затем с помощью специальных переносчиков, так называемых векторов, вводят их в реципиентную клетку. Таким путем гены из одного генетического

окружения перемещаются в другое. Это приводит к различным фенотипическим изменениям клетки.

В генетической инженерии выделяют две области - генную и геномную. Каждая из них преследует разные цели: генная - получение организмов с новыми, несвойственными данному виду признаками. Видовая принадлежность организма при этом не меняется.

Геномная инженерия предусматривает более глубокое вмешательство в геном вплоть до создания организмов нового вида.

Успешное проведение экспериментов по конструированию искусственных генетических структур - рекомбинантных ДНК - стало возможным после того, как в распоряжении исследователей оказались соответствующие ферменты - рестрикционные эндонуклеазы, расщепляющие молекулы ДНК в строго определенных участках, и лигазы, сшивающие фрагменты ДНК в единую молекулу.

Конструирование штаммов микроорганизмов с новыми свойствами метода генетической инженерии включает ряд этапов: получение отдельных генов (фрагментов ДНК), присоединение генов к векторным молекулам, т. е. получение рекомбинантной молекулы ДНК, введение рекомбинантной ДНК в реципиентную клетку.

Для создания рекомбинантных молекул ДНК могут быть использованы гены природной ДНК, выделенной из разных организмов, или гены, полученные путем химического или ферментативного синтеза. Выделение нужных генов из ДНК осуществляют с помощью ферментов рестрикции (расщепления) - рестриктаз, или рестриктирующих эндонуклеаз. Они узнают в двухцепочечной ДНК специфические последовательности (мишени), связываются с ними и расщепляют ДНК в самом месте-мишени. Рестриктазы, расщепляющие ДНК в строго определенных сайтах, отнесены ко второму классу (тип Hind П). Они в основном и применяются в генной инженерии. Рестриктазы способны распозновать в ДНК последовательность из 4-6 п. н. и разрезать ее либо пополам, либо на неравные части с образованием выступающих одноцепочечных концов. Одна и та же рестриктаза разрезает разные ДНК с образованием концов с одинаковой последовательностью нуклеотидов. Эти

концы получили название «липких». В силу одинаковой нуклеотидной последовательности они комплементарны друг другу и могут гибридизоваться между собой. Это позволяет объединять фрагменты ДНК различного происхождения, а также включать гены в состав вектора.

Химический синтез генов образуется на сведениях о первичной структуре кодируемых ими белков (последовательности аминокислот в молекуле белка). Впервые химический синтез гена был осуществлен в 1969 г. Г. Кораной с сотрудниками. Это был ген аланиновой тРНК дрожжей, содержащий 77 п.н. Но он не обладал функциональной активностью. Позднее ими был синтезирован функционально активный ген тирозиновой тРНК E. coli длиной около 200 п. н.

В настоящее время химически синтезированные гены используются для получения многих пептидных гормонов, в их числе гормона роста человека - соматотропина. Ген, кодирующий этот гормон, имеет длину 584 п. н. Он включен в плазмиду и введен в E. coli, где реплицируется в составе плазмиды под контролем промотора триптофанового оперона. Методом химического синтеза получен также ген инсулина человека. Искусственное получение генов осуществляется также путем ферментативного синтеза при участии РНК-зависимой ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы. В присутствии соответствующих иРНК этот фермент может катализировать синтез любого гена. Таким способом был синтезирован ген интерферона человека. Для его введения в клетки бактерий сконструирована рекомбинантная плазмида, включающая ген интерферона и сигнальные последовательности, инициирующие синтез иРНК и белка, так называемая химерная плазмида (не встречающаяся в природе). Плазмида введена в E. coli. Полученный штамм бактерий синтезирует до 5 мг интерферона на 1 л бактериальной суспензии, что в 5 000 раз превышает его содержание в 1 л донорской крови.

Гены, полученные любым способом, вводятся в реципиентную клетку с помощью векторов, так как они не имеют системы сигналов, управляющей их действием в клетке, и не способны к самостоятельной репликации. Вектор - это молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК и обеспечивать там ее

размножение и наследование. Вектор должен обладать свойством автономной репликации, т. е. быть репликоном, нести селективные маркеры (например, гены устойчивости к антибиотикам) для обнаружения трансформированных клеток, содержать сайт узнавания рестриктазой в несущественной для репликации области. В качестве векторов используются плазмиды, фаги и созданные на их основе более сложные системы - фаго-плазмидные векторы, или фазмиды (например, космиды - производные плазмиды Col, E1 и фага λ).

Включение генов в состав вектора осуществляется по-разному. Если клонируемый ген и молекула вектора содержит идентичные «липкие» концы, то они соединяются водородными связями. При отсутствии таковых, двухцепочечные концы фрагментов ДНК (гена и вектора) соединяются ферментативным путем при участии ДНК-лигазы. Сочетание гена и вектора дает рекомбинантную молекулу ДНК.

Способ введения рекомбинантной ДНК в реципиентную клетку определяется природой вектора. При использовании в качестве вектора плазмид ДНК вводится путем генетической трансформации. Если же вектором является фаг, то введение ДНК осуществляется путем трансфекции. Для повышения эффективности трансфекции в качестве реципиентов используются сферопласты бактерий, или бактерий, обработанных на холоде хлористым кальцием.

Методы генетической инженерии успешно применяются не только для конструирования организмов с новыми свойствами, но и для решения фундаментальных проблем. Генетическая инженерия помогла понять сущность непостоянства генома, связанного с присутствием мигрирующих генетических элементов, открыла новые возможности для изучения молекулярных основ онтогенеза и эволюционного происхождения разных организмов, разработала пути перестройки наследственного аппарата микро- и макро-организмов. Реализация потенциальных возможностей генетической инженерии позволит успешно устранять наследственные заболевания человека путем исправления генетических дефектов.

Глава 11

ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Экология (от греч. oikos - дом, местообитание) микроорганизмов изучает развитие и функционирование отдельных видов микроорганизмов и их естественных сообществ (микробоценозов) в природной среде. Микроорганизмы обитают во всех природных средах и являются обязательным компонентом любой экологической системы и биосферы в целом. Это обусловлено их широкими метаболическими способностями, благодаря которым они могут использовать для энергетических и конструктивных целей практически все природные и синтетические соединения.

На пороге XXI в. как никогда, возрос интерес к экологии микроорганизмов в связи с расширением производственно-бытовой деятельности человека и его активным воздействием на биосферу. Механизация, мелиорация, химизация и радиация привели к глобальным преобразованиям внешней среды, выразившимся в нарушении складывающихся миллионы лет природных биоценозов, в том числе и микробных. Количественные и качественные изменения микробных ассоциаций во многом отразились на экологии планеты в целом.

Изучение распространения микроорганизмов в природной среде теснейшим образом связано с проблемами экологии, охраны окружающей среды, с выявлением источников и путей распространения возбудителей инфекционных заболеваний человека, животных и растений, а также с использованием микроорганизмов в качестве индикаторов состояния природной среды и в других практических целях.

11.1. МИКРОФЛОРА ПОЧВЫ

Жизнедеятельность микроорганизмов в почве, их численность и разнообразие всецело определяются почвенными условиями: наличием и доступностью питательных веществ, влажностью, аэрацией, реакцией среды, температурой и т. д. Почва как среда обитания весьма гетерогенна. Составными частями ее служат

органические и минеральные вещества, почвенный раствор, воздух. Химический состав и соотношения данных компонентов непостоянны в разных типах почв и даже в одних и тех же горизонтах. Все это определяет разнообразие микроорганизмов, населяющих почву.

По сравнению с другими природными средами (водой, атмосферой), почва чрезвычайно богато населена микроорганизмами, особенно ее верхний горизонт глубиной 2,5-15 см. Здесь на 1 г почвы приходится от нескольких десятков миллионов до миллиардов микробных клеток. С глубиной число их уменьшается, так как снижается количество питательных веществ и ухудшаются условия аэрации.

Преобладающим микронаселением почвы являются бактерии и бациллы. Они составляют 70-90 % всей микрофлоры. Второе место по численности занимают актиномицеты - 10-30 %. Численность грибов невысокая - до 1 %, хотя биомасса их за счет мицелия может быть очень значительной, особенно в целинных кислых почвах.

Большое влияние как на общую численность, так и на соотношение отдельных систематических групп микроорганизмов, оказывает тип почвы. Различаясь по физическим и химическим свойствам, почвы арктические и заболоченные (зона тундры), дерново-подзолистые (зона тайги), сероземы, черноземы, каштановые (зоны лесостепи, степи и пустынь) представляют весьма различную среду для жизнедеятельности микроорганизмов. Развивающаяся микрофлора в разных типах почв имеет значительные различия как в качественном, так и в количественном отношении. Наибольшее количество бактерий и актиномицетов находится в черноземах, сероземах и каштановых почвах. Дерново-подзолистые почвы характеризуются более низким содержанием микроорганизмов (в 10-100 раз).

Положительное влияние на развитие почвенных микроорганизмов оказывает окультуривание почв. Агромероприятия, проводимые в земледелии, - обработка почвы, внесение удобрений, известкование, мелиорация - способствуют изменению почвенных условий в благоприятную для микроорганизмов сторону. Поэтому в

окультуренных почвах численность микроорганизмов значительно выше, чем в целинных (в 2-10 раз).

Микроорганизмы первыми поселяются на материнской горной породе и обусловливают почвообразовательные процессы. Образуя в процессе жизнедеятельности минеральные и органические кислоты, микроорганизмы ускоряют процессы растворения и выветривания горных пород, вовлечения освобожденных минералов в биологический круговорот. Кроме разрушения горной породы, микроорганизмы дают начало образованию перегноя, или гумуса, определяющего основное свойство почвы - плодородие. Особенно велика здесь роль водорослей, которые вместе с хемосинтезирующими бактериями являются пионерами освоения горных пород. Это главные накопители органического вещества, способствующие превращению горной породы в почву.

В сформировавшейся почве некоторые микроорганизмы (капсульные бактерии, актиномицеты, мицелиальные грибы) участвуют в образовании прочной комковатой структуры, что улучшает водно-воздушный режим ее.

Особенно существенна роль микроорганизмов в создании и минерализации органических веществ, в осуществлении непрерывного круговорота биогенных элементов, в обогащении почвы биологически активными соединениями, такими как ферменты, витамины, аминокислоты, которые повышают напряженность биологических процессов в почве и тем самым обеспечивают ее плодородие.

11.2. МИКРОФЛОРА ВОДЫ

Водоемы - также благоприятная естественная среда для развития микроорганизмов. В воде в растворенном виде содержатся разные химические вещества - кислород, азот, углекислота, соединения серы, железа, фосфора и др. Это обусловливает развитие различных физиологических групп микроорганизмов, окисляющих аммиак, серу, железо, фиксирующих молекулярный азот, восстанавливающих нитраты, сульфаты, минерализующих органические соединения.

Главным фактором, определяющим массовое развитие микроорганизмов в воде, является наличие в ней питательных веществ. Количество микробов прямо пропорционально степени загрязнения водоемов. Особенно богаты микроорганизмами пруды, ручьи и озера густонаселенных городов и деревень.

В водоемах закрытого типа (пруды, озера) наблюдается определенная закономерность в распределении бактерий: в прибрежной зоне, соприкасающейся с почвой, их больше. Наблюдаются существенные различия в численности микроорганизмов и в вертикальном разрезе водоема: наиболее обильно заселена не сама поверхность воды, а 10-100-сантиметровая глубина. В более глубоких слоях количество микроорганизмов значительно снижается, что видно на примере морей, океанов (на глубине 5 м в 1 мл воды насчитывается до 300 клеток, на глубине же 200 м они практически отсутствуют).

Ключевые воды и воды артезианских колодцев наиболее чисты. Здесь количество микробов не превышает 10 на 1 мл. Бедна микробами и дождевая вода. Вода глубоких питьевых колодцев, проходя через фильтрующие слои почвы, очищается и поэтому также отличается высокой чистотой. Правда, просачивание поверхностных вод может привести к увеличению в ней микробов.

11.2.1. Роль микроорганизмов в продуктивности и самоочищении водоемов

Микроорганизмы играют существенную роль в продуктивности водоемов, особенно озер и водохранилищ, постоянно обогащающихся дополнительным органическим веществом из стоков вод с суши. Деструкция этого вещества осуществляется бактериями. Число их в рыбоводных прудах составляет 3-6 млн/мл, а биомасса 2-8 г/м^3. Но при внесении в пруды органических удобрений (навоз, трава) биомасса бактерий может значительно возрастать (до 30 г/м^3). Прирост биомассы бактерий за сутки в прудах составляет 5-10 г/м^3 при скорости размножения 10-15 ч.

Источником энергии для развития бактерий, кроме экзогенного органического вещества, служит органическое вещество отмирающего фитопланктона (водоросли) и водных растений. Эта

энергия через бактериальное звено включается в пищевую цепь и прямо или через посредство беспозвоночных животных (дафнии, босмины, коловратки, олигохеты и другие так называемые фильтраторы) используется рыбами. Поэтому, зная оптимальные условия активной жизнедеятельности бактерий, этим процессом можно управлять, увеличивая их биомассу и, следовательно, рыбопродуктивность водоемов. Таким образом, роль бактерий в продуктивности водоемов сводится к передаче энергии, заключенной в органическом веществе отмирающего фитопланктона и в привнесенном органическом веществе суши, через инфузорий и других фильтратов к макрозоопланктону - источнику питания рыб.

Велика роль микроорганизмов в круговороте биогенных элементов в водоемах, который осуществляется по тому же принципу, что и в почве.

В наш век, в век ускоренного индустриального развития, водоемы, как пресные, так и морские, испытывают огромную нагрузку промышленных и бытовых сточных вод. Охрана водоемов от загрязнения становится одной из важнейших проблем.

Различают естественные загрязнения, происходящие независимо от человека, и загрязнения, связанные с деятельностью человека (отходы промышленности, радиоактивные вещества, нефтепродукты, пестициды и др.). Хотя естественные загрязнения происходят постоянно, они менее существенны в сравнении с теми загрязнениями, которые вносит человек.

В последнее время значительно возрос интерес к изучению процессов биологического самоочищения водоемов от загрязнения. Под самоочищением понимают биологические и физико-химические процессы, приводящие к восстановлению качества воды. Физико-химическое самоочищение осуществляется путем осаждения взвешенных веществ и окисления растворенных соединений кислородом.

Биологическое самоочищение водоемов является результатом жизнедеятельности целого комплекса водных организмов, которые выполняют функцию по обезвреживанию и окислительной переработке поступающих в водоем загрязняющих веществ. Начальные этапы процесса самоочищения осуществляют организмы, питающиеся растворенными органическими веществами. Это в основном

бактерии, грибы и ряд простейших. Многие водные животные - низшие ракообразные и коловратки - пожирают бактерии, простейших животных и мелкий органический детрит, т. е. все то, что содержится в загрязненных водоемах.

Очищение воды, в том числе и сточных вод, от органических и неокисленных минеральных загрязнений с помощью микроорганизмов разделяется на анаэробное и аэробное. От участия кислорода зависит интенсивность и степень очистки. Аэробным процессам распада, как и анаэробным, подвергаются разного рода органические вещества, сбрасываемые в водоемы. Это клетчатка, фенолы и крезолы, углеводороды нефти и др. В аэробных условиях процессы разложения их происходят наиболее интенсивно и полно, чаще всего до простых минеральных соединений: воды, углекислого газа, водорода, нитратов и сульфатов.

Анаэробные процессы протекают в замедленном темпе, распад органических веществ, а следовательно, и очистка воды происходят значительно дольше, чем при аэробной очистке. Образующиеся продукты часто более токсичны, чем исходные. Это сероводороды, меркаптаны, аммиак, низкомолекулярные жирные кислоты.

Биологическая очистка сточных вод производится на специально приспособленных земельных участках - полях орошения и полях фильтрации, куда спускаются подлежащие очистке воды. Просачиваясь через слои почвы, они подвергаются окислительному воздействию целого комплекса почвенных микроорганизмов, в результате чего содержащиеся органические вещества полностью минерализуются. Аналогичный процесс наблюдается при сбросе сточных вод в водоем. Микрофлора водоема окисляет весь комплекс растворенных соединений до минеральных продуктов.

Однако в настоящее время при высоком уровне развития промышленности и огромном количестве образующихся сточных вод естественные методы очистки в водоемах не могут быть использованы, так как это приведет к резкому дефициту кислорода в водоемах (из-за потребления кислорода на окислительные процессы) и, следовательно, к вымиранию всего живого. Поэтому создаются специальные сооружения аэробной биологической очистки - биосферы, аэрофильтры и аэротенки. Принцип очистки сточных вод на этих сооружениях тот же, что на полях фильтрации. Но

благодаря созданию для микроорганизмов наиболее благоприятных экологических условий - аэрации, температуры, реакции среды, содержанию некоторых солей - процесс биологического окисления идет гораздо интенсивнее.

11.2.2. Санитарно-микробиологический контроль

Наряду с полезной ролью, которую играют микроорганизмы в биологической очистке воды, они одновременно являются и загрязнителями внешней среды. В воде могут находиться возбудители различных заболеваний: тифа, холеры, дизентерии, туляремии и др. Особенно часто они обнаруживаются в бытовых хозяйственно-фекальных сточных водах населенных мест и ряда производств: мясокомбинатов, кожевенных заводов, боен. Чтобы предотвратить попадание патогенных микроорганизмов в естественные водоемы и источники водоснабжения, необходимо знать методы санитарно-бактериологического исследования и обеззараживания воды.

Выбор эффективного средства и метода дезинфекции производится на основании особенностей биологии патогенных микроорганизмов и учета экологической среды.

Общим санитарно-бактериологическим показателем состояния среды является количество микроорганизмов в 1 мл воды. Но более важно с санитарно-гигиенической точки зрения выявление в среде патогенных бактерий. Однако непосредственное обнаружение патогенных бактерий в таких средах, как вода, затруднено и требует длительного времени (10-12 сут). Это связано с тем, что численность патогенных микроорганизмов в естественной среде по сравнению с численностью непатогенных (сапрофитов) мала. При высеве пробы на питательные среды создаются условия конкуренции между сапрофитными и патогенными бактериями, невыгодные для последних из-за их малочисленности. Поэтому основной целью бактериологического исследования среды является обнаружение фекального загрязнения. Показателями фекального загрязнения служат обитатели кишечника человека, в первую очередь кишечная палочка.

Для количественной характеристики содержания кишечной палочки в среде служат два показателя: коли-титр и коли-индекс. Под коли-титром понимают наименьшее количество исследуемого материала, в котором содержится 1 кишечная палочка. Коли-индекс - это количество кишечных палочек в 1 л воды. Для перевода коли-титра в коли-индекс надо 1000 разделить на величину коли-титра. Например, при коли-титре 333 (для питьевой воды) коли-индекс равен 1000 : 333 ≈ 3. Это означает, что в 1 л воды содержится 3 кишечных палочки. Вода считается пригодной для питья при коли-титре не менее 300 и коли-индексе равном 3.

При более высоком содержании кишечной палочки применяются методы обеззараживания. Самым распространенным из них является хлорирование воды. Оно основано на том, что хлор, попадая в бактериальную клетку, вызывает в ней сильные окислительные процессы, приводящие к инактивации ферментов и гибели ее. Такой же эффект дают и другие окислители - перманганат, озон, перекись водорода. Кроме них, для дезинфекции могут применяться любые антимикробные средства.

11.3. МИКРОФЛОРА АТМОСФЕРЫ

Несмотря на то, что атмосфера является неблагоприятной средой для развития микроорганизмов, последние находятся в ней постоянно. Условия, существующие в атмосфере, не исключают полностью возможности обитания в ней микроорганизмов, особенно в нижних слоях - тропосфере. Здесь постоянно содержатся водяные пары, газообразные азот и углерод и другие элементы. В атмосферу микроорганизмы попадают вместе с пылью. Они находятся там некоторое время во взвешенном состоянии, а затем частично оседают на землю, некоторые же погибают от действия прямых солнечных лучей и высушивания. В сухую солнечную погоду микробы гибнут массами. Благодаря этому микрофлора воздуха немногочисленна. Она зависит от микрофлоры и состояния почвы, над которой расположен исследуемый слой воздуха. Над окультуренной, богатой органическим веществом почвой гораздо больше микробов, чем над почвой бесплодных пустынь или над заснеженными полями.

По качественному составу среди микрофлоры воздуха преобладают различные пигментные формы, дающие на плотных средах окрашенные колонии. Это связано с тем, что бесцветные микробы более чувствительны к бактерицидному действию солнечных лучей, в то время как у пигментных форм каротиноиды служат защитой от губительного действия ультрафиолетовой радиации.

Наиболее частыми обитателями воздуха являются дрожжи, грибы, сарцины, стафилококки и различные споровые палочки. Неспороносных палочковидных бактерий в воздухе немного, так как у них низкая устойчивость к высушиванию. В воздухе жилых помещений и в особенности в окружении больных могут находиться и болезнетворные микробы.

Количество микроорганизмов и их состав в воздухе меняются в зависимости от многих условий. Сухость почвы, распыленность ее и ветры резко повышают степень загрязненности воздуха микробами. Выпадающие осадки значительно очищают воздух. Меньше всего микробов в воздухе над лесами, морями и снегами. По исследованиям Б. Л. Исаченко, воздух над местами, покрытыми круглый год снегом, можно считать абсолютно чистым. В таких условиях на бактериальную чашку за час оседает 1-2 микроба.

Работники полярной экспедиции О. Ю. Шмидта в 1930 г. установили исключительную чистоту воздуха Крайнего Севера. Так, воздух Новой Земли почти свободен от микроорганизмов. Больше всего микроорганизмов приходится на слои воздуха, расположенные над промышленными городами, над которыми стоит много пыли, но по мере подъема вверх количество их снижается.

Содержание микробов в воздухе зависит и от времени года. Меньше всего их зимой и больше летом, так как зимой почва покрыта снегом и воздух непосредственно с ней не соприкасается. Летом же ветер поднимает с земли пыль, а вместе с ней и массу микробов. Заселенность воздуха весной и осенью занимает среднее положение между летней и зимней заселенностью, так как в это время часто идут дожди и ветер поднимает меньше пыли с влажной почвы.

Воздух закрытых помещений зимой, наоборот, богаче микроорганизмами, чем летом. Это объясняется тем, что зимой человек большую часть времени проводит в помещении. Особенно

велико число микроорганизмов в многолюдных общественных помещениях - в кинотеатрах, школах, здесь воздух нагревается, обогащается влагой, загрязняется пылью и примесью газообразных и парообразных продуктов. Мельчайшие капли жидкости могут адсорбировать различные органические вещества, попадающие в воздух, и давать, таким образом, возможность микроорганизмам, находящимся в каплях, размножаться. Так воздушная среда обеспечивает не только временное пребывание там микроорганизмов, но иногда даже благоприятствует их развитию.

Микроорганизмы, содержащиеся в воздушной среде, могут явиться причиной различных инфекционных заболеваний - гриппа, ангины, кори, скарлатины и др.

Микробиологическое исследование атмосферного воздуха, а также воздуха закрытых помещений занимает важное место при осуществлении очистки его от бактериального загрязнения как мера борьбы с аэрогенными инфекциями.

В настоящее время изучению микробиологии атмосферы уделяется большое внимание в связи с освоением космоса.

Глава 12

БИОГЕОХИМИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмам принадлежит исключительно важная роль в круговороте в природе, в образовании и разрушении месторождений полезных ископаемых, минералов и горных пород, а также в миграции отдельных элементов.

Основы понимания биохимической роли микроорганизмов были заложены на рубеже XIX и XX вв. исследованиями выдающихся русских микробиологов С. Н. Виноградского, Т. А. Надсона, В. Л. Омелянского, а также В. И. Вернадского, который указывал на большую роль микроорганизмов в перемещении, концентрации и рассеивании химических элементов в биосфере.

Наиболее отчетливо биогеохимическая деятельность микроорганизмов проявляется в реакциях разложения органического вещества, в окислении водорода, метана, элементарной серы, в восстановлении сульфатов и многих других процессах, обеспечивающих непрерывный круговорот биогенных элементов.

Будучи широко распространенными в природе и обладая активным ферментным аппаратом, микроорганизмы осуществляют процессы расщепления и синтеза самых сложных органических веществ. Благодаря минерализующей деятельности микроорганизмов происходит постоянное очищение поверхности земли от трупов животных и остатков растений. По словам В. Л. Омелянского, микроорганизмы являются настоящими могильщиками органического мира. Органические вещества растений и животных под действием микроорганизмов разлагаются на простые минеральные элементы, которые растворяются в воде и используются растениями в качестве источника питания, вовлекаясь таким образом в малый биологический круговорот. Следовательно, биологический круговорот объединяет процессы синтеза и распада органических веществ и обусловлен деятельностью живых организмов.

Помимо биологического круговорота элементов, в природе функционирует большой геологический круговорот. Он осуществляется действием физико-химических факторов и включает процессы выветривания горных пород, растворения минеральных продуктов выветривания и вынос их в моря и океаны. Преобладающая часть вынесенных минеральных элементов используется водными организмами и после их смерти частично переходит в состав осадочных пород, выключаясь тем самым из биологического круговорота. Если бы этот процесс был бы постоянно, то жизнь на земной поверхности не могла бы развиваться. Однако этого не происходит, так как биологически важные элементы непрерывно закрепляются в почве благодаря деятельности зеленых растений и некоторых автотрофных микроорганизмов, использующих минеральные элементы для синтеза органического вещества. После отмирания растения и животные минерализуются микроорганизмами и в зависимости от условий поступают в биологический или геологический круговорот. Круговорот веществ совершается по длинной цепи последовательных и тесно связанных между собой реакций.

12.1. КРУГОВОРОТ АЗОТА

В цикл превращений азота входят реакции синтеза сложных азотистых соединений и реакций минерализации органического азота до солей азотной и азотистой кислоты или молекулярного азота.

Цикл азота состоит из четырех этапов (рис. 12.1). Первый этап - это фиксация молекулярного азота. Он осуществляется некоторыми аэробными и анаэробными микроорганизмами, фотосинтези-

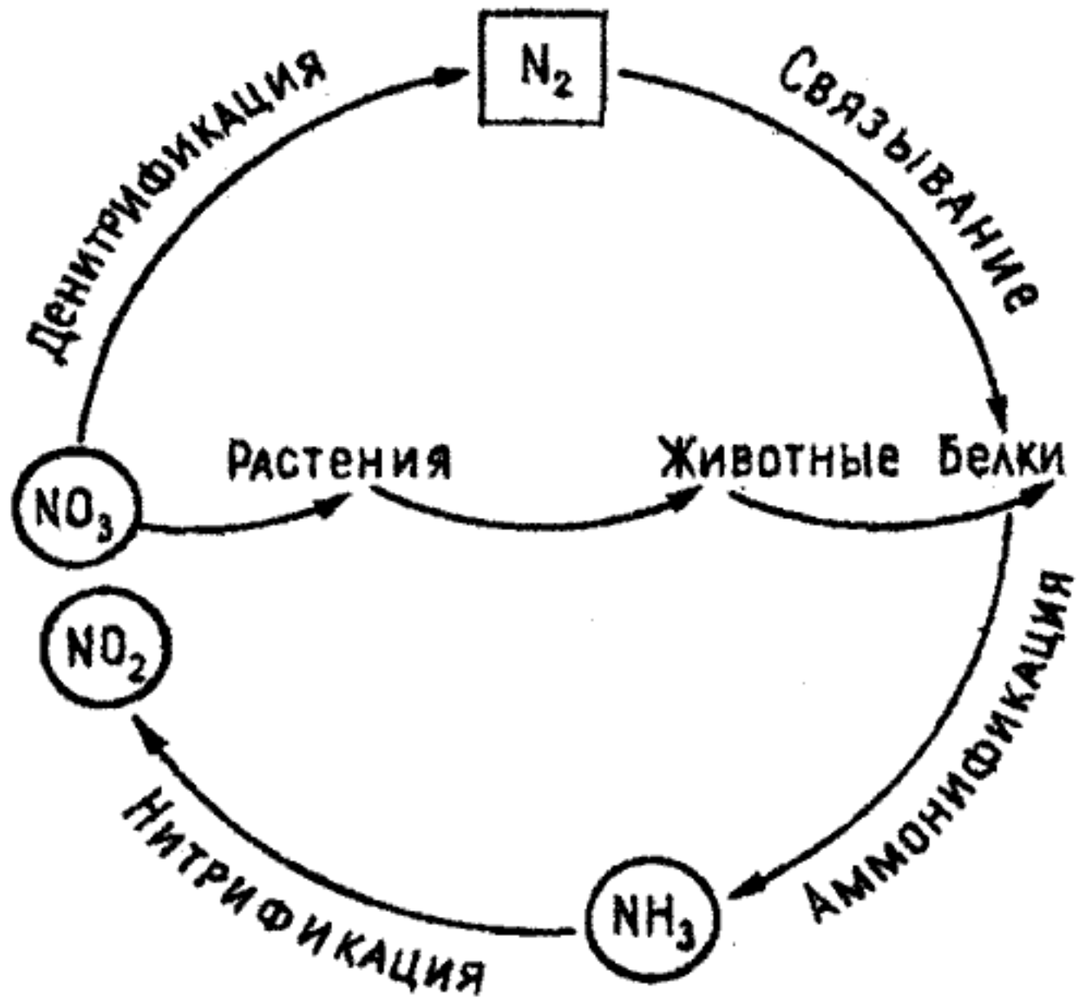


Рис. 12.1. Схема круговорота азота

рующими бактериями и сине-зелеными водорослями. К какой бы группе ни относился азотфиксатор, конечным продуктом азотфиксации всегда являются азотсодержащие органические вещества.

Органический азот микроорганизмов, подобно азоту растений и животных, подвергается минерализации. Конечным продуктом данного процесса является аммиак. Это второй этап цикла азота, получивший название аммонификации.

На третьем этапе образовавшийся в процессе аммонификации аммонийный азот окисляется до нитритов и нитратов, происходит процесс нитрификации. Нитраты частично усваиваются корневой системой растений, а частично восстанавливаются до аммиака и молекулярного азота. Этот процесс получил название денитрификации. Им завершается цикл превращения азота.

12.1.1. Фиксация молекулярного азота

Биологическая фиксация молекулярного азота - одна из самых важных проблем почвенной микробиологии. Разрешение ее имеет большое практическое и теоретическое значение.

Азот - это важнейший биогенный элемент, входящий в состав белковой молекулы каждого живого существа. Его источником служит минеральный азот атмосферы и почвы. Но запасы минерального азота в почве сравнительно невелики - до 150 кг на гектар пахотного слоя, в то время как в атмосфере количество свободного (молекулярного) азота неисчерпаемо: около 4/5 окружающего нас воздуха приходится на долю свободного азота. Столб воздуха над гектаром почвы содержит его до 80000 т. Однако в силу своей инертности и ограниченной способности вступать в химические реакции с другими элементами этот азот непригоден для питания растений и животных. Именно поэтому он и получил свое название «азот», что означает «безжизненный».

Растения, выращиваемые на почвах, бедных минеральным азотом, отличаются слабым ростом и быстро гибнут, несмотря на наличие огромного количества молекулярного азота в воздухе. Этот азот оставался бы мертвым капиталом природы, если бы не микроорганизмы. Специфическая группа микроорганизмов, получившая название азотфиксаторов, обладает способностью фик-

сировать атмосферный азот и переводить его в связанное состояние. За счет деятельности азотфиксаторов в почву ежегодно поступает 60-75 % азота от общего содержания его в почве. Согласно подсчетам, только культурные растения земного шара за год потребляют около 100 млн тонн азота, в то время как в виде минеральных удобрений в почву вносится приблизительного лишь 32 млн тонн, а остальной азотный дефицит покрывается за счет биологической азотфиксации.

Изучение природы биологической фиксации азота начато С. Н. Виноградским в 1893 г. и продолжено В. Л. Омелянским, С. П. Костычевым, М. В. Федоровым, Е. Н. Мишустиным и многими зарубежными учеными. В результате многочисленных исследований установлено, что способностью фиксировать молекулярный азот обладают не единичные виды, как это предполагалось до 1949 г., а многие микроорганизмы, принадлежащие к различным группам прокариот.

Азотфиксирующие микроорганизмы можно разделить на две группы: свободноживущие и симбиотические, т. е. вступающие в сожительство с высшими растениями.

Свободноживущие азотфиксаторы. Классическими представителями этой группы микроорганизмов являются бактерии рода Azotobacter и анаэробная палочка Cl. pasteurianum. Азотобактер был выделен в чистую культуру голландским ученым М. Бейеринком в 1901 г., который описал его морфологию и физиологию. В молодой культуре азотобактер представляет собой крупные (3 × 6 мкм), иногда сцепленные попарно палочки с закругленными концами. С возрастом они постепенно укорачиваются и превращаются в кокки, покрытые толстой слизистой капсулой (рис.12.2). Кокки часто бывают соединены в сарциноподобные пакеты - цисты, характерные для покоящейся стадии азотобактера.

Молодые клетки азотобактера благодаря расположенным по всей поверхности тела жгутикам обладают подвижностью. Последняя при старении клетки в результате уменьшения числа жгутиков и появления капсулы исчезает.

Азотобактер хорошо растет на безазотистых питательных средах. На плотных средах колонии имеют вид густослизистых полупрозрачных выпуклых капель. В зависимости от вида азото-

бактера они окрашиваются в желтый (Az. vinelandii), темно-коричневый (Az. chroococcum) или флуоресцирующий желто-зеленый цвет (Az. agile).

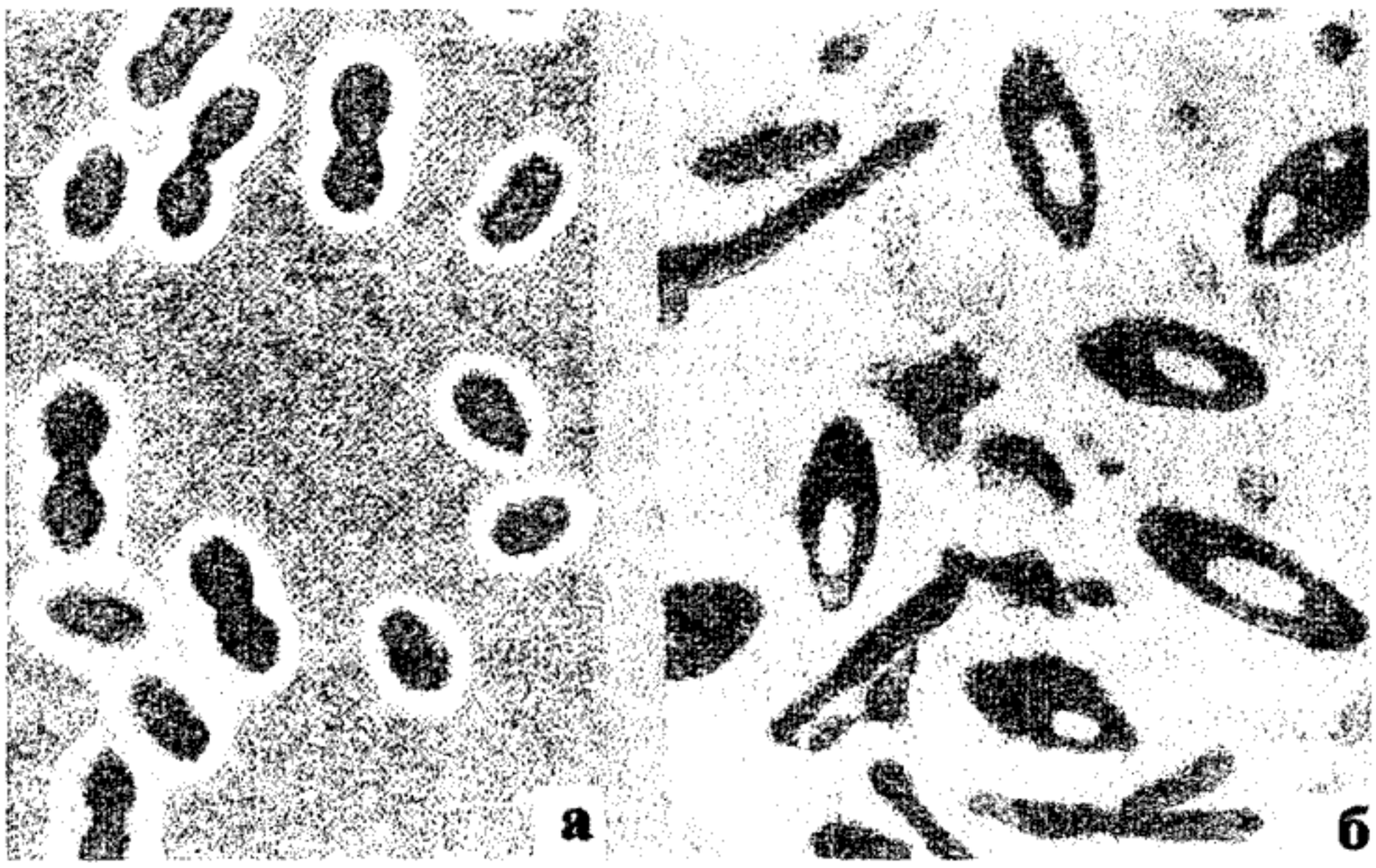


Рис.12.2. Азотфиксирующие бактерии:
а - Az. chroococcum (увеличение × 1 800);
б - Cl. pasteurianum (увеличение ×3 500)

Углерод и энергию азотобактер получает из разнообразных органических веществ: углеводов, спиртов, органических кислот и их солей. Источником азота, кроме атмосферного, могут служить минеральные (соли аммония, нитраты и нитриты) и органические (аминокислоты, мочевина) соединения. Но в тех случаях, когда азотобактер развивается на азотсодержащих средах, он не фиксирует молекулярный азот и при длительном культивировании на таких средах вообще утрачивает азотфиксирующую способность. Количество азота, фиксированное на 1 г потребленного источника энергии, называется азотфиксирующей способностью. Эта величина непостоянна, она зависит от индивидуальных свойств штамма, состава питательной среды, ее кислотности, условий выращивания культуры (температура, аэрация) и в среднем равна 10-15 мг.

Азотобактер - строгий аэроб. Оптимальная температура для него 28-30^0 С, pH 7,2-8,0. Хотя азотобактер в естественных условиях встречается при pH от 4,5 до 9,0, как в кислых, так и в сильно щелочных средах, он теряет активность и способность связывать

молекулярный азот. Азотобактер требователен к наличию в среде фосфора, кальция и микроэлементов - молибдена, железа, кобальта, в первую очередь необходимых для осуществления процесса азотфиксации.

Азотобактер обладает способностью синтезировать значительное количество биологически активных веществ - витамины группы В, никотиновую и пантотеновую кислоты, гетероауксин, гиббереллин и фунгистатический (задерживающий рост грибов) антибиотик группы анисомицина.

Азотобактер широко распространен в почвах и водоемах, имеющих нейтральную или слабощелочную реакцию среды и содержащих легкодоступные органические вещества.

Морфологическое сходство с азотобактером имеют аэробные азотфиксирующие бактерии рода Beijerinckia. Клетки имеют палочковидную, круглую или овальную формы. На безазотистых плотных средах они образуют выпуклые, иногда складчатые слизистые колонии. Продуктивность азотфиксации 15, 20 мг азота на 1 г сахара. От азотобактера эти бактерии отличаются медленным ростом, высокой кислотоустойчивостью (развиваются при pH 3,0), отрицательным отношением к наличию в среде кальция. Бактерии рода Beijerinckia широко распространены в южной и тропической зонах, реже встречаются в зоне умеренного климата.

К свободноживущим азотфиксаторам относится и анаэробный микроорганизм Cl. pasteurianum, клетки которого имеют вид палочки длиной 1,5 - 8 мкм, шириной 0,8-1,3 мкм с округленными концами (см. рис. 12.2). При образовании спор клетки утолщаются посередине и принимают форму веретена. Эти бактерии - грамположительные облигатные анаэробы, предельное pH для них равно 5,5-8,0; споры выдерживают температуру 96^0 С, а при 100^0 С погибают. Подобно азотобактеру данные микроорганизмы используют различные источники углеродного питания. На безазотистых средах они фиксируют молекулярный азот.

Cl. pasteurianum широко распространен во всех почвах. Особенно в больших количествах он встречается в плохо аэрируемых слежавшихся или залитых водой почвах. Рисовые поля обогащаются азотом в основном за счет деятельности Cl. pasteurianum и

водорослей и длительное время не нуждаются в азотных удобрениях.

Связывать молекулярный азот воздуха могут и некоторые другие микроорганизмы - Azotomonas fluorescens, Azotomonas insolita, микобакетрии, фотосинтезирующие бактерии, а также азоспириллы, обитающие в ризосфере злаковых растений. Однако азотфиксирующая активность у этих микроорганизмов гораздо ниже, чем у первых двух групп.

Симбиотические азотфиксаторы. Наряду со свободноживущими азотфиксирующими микроорганизмами в почве обитают и симбиотические азотфиксаторы - клубеньковые бактерии, открытые русским ученым М. С. Ворониным в 1866 г. Воронин обнаружил на корнях люпина и ольхи мелкие клубеньки, заполненные палочковидными организмами вздутой или ветвистой формы, описал морфологию и размеры этих организмов, считая их причиной образования клубеньков.

Через 20 лет это открытие было подтверждено М. Бейеринком. Более того, Г. Гельригелем и Г. Вильфартом было доказано, что бактерии, находящиеся в клубеньках, выполняют важную биологическую функцию фиксации молекулярного азота. (Данная гипотеза была высказана еще в 1838 г. Ж. Буссенго). Г. Гельригель и Г. Вильфарт установили, что клубеньки образуются только на корнях бобовых растений и только в нестерильной почве. Отмечено, что в этой же почве накапливается значительно больше азота, чем его было до выращивания бобовых растений. Так была доказана роль клубеньков бобовых растений в ассимиляции атмосферного азота. Чистая культура клубеньковых бактерий, выделенная в 1888 г. М. Бейеринком из клубеньков гороха, была названа им Bacillus radicicola. Затем было предложено название Rhizobium (от греч. rhizo - корень, bios - жизнь, т. е. жизнь на корнях). В настоящее время эти

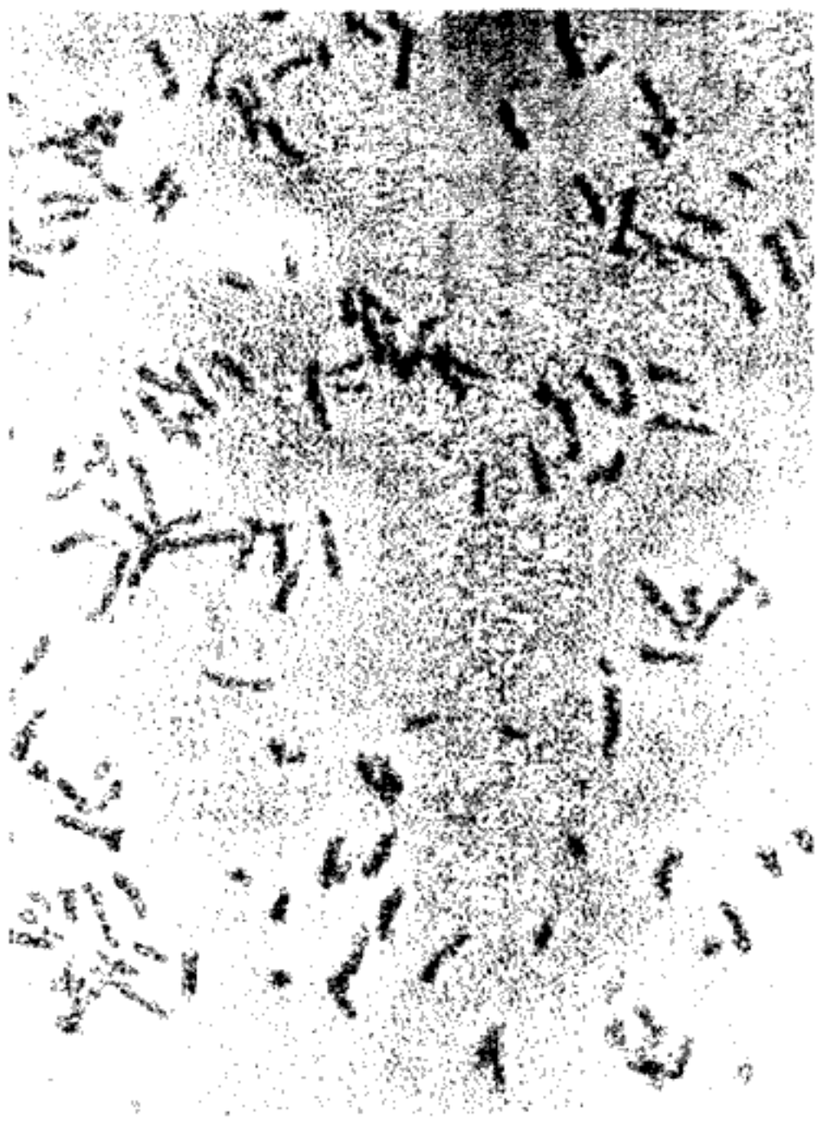


Рис.12.3. Клубеньковые бактерии (увеличение × 1 800)

бактерии объединены в самостоятельный род Rhizobium.

Клубеньковые бактерии представляют собой грамотрицательные, не образующие спор, подвижные палочки размером 1,2-3 × 0,5-0,9 мкм (рис. 12.3). В клубеньках клетки обычно более крупных размеров, часто имеют раздутую или ветвистую формы, напоминающие буквы V, L, X. Такие формы принято называть бактероидами.

Клубеньковые бактерии чаще всего обнаруживаются там, где растут бобовые растения, хотя могут встречаться в почве и в свободном состоянии. В корни растений они проникают через корневые волоски, где образуют инфекционные нити, которые представляют собой бактерии, заключенные в выделяемую ими слизь (рис. 12.4). Эти нити проникают через стенки клеткок до внутренних покровов коры корня. Под действием β-индол-уксусной кислоты или других каких-то факторов, связанных с инфекцией, клетки коры начинают беспорядочно делиться и в результате возникает первичная, затем вторичная меристемы клубенька. Инфекционная нить, разветвляясь, пронизывает клетки меристемы и бактерии под действием внутреннего давления, возникающего вследствие их интенсивного размножения, выходят из нити в цитоплазму клеток растения-хозяина. Здесь они продолжают размножаться, а клетки растений, наполняющиеся бактериями, начинают усиленно делиться. Так происходит формирование клубенька (рис. 12.5). Зона клубенька, заполненная бактериями, называется

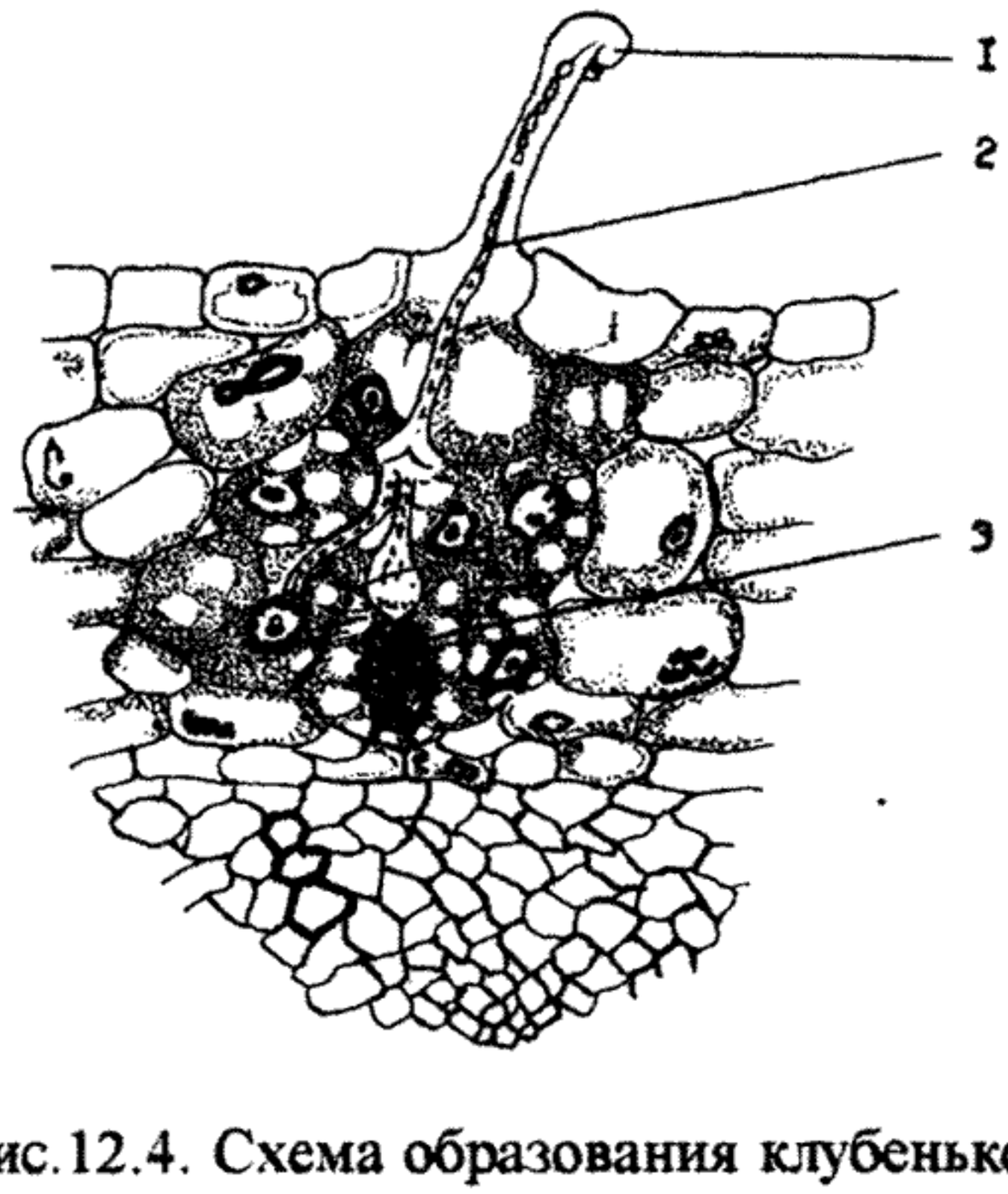


Рис.12.4. Схема образования клубеньков у бобовых растений: *1 - инфицированный корневой волосок; 2 - инфекционная нить; 3 - делящиеся клетки корня*

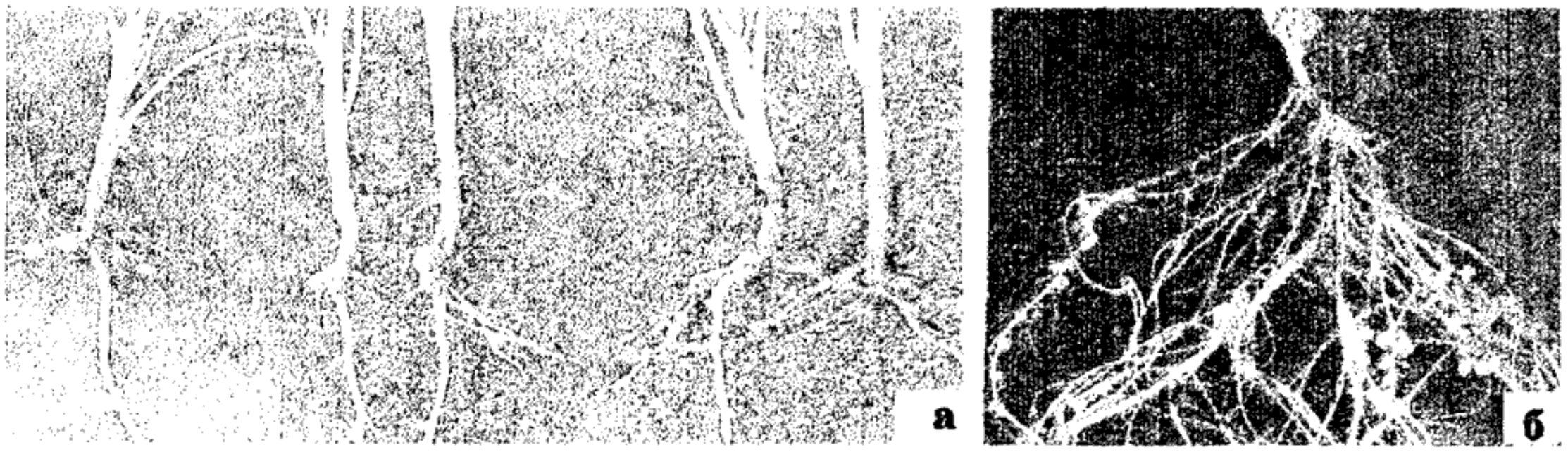


Рис.12.5. Клубеньки на корнях люпина (а) и гороха (б)

бактериальной зоной. Она занимает центральную часть клубенька, окружена меристемой, покрытой клубеньковой корой. Ни клетки меристемы, ни клетки коры не содержат бактерий.

Связь клубенька с корнем растения осуществляется через сосудисто-волокнистые пучки, которые образуются из клеток перикамбия центрального цилиндра корня. По этим пучкам в клубеньки поступают питательные вещества, синтезируемые растениями, и выводятся продукты жизнедеятельности бактерий. Так между бактериями и растениями устанавливаются тесные симбиотические отношения.

Клубеньковые бактерии характеризуются строгой специфичностью в отношении растений. Они могут вступать в симбиоз только с определенным видом бобового растения.

Специфичность клубеньковых бактерий определяется природой капсульных липополисахаридов, которые избирательно реагируют с лектинами (фитогемагглютининами) бобовых растений. Последние представляют собой белки, продуцируются бобовыми растениями, концентрируясь на поверхности корней. Они несут ответственность за «узнавание» специфических клубеньковых бактерий. Взаимодействие с бактериями осуществляется аналогично взаимодействию антиген-антитело. Лектины играют роль антигена, липополисахариды капсулы бактерий - роль антитела. В результате их взаимосвязи клубеньковые бактерии фиксируются на поверхности корней и инфицируют растение. Мутанты бактерий с нарушенной способностью к синтезу липополисахаридов неспособны заражать растения и образовывать клубеньки.

Поскольку лектин каждого вида бобового растения связывается только с определенным липополисахаридом Rhizobium,

образуется видоспецифичный комплекс, присущий конкретному виду бактерий и растений. Специфичность клубеньковых бактерий положена в основу их классификации.

Различают бактерии клевера Rh. trifolii, бактерии фасоли Rh. phaseoli, бактерии люпина Rh. lupini, бактерии сои Rh. japonicum, бактерии люцерны и донника Rh. meliloti, бактерии гороха, вики, бобов Rh. leguminosarum.

При инфекции корневой системы бобовых растений клубеньковыми бактериями большое значение имеет вирулентность последних. Под вирулентностью следует понимать способность бактерий проникать в растение и вести там активный образ жизни, т. е. размножаться и вызывать образование клубеньков. Если специфичность клубеньковых бактерий определяет спектр их действия, то вирулентность характеризует их активность в пределах данного спектра.

Однако не все бобовые растения способны образовывать клубеньки. Из изученных 1 200 видов 133 не формируют их. Есть предположение, что причиной является отсутствие бактерий, специфичных для этих видов растений.

Среди клубеньковых бактерий различают активные и неактивные расы, которые образуют разные по эффективности клубеньки. Эффективные клубеньки характеризуются более крупными размерами и интенсивной азотфиксацией. Неэффективные, как правило, лишены азотфиксирующей способности. Причина эффективности азотфиксации долгое время оставалась неизвестной. К выяснению ее подходили по-разному: рассматривались морфофизиологические, биохимические и генетические особенности бактерий. Однако вскоре пришли к убеждению, что, основываясь лишь на свойствах бактерий, разрешить этот вопрос невозможно, так как оказалось, что ни культуральная, ни физиологическая специфика, ни антигенная структура их не связаны с эффективностью клубеньков. И только изучение внутреннего содержимого клубенька в бактериологическом и биохимическом отношении позволило установить, что эффективные клубеньки заполнены бактериями в стадии бактероидов. Второй особенностью эффективных клубеньков является наличие в них гемоглобина, который называют леггемоглобином (от «гемоглобин»

Leguminosae»). Он был выделен из клубеньков в 1939 г. японским ученым Г. Кубо. Данное открытие имело большое значение, так как позволило установить химические различия между эффективными и неэффективными клубеньками.

Леггемоглобин рассматривается как необходимый фактор симбиотической фиксации азота, где он выполняет функции регулятора парциального давления кислорода и транспорта электронов в азотфиксирующую систему. Предполагают также, что леггемоглобин может осуществлять превращения гидроксиламина в аммиак, азот которого включается в состав органических веществ.

В период максимальной азотфиксации, обычно наблюдающейся в стадии бутонизации и цветения растений, в них поступает до 90 % азота, фиксированного клубеньками. Установлено, что бобовые растения в симбиозе с эффективными штаммами клубеньковых бактерий фиксируют от 50 до 200 кг азота на 1 га почвы.

Кроме бобовых растений способностью к образованию клубеньков и симбиотической азотфиксации обладает более 200 видов небобовых. Среди них представители голосеменных (саговники, гинкговые, хвойные) и покрытосеменных (береза, ольха, облепиха). Из травянистых небобовых растений клубеньки обнаружены у дикорастущих злаковых (лисохвост луговой, мятлик луговой, два вида волоснеца - сибирский и солончаковый).

В клубеньках небобовых растений выявлены грибы фикомицеты у хвойных, актиномицеты у ольхи, бактерии у злаковых. Все перечисленные представители способны к симбиотической азотфиксации. Например, роща ольхи (в среднем 5 растений на 1 $м^2$) за 7 лет дает прибавку азота 700 кг на 1 га.

Многие тропические растения (около 400 видов) образуют клубеньки на листьях, так называемые листовые клубеньки. Они располагаются на нижней поверхности листа. Так, возбудителями формирования листовых клубеньков у растений Pavetta и Psychotria являются бактерии рода Klebsiella. Эти бактерии фиксируют азот как в симбиозе с растениями, так и в чистой культуре. Полагают, что они обеспечивают развитие растений на почвах, бедных азотом.

12.1.2. Механизм фиксации молекулярного азота

Изучение механизма биологической фиксации молекулярного азота проводится со времени открытия и выделения азотфиксирующих микроорганизмов. В результате выяснены многие важные стороны этого сложного биохимического процесса. В частности, изучено строение и свойства азотфиксирующего ферментного комплекса - нитрогеназы; установлены единста структуры и функций этого фермента у разных азотфиксирующих микроорганизмов, его высокая чувствительность к кислороду; доказан единый восстановительный путь связывания азота у всех азотфиксирующих микроорганизмов; определены ферментные системы, катализирующие реакции восстановления молекулярного азота и пути его дальнейшего превращения.

Как известно, молекулярный азот весьма стабилен и почти не вступает в химические связи с другими элементами (исключение составляет металлический литий, с которым N_2 образует в обычных условиях (Li_3N). Атомы в молекуле азота соединены тремя связями ($N \equiv N$). Энергия диссоциации их равна 225 ккал/моль. Наибольшей энергией обладает первая связь - 127 ккал/моль, вторая - 60, третья - 38.

Прочность связей определяет инертность молекулярного азота. Поэтому для химического связывания азота с другими элементами необходима предварительная активизация каждого из них. На химическом активировании молекулярного азота базируется известный способ синтеза аммиака из атмосферного азота химическим путем, предложенный А. Габером-Бошем. Синтез осуществляется при температуре 400-500^0 С и давлении 200-1000 атм.

В клетках же микроорганизмов данный процесс происходит в обычных условиях. Биологическая фиксация молекулярного азота идет восстановительным путем. Первым стабильным продуктом азотфиксации является аммиак. Активирование молекулярного азота и восстановителя обусловлено деятельностью специфического ферментного комплекса - нитрогеназы. Это основной компонент азотфиксирующей системы. Он состоит из двух белков, т. е. двух ферментных компонентов, один из которых содержит молибден и железо, второй - только железо. Нитрогеназа обладает гидро-

геназной активностью, поэтому молекулярный водопровод может подавлять фиксацию азота, конкурируя с ним за активный центр ферментной системы. Донором электронов, т. е. восстановителем, служит негеминовый железосодержащий белок ферродоксин, или флаводоксин, источником энергии - АТФ, являющийся обязательным компонентом азотфиксирующей системы. Потребность в АТФ у азотфиксирующих микроорганизмов очень велика. Для восстановления одной молекулы N_2, на которое требуется шесть электронов, затрачивается 12 молекул АТФ. Суммарное уравнение реакции имеет следующий вид:

$$N_2 + 6e^- + 12\ АТФ + 12H_2O \longrightarrow 2NH_4^+ + 12\ АДФ + 12\ Ф_Н + 4H^+.$$

Образовавшийся аммоний используется для синтеза глутаминовой кислоты и глутамина. Ключевую роль в этом процессе играет глутаминсинтетаза. Она катализирует реакцию синтеза глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака, снижая тем самым концентрацию аммония в клетке. Это имеет большое значение для повышения азотфиксирующей способности микроорганизмов, ибо ионы аммония или его производные - аминокислоты - подавляют процесс азотфиксации, репрессируя синтез нитрогеназы. Функции глутаминсинтетазы в фиксации молекулярного азота не ограничиваются связыванием аммиака. Она выполняет основную регуляторную роль в синтезе нитрогеназы, активизируя работу nif-оперона, а также в синтезе других ферментов азотного метаболизма.

Опыты, проведенные на бесклеточных препаратах и с очищенным ферментом, показали токсическое действие кислорода на активность нитрогеназы. Но вместе с тем кислород необходим для дыхания аэробных азотфиксирующих микроорганизмов, так как получение энергии из органических соединений и ее трансформация в макроэргические связи АТФ осуществляются у них в процессах дыхания и сопряженного окислительного фосфорилирования. Чтобы предохранить нитрогеназу от токсического действия кислорода воздуха, у микроорганизмов выработались различные защитные механизмы: сильная респирация у азотбактера, обильное

слизеобразование у ризобий в чистой культуре, наличие леггемоглобина в клубеньках.

Леггемоглобин в клубеньках находится между клетками бактероидов и окружающими их мембранами растений. Синтез леггемоглобина осуществляется растительной клеткой, а синтез исходного вещества - протогема - производится в бактероидах. В отдельности ни бобовые растения, ни клубеньковые бактерии неспособны к синтезу леггемоглобина. При симбиотической азотфиксации растения и бактерии функционируют как единая система (рис.12.6). Высшие растения играют роль поставщика энергетического материала для активации и связывания азота и в то же

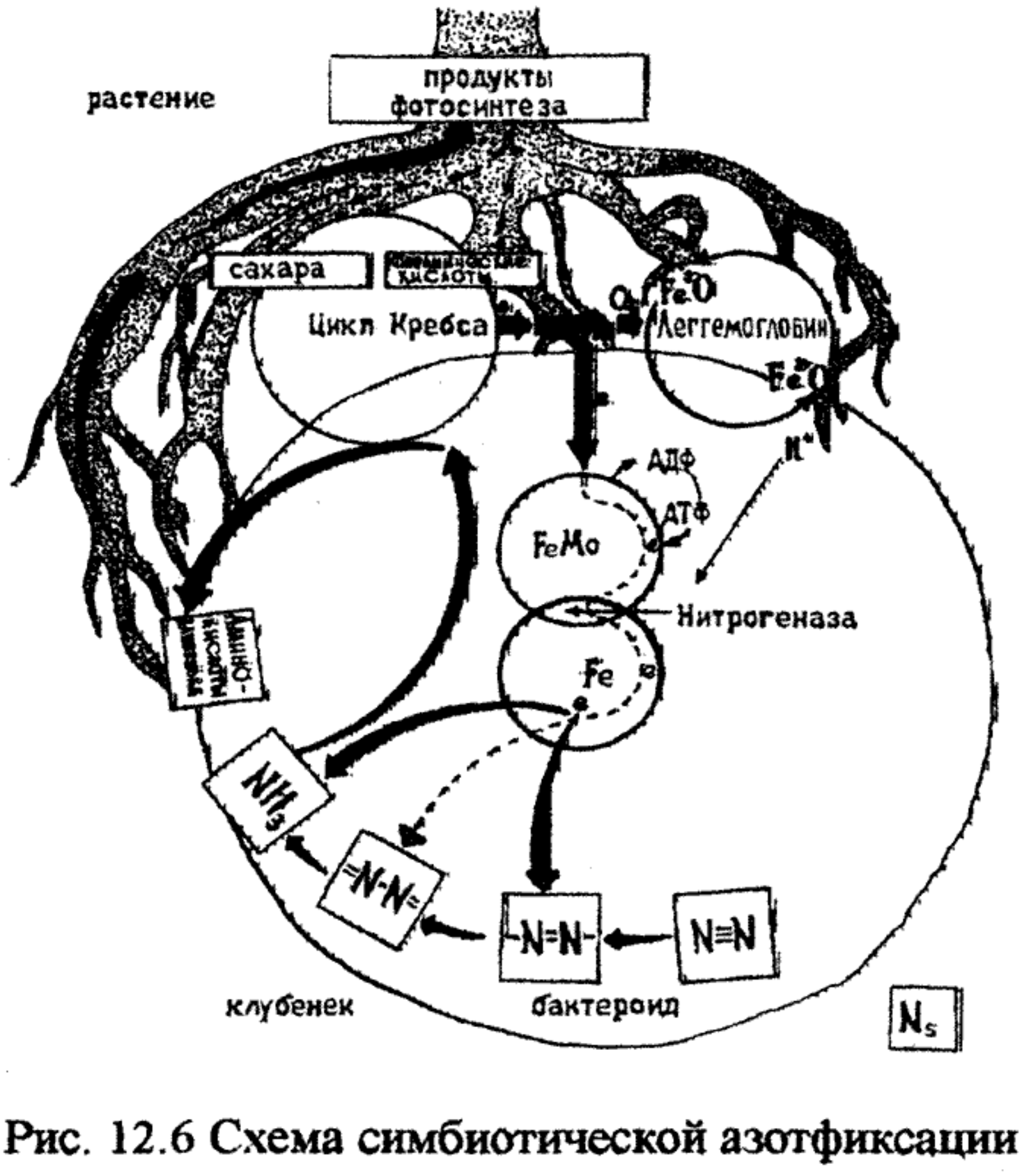


Рис. 12.6 Схема симбиотической азотфиксации

время потребителя азотсодержащих соединений. Электронтранспортную функцию выполняют леггемоглобин; он же регулирует содержание кислорода в симбиотической системе, который, с одной стороны, необходим для образования АТФ (путем окислительного фосфорилирования), а с другой стороны - является токсичным для нитрогеназ.

Процесс азотфиксации осуществляется в бактероидах. Конечным продуктом его, как было отмечено, является аммоний. Растениями же используются аминокислоты, образовавшиеся в результате соединения аммония с кетокислотами. Выяснение функций бактерий и растений в симбиотической азотфиксации позволило воспроизвести условия для развития бактерий, аналогичные таковым в клубеньке бактерий, и показать способность клубеньковых бактерий разных видов к самостоятельной азотфиксации. Обязательным условием для фиксации молекулярного азота чистыми культурами клубеньковых бактерий является наличие в среде подходящих источников углерода, преимущественно пентоз (арабиноза, рибоза), промежуточных соединений цикла Кребса (сукцинат, пируват) и минимальных количеств связанного азота. Необходимы также витамины и микроэлементы (Mo, Co). Веским доказательством азотфиксирующей способности свободноживущих клубеньковых бактерий послужило обнаружение в их клетках (а не в растительных) генов азотфиксации.

Симбиотическая азотфиксация обеспечивается сложной системой генов клубеньковых бактерий. Одни из них - гены симбиоза (nof - гены) - контролируют специфичность клубеньковых бактерий и образование клубеньков; другие - гены азотфиксации (nif - гены) кодируют синтез азотфиксирующих ферментов, в том числе и нитрогеназы; третьи гены принимают в азотфиксации косвенное участие - регулируют метаболизм в направлении обеспечения процесса азотфиксации энергией. Гены симбиоза и большинство генов азотфиксации находятся на плазмидах, только некоторые из nif-генов (nif-3, nif-4, nif-7) расположены на хромосоме. Плазмиды клубеньковых бактерий являются составной частью генома, отличаются большой молекулярной массой ($2 \cdot 10^8$) и способны передаваться из клетки в клетку.

12.1.3. Бактериальные удобрения

Способность азотобактера и клубеньковых бактерий фиксировать азот атмосферы и обогащать им почву нашли

практическое применение в изготовлении бактериальных удобрений - нитрагина и азотобактерина.

Нитрагин - это препарат, содержащий чистую культуру клубеньковых бактерий. Впервые он был изготовлен в 1897 г. из смеси клубеньковых бактерий, специфичных для 19 видов бобовых растений. У нас в стране почвенный нитрагин был получен в 1911 г. и уже в 1929 г. начался его массовый выпуск.

В настоящее время осуществляется широкое производственное изготовление торфяного нитрагина. Для этих целей используется разложившийся, нейтрализованный до pH 6-7, торф с влажностью 40-45 % от полной влагоемкости. Торф заражается чистой культурой клубеньковых бактерий определенного вида, затем выдерживается при температуре 25-28^0 С до тех пор, пока титр клеток не достигнет 100-200 млн/г почвы. Обработка семян бобовых растений производится непосредственно перед высевом их в почву. При этом строго соблюдается специфичность бактерий, т. е. нитрагин вносится под определенные виды бобовых.

Применение нитрагина повышает урожай растений на 30-40 %, значительно улучшает его качество за счет увеличения содержания белкового азота и витаминов группы В. Кроме того, нитрагин оказывает положительное влияние на рост последующих за бобовыми культур, это так называемое последствие нитрагина.

Азотобактерин - бактериальный препарат, содержащий чистую культуру азотобактера. В производственных условиях изготавливается два вида этого препарата: агаровый и почвенный. Технология изготовления такая же, как и нитрагина.

Азотобактерин применяется под овощные и технические культуры. Существенное влияние на эффективность действия азотобактерина оказывают тип почвы и вид растений. Более постоянные и высокие прибавки (в среднем 15-20 %) в урожае характерны для овощных культур, картофеля, кукурузы, сахарной свеклы; значительно слабее действует азотобактер на злаковые культуры (прибавка в среднем 7,5-10 %).

Положительное действие азотобактерина определяется рядом ценных биологических особенностей азотобактера: его азотфиксирующей способностью, приводящей к увеличению общего содержания азота в почве; способностью образовывать физиоло-

гически активные вещества (витамины, ауксины), стимулирующие рост растений; антагонистическими свойствами по отношению к некоторым фитопатогенным грибам и бактериям, снижающим заболевания растений; его стимуляцией развития почвенных микроорганизмов и интенсификацией микробиологических процессов.

Наибольший эффект от применения азотобактерина получают при правильном сочетании его с органическими и минеральными удобрениями или при использовании его на хорошо возделанных почвах.

12.1.4. Аммонификация

Почти весь азот, попадающий в почву в процессе азотфиксации, а также азот растительных и животных тканей, зеленых удобрений, навоза, гумуса содержится в органических белковых соединениях - до 99 % от всего запаса азота в почве. Однако этот азот не может усваиваться растениями. Им необходим минеральный азот. И только благодаря деятельности микроорганизмов - бактерий, актиномицетов и грибов - в почве и воде постоянно происходит разложение органических азотистых соединений на более простые вещества, в результате чего выделяется аммиак. Этот процесс, получивший название аммонификации, представляет собой второй этап цикла азота.

Аммонификации подвергаются вещества самой разнообразной структуры - белковые соединения, аминосахара, нуклеиновые кислоты, алкалоиды, мочевина и другие, причем освобождающийся аммиак расходуется по-разному. Часть его адсорбируется в обменных реакциях почвы, часть используется гетеротрофными микроорганизмами и превращается в белки их тел; некоторое количество аммиака окисляется автотрофами до нитритов и нитратов; или же он может остаться в свободном состоянии и выделяться в атмосферу.

В аммонификации принимают участие многие микроорганизмы, включая неспорообразующие бактерии, бациллы, актиномицеты, микроскопические грибы. В зависимости от стадии минерализации органического вещества доминирует те или другие представители. Активными возбудителями процесса являются

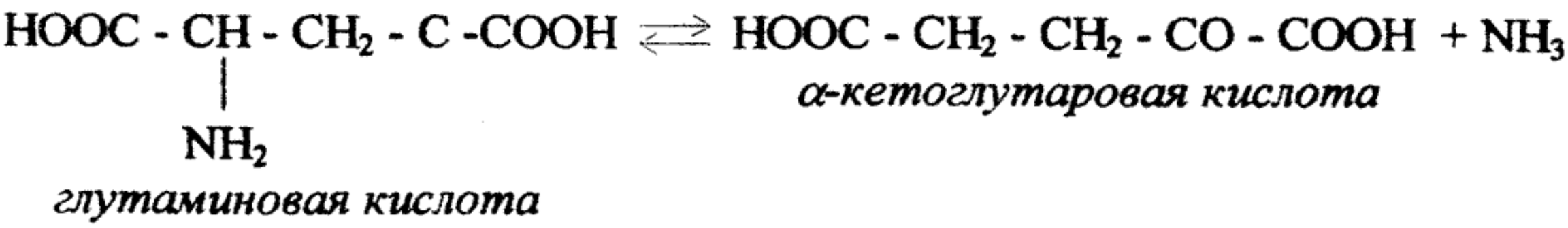
бактерии родов Pseudomonas и Bacillus. В развитии аммонификации наблюдается определенная закономерность, характеризующаяся последовательной сменой доминирующих групп микроорганизмов.

Аммонификацию свежего материала начинают неспорообразующие бактерии в ассоциации с некоторыми микроскопическими грибами. По мере потребления легкодоступных соединений развитие их замедляется, численность снижается. Доминирующие положение начинают занимать бациллы. Они производят расщепление более сложных соединений. Однако исчерпание данных соединений и появление гумуса благоприятствует развитию актиномицетов, которые в значительной мере сдерживают развитие бацилл. В микробоценозе численность актиномицетов не уступает численности бацилл. Завершают процесс минерализации органического вещества мицелиальные грибы.

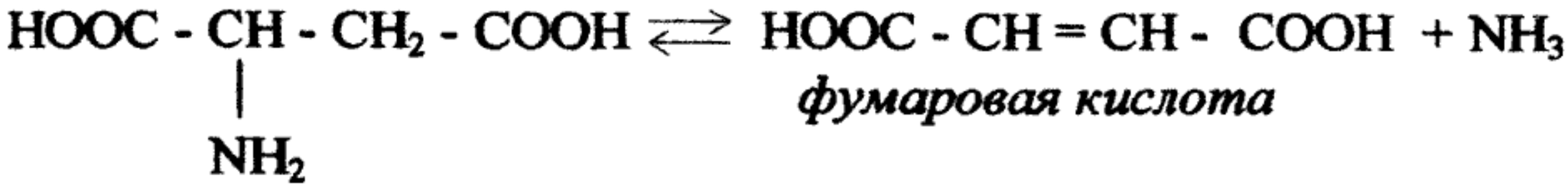
Химизм аммонификации состоит в следующем. Расщепление молекулы белка начинается с процесса гидролиза, осуществляемого внеклеточными гидролитическими ферментами, выделяемыми аммонификаторами. В результате образуется более простые продукты: белок → пептоны → пептиды → аминокислоты. Аминокислоты ассимилируются бактериями как источники питания, и под действием внутриклеточных ферментов дезаминаз от них отщепляется аммиак - конечный продукт аммонификации. Чаще всего наблюдается гидролитическое и окислительное дезаминирование, реже - дезаминирование, приводящее к образованию ненасыщенных соединений; для анаэробных условий характерно восстановительное дезаминирование.

Кроме аммиака, продуктами дезаминирования аминокислот могут быть органические кислоты, а при сочетании с декарбоксилированием - спирты и углеводороды.

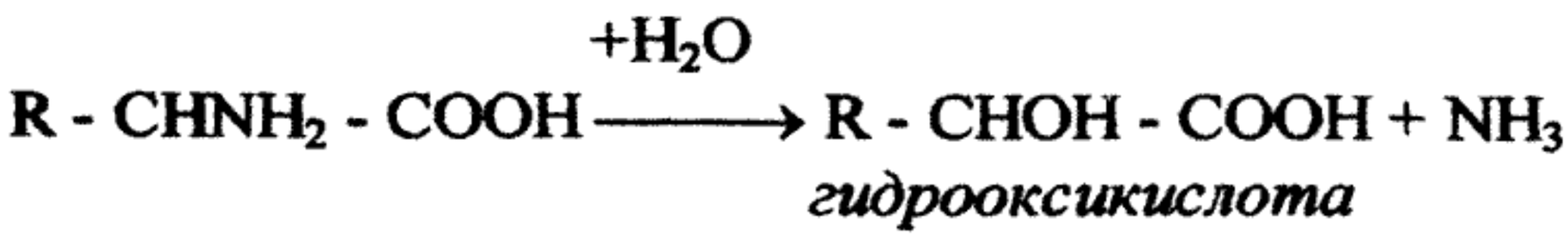
Так, при окислительном дезаминировании глутаминовой кислоты глутаматдегидрогеназой образуются α-кетоглутаровая кислота и аммиак:



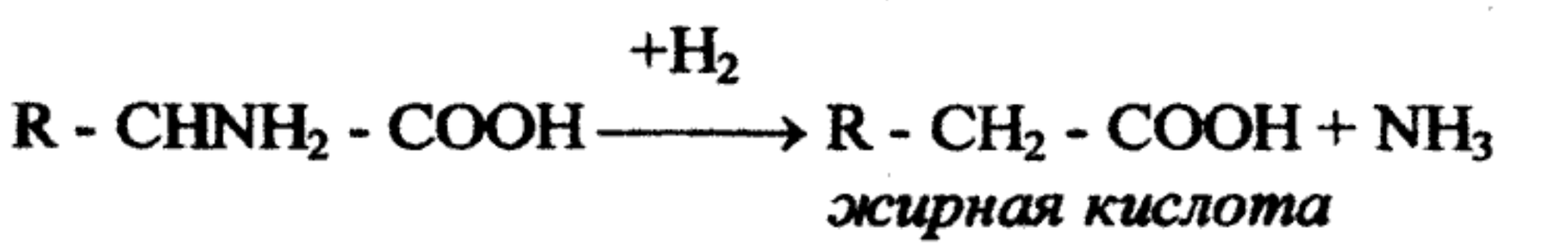
Аспарагиновая кислота дезаминируется аспартазой и дает фумаровую кислоту:



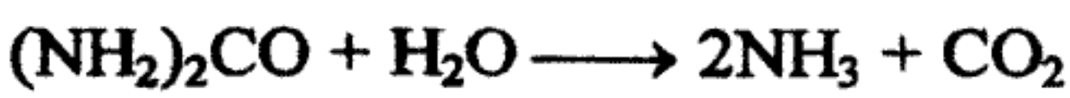
Гидролитическому дезаминированию подвергаются многие аминокислоты. Реакция идет по схеме:



Восстановительное дезаминирование приводит к образованию жирных кислот:



Дезаминированию подвергаются вещества и небелковой природы. Многие бактерии в качестве источника азота используют мочевину. Расщепление мочевины осуществляется гидролитическим путем с участием фермента уреазы:



Аммонификация мочевины, как и белковых веществ, имеет положительное значение для обеспечения бактерий и растений аммонийным азотом.

Наряду с дезаминированием может происходить и декарбоксилирование аминокислот. Обычно в кислой среде наблюдается декарбоксилирование, в щелочной - дезаминирование. Обе ферментные системы - дезаминаз и декарбоксилаз - действуют как механизмы нейтрализации среды, в результате чего pH поддерживается на уровне, обеспечивающем нормальную жизнедеятельность клетки. При декарбоксилировании аминокислот образуются первичные

амины, такие, как кадаверин, путресцин (трупные яды), и выделяется углекислый газ (рис. 12.7).

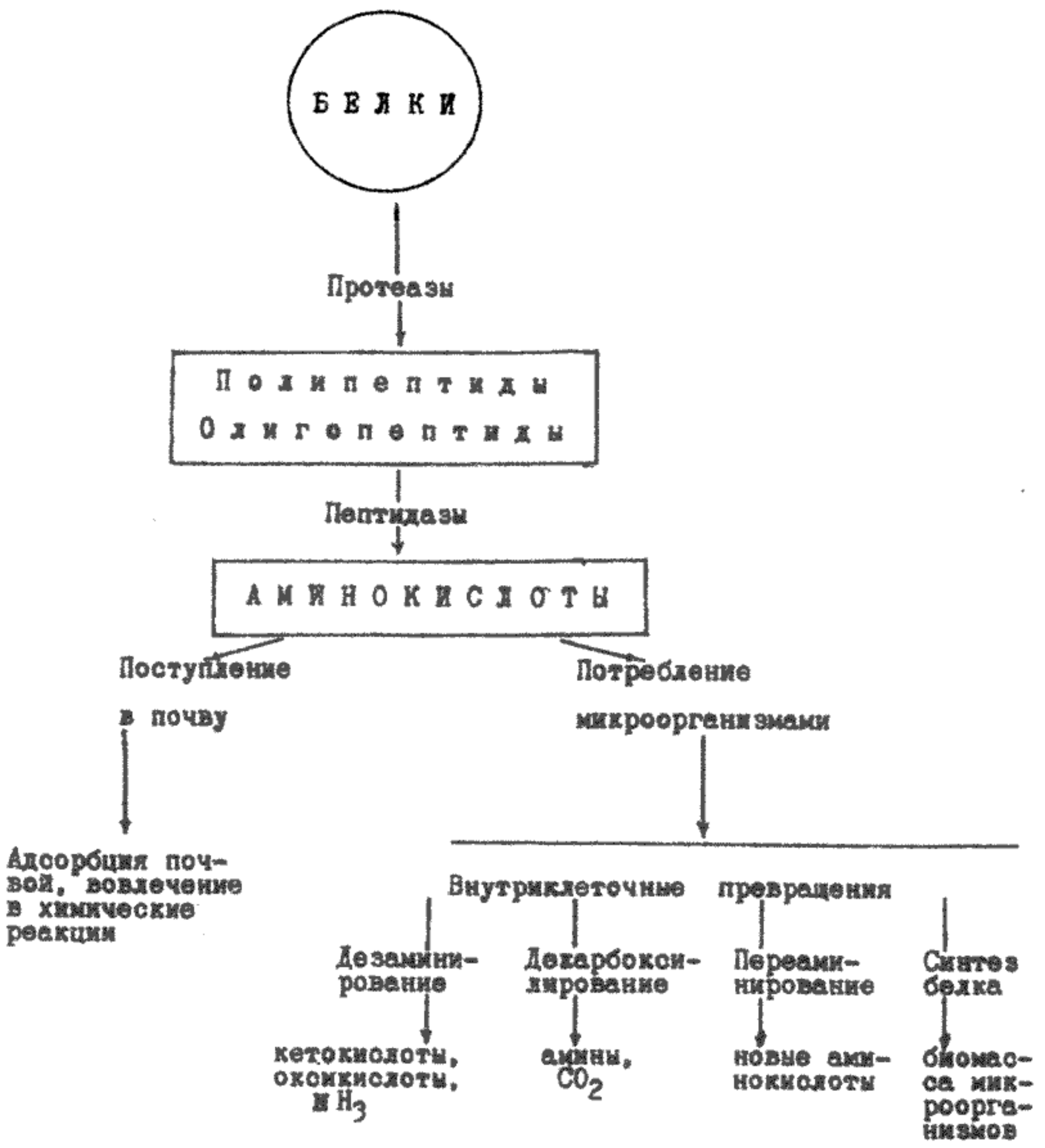


Рис. 12.7. Схема аммонификации белков

12.1.5. Нитрификация

Аммиак и аммонийные соли, образующиеся в процессах аммонификации, подвергаются в почве и водоемах окислению в соли азотистой (нитриты), и затем азотной кислоты (нитраты). Процесс окисления аммиака и аммиачных солей до азотной кислоты называется нитрификацией. Сущность процесса нитрификации была выяснена в классических исследованиях С. Н. Виноградского.

В 1891 г. он выделил возбудителей нитрификации в чистую культуру и показал, что процесс нитрификации является двухфазным и осуществляется различными видами бактерий.

В первую фазу через ряд промежуточных звеньев происходит окисление аммиака до нитритов:

$$NH_3 \xrightarrow{+H_2O} NH_4OH \xrightarrow{-2H} NH_2OH \xrightarrow{-2H} HNO \xrightarrow{-2H} HNO_2 + 65{,}6 \text{ ккал}$$

едкий аммоний — *гидроксил-амин* — *нитро-ксил* — *нитрит*

Освобожденная при этом энергия обусловливают развитие нитрифицирующих бактерий. Возбудителями первой фазы нитрификации являются бактерии родов Nitrosomonas, Nitrosocystis, Nitrosolobus (рис. 12.8 (I)). Они различаются по морфологии и упорядоченности внутриклеточных мембран, тонкая структура которых была описана Ж. Ватсоном в 1971 г. Наиболее значимым в процессе нитрификации является род Nitrosomonas. Бактерии этого рода имеют палочковидную палочковидную форму размером 1,5 × 1 мкм. Они грамотрицательны, подвижны, спор не образуют.

Для второй фазы характерно окисление нитритов до нитратов:

$$HNO_2 \xrightarrow{+1/2\ O_2} HNO_3 + 20{,}9 \text{ ккал}$$

Возбудителями второй фазы нитрификации являются бактерии родов Nitrobacter, Nitrococcus, Nitrospina. Представители рода Nitrobacter - мелкие (1 × 0,8 мкм) овальные грамотрицательные палочки (12.8(II)).

Как и возбудители первой фазы, это типичные хемоавтолитотрофы, т. е. они развиваются на чисто минеральных средах, используя для синтеза органических веществ энергию реакций окисления нитритов, а углерод - из углекислого газа.

Нитрификаторы являются облигатными аэробами. Оптимальная температура их развития равна 28-30^0 С. Нитрифицирующие бактерии очень специфичны в отношении окисляемого субстрата. Nitrosomonas окисляет только аммиак, а Nitrobacter - только соли

азотистой кислоты. Ни один из этих организмов не может использовать в качестве источника энергии соединения серы или органические вещества. Единственным источником углерода для них являются углекислота и карбонаты.

Кроме типичных нитрификаторов многие гетеротрофные бактерии родов Pseudomonas, Xanthomonas, Arthrobacter, Bacillus способны окислять аммиак и другие восстановительные соединения азота до нитритов и нитратов. Этот тип нитрификации получил название гетеротрофной. В отличие от нитрификации, осуществляемой бактериями Nitrosomonas и Nitrobacter, гетеротрофная нитрификация не является источником энергии для бактерий.

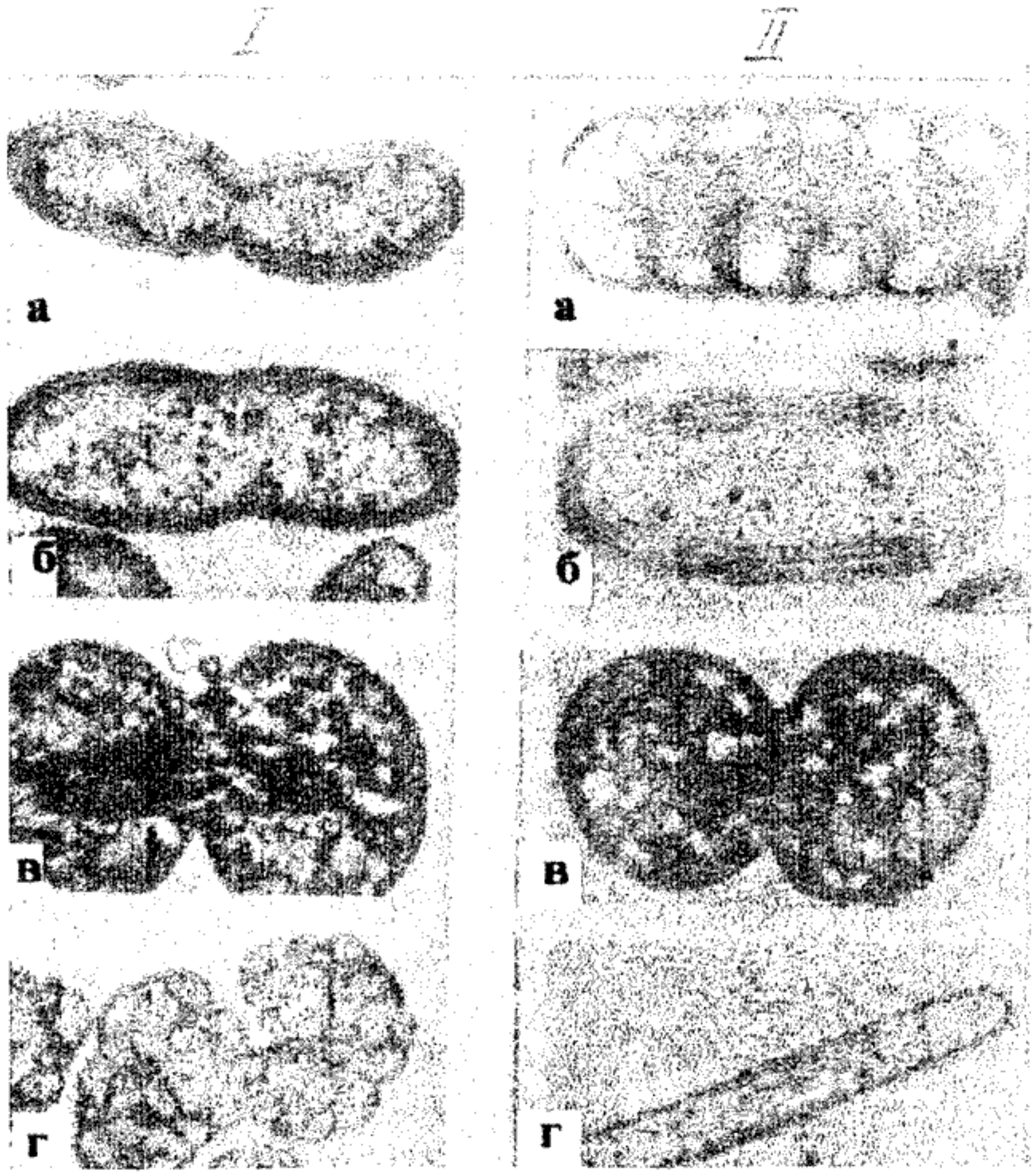


Рис.12.8. Нитрифицирующие бактерии: I - возбудители первой фазы нитрификации: *а - Nitrosomonas europea; б - Nitrosomonas sp.; в - Nitrosocystis; г - Nitrosolobus;* II - возбудители второй фазы нитрификации: *а - Nitrosospira; б - Nitrobacter; в - Nitrococcus; г - Nitrospira*

Гетеротрофная нитрификация широко распространена в природе, особенно там, где аммиак образуется в условиях высокого содержания органического вещества, например, в компостах, сточных водах. Образование нитратов параллельно окислению органического вещества.

12.1.6. Денитрификация

Судьба образовавшихся нитратов весьма различна. Они частично используются высшими растениями, частично вымываются водой, некоторое же количество их расходуется на построение самих бактерий. Ряд бактерий используют кислород нитратов для окисления органических веществ. При этом происходит восстановление нитратов в нитриты, молекулярный азот и другие газообразные продукты. Процесс восстановления нитратов получил название денитрификации или нитратредукции. Общая схема денитрификации может быть представлена в виде последовательности реакций:

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$$

где NO_2, $\overline{NO}$ и N_2O являются облигатными свободными интермедиатами, а реакции катализируются соответственно четырьмя различными редуктазами.

Для замыкания цикла азота имеет значение лишь стадия молекулярного азота, так как промежуточные продукты могут быть использованы в обменных реакциях, в то время как выделение молекулярного азота приводит к реальной потере его почвой или водой.

Денитрифицирующие бактерии относятся к аэробам или факультативным анаэробам. Наиболее активные денитрификаторы известны среди бактерий родов Pseudomonas, Paracoccus, Alcaligenes, Bacillus. Способностью восстанавливать нитраты обладает серобактерия Thiobacillus denitrificans. В процессе окисления серы она использует нитраты как акцептор электронов, и процесс протекает аналогично анаэробному дыханию.

По участию микроорганизмов в восстановлении нитратов различают прямую и косвенную денитрификацию. Под прямой - подразумевают биологическую редукцию нитратов, под косвенной - чисто химическое восстановление, осуществляющееся взаимодействием нитритов с аминокислотами, которые образуются в процессе жизнедеятельности микроорганизмов:

$$HNO_2 + RCHNH_2 - COOH \longrightarrow RCHOH - COON + N_2 + H_2O.$$

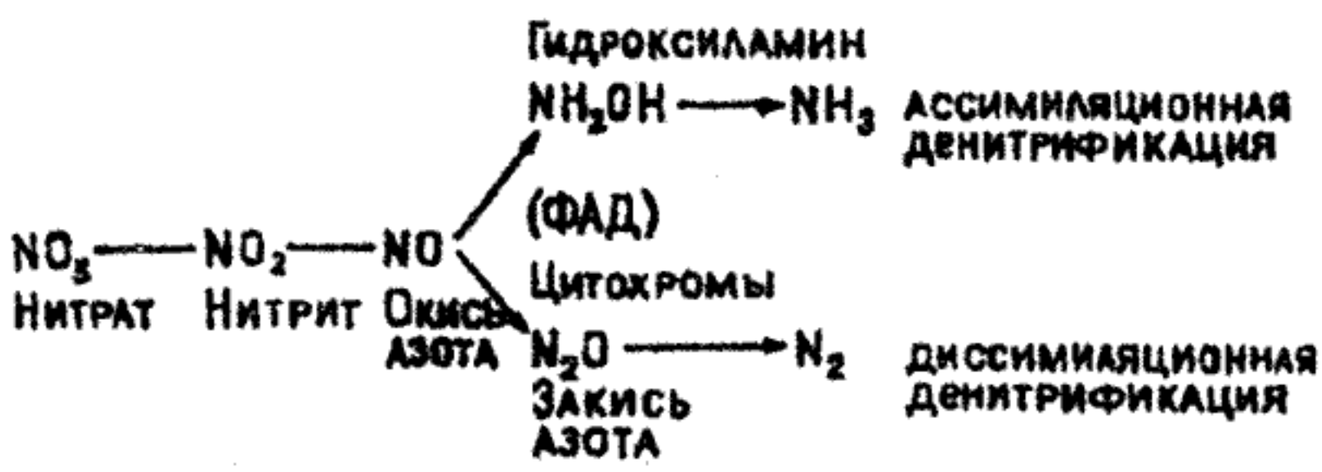
Косвенная денитрификация имеет место только в кислой среде.

Более распространена в природе прямая, или биологическая, денитрификация, обусловленная непосредственной деятельностью микроорганизмов.

Бактерии-денитрификаторы имеют две ферментные системы нитратредукции: цитохромную (диссимиляционная) и флавопротеидная (ФАД, ассимиляционная). Последняя характерна для многих микроорганизмов и всех зеленых растений. Обе системы нитратредуктаз у типичных денитрификаторов (Ps. denitrificans) активны. Наличие этих систем обеспечивает два пути восстановления нитратов. Поэтому различают два типа биологической денитрификации: ассимиляционную, неспецифическую, и диссимиляционную, специфическую.

Ассимиляционная денитрификация, или иначе аммонификация нитрата, приводит к образованию аммиака, который ассимилируется организмами и включается в метаболизм. Нитраты здесь используются как источник азота. Этот вид денитрификации присущ всем зеленым растениям и некоторым бактериям.

Диссимиляционная денитрификация, или нитратное дыхание, осуществляется микроорганизмами для получения энергии. Нитраты в данном случае выступают в качестве конечных акцепторов водорода (e^-) в цепи транспорта электронов (см. гл 9). Конечным продуктом диссимиляционной денитрификации является молекулярный азот:



Диссимиляционная денитрификация происходит интенсивно в анаэробных условиях, хотя возбудители ее и не являются облигатными анаэробами. Кислород подавляет синтез и функцию

нитратредуктаз, являясь более сильным конкурентом (по сравнению с нитратами) за электроны в дыхательной цепи.

Диссимиляционная денитрификация приводит к обеднению водоемов и почв связанным азотом, так как образующийся N_2 улетучивается в атмосферу. Однако и этот процесс необходим для обеспечения равновесия в круговороте азота.

12.2. КРУГОВОРОТ УГЛЕРОДА

Углерод, так же как и азот, является важнейшим элементом органической жизни. Первоисточником углерода любого органического вещества служит углекислота воздуха (рис. 12.9). Содержание ее в воздухе составляет 0,03 % от общего объема газов и является довольно постоянной величиной. Это постоянство поддерживается как физико-химическими, так и биологическими процессами. К первым относятся извержения вулканов, сопровождающиеся выделением огромного количества углекислоты, сжигание топливных материалов для промышленных целей.

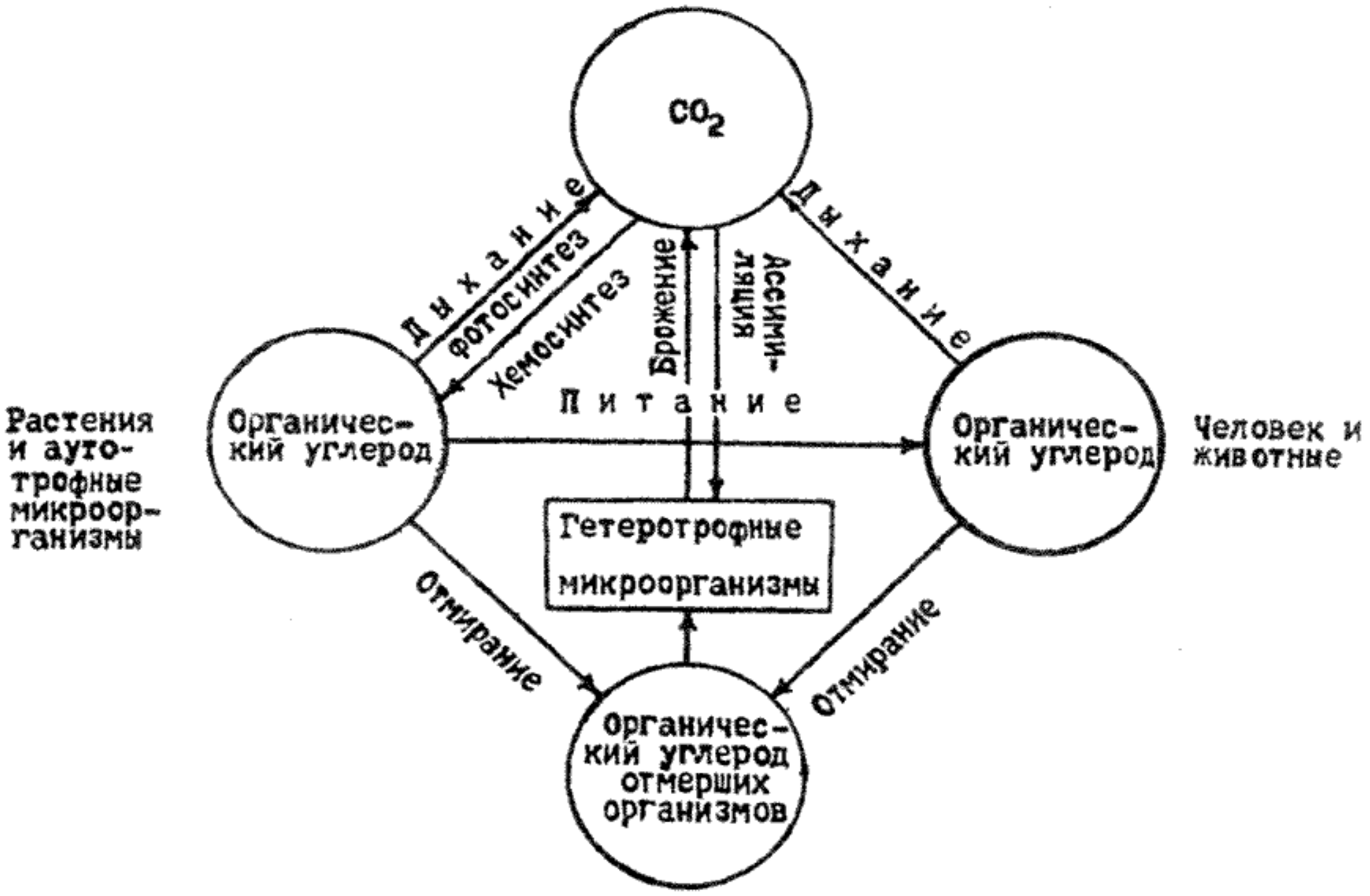


Рис.12.9. Схема круговорота углерода

Например, только от сжигания каменного угля ежегодно в атмосферу возвращается около 4,7 % углекислоты от ее общего запаса в природе. К биологическим процессам относятся все биохимические реакции фотосинтеза, хемосинтеза, дыхания и брожения, сопровождающиеся потреблением и выделением углекислого газа.

Круговорот углерода начинается с фиксации углекислоты зелеными растениями и автотрофными микроорганизмами. Образовавшиеся в процессе фото- и хемосинтеза организмов углеводы или другие углеродсодержащие органические соединения частично используются этими же организмами для получения энергии, при этом углекислота (продукт реакций окисления) выделяется в среду. Часть фиксированного растениями углерода потребляется человеком и животными, которые выделяют его в форме углекислоты в процессе дыхания. Углерод, выделяющийся в результате разложения отмерших растений и животных, окисляется до углекислоты и тоже возвращается в атмосферу.

Ведущая роль в возращении углерода в атмосферу принадлежит микроорганизмам. В процессах дыхания и брожения они разлагают самые разнообразные органические соединения. Более доступными являются углеродсодержащие соединения, растворимые в воде (углеводы, спирты). Но в естественных условиях - в почве и воде - в гораздо большем количестве встречаются труднорастворимые соединения углерода, такие, например, как крахмал, пектиновые вещества, клетчатка, лигнин. В них сосредоточена основная масса углерода. Разложение их начинается с гидролиза, в результате чего образуются более простые соединения типа углеводов. Дальнейшее превращение данных соединений осуществляется в реакциях дыхания или брожения.

12.2.1. Расщепление крахмала

Крахмал образуется зелеными растениями при ассимиляции углекислоты и в почву попадает в составе семян, клубней и растительных тканей. Расщепление крахмала микробами начинается с его гидролиза. Под действием амилазы крахмал превращается в декстрин, затем в мальтозу и изомальтозу. Осахарившийся крахмал

легко подвергается действию микробов и в анаэробных условиях разлагается по одному из типов брожения углеводов. В аэробных условиях крахмал окисляется через ЦТК или пентозофосфатный цикл до углекислоты.

Амилолитической активностью обладают многие микроорганизмы. В анаэробных условиях расщепление крахмала осуществляется спорообразующими микроорганизмами рода Clostridium. Специализированные виды его (Cl. amyloliticum) расщепляют крахмал до стадии кислот, спиртов и газов.

Расщепление крахмала микроорганизмами нашло практическое применение в спиртовой и текстильной промышленности (удаление крахмала из текстиля), а также в хлебопечении.

12.2.2. Расщепление пектиновых веществ

Пектиновые, или межклеточные, вещества разных растений имеют слизистую консистенцию и сложное химическое строение. В своем составе они содержат более 40 углеродных атомов. Сюда входят в значительном количестве кальциевые соли пектиновой кислоты и различные производные гексоз и пектоз. Эти соединения обладают коллоидными свойствами и прочно цементируют растительные клетки в ткани. Поэтому для минерализации растительных тканей или расщепления их на отдельные клетки необходимо разрушение пектиновых веществ. Это разрушение в почве осуществляется специальными пектинразлагающими микроорганизмами. В аэробных условиях здесь принимают участие Bac. subtilis, Bac. mesentericus, в анаэробных - Cl. felsineum и Cl. pectinovorum. Разложение пектина начинается с его гидролиза под действием фермента пектиназы. В результате образуются галактуроновая и уксусная кислоты, метиловый спирт, которые далее окисляются до углекислоты и воды. В анаэробных условиях сбраживанию подвергаются только галактоза и арабиноза с образованием масляной кислоты, остальные вещества накапливаются в субстрате или разлагаются аэробами:

$$C_5H_{10}O_5 \longrightarrow C_3H_7COOH + CO_2 + H_2$$

Возбудителем брожения является Cl. felsineum - крупная грамположительная подвижная палочка.

Активное участие в разложении пектиновых веществ в аэробных условиях принимают некоторые грибы - Asp. niger, Penic. glaucum, Mucor, Cladosporium, Sclerotinia libertiana. Особенно велика роль их в разрушении пектиновых веществ в лесных почвах, где гифы грибов пронизывают всю массу опавших листьев и быстро мацерируют их.

Разрушение клеточных веществ играет важную роль в почвенных процессах, так как определяет быстроту минерализации растительных тканей. Когда ткань распадается на отдельные клетки, то создается большая поверхность для воздействия целлюлозо-разлагающих бактерий, обычно заканчивающих минерализацию растительных остатков.

На деятельности пектинразлагающих микроорганизмов основана так называемая мочка льна и конопли, имеющая большое практическое значение. Мочка производится с целью разрушения паренхимной ткани, пропитанной пектиновыми веществами, и отделения лубяных волокон от кожицы, друг от друга и от древесинной части стебля - «костры». Мацерация прядильных растений производится их стланьем («росяная мочка») или погружением в воду («водяная мочка»). При росяной мочке лен расстилается на открытом месте и подвергается действию главным образом мукоровых плесеней и разнообразных физико-химических факторов: росы, дождя, температуры, света и др. Процесс идет медленно, особенно в холодное время. При водяной мочке лен погружают в водоемы. Здесь в основном принимают участие анаэробные маслянокислые бактерии. Аэробная мочка льна, конопли и кенафа введена у нас в практику И. А. Макриновым, который применял для этого выделенный им микроб Pectinobacter amylovorum.

Способностью разлагать пектиновые вещества обладают многие бактерии, грибы и в первую очередь возбудители заболеваний растений. Пектолитические ферменты выявлены у бактерий рода Erwinia, у грибов Fusarium, Botrytis, Aspergillus. Активные штаммы грибов используются в промышленности для

получения пектолитических ферментов, которые применяются с целью осветления фруктовых соков.

12.2.3. Расщепление целлюлозы

Огромное значение в круговороте углерода имеет расщепление целлюлозы (клетчатки). В состав целлюлозы входит более 50 % всего органического углерода биосферы. Целлюлоза - наиболее широко распространенное вещество растительных клеток. Она составляет 45-80 % сухого веса растений. По химической природе целлюлоза - полисахарид, состоящий из цепочек глюкозы по 100-200 молекул. Они объединяются в пучки фибрилл, которые покрываются общей оболочкой, пропитанной воском и пектином, составляя целлюлозные волокна.

Целлюлоза представляет собой очень стойкое органическое соединение и может быть разрушена только при действии сильных химических окислителей. Но в природе она довольно интенсивно разрушается широко распространенными микроорганизмами, впервые описанными В. Л. Омелянским в 1899 г. Эти микроорганизмы образуют ферменты целлюлозы. Они расщепляют целлюлозу до глюкозы или до дисахарида целлобиозы.

Различают аэробное и анаэробное расщепление целлюлозы. В аэробных условиях большая часть целлюлозы окисляется до углекислоты и воды и лишь незначительное количество ее окисляется не полностью и входит в состав гумуса. В аэробных условиях ведущая роль в разложении целлюлозы принадлежит грибам. Это часто встречается в кислых почвах и при разложении целлюлозы древесных растений, где она инкрустирована лигнином. Высокой целлюлолитической активностью характеризуются грибы родов Fusarium, Chaetomium, Botrytis, Rhisoctonia. Возбудителями аэробного окисления целлюлозы являются и бактерии родов Cytophaga и Sporocytophaga (пор. Cytophagales), миксобактерии родов Myxococcus, Archangium и Polyangium, а также сходные с псевдомонадами бактерии группы Cellvibrio. Все они широко распространены в природе.

Бактерии рода Cytophaga были выделены в чистую культуру С. Н. Виноградским в 1919 г. Они имеют форму довольно длинных

(3-8 мкм) палочек с заостренными концами. При развитии на клетчатке (фильтровальной бумаге) они образуют желтый пигмент разных оттенков. В отличие от этих бактерий представители рода Sporocytophaga образуют цисты.

Целлюлозоразрушающие бактерии способны вызывать гидролиз целлюлозы только при непосредственном контакте с ней. Внеклеточных целлюлаз в культуре данных бактерий не обнаружено.

В анаэробных условиях разложение клетчатки осуществляют мезофильные бактерии Bac. omelianskii, некоторые кокки и термофильные клостридии. Они характеризуются строгой приуроченностью к использованию целлюлозы. Например, Cl. thermocellum развивается на синтетических средах только при наличии целлюлозы или целлобиозы; глюкозу и другие углеводы этот микроорганизм не использует. Разложение целлюлозы в анаэробных условиях идет по типу брожения. Вначале под действием целлюлаз происходит внеклеточный гидролиз. Затем продукты гидролиза - глюкоза и целлобиоза - сбраживаются, образуя различные вещества: уксусную, масляную, молочную и муравьиную кислоты, углекислоту и молекулярный водород. В смешанных культурах эти кислоты под действием метанобразующих бактерий подвергаются метановому брожению, в результате чего образуется метан. Метановое брожение часто протекает одновременно с брожением целлюлозы.

Анаэробные целлюлозоразрушающие бактерии широко распространены в природе. Развитие их часто осуществляется в симбиозе с другими микроорганизмами, называемыми спутниками.

12.2.4. Превращение углеводородов

Углеводороды биогенного и абиогенного (геохимического) происхождения концентрируют значительную часть углерода. Поэтому разложение их составляет важный этап в круговороте углерода. Большинство природных углеводородов частично или полностью окисляется микроорганизмами. Даже такие химически устойчивые соединения, как нефть, каучук, парафин разлагаются под действием микроорганизмов. Из всех природных соединений наибольшей устойчивостью к микробному разложению обладают ароматические углеводороды - фенилпропановые соединения.

Биологическое разрушение их происходит в аэробных условиях, так как для разрыва ароматического кольца требуется кислород. Реакции разрыва катализируются индуцибельными ферментами - оксигеназами, под действием которых происходит включение одного или двух атомов кислорода в ароматическое кольцо углеводорода. В результате этого при одном или двух углеродных атомах ароматического кольца образуются гидроксильные группы. Разрыв кольца может происходить между двумя гидроксилированными атомами углерода (орторасщепление) или между гидроксилированным и соседним негидроксилированным С-атомами (метарасщепление). Известен еще третий путь расщепления - разрыв кольца между гидроксилированным С-атомом и С-атомом, соединенным либо гидроксильной, либо той или иной алифатической группой. Так расщепляется фенилаланин, фенилпропановая кислота, тиразин.

Пути микробного расщепления ароматических углеводородов многообразны. Процесс этот не является узкоспецифичным. Способностью к расщеплению ароматических углеводородов обладают многие бактерии и грибы: псевдомонады, микобактерии, бациллы и дрожжи. При соответствующих условиях они производят полное окисление определенного углеводорода без накопления промежуточных продуктов. Например, некоторые штаммы нокардий, в частности, Nocardia corallina, могут расти на бензоле или толуоле как единственных источниках углерода без накопления промежуточных продуктов. Нафталин и антрацен также могут использоваться отдельными штаммами Nocardia и Corynebacterium.

Микробному превращению подвергаются и газообразные углеводороды: метан, этан, пропан, бутан. Они используются микроорганизмами как источники углерода. Микроорганизмы, окисляющие газообразные углеводороды, объединяются в особую группу - метилотрофы - и характеризуются субстратной специфичностью. По отношению к источнику углерода метилотрофы разделяются на две группы: облигатные и факультативные. К первым относятся метанокисляющие микроорганизмы, которые, кроме метана и метанола, не ассимилируют другие источники углерода. В отличие от них факультативные метилотрофы, помимо газообразных углеводородов, способны усваивать углерод различ-

ных органических соединений: кислот, сахаров, спиртов. Эта способность широко распространена у бактерий рода Pseudomonas. Так, Ps. radiobacter и Ps. liquefaciens наряду с различными органическими источниками углеродного питания могут использовать метан; Ps. methanica и Ps. fluorescens - этан; на бутане развивается Ps. scissa. Отдельные представители родов Mycobacterium, Nocardia, Corynebacterium производят полное окисление этана, бутана и пропана. С удлинением цепи углеводородов увеличивается число видов микроорганизмов, способных использовать эти соединения.

Облигатные метилотрофы - специфичные метанокисляющие бактерии - объединены в сем. Methylomonas, Methylococcus, Methylobacter и др. Особенностью метанокисляющих бактерий служит их тесное сожительство с бактериями, не ассимилирующими метан, с которыми они образуют микробные ассоциации. Это усложняет получение чистых культур облигатных метилотрофов и изучение их биологических свойств.

Отличительной чертой всех изученных штаммов метанокисляющих бактерий является наличие у них внутрицитоплазматических мембранных структур, подобных аналогичным образованиям у нитрифицирующих и фотосинтезирующих бактерий. Эти мембраны располагаются на периферии или пронизывают всю цитоплазму. Хорошо развитая мембранная система, образованная из цитоплазматической мембраны, обусловливает высокую метанокисляющую способность метилотрофов. Окисление метана осуществляется через метанол, формальдегид и муравьиную кислоту до углекислоты.

Метанокисляющие бактерии приурочены к природным субстратам, где образование метана происходит биологическим путем в процессе анаэробного разложения органических веществ.

Микроорганизмы, использующие газообразные углеводороды в качестве единственного источника углеродного питания, находят применение в различных областях народного хозяйства: для разведки нагорючие газы и нефть, для борьбы со скоплением метана в шахтах; они также представляют интерес как перспективные синтетики кормового белка и биологически активных веществ.

12.3. КРУГОВОРОТ СЕРЫ



Рис.12.10. Схема круговорота серы

В природе постоянно происходят многообразные превращения серы, где основную роль играют микроорганизмы. Цикл превращений серы составляет круговорот, аналогичный круговоротам азота и углерода. Схематически он представлен на рис. 12.10.

Микроорганизмы осуществляют три важнейших этапа в превращении серы: минерализацию органической серы, окисление минеральной серы и восстановление минеральной серы. Эти три этапа определяют три основные формы природной серы: органическую серу (белки, аминокислоты); сульфаты и сульфиты; сероводород и сульфиды.

12.3.1. Минерализация органической серы

В этом процессе участвуют многочисленные неспециализированные гетеротрофные микроорганизмы. Они осуществляют минерализацию серосодержащих соединений с образованием различных конечных продуктов. Раньше сероводород считали чуть ли не единственным конечным продуктом. В настоящее время установлено, что помимо сероводорода, особенно в аэробных условиях, образуются и другие соединения: меркаптаны, минеральная сера и сульфаты.

В расщеплении органических соединений серы участвуют и многообразные аэробные и анаэробные бактерии, грибы и

некоторые актиномицеты. В анаэробных условиях Proteus vulgaris, Bac. subtilis образуют H_2S из цистина и цистеина. Грибы Microsporum и Asp. niger образуют метилмеркаптаны и сульфаты; актиномицеты при разрушении метионина образуют окислительные соединения серы и сульфиды.

Сера, освобожденная из органических соединений, используется специализированными бактериями, в большинстве случаев автотрофами, которые превращают ее в сульфаты. В одних случаях сера является донором электрона и источником энергии (происходят процессы окисления серы); когда же она играет роль акцептора водорода, то идут восстановительные процессы.

12.3.2. Окисление минеральной серы

Окисление минеральной серы, получившее название сульфофикации, включает процессы окисления сероводорода, элементарной серы, тио- и тетрасоединений. Эти процессы вызываются особыми группами бактерий - серобактериями и тионовыми бактериями, широко распространенными как в почвах, так и в водоемах.

Окисление сероводорода серобактериями осуществляется в два этапа. Сначала происходит внутриклеточное окисление сероводорода до элементарной серы. Последняя накапливается в форме гранул капельно-жидкой серы в протоплазме клеток, что и определило название данных бактерий. Откладываемая в протоплазме клеток сера является запасным питательным материалом. Если среда обедняется сероводородом, то эта сера начинает быстро окисляться до серной кислоты. Оба этапа окисления можно выразить следующими уравнениями:

$$2H_2S + O_2 = 2H_2O + S_2 + 65 \text{ ккал}$$
$$S_2 + 3O_2 + 2H_2O = 2H_2SO_4 + 283 \text{ ккал}$$

Образующаяся серная кислота вступает в реакцию с бикарбонатами кальция и превращается в гипс ($CaSO_4$), который диффундирует из клеток в окружающую среду. Поэтому для развития серобактерий необходимо наличие в среде бикарбонатов.

Серобактерии. Серобактерии представляют собой физиологическую группу бесцветных и пурпурных микроорганизмов, довольно разнообразных по строению и развитию. Они культивируются только в среде, содержащей сероводород. Для типичных серобактерий окисление сероводорода является энергетическим процессом. Основная характеристика физиологии серобактерий дана С. Н. Виноградским (1888): «Эти бактерии не могут жить без серы, которая откладывается в их клетках. Серу они могут получать только при окислении сероводорода, который вследствие этого необходим для их развития. Свою серу они окисляют в серную кислоту и выделяют наружу из клеток в виде сернокислых солей, главным образом гипса. Если же процесс окисления из-за недостатка серы приостановлен, то серобактерии угнетаются в своих жизненных функциях и скоро погибают. Что касается питания этих организмов органическими веществами, то в этом отношении они совершенно нетребовательны: в высшей степени ничтожные количества органических веществ, которые не могут поддерживать рост большинства организмов, вполне их удовлетворяют. Хорошие питательные вещества, т. е. легко сбраживаемые, не оказывают при культивировании их благоприятного действия, напротив, они могут оказаться косвенно неблагоприятными, вызывая развитие различных гнилостных бактерий.

К бесцветным серобактериям относятся нитчатые формы, представленные тремя родами: Beggiatoa, Thioploca, Thiothrix (рис.12.11). К первому принадлежат свободно плавающие подвижные формы до 1 см длиной.

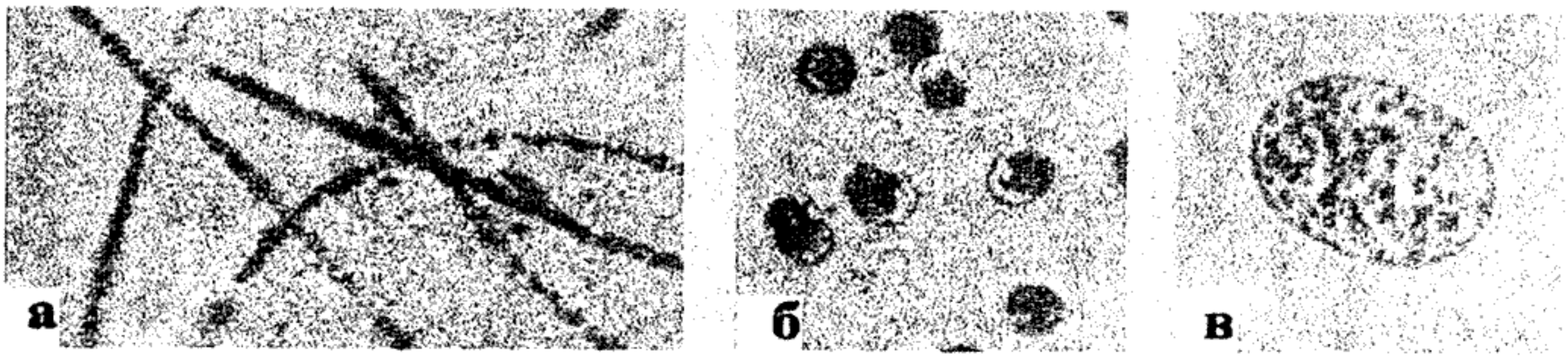


Рис.12.11. Бесцветные серобактерии, окисляющие серу: *а - Beggiatoa, б - Thiovulum, в - Achromatium*

Среди них следует указать Beg. alba (диаметр 3 мкм), Beg. media (диаметр 1,5 мкм); особенно большими размерами отличается Beg. mirabilis, которая является настоящим великаном среди бесцветных серобактерий (диаметр до 45 мкм).

Близок к Beggiatoa род Thioploca, но отличается тем, что нити у него по несколько штук заключены в толстые слизистые влагалища. Серобактерии рода Thiothrix неподвижные. При помощи слизистых подушечек, располагающихся на одном конце нити, они обычно прикрепляются к камням, стеблям, водорослям. Отличием служит также наличие у нитей Thiothrix особого чехла, благодаря чему отмершая нить не распадается на отдельные членики. Размножение у этих бактерий происходит при помощи подвижных конидий.

К бесцветным серобактериям принадлежат не обязательно нитчатые формы. Клетки Thiospirillum, например, имеют спирально извитую форму.

Все бесцветные серобактерии окисляют сероводород до серной кислоты через промежуточную стадию элементарной серы по схеме вышеприведенных уравнений. Бесцветные серобактерии относятся к хемосинтезирующим автотрофам. Они способны восстанавливать углекислый газ до органических соединений и использовать их для построения протоплазмы тела:

$$CO_2 + 2H_2S \longrightarrow 1/6C_6H_{12}O_6 + H_2O + S_2$$

Восстановление идет по пентозофосфатному циклу с образованием первого стабильного продукта ассимиляции углекислого газа - 3-фосфоглицериновой кислоты, которая через серию реакций превращается в фруктозодифосфат. Способность серобактерий усваивать углерод из угольной кислоты дает возможность им развиваться в чисто минеральных средах.

Пурпурные серобактерии сем. Chromatiaceae отличаются от бесцветных морфологией и наличием пигмента. Описание их приведено выше (см. гл. 8.8). Окисление сероводорода они осуществляют в процессе фотосинтеза, где сероводород является донором водорода.

Серобактерии широко распространены в природе. Они постоянно встречаются в серных источниках, в спокойных стоячих водах, в почве. Для их массового размножения обязательно присутствие кислорода и сероводорода. В результате окисления последнего они получают необходимую для жизнедеятельности энергию.

Тионовые бактерии. В отличие от серобактерий, тионовые бактерии способны окислять сернистые соединения без отложения серы внутри клетки. Сера накапливается вне клетки. Например, окисление гипосульфита происходит по следующей схеме:

$$N_2S_2O_3 + H_2O + O_2 \longrightarrow Na_2SO_4 + H_2SO_4 + S_2 + 500 \text{ ккал}$$

За счет освобождающейся энергии бактерии ассимилируют углекислый газ (рис. 12.12). Ассимиляция углекислоты совершается по циклу Кальвина, подобно тому как у зеленых растений при фотосинтезе.

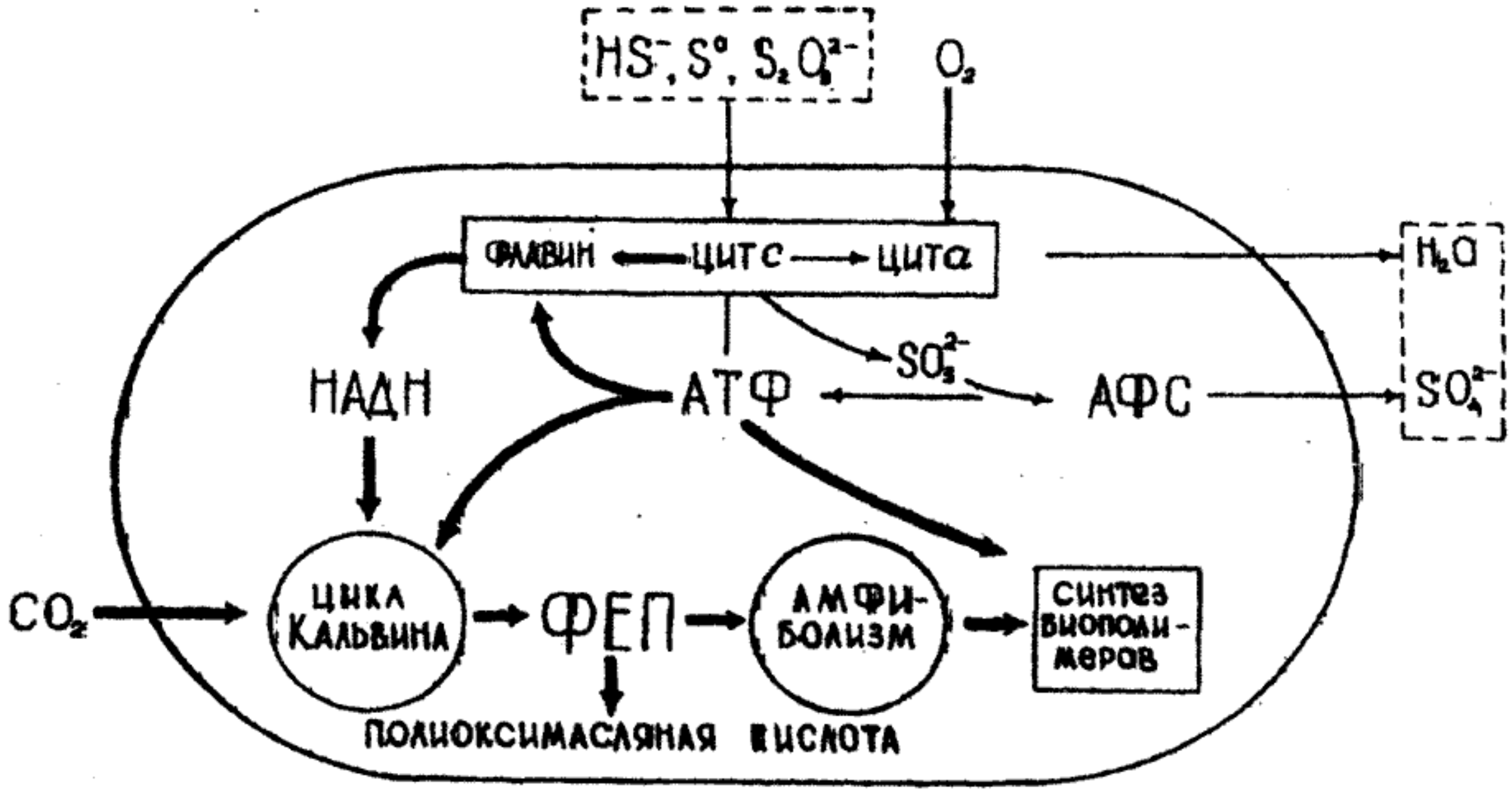


Рис. 12.12. Схема обмена тионовых бактерий: *тонкие стрелки - путь энергетического обмена; толстые - конструктивного обмена*

К представителям тионовых бактерий относятся Thiobacillus, Th. thiooxidans, Th. thioparus и др.

Тионовые бактерии являются литотрофами. Многие развиваются при низких значениях pH (оптимум pH 2,2). Среди них есть термофилы (Thiospirillum pistiense). Они растут при температуре выше 80^0. Значительное количество их отмечается в терминальных источниках вулканического происхождения. Наличие минеральной серы вблизи вулканов и серной кислоты в водных источниках обусловлено деятельностью тионовых бактерий.

Тионовые бактерии в природных условиях производят окисление сульфидных минералов, способствуя тем самым выщелачиванию находящихся в руде металлов. При участии тионовых бактерий окисление сульфидов и выщелачивание металлов идет быстрее, чем при их отсутствии и, кроме того, сопровождается большим выходом металлов. Тионовые бактерии, в частности Th. thiooxidans, используются в гидрометаллургии для выщелачивания редких металлов: германия, галия, селена, индия, которые содержатся в сульфидах цинка, свинца, меди.

12.3.3. Восстановление минеральной серы

Процесс восстановления соединений минеральной серы до сероводорода получил название десульфофикации. Он происходит в анаэробных условиях: в водоемах на значительных глубинах, в почвах, насыщенных водой, торфяниках (об этом говорит и их черная окраска, обусловленная наличием сульфидов железа).

Восстановление сульфатов осуществляется группой специальных факультативных автотрофных десульфофицирующих бактерий. Одна из этих бактерий была выделена М. Бейеринком в 1895 г. из сточной воды и названа Vibrio desulfuricans. Это анаэробная грамотрицательная бактерия, имеющая форму вибрйона.

Сульфатредуцирующие бактерии являются облигатными анаэробами. В качестве конечного акцептора водорода они используют сульфаты. Донором водорода могут служить различные органические соединения (спирты, кислоты) и молекулярный водород. В качестве побочного продукта сульфатного дыхания образуется сероводород. Восстановление сульфатов происходит по уравнению:

$$2CH_3CHOHCOOH + Na_2SO_4 \longrightarrow 2CH_3COOH + CO_2 + H_2S + NaOH$$

Органические соединения сульфатредуцирующие бактерии окисляют не до конца, чаще всего до уксусной кислоты.

Сульфатредуцирующие бактерии представлены небольшой группой микроорганизмов, относящихся к двум родам: Desulfovibrio и Desulfatomaculum. Бактерии рода Desulfovibrio имеют форму вибриона с полярно расположенным жгутиком. Спор они не образуют, содержат оранжевый пигмент десульфовиридин и цитохром C_3. Донором водорода служат пируват и малат.

Род Desulfatomaculum включает четыре вида спорообразующих палочковидных бактерий, содержащих цитохром b. Типичным представителем его является D. nitrificans. В качестве доноров водорода он использует пировиноградную и молочную кислоты. Это термофил, оптимальная температура для его роста 55^0 С. Остальные виды – мезофилы. Наличие цитохромов в клетках сульфатредуцирующих бактерий обусловливает окислительный характер обмена веществ. Энергию они получают в результате окислительного фосфорилирования. Это обеспечивает возможность ассимиляции органических веществ.

Процессы сульфатредукции широко распространены в природе и при надлежащих условиях могут привести к накоплению в среде значительных количеств сероводорода. В некоторых водоемах его может быть несколько миллиграммов на литр воды. Например, в Черном море на глубине 2500 м содержание сероводорода достигает 6,5 мг на 1 л. Образователем сероводорода там является Desulfovibrio. Это очень активный микроорганизм. Аналогичное накопление сероводорода наблюдается и в растворе почвы, если она продолжительное время залита водой. В аэробных условиях сероводород неустойчив и превращается либо в элементарную серу, либо окисляется серобактериями в сульфаты.

12.4. КРУГОВОРОТ ЖЕЛЕЗА

Железо – один из важнейших элементов органической жизни. Оно входит в состав гемоглобина и многих окислительных

ферментов, таких, например, как каталаза, пероксидаза, цитохром-оксидаза, всегда обнаруживается в зеленых растениях. На почвах, лишенных соединений железа, растения очень скудны, наблюдается их хлороз. Для многих микробов присутствие солей железа в питательной среде – необходимое условие для нормальной жизнедеятельности.

В превращении соединений железа принимают участие специализированные и неспециализированные микроорганизмы. Минерализация органических железосодержащих соединений осуществляется гетеротрофными бактериями. При этом освобождается минеральное окисное или закисное железо. Превращение минерального железа осуществляется железобактериями. На наличие их в природе впервые указал Х. Эренберг в 1836 г. Позже, в 1888 г. С. Н. Виноградский подтвердил существование этой физиологической группы бактерий. Установлено, что она получает энергию путем окисления закисных соединений железа. Окисление железа рассматривается как дыхательный акт железобактерий, при котором клетки получают энергию, необходимую для хемотрофного восстановления углекислого газа.

К типичным железобактериям относятся роды Crenothrix и Leptothrix, Gallionella и некоторые представители почкующихся бактерий.

Наиболее широко распространены в природе нитчатые бактерии Leptothrix ochraceae. Палочковидные клетки этой бактерии образуют нити длиной 0,5 см, покрытые чехлом из гидроокиси железа. В железистых источниках - ручьях, болотах - они образуют скопления охряного цвета.

Образование в природных условиях огромных количеств гидрата окиси железа, так называемой болотной руды, является результатом деятельности железобактерий.

Полагают, что большинство железобактерий миксотрофны, т. е. наряду с автотрофностью они могут питаться органическим веществом. Физиология железобактерий изучена недостаточно, хотя для некоторых из них установлена возможность хемосинтеза за счет окисления железа. Такой способностью обладает Thiobacillus ferroxidans. Он относится к тионовым бактериям. Эти палочковидные, неспорообразующие бактерии - облигатные автотрофы.

Углерод для своего развития они получают из углекислоты атмосферы, а энергию - при окислении закисного железа, элементарной серы и сульфидов различных металлов. Th. ferroxidans окисляет практически все известные сульфидные минералы. Окисление закисного железа идет по схеме:

$$4FeSO_4 + O_2 + 2H_2SO_4 \longrightarrow 2\ Fe\ (SO_4)_3 + 2H_2O + 11\ ккал$$

Важной физиологической особенностью этих бактерий является то, что они развиваются при очень низких pH (оптимум 1,7-3,5).

Литотрофные микроорганизмы Thiobacillus ferroxidans и Th. thioxidans играют большую роль в выщелачивании цветных и редких металлов в месторождениях сульфидных руд.

Глава 13
ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В МИРЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. АНТИБИОТИКИ.

В естественной среде микроорганизмы развиваются в сложных микробных сообществах - микробоценозах, состоящих из различных видов, между которыми устанавливаются определенные взаимоотношения. Характер этих взаимоотношений зависит от биологических особенностей развивающихся видов, количества и доступности питательных веществ, физического и химического состояния среды. Взаимоотношения между микроорганизмами могут быть разделены на симбиотические - симбиоз, метабиоз и сателлитизм и конкурентные - антагонизм, паразитизм и хищничество.

13. 1. СИМБИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

13.1.1. Симбиоз

Симбиоз - это взаимоотношения двух различных видов существ (симбионтов), приносящие им взаимную пользу. При симбиотическом сожительстве симбионты стимулируют и поддерживают развитие друг друга и совместно развиваются продуктивнее, чем каждый в отдельности. Между ними устанавливается и закрепляется такое разделение функций, при котором взаимный обмен продуктами жизнедеятельности становится неизбежным.

Явление симбиоза в мире микроорганизмов наблюдаются между различными систематическими группами: бактериями, актиномицетами, плесневыми грибами, водорослями. Примером бактериального симбиоза является совместное развитие аэробов и анаэробов в естественной среде, описанное еще Л. Пастером в 1863 г. Аэробные микробы поглощают кислород и тем самым создают условия для развития анаэробов. Анаэробы, в свою очередь, предоставляют аэробам продукты своей жизнедеятельности.

В симбиотические отношения с молочнокислыми и уксуснокислыми бактериями вступают дрожжевые грибки. Молочнокислые бактерии подкисляют среду и создают благоприятные условия для дрожжей. Последние же продуцируют аминокислоты и витамины, необходимые для нормальной жизнедеятельности молочнокислых бактерий. В результате этого сожительства образуются так называемые кефирные зерна.

Уксуснокислые бактерии с дрожжами также образуют как бы один целостный организм, напоминающий по форме гриб, известный под названием «чайный гриб», служащий для приготовления в домашнем обиходе освежающего напитка с приятным вкусом.

Широко распространенные в природе лишайники также представляют собой симбиотическое сожительство мицелиальных грибов и водорослей. Грибы обеспечивают водорослям влагу и минеральные вещества, а водоросли снабжают грибы азотным и углеродным питанием.

Бактерии и грибы могут вступать в симбиотические взаимоотношения и с высшими растениями. Такой способностью обладают клубеньковые бактерии, образующие на корнях бобовых растений клубеньки, и микоризные грибы, образующие на корнях древесных растений микоризу.

13.1.2. Метабиоз, или синтрофизм

Явление метабиоза, весьма близкое симбиозу, определяет взаимоотношения, при которых продукты обмена одного вида микроорганизмов служат питательным материалом для другого. Так, аммиак, выделяющийся в результате жизнедеятельности аммонификаторов, представляют собой независимый субстрат для развития нитрификаторов. Нитрифицирующие бактерии первой фазы, окисляя аммиак до нитритов, создают условия для развития нитрификаторов второй фазы. Последние, продолжая начатый процесс, реализуют продукты жизнедеятельности предшественников и тем самым стимулируют их дальнейшее развитие. Аналогичное явление наблюдается между азотобактером и целлюлозоразлагающими бактериями. Продукты разложения целлюлозы - углеводы, спирты, органические кислоты - используются азотобактером как

источники углеродного питания. В смешанной с целлюлозоразлагающими бактериями культуре азотобактер энергично размножается, образуя клетки нормальной формы и размеров. В присутствии азотобактера разрушение клетчатки также идет интенсивнее. Это, возможно, объясняется освобождением целлюлозных бактерий от продуктов их жизнедеятельности.

Метабиотические взаимоотношения весьма широко распространены среди микроорганизмов и лежат в основе круговорота веществ в природе, обусловливая этапность процессов и смену одних форм микроорганизмов другими.

Синтрофизм представляет собой явление совместного роста двух и более видов микроорганизмов на среде, недоступной каждому виду в отдельности. Распространенным типом синтрофного взаимодействия является обмен факторами (субстраторами) роста, или удаление токсических продуктов. Например, разрушение пенициллина бактериями, образующими пенициллиназу, обеспечивает возможность развития пенициллиночувствительным бактериям. Синтрофные взаимодействия широко распространены в биотических сообществах.

13.1.3. Сателлитизм

Разновидностью метабиоза является сателлитизм (стимуляция). Для данной формы взаимоотношений характерно то, что микроб-сателлит выделяет в среду ростовые вещества - витамины, ауксины или аминокислоты, которые стимулируют развитие сожительствующего с ним другого вида. Такой способностью обладают дрожжи, сарцины. Этот тип взаимоотношений характерен для совместной культуры дрожжей и молочнокислых бактерий, особенно на начальных этапах развития последних. На более позднем этапе сателлитизм может смениться новым типом взаимоотношений - синергизмом, при котором у членов микробной ассоциации усиливаются физиологические функции, образуются иные продукты метаболизма, чем в чистой культуре. Так, дрожжи в чистой культуре сбраживают сахар до спирта, в смешанной с молочнокислыми бактериями - до пировиноградной кислоты, окисляемой затем до молочной кислоты. Отсутствие спирта в

продуктах брожения стимулирует развитие дрожжей, а последние своими продуктами жизнедеятельности активизируют развитие молочнокислых бактерий.

13.2. КОНКУРЕНТНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

13.2.1. Антагонизм

Антагонизм - это форма взаимоотношений микроорганизмов, когда один из них подавляет развитие или вызывает полную гибель другого. Развитие антагонистов осуществляется по принципу: «Моя жизнь - твоя смерть».

Открытие микробного антагонизма принадлежит Л. Пастеру и Ж. Жуберу (1877), обнаружившим быструю гибель палочки сибирской язвы в смешанной культуре с синегнойной палочкой. Л. Пастер охарактеризовал это явление как «борьбу за существование между сибиреязвенным организмом и его сородичами». А. Д. Павловский в этом же году экспериментально установил способность пневмококков предохранять животных от заболевания сибирской язвой.

В литературе того времени встречается и ряд других сообщений об антагонизме микробов. Интересны наблюдения русских врачей В. А. Манассейна и А. Г. Полотебного над антагонистическим действием зеленой плесени пенициллиум по отношению к гноеродным бактериям. Исходя из этого А. Г. Полотебнов использовал пенициллиум для лечения гнойных ран и других кожных заболеваний. Антагонистические взаимоотношения в мире микроорганизмов наблюдали многие исследователи. Однако эти наблюдения чаще всего были случайными и носили описательный характер, хотя в дальнейшем они послужили ценным материалом для создания учения об антагонизме и антибиотиках.

В основе микробного антагонизма лежат разные причины: исчерпание питательных веществ, физико-химическое изменение среды (подкисление или подщелачивание, потребление кислорода), выделение в среду протеолитических ферментов, токсических

веществ. Учитывая это, Н. С. Егоров разделяет антагонизм на пассивный и активный.

Пассивный антагонизм проявляется в двух формах. К первой относится антагонизм, обусловленный использованием сожительствующими организмами одних и тех же питательных веществ. При наличии их в среде в ограниченном количестве преимущество получает тот вид микроорганизма, который обладает большей биологической активностью. Так, при одновременном высеве в среду бактерий и актиномицетов, первые, как более быстроразмножающиеся, подавляют развитие вторых.

Вторая форма - это насильственный антагонизм, основанный на том, что при недостатке в среде питательных веществ бактерии, образующие протеолитические ферменты, используют в качестве пищи клетки других бактерий. Этот процесс идет в два этапа: вначале происходит разрушение бактерий протеолитическими ферментами, выделяемыми антагонистом, затем потребление образовавшихся продуктов распада и дальнейшее внутриклеточное превращение их. Эта форма антагонизма была установлена учеником И. И. Мечникова И. Г. Шиллером (1914). Он наблюдал гибель стрептококка в совместной культуре с ацидофильной палочкой. Последняя при недостатке углеводов в среде выделяла в присутствии стрептококка активные протеолитические ферменты, лизирующие его.

Активный антагонизм также подразделяется на две формы. Это антагонизм, обусловленный накоплением в среде продуктов обмена (спиртов, кислот, щелочей), которые резко изменяют активную кислотность среды и тем самым подавляют развитие организмов других видов. Примером может служить развитие микрофлоры молока. В свежевыдоенном молоке одновременно содержатся молочнокислые и гнилостные бактерии, которые вначале развиваются независимо друг от друга. Затем в процессе жизнедеятельности молочнокислых бактерий происходит накопление молочной кислоты. В результате молоко подкисляется настолько, что развитие гнилостных бактерий полностью подавляется. Некоторые плесневые грибы образуют лимонную кислоту, которая также подавляет жизнедеятельность большинства сапрофитных бактерий. Уробактерии, наоборот, развиваясь на МПА

с мочевиной, выделяют такое количество аммиака, что pH среды подщелачивается до 9,3 и развитие большинства микроорганизмов в такой среде прекращается.

Различают и антагонизм, обусловленный наличием в среде антибиотических веществ. Некоторые микроорганизмы вырабатывают особые вещества - антибиотики, которые губительно действуют на рост и размножение других микроорганизмов.

Эффект действия антагонистов может быть бактериостатическим, т. е. задерживающим рост, и бактерицидным - вызывающим гибель клеток угнетаемого микроба.

Явление антагонизма широко распространено среди различных групп микробов. Наибольшее число антагонистов с широким спектром действия обнаружено у актиномицетов.

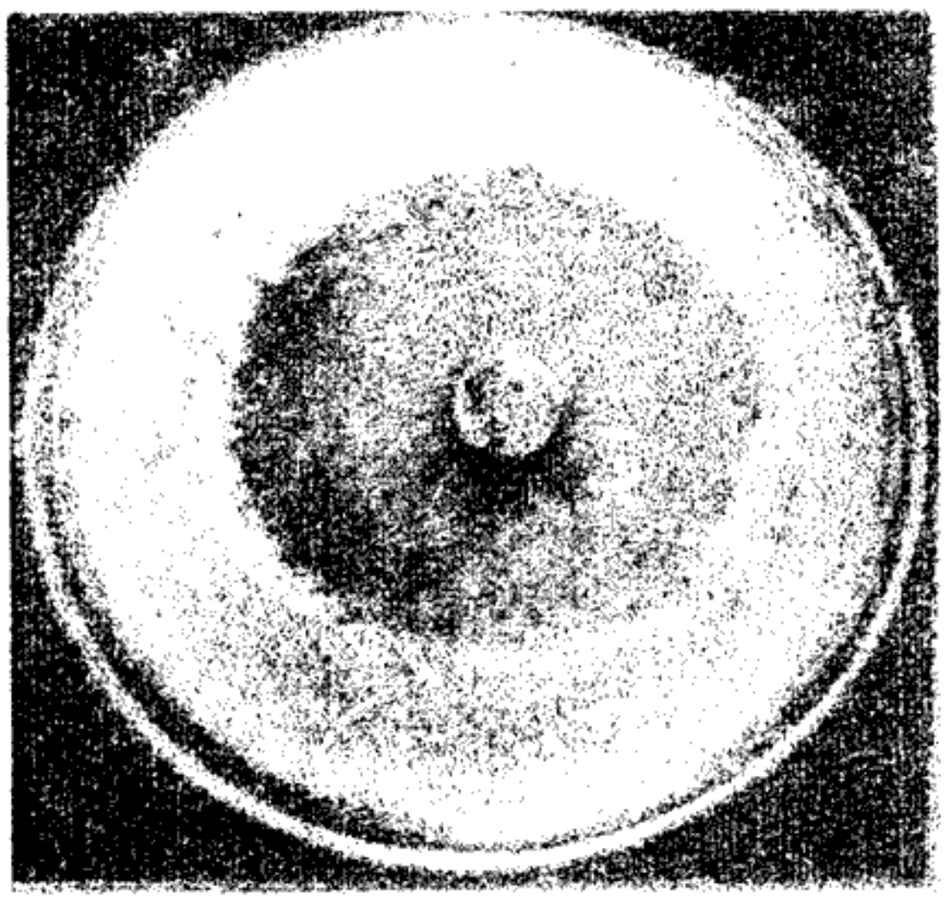


Рис.13.1. Антагонистическое действие пенициллина на азотобактер

Значительный удельный вес среди антагонистов составляют плесневые грибы. Особенно в этом отношении выделяются пенициллы (25 %) и аспергиллы (40 %). Грибы обладают антагонистическими свойствами в отношении многих групп организмов: бактерий, актиномицетов, дрожжевых и дрожжеподобных грибов (рис. 13.1).

Наибольшее число бактерий-анатагонистов приходится на споровые формы, такие, как Bac. subtilis, Bac. mycoides, Bac. brevis и другие (около 25 %). Антагонисты встречаются также и среди неспоровой группы бактерий, хотя она в этом отношении менее изучена.

Впервые бактерии-антагонисты выявлены среди пигментных форм (Ps. pyocyanea, Serratia marcescens), затем были обнаружены антагонистические свойства молочнокислых бактерий, уробактерий, азотобактера, стафилококков, стрептококков и некоторых других видов.

В естественной среде антагонизм микробов играет большую роль в самоочищении почвы. Еще в 1889 г. Г. Гарр и Е. Фрейден-

рейх показали, что почвы благодаря наличию в них антагонистов становятся бактерицидными по отношению к возбудителям кишечных заболеваний: тифа, холеры, дизентерии и др. По наблюдениям Н.А. Красильникова, гноеродные кокки, выделенные из ран, погибают в почве довольно быстро, но степень их отмирания зависит от культуры микроба и типа почвы. Подзолистая почва оказалась менее бактерицидной, чем каштановая. Некоторые авторы отмечают довольно быструю гибель в почве многих фитопатогенных микроорганизмов. В частности, мицелий некоторых грибов, патогенных для растений, лизируется бактериями-антагонистами.

Изучение микробного антагонизма заложило основу получения практического применения антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве.

13.2.2. Паразитизм

Явление паразитизма, наблюдающееся среди микроорганизмов, можно разделить на два типа: паразитизм без контакта с клеткой-жертвой и паразитизм при контакте с клеткой-жертвой. К первому типу относится лизис грибов миксобактериями, осуществляемый гидролитическими экзоферментами. Второй тип паразитизма предусматривает обязательное внедрение паразита в другой организм. До недавнего времени этот тип паразитизма был представлен только взаимоотношением вирулентных фагов с бактериями. На протяжении последних лет были выявлены новые внутриклеточные паразиты микроорганизмов: в 1963 г. Г. Штольп описал эндопаразит бактерий Bdellovibrio bacteriovorum; в 1966 г. Б. В. Громов - протозооподобный эндопаразит водорослей рода Scenedesmus - Amoeboaphelidum.

Bdellovibrio - весьма подвижный микроб, паразитирующий на грамотрицательных бактериях (рис. 13.2). При контакте с клеткой-жертвой он прикрепляется к ней жгутиком, вращательными движениями пробуравливает клеточную стенку и внедряется внутрь. Здесь он интенсивно размножается (до 20-50 паразитов на одну клетку) и через 3-5 ч клетка лизируется и паразит освобождается.

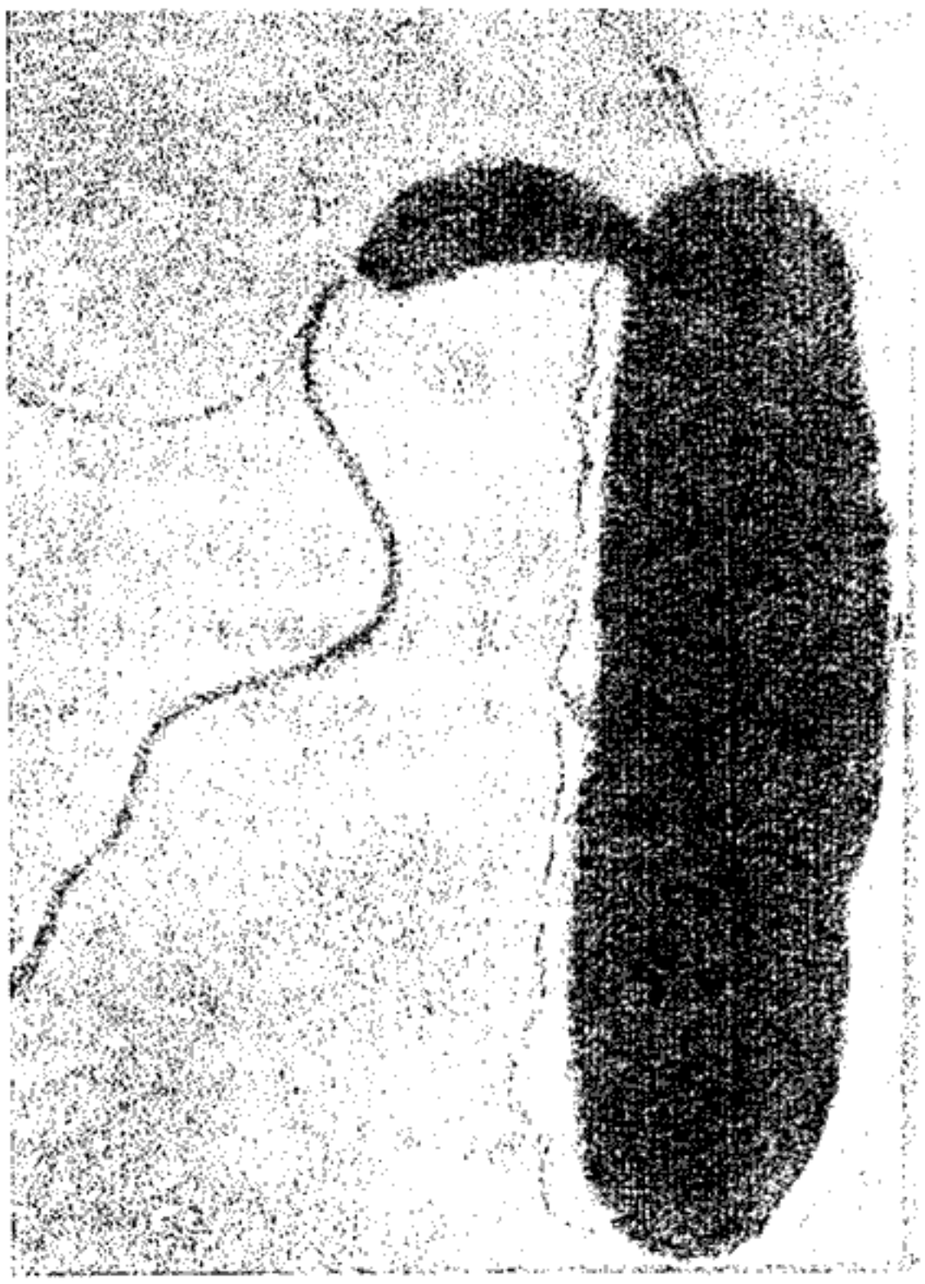


Рис. 13.2. Паразит Bdellovibrio bacteriovorus

Паразитические бактерии распространены в почве, воде. Они обладают способностью переходить от паразитизма к сапрофитизму, что обеспечивает им большую выживаемость в природе.

13.2.3. Хищничество

Особое положение среди микроорганизмов занимают хищные грибы-нематофаги, питающиеся нематодами (беспозвоночные животные). По образу жизни их нельзя отнести к паразитам, так как они умерщвляют жертву в течение короткого времени, тогда как паразиты поселяются в живом организме и уничтожают свою жертву постепенно.

Хищные грибы ловят животных с помощью специальных ловчих колец (колец мицелия) и убивают их (рис. 13.3). В отличие от сапрофитов они питаются только свежеубитыми животными.

Хищные грибы распространены среди ограниченного числа видов гифомицетов и приурочены к среде, богатой нематодами.

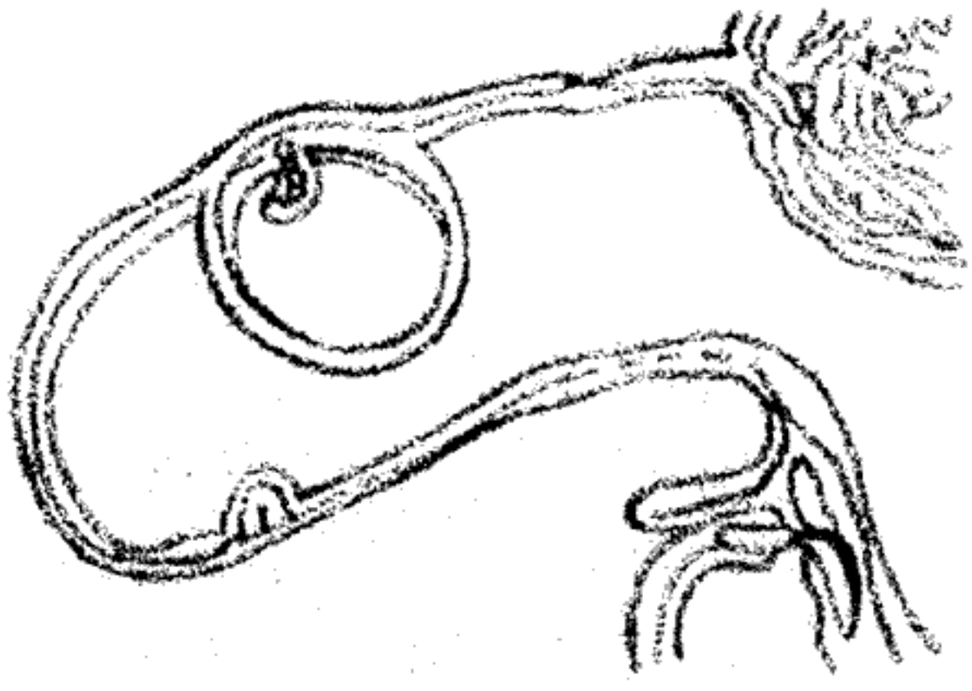


Рис. 13.3. Ловчие кольца хищных грибов-нематофагов

Хищный образ жизни ведут бактерии рода Caulobacter, которые с помощью стебельков прикрепляются к водорослям, простейшим или другим бактериям и используют их как источник пищи (рис. 13.4).



Рис.13.4. Прикрепление хишных бактерий рода Caulobacter к бактериям родов Bacillus (а) и Azotobacter (б)

13.3. АНТИБИОТИКИ

Антибиотики - специализированные продукты жизнедеятельности различных организмов, обладающие способностью в незначительных концентрациях избирательно подавлять развитие микроорганизмов. Термин «антибиотики» означает «против жизни» (от греч. anti - против, bios - жизнь). С. Ваксман, предложивший этот термин, имел в виду пагубное действие веществ на микробы.

Антибиотики, как химиотерапевтические вещества, полученные на основе жизнедеятельности микро- и макроорганизмов, отличаются от обычных метаболитов специфичностью и исключительно высокой биологической активностью в отношении чувствительных к ним микроорганизмов.

Способностью вырабатывать антибиотики обладают некоторые виды растений, животных и микроорганизмов. Это специфи-

ческое физиологическое свойство возникло у них и закрепилось естественным отбором в результате длительного эволюционного развития. С общебиологической точки зрения образование антибиотиков является приспособительной функцией организма, обеспечивающей выживание вида.

Важным этапов в истории получения антибиотиков было открытие английским ученым А. Флемингом пенициллина (1928). Открытие было делом случая. Просматривая чашки с посевом стафилококка, А. Флеминг заметил, что на чашке, загрязненной плесенью Penicillium, рост стафилококка отсутствует. Выделение колонии плесени в чистую культуру и повторение опыта подтвердило прежние результаты. Оказалось, что плесень подавляла рост не только стафилококка, но и всех грамположительных микробов. Вскоре А. Флеминг получил прозрачную культуральную жидкость этого же гриба, обладающую антибактериальными свойствами по отношению к гноеродным коккам, которой дал название «пенициллин». Однако пенициллин А. Флеминга не нашел применения из-за малой стойкости и болезненного введения в организм.

Мощным стимулом для изыскания антибиотических веществ явилось получение микробиологом Р. Дюбо *тиротрицина* (1939) из споровой палочки Bac. brevis. Тиротрицин в ничтожных концентрациях убивал патогенных бактерий как в пробирке, так и в организме зараженного животного. С открытием тиротрицина возобновились работы по совершенствованию методов получения и очистки пенициллина. Особенно интенсивные исследования начали проводиться на родине А. Флеминга оксфордской группой ученых, которую возглавили врач-бактериолог Х. Флори и биохимик Д. Чейн. В 1941 г. ими был получен чистый кристаллический концентрированный сухой препарат - пенициллин. Препарат обладал высокой активностью: в ничтожной концентрации ($1 : 5 \cdot 10^7$) губительно действовал на гноеродных кокков, оставаясь нетоксичным для человека. Большое практическое значение пенициллина привело в очень короткое время к созданию пенициллиновой промышленности.

Вслед за пенициллином была открыта серия других антибиотиков, образуемых грибами, бактериями, актиномицетами и

другими организмами. Так, в 1942 г. Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражникова получили антибиотик *грамицидин советский* (грамицидин С). Продуцентом его оказалась споровая палочка Bac. brevis. Грамицидин С отличается от тиротрицина Р. Дюбо по химическому составу и биологическому действию. Он представляет собой полипептид, состоящий из пяти типов аминокислот. Тиротрицин включает два различных полипептида - тироцидин и грамицидин. Последний содержит 24 аминокислотных остатка. Кроме того, грамицидин С характеризуется более широким спектром антибактериального действия.

В 1944 г. С. Ваксман с сотрудниками из лучистого грибка Streptomyces griseus получили антибиотик стрептомицин. Это открытие явилось мощным толчком к всестороннему изучению актиномицетов и поиску среди них продуцентов новых антибиотиков.

В настоящее время известно более 1500 различных антибиотических веществ, но в медицинской практике применяется только около 50 (3-4 %). Это связано с тем, что не все они отвечают требованиям, которые предъявляются при внедрении их в практику. Антибиотики должны сочетать низкую токсичность к макроорганизму и высокую токсичность к микроорганизму; действовать на бактерии в малых концентрациях, сохранять активность в присутствии нормальных и патологических жидкостей (кровь, гной и др.); не инактивироваться тканевыми ферментами и не разрушаться в воспалительных экссудатах; не обладать антигенными свойствами, чтобы повторное введение не вызвало аллергических и анафилактических явлений; хорошо растворяться в воде при концентрации водородных ионов, соответствующей таковой в жидкости тела (для диффузии лекарства из крови в пораженные ткани).

По химическому составу антибиотики представляют собой самые разнообразные вещества – от простых соединений до очень сложных полипептидных структур. Химическое строение изучено у большинства антибиотиков и положено в основу их классификации. Согласно М. М. Шемякину и А. С. Хохлову, различают антибиотики ациклического и ароматического строения, хиноны, кислородсодержащие гетероциклические соединения, пенициллины, стрепто-

мицины, антибиотики-полипептиды, антибиотики с установленной и неустановленной суммарной формулой. С химической структурой антибиотика связаны многие его свойства: растворимость, стойкость, токсичность.

Важной особенностью антибиотиков является избирательность действия: каждый из них активен только по отношению к определенной группе микроорганизмов и ингибирует строго определенные биохимические функции. Например, пенициллин действует только на растущие клетки грамположительных бактерий, в то время как грамотрицательные к нему менее чувствительны. В этом состоит одно из существенных отличий антибиотиков от общебиологических ядов – сулемы, мышьяка, фенола, которые подавляют жизнедеятельность любого организма, вступившего с ними в контакт.

Характер действия антибиотиков различен. Большинство из них бактериостатичны, т. е. задерживают рост чувствительных микробов; другие, обладая бактерицидным свойством, вызывают гибель соответствующих микробов. Значительно меньше антибиотиков, обладающих бактериолитическими свойствами. Эффективность антибиотиков зависит от дозы и длительности воздействия: кратковременное воздействие в малых дозах задерживает рост, а более высокие концентрации и продолжительное воздействие вызывают гибель тех же микробов.

Тетрациклины – группа химически близких антибиотиков. Они обладают широким спектром действия: активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий и ряда крупных вирусов. Тетрациклины широко применяются в медицинской практике, в животноводстве как стимуляторы роста животных и птиц, в пищевой промышленности как консерванты скоропортящихся продуктов.

К настоящему времени известно шесть препаратов тетрациклинов. Первым был получен хлортетрациклин – ауреомицин (1949) из культуральной жидкости Str. aureofaciens, который выращивается глубинным методом при непрерывной аэрации[8]. Очищенный препарат имеет светло-желтый цвет, плохо

[8] Продуцент хлортетрациклина образует также витамин B_{12}.

растворим в воде. Хлортетрациклин выпускается промышленностью под различными названиями – биомицин, ауреомицин, дуомицин – и применяется при лечении пневмоний, бруцеллеза, туляремии, риккетсиозов и некоторых вирусных заболеваний. Неочищенный, так называемый кормовой, биомицин используется в животноводстве.

Из антибиотиков актиномицетного происхождения заслуживают внимания хлорамфеникол, или хлоромицетин – продуцент Act. venezuelae и группа актиномицинов, продуцентами которых являются многие виды актиномицетов. *Хлорамфеникол* (левомицетин) относиться к антибиотикам широко спектра действия и в очень малых концентрациях подавляет рост многих бактерий. В отличие от пенициллина и стрептомицина он действует на крупные вирусы – возбудителей трахомы, венерической лимфогранулемы, а также на ряд риккетсий – возбудителя сыпного тифа, лихорадки Q и пятнистой лихорадки Скалистых гор.

Эритромицин принадлежит к группе антибиотиков-макролидов. Для них характерна крупная, сложно построенная молекула. Продуцентом эритромицина служит Saccharopolospora erythreus, выделенный из почв Филиппин. Эритромицин является антибио-тиком широкого спектра действия, но более активен по отношению к грамположительным микробам. Он действует также на риккетсии, крупные вирусы и микобактерии. Наибольшее практическое значение имеет действие его на золотистый стафилококк, особенно на штаммы, устойчивые к пенициллину.

Помимо антибиотиков, которые подавляют развитие болезнетворных микроорганизмов, некоторые актиномицеты могут продуцировать вещества, задерживающие развитие злокачественных опухолей. Это так называемые противораковые антибиотики. *Актиномицин* – первый известный противораковый антибиотик, выделенный С. Ваксманом и Г. Вудрефом из Str. antibioticus в 1940 г. Он обладает сильным антибактериальным действием, подавляет развитие актиномицетов и некоторых дрожжей. Противораковое действие его было открыто в 1952 г. Он тормозит развитие карциномы Эрлиха и раковых заболеваний лимфатической системы. Применение актиномицина ограничено из-за его высокой токсич-

ности. К настоящему времени получен целый ряд актиномицинов. Они хорошо изучены, установлена сфера их клинического применения.

В СССР в 1963 г. был получен противораковый антибиотик *брунеомицин*. Продуцентом его явился Str. albus var. bruneomycini. Брунеомицин подавляет рост некоторых опухолей человека и перевиваемых опухолей лабораторных животных. Он избирательно ингибирует синтез ДНК и вызывает ее деградацию в клетках бактерий. К противораковым антибиотикам, полученным из актиномицетов, относятся *рубомицин, оливомицин, стрептонигрин, дауномицин* и др.

Имеющиеся противораковые антибиотики пока не дают таких успешных результатов, как антибиотики, применяемые для лечения бактериальных заболеваний. Исследования по изысканию новых эффективных антибиотиков против раковых заболеваний продолжаются.

13.3.1. Механизм действия антибиотиков

Взаимодействие антибиотика с микробной клеткой может вызвать лизис клетки в результате нарушения ее осмотического барьера, может изменить проницаемость клеточной стенки, нарушить один или несколько энзиматических процессов, оказывающих влияние на метаболизм клетки.

Успехи в области молекулярной биологии позволили выяснить молекулярные механизмы действия большинства антибиотиков и определить их конкретную роль в нарушении жизнедеятельности чувствительной клетки. В зависимости от общего биохимического процесса или отдельного звена в цепи реакций, т. е. от мишени, на которую действуют антибиотики, их разделяют на ингибиторы синтеза клеточной стенки, функций цитоплазматической мембраны, синтеза нуклеиновых кислот, функций рибосом.

Наиболее универсальным ингибитором синтеза клеточной стенки бактерий является пенициллин, активно убивающий растущие культуры. Мишенью ингибиторного действия пенициллина служит фермент транспептидаза, катализирующий

образование поперечных сшивок между цепями в молекуле гликопептида. Механизм действия пенициллина сводится к тому, что он связывается с одним из активных центров фермента и необратимо инактивирует его. В результате в растущей культуре бактерий в присутствии пенициллина появляются мономеры гликопептида в виде одиночных фибрилл. Синтез несшитого гликопептида приводит к формированию дефектной клеточной стенки, в результате чего в пенициллиновой культуре либо образуются протопласты, либо клетки лизируются под действием автолитических ферментов, которые не инактивируются пенициллином. Эти ферменты играют весьма существенную роль в литическом действии пенициллина. В связи с тем, что синтез материала клеточной стенки наиболее активно происходит в области деления клетки (т. е. в области образующейся поперечной перегородки), вполне понятно бактерицидное действие пенициллина только на растущие клетки.

В настоящее время известен и ряд других антибиотиков, ингибирующих синтез гликопептида. Так, антибиотик D-циклосерин ингибирует ферменты, катализирующие включение D-аланина в гликопептид, и вызывает образование стабильных протопластов или сферопластов.

Молекулярные механизмы действия антибиотиков на функционирование цитоплазматической мембраны чувствительных клеток изучены слабее. Предполагают, что антибиотики этой группы - грамицидин С, тироцидин, нистатин, полимиксины - взаимодействуют с белково-липидными комплексами мембраны, вызывая дезорганизацию их структуры. В результате мембраны утрачивают способность служить барьером проницаемости: На примере действия полимиксина было показано, что добавление этого антибиотика в бактерицидных концентрациях к культурам чувствительных бактерий приводит к освобождению из клеток азотистых оснований, пентоз и других низкомолекулярных веществ. Было установлено, что полимиксин, меченный флюоресцирующим веществом, взаимодействует с фосфатными группами фосфолипидов. Разветвленная концевая цепь жирной кислоты, входящей в состав полимиксина, проникает в неполярные области фосфолипидов мембраны, взаимодействует с ними, вызывая дезор-

ганизацию и реориентацию липидов мембраны. В конечном итоге нарушается проницаемость мембраны и клетка погибает.

К антибиотикам, подавляющим синтез нуклеиновых кислот, относятся все противоопухолевые антибиотики. Химиотерапия рака на данном этапе основана главным образом на этом свойстве антибиотиков избирательно ингибировать синтез нуклеиновых кислот, причем некоторые из антибиотиков обладают множественностью механизмов действия.

Противоопухолевые антибиотики, подавляющие синтез нуклеотидов, являются структурными аналогами аминокислот и аминов (азасерин - глутамина, хадацидин - аспарагиновой кислоты) и конкурируют с ними за соответствующие ферменты. Связывание антибиотика с ферментом приводит к необратимой инактивации последнего и блокированию необходимых биосинтетических реакций. Так, азасерин подавляет синтез пуринов на стадии фосфорибозилформилглицинамидинсинтетазы, хотя к его действию чувствительны и другие реакции синтеза, которые нуждаются в глутамине. Антибиотик хадацидин подавляет синтез адениновых нуклеотидов путем блокирования аденилосукцинатсинтетазы. Ряд антибиотиков (формицин, туберцидин и др.) представляют собой аналоги азотистых оснований и в клетке могут включаться в РНК вместо нормальных нуклеотидов. В результате изменяются свойства нуклеиновых кислот и нарушаются их функции в синтезе белка. Внешне это проявляется в цитотоксическом действии антибиотиков.

Некоторые антибиотики могут подавлять синтез нуклеиновых кислот путем нарушения матричной функции ДНК. Причем одни из них оказывают прямое действие, связываясь с ДНК в комплекс антибиотик-ДНК: другие - косвенное, вызывая изменения структуры путем разрыва цепи, удаления оснований или образования сшивок.

Непосредственное действие на функции ДНК как матрицы оказывает антибиотик актиномицин, используемый в химиотерапии опухолей. Актиномицин обладает способностью связываться с ДНК-матрицей, подавляя этим самым активность РНК-полимеразы, которая катализирует синтез мРНК. Механизм действия состоит в том, что актиномицин, связываясь с молекулой ДНК, образует комплекс антибиотик - ДНК, который является своего рода блоком, препятствующим продвижению фермента РНК-полимеразы вдоль

матрицы и «считыванию» информации. В результате наблюдается замедление или полное прекращение синтеза мРНК.

Образование сшивок в молекуле ДНК, которые предотвращают расхождение нитей, родительской ДНК и репликацию, вызывает антибиотик митомицин С.

Многие антибиотики, такие, как стрептомицин, тетрациклин, эритромицин, хлорамфеникол, *ингибируют функции рибосом,* а следовательно, синтез белка. Каждый из них взаимодействует с определенной субчастицей рибосомы (большой или малой), нарушая ее нормальное функционирование. Специфическим ингибитором белкового синтеза является хлорамфеникол. Чувствительным участком на рибосоме для хлорамфеникола является 50S-субчастица. Связываясь с ней, антибиотик подавляет пептидилтрансферазную реакцию, предотвращая образование пептидных связей и рост полипептидной цепи, а также перемещение рибосом вдоль мРНК. Как и многие другие ингибиторы синтеза белка хлорамфеникол обладает бактериостатическим действием, однако при более высоких концентрациях может приводить к гибели чувствительные клетки.

Антибиотики тетрациклин и стрептомицин связываются с малой субчастицей рибосомы (30S) и тоже подавляют синтез белка. Тетрациклины ингибируют связывание аминоацил-тРНК с рибосомами (А-участком), стрептомицин, помимо этой реакции, вызывает ошибки трансляции мРНК (ошибки считывания) и подавляет все реакции синтеза белка. Антибиотик любой природы (независимо от его химической структуры), взаимодействующий с рибосомами, обусловливает одинаковый конечный эффект - подавление биосинтеза белка и как следствие - прекращение роста микроорганизма.

13.3.2. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам

Микроорганизмы различаются по своей чувствительности к антибиотикам. Существуют антибиотикорезистентные варианты. Механизмы, обеспечивающие антибиотикорезистентность, разнообразны. Это может быть способность вырабатывать индуцибельные ферменты, разрушающие препарат. Например, ряд штаммов стафилококка и спороносных бактерий в среде с пенициллином

образуют фермент пенициллиназу, который разрушает молекулу пенициллина по лактамному кольцу, образуя пенициллиновую кислоту. Последняя не обладает антибактериальной активностью. Пенициллин выступает здесь как индуктор синтеза пенициллиназы.

Антибиотикоустойчивость микроорганизмов может быть обусловлена способностью клетки к замене одних звеньев обмена веществ на другие (фенотипическая изменчивость), а также наличием в клетках генетических факторов лекарственной устойчивости (R-фактора. Устойчивость к антибиотикам может появляться в результате мутаций и рекомбинаций.

Антибиотикоустойчивые штаммы микроорганизмов отличаются от исходных рядом биохимических и физиологических признаков. Например, у стафилококков наблюдается пониженная активность к ферментации углеводов, у азотобактера и клубеньковых бактерий пониженный темп роста, у патогенных форм снижается вирулентность. Приобретенная устойчивость, как правило, специфична: устойчивость микроба к одному антибиотику не исключает чувствительности к действию других. Это характерно для антибиотиков, имеющих разное химическое строение и различные продуценты. Для антибиотиков, близких по химическому составу, присуща перекрестная устойчивость микроорганизмов, т. е. микроорганизмы, приобретшие устойчивость к одному из антибиотиков, становятся устойчивыми и к действию других, родственных им. Это относится ко всем пенициллинам и тетрациклинам.

Основные пути преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов к антибиотикам - это изыскание и внедрение в практику новых антибиотиков, комбинированное применение одновременно нескольких антибиотиков с различным механизмом действия, удаление из клеток микроорганизмов факторов лекарственной устойчивости.

13.3.3. Антибиотики микробного происхождения

Первым высокоэффективным антибиотиком, получившим широкое применение в медицине, является антибиотик грибного происхождения - *пенициллин.* Продуцентами его служат грибы рода

Penicillium (P. notatum, P. crustosum, P. chrysogenum). В лечебной практике применяются природные и полусинтетические антибиотики. Из природных пенициллинов наиболее активным и стойким является бензилпенициллин, или пенициллин (продуцент P. chrysogenum). Основой для производства полусинтетических пенициллинов служит 6-аминопенициллиновая кислота, которую получают из культуральной жидкости P. chrysogenum и путем гидролиза бензилпенициллина. К полусинтетическим пенициллинам относятся ампициллин, оксациллин и др.

Пенициллин - один из наименее токсичных антибиотиков, обладающих высоким лечебным действием. Он дает хорошие результаты при лечении сепсиса (общая гнойная инфекция), крупозной пневмонии, стрептококковых и стафилококковых заболеваний. Пенициллин активен против грамположительных бактерий.

Некоторые виды пенициллинов продуцируют антибиотик гризеофульвин и его аналоги, активные против грибковых инфекций - лишая, парши.

Кроме пенициллина и гризеофульвина к антибиотикам грибного происхождения относятся цефалоспорины (продуцент Cephalosporium salmasynnematum) и их полусинтетические производные, обладающие широким спектром действия. Они подавляют микроорганизмы, устойчивые к пенициллину. Цефалоспорины синтезируют также некоторые актиномицеты - самая обильная группа продуцентов антибиотиков.

Из актиномицетов получают около 70 % известных в настоящее время антибиотиков. Огромную популярность в мире как противотуберкулезный препарат получил *стрептомицин*. Впервые этот антибиотик выделен С. З. Ваксманом в 1944 г. из Str. griseus. Он активен как в отношении грамположительных, так и в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе возбудителей туберкулеза, чумы и других патогенных бактерий.

Известно около 60 антибиотиков бактериального происхождения, однако немногие из них нашли практическое применение. Это связано в основном с их токсичностью для макроорганизма. В медицинской практике используется грамицидин С, полимиксины, бацитрацины, пиоцианин и др.

Грамицидин С - вещество полипептидной природы. Получают его из культур аэробной споровой палочки Bac. brevis. Он не растворим в воде, кислотах и щелочах, растворим в спирте. Грамицидин С обладает высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий: подавляет развитие фекального стрептококка, на который не действует ни пенициллин, ни сульфаниламидные препараты. Грамицидин С применяется при лечении инфицированных ран, ожогов и других гнойных процессов. С 1956 г. с установлением химической природы антибиотика осуществлен его химический синтез.

Низины выделены из культуральной жидкости Streptococcus lactis и представляют смесь нескольких антибиотиков. Низины активны по отношению ко многим грамположительным бактериям, широко применяются в пищевой промышленности в качестве консервантов, в ветеринарии для лечения мастита у коров.

Многие бактерии рода Pseudomonas являются продуцентами различных по структуре и механизму действия антибиотиков. На практике для лечения дерматомикозов применяется пирролнитрин. Он активен также в отношении бактерий группы кишечной палочки. Из Ps. sorbistini получен комплекс антибиотиков аминогликозидов широкого спектра действия сорбистины. Они плдаволяют рост бактерий, устойчивых к другим аминогликозидам, что дает основание считать их перспективными для применения в клинике.

13.4. БАКТЕРИОЦИНЫ

Бактериоцины - антибактериальные вещества белковой природы, образуемые отдельными штаммами разных видов бактерий. В отличие от антибиотиков бактериоцины характеризуются очень узким спектром действия - подавляют развитие бактерий только своего вида или близкородственных видов. Клетки, продуцирующие бактериоцины, резистентны к влиянию собственных, а также гомологичных бактериоцинов, т. е. обладают специфической устойчивостью. Но образование бактериоцинов всегда имеет летальный исход - заканчивается гибелью клетки-продуцента.

Наиболее изученными являются бактериоцины E. coli, впервые выявленные П. Грациа в 1925 г. и названные колицинами.

Колицины адсорбируются поверхностью чувствительных к ним бактерий и нарушают различные обменные процессы, вызывая гибель клеток. К настоящему времени описано более 25 типов колицинов. Они различаются по физико-химическим свойствам, по антигенной структуре и способности адсорбироваться на определенных рецепторных участках клетки. Синтез колицинов детерминируется Col-факторами, относящимися к категории плазмид (см. гл. 10).

Бактериоцины, выделенные из других бактерий (Pseudomonas Erwinia), представляют собой в основном высокомолекулярные соединения, часто сложного белково-липополисахаридного состава, имеющие разную форму и размеры. Некоторые из них могут быть классифицированы как «дефектные фаги». По форме они напоминают хвостовые отростки фаговых частиц (рис. 13.5).

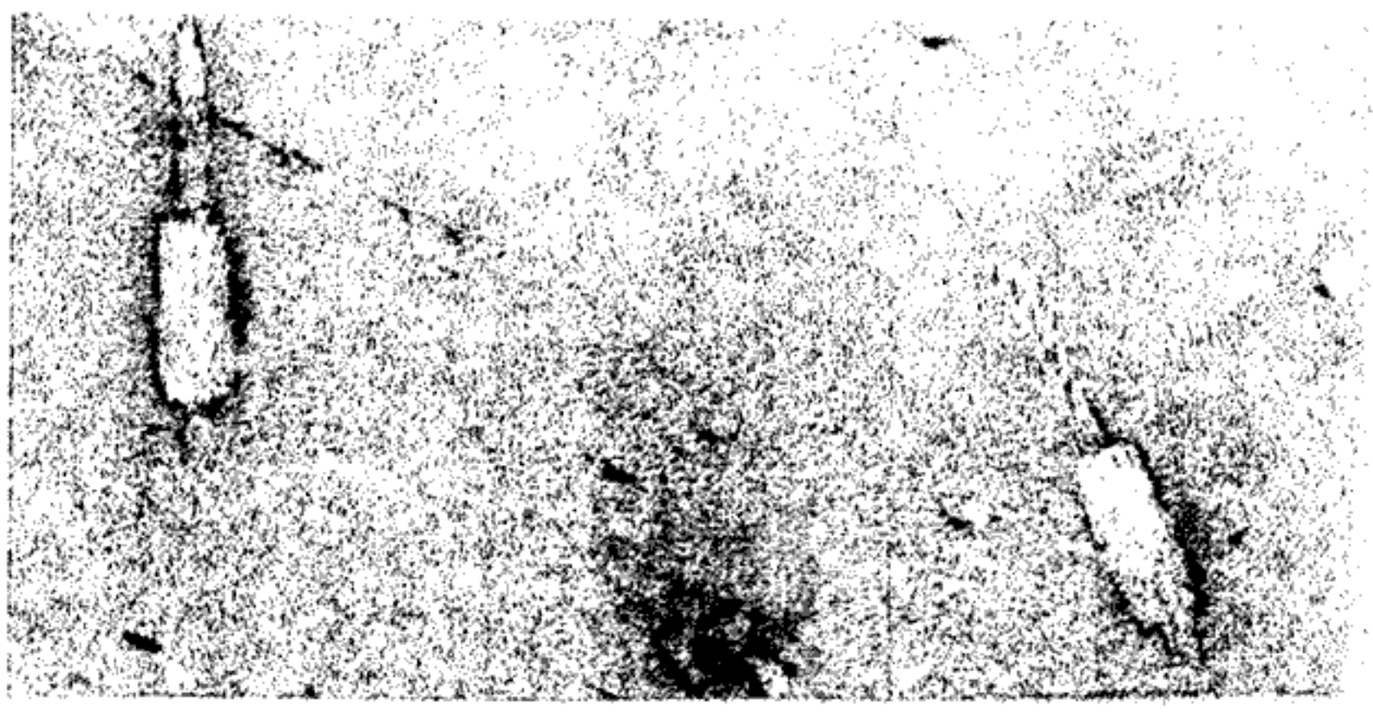


Рис. 13.5. Бактериоцины E. carotovora (увеличение ×200 000) (фото представлено В.В. Лысаком)

Способность бактериальных клеток продуцировать определенный тип бактериоцина является стабильным свойством, контролируемым факторами бактериоцингенности. Но в некоторых случаях гены, ответственные за синтез бактериоцинов, локализованы в хромосоме. Например, генетические детерминанты R 1, R 2, R 3, продуцируемые штаммами Pseudomonas aeruginosa, связаны с триптофановым локусом и расположены в хромосоме клетки-продуцента. Такие штаммы характеризуются конститу-

тивным синтезом бактериоцинов и при определенных условиях культивирования любая клетка способна их продуцировать.

Биологическая роль бактериоцинов заключается в том, что они придают штамму-продуценту селективное преимущество перед близкородственными штаммами, которых они убивают. Хотя небольшая часть клеток-продуцентов бактериоцинов при этом погибает, но клон в целом развивается активно.

Глава 14

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ВЫСШИМИ РАСТЕНИЯМИ

Микроорганизмы являются постоянным спутником не только человека и животных, но в равной мере и высших растений. Они поселяются и ведут активный образ жизни как на поверхности, так и внутри зеленых частей растений, их корней, семян, плодов. Находясь в тесном контакте с растениями, микроорганизмы оказывают на них как полезное действие, обеспечивая минеральными элементами питания и ростактивирующими веществами, так и вредное, вызывая различные заболевания. Растения в свою очередь также влияют на своих спутников. Степень взаимного влияния выражается тем сильнее, чем больше контакт между данными организмами.

14. 1. МИКРОФЛОРА РИЗОСФЕРЫ

Зона почвы, находящаяся в контакте с корневой системой растений, носит название ризосферы, а микроорганизмы, развивающиеся в данной зоне, называются ризосферными микроорганизмами. Условно различают два типа ризосферы: ближнюю (ризоплану) и отдаленную. Ближняя ризосфера располагается непосредственно на поверхности корней и извлекается вместе с ними, отдаленная начинается на расстоянии нескольких миллиметров от корней и распространяется в радиусе 50 см от них. .

Ближняя и отдаленная ризосферы различаются по количеству микроорганизмов. Например, в почве, взятой на расстоянии 15 см от корней, число бактерий составляет до 5 млн, а на поверхности корней - от 50 млн до 10 млрд. Согласно Н.А. Красильникову, число микроорганизмов в ризосфере в 100 раз больше, чем в почве, где растения не произрастают. Следовательно, влияние ризосферы благоприятно сказывается на увеличении численности общей микрофлоры, которая зависит не только от зоны ризосферы, но и от вида и стадии развития растений. Так, в ризосфере картофеля и клевера в 100, а пшеницы только в 7 раз больше микробов, чем в

окружающей почве. Скопление микробов вблизи корней связано с выделением последними различных питательных веществ - с так называемым экзосмосом. В корневых выделениях установлено наличие органических кислот - янтарной, щавелевой, яблочной, фумаровой: углеводов типа альдоз и кетоз, аминокислот и нуклеотидов; физиологически активных веществ - ферментов, витаминов, алкалоидов и других соединений. Корневые выделения могут служить важным селективным фактором в формировании в ризосфере отдельных микробных ассоциаций. Кроме корневых выделений, микроорганизмы используют в качестве источников питания отмершие корневые волоски, эпидермис. Кроме того, в зоне корней улучшаются физико-химические свойства почвы, ее структурность, влажность, pH. Поэтому плотность микроорганизмов в ризосфере значительно выше, чем вне корневой зоны.

Основная масса прикорневой микрофлоры представлена неспороносными бактериями рода Pseudomonas. Однако в зависимости от вида растений в микробных ассоциациях могут происходить значительные изменения видового состава. По данным М. Федорова, например, ведущее место в ризосфере тимофеевки занимают микобактерии, в то время как в ризосфере клевера преобладают флюоресцирующие бактерии и Ps. radiobacter, в ризосфере крестоцветных в значительных количествах обнаруживается азотобактер. В связи с возрастом растения и его физиологическим состоянием специфика доминирующих видов может сильно изменяться, но общая закономерность, присущая ризосфере того или иного растения сохраняется. Динамика численности ризосферных бактерий изменяется по периодам роста растений. В их развитии наблюдаются два максимума: первый приходится на период кущения, второй - на период цветения и плодоношения. В эти же периоды происходит максимум корневых выделений. В период созревания и завядания активность и численность ризосферных бактерий снижается.

Таким образом, высшие растения оказывают большое влияние на развитие отдельных видов бактерий и формирование микробных ценозов в почве. Бактерии ризосферы в свою очередь также воздействуют на растения: одни стимулируют развитие их, другие же угнетают и приводят к снижению уровня. Стимулирующее

действие сказывается благодаря увеличению в ризосфере минеральных элементов питания в связи с минерализацией микроорганизмами органических веществ (растительных остатков и трупов животных); образованию и выделению витаминов и других ростовых веществ (например, азотобактер и клубеньковые бактерии синтезируют и выделяют биотин, витамины B_6, B_{12}, гетероауксин); улучшению структуры почвы (основная роль в этом процессе принадлежит мицелиальным грибам и капсульным бактериям); снижению поражаемости растений бактериальными и грибными заболеваниями, обусловленому наличием среди микрофлоры ризосферы активных антагонистов. Из практики известно, что многие патогенные грибы проявляют большую вирулентность, когда находятся в контакте со стерильными корнями растений.

Угнетающее действие микрофлоры ризосферы на высшие растения связано с образованием и выделением в почву токсических веществ отдельными видами микроорганизмов, а также наличием среди них возбудителей заболеваний. Для устранения условий, благоприятствующих этим явлениям, необходимо проводить чередование культур в севообороте, что обеспечивает смену микробных ассоциаций в почве.

14.1.1. Микориза

Термин «микориза» обозначает ассоциацию мицелиальных нитевидных грибов с корнями хлорофиллоносных растений. В настоящее время известно около 2 000 видов растений, способных к образованию микоризы. Это главным образом древесные растения, папоротники, хвощи, из травянистых орхидные и лилейные. Некоторые культурные растения также образуют микоризу (картофель в высокогорных районах Кавказа, пшеница на Урале).

Явление микоризы было открыто и основательно изучено Ф. М. Каменским в 1880 г. К микоризным грибам относятся в основном базидиальные грибы, хотя ряд других (аскомицеты, фикомицеты) тоже способны образовывать микоризу. Микоризные грибы, как правило, приурочены к определенному виду растений, например, подберезовики к березе, подосиновики к осине.

В зависимости от морфологических особенностей сожительства грибов с растениями различают эктотрофные и эндотрофные микоризы. Эктотрофные - это ассоциации, при которых гриб не проникает внутрь корней, а поселяется на поверхности их, образуя своего рода чехол для мицелия. При эндотрофных микоризах мицелий гриба располагается в клетках коры корней растений. Микоризы этих двух типов обнаруживаются на корнях многих лесных пород как хвойных, так и лиственных.

Микориза рассматривается как симбиотическое сожительство филогенетически далеких организмов. Особенно это сожительство благоприятно для развития растений. Микориза прежде всего увеличивает поглощающую поверхность корней за счет разветвления гиф гриба, которые выполняют функции корневых волосков, отсутствующих у лесных деревьев. Поглащая из почвы воду и растворенные в ней питательные вещества, грибы способствуют обеспечению растений минеральной пищей и особенно азотом и фосфором.

Обладая активными протеолитическими ферментами, грибы разлагают богатые азотом весьма стойкие органические соединения (гуматы и ульматы) и выделяют аммиак в непосредственной близости от корня, создавая этим самым благоприятные условия для питания растений. На эту, одну из важнейших функций микоризных грибов, не раз обращал внимание В. Р. Вильямс (1947): «...грибница микоризы, как бесхлорофильный организм, разрушает органическое вещество, ульминовую и апокреновую кислоты, сама использует их богатое содержание азота и снабжает им своего сожителя - дерево. Кислая реакция ульминовой кислоты не вредна грибам».

Микоризные грибы снабжают растения также некоторыми ростовыми веществами (никотиновая кислота, гетероауксин), что имеет большое значение для прорастания и укоренения сеянцев.

Растение в свою очередь выделяет ряд ростовых веществ, стимулирующих развитие гриба. Так, в большинстве водных экстрактов из лесной почвы обнаруживается тиамин, который является сильным активатором роста ряда грибов. Кроме того, грибы получают от растения углеродистую пищу в форме углеводов, служащую источником энергии.

Следовательно, взаимоотношения между растениями и микоризными грибами вполне могут рассматриваться как симбиотические. Польза, приносимая микоризными грибами многим лесным деревьям, не вызывает сомнений, и поэтому микоризные грибы нашли практическое применение в инокуляции семян и саженцев соответствующих древесных пород при высадке их в почву.

14.2. ЭПИФИТНАЯ МИКРОФЛОРА

Эпифитной называется микрофлора, находящаяся на поверхности надземных частей растений. По качественному составу она довольно однообразна и не зависит ни от вида растений, ни от их географического произрастания. Типичными представителями эпифитной микрофлоры является Xanthomonas herbicola aureum - грамотрицательная короткая подвижная палочка и Pseudomonas fluorescens - грамотрицательная палочка, образующая на агаре флюоресцирующие колонии. Эти два вида бактерий сопутствуют растению на протяжении всей его жизни. Растение для них, особенно для первого, - основное местообитание. К эпифитной микрофлоре относятся и другие бактерии, встречающиеся на здоровых растениях, однако они не столь специфичны, как X. herbicola aureum, и могут развиваться в иных условиях. Эпифитная микрофлора сохраняется на семенах и при их прорастании переходит на поверхность растений.

Большой интерес представляют взаимоотношения между эпифитной микрофлорой и растением. Имеющийся небольшой экспериментальный материал показывает, что среди эпифитных бактерий встречаются такие, которые образуют антимикробные вещества, действующие отрицательно на фитопатогенные бактерии, и тем самым предохраняют растения от заболеваний. Так, X. herbicola способна подавлять рост возбудителя бактериоза фасоли X. phaseoli. Антагонистическим действием обладают и некоторые культуры Ps. fluorescens. Но наряду с этим отмечается также способность отдельных представителей эпифитных бактерий поражать растения. Более того, высказывается предположение о происхождении фитопатогенных бактерий от эпифитных. В пользу этого

предположения служат найденные промежуточные формы, занимающие положение между сапрофитными, эпифитными и паразитирующими фитопатогенными бактериями. Так, М. В. Горленко (1966) установил, что связующим звеном между эпифитной бактерией X. herbicola aureum и фитопатогенными бактериями этого рода является X. heterocea, паразитирующая на многих растениях. Продолжают паразитический ряд бактерии X. translucens, далее идут более узко специализированные виды - X. campestris на крестоцветных, X. vesicatoria на томатах и др. Вероятно, основной причиной эволюции эпифитных бактерий в направлении паразитизма явилось питание растительными тканями. Поселяясь на поврежденных растениях, бактерии вначале питались мертвыми, затем отмирающими тканями и постепенно давали начало развитию паразитирующих форм. Быстрая изменчивость и приспособляемость микроорганизмов к факторам питания обусловливает возможность эволюции сапрофитных бактерий в направлении паразитизма.

14.3. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ РАСТЕНИЙ

Наряду с пользой, приносимой растениям ризосферными и эпифитными бактериями, последние причиняют и большой вред, вызывая различного рода заболевания их. Заболевания растений, вызываемые бактериями, называются бактериозами. Бактерии в этом случае считаются фитопатогенными.

Впервые на возникновение патологических изменений в растительных тканях под влиянием бактерий указал М. С. Воронин в 1866 г. Наблюдая за образованием клубеньков на корнях бобовых растений, он высказал идею о возможности паразитизма бактерий в тканях растений. Большая заслуга в создании учения о бактериозах принадлежит Э. Смиту, который экспериментально доказал существование многих бактериальных болезней растений. Основные возбудители бактериозов растений относятся преимущественно к родам Pseudomonas, Xanthomonas, Erwinia, Agrobacterium, Corynebacterium. Фитопатогенные бактерии обладают различной степенью патогенности. Одни из них вызывают общее или сосудистое поражение растений, другие - местное паренхиматозное, третьи образуют опухоли. При общем поражении

возбудитель проникает в корни или сосудистую систему. Болезнь сопровождается увяданием листьев, стеблей и приводит к гибели растения. Типичным примером сосудистого бактериоза служит бактериальный рак томатов (возбудитель Cor. michiganense), а также и кольцевая гниль картофеля (Cor. sepedonicum).

Внешними признаками поражения томатов бактериальным раком являются увядание отдельных листьев или ветвей, образование темных продольных пятен на стеблях, черешках и плодах (рис. 14.1). При раннем поражении погибает до 96 % растений. Это резко снижает урожай, так как больные растения дают некачественные плоды.



Рис. 14.1. Бактериозы растений: *а - корневой рак сливы; б - рак томатов*

При кольцевой гнили картофеля наблюдается скручивание листьев и увядание растений. При данном заболевании бактерии закупоривают сосуды и препятствуют тем самым поступлению воды вверх по стеблю. Поражение сосудов в клубнях картофеля проявляется в виде образования темного кольца. Сосудистые заболевания называются также и некоторыми другими видами родов Xanthomonas, Pseudomonas и Erwinia.

Кроме сосудистых существуют паренхиматозные бактериозы, характеризующиеся проникновением бактерий в ткани, где они с

помощью фермента протопектиназы производят мацерацию их (отслаивание друг от друга).

Паренхиматозные поражения вызывает ряд бактерий: E. carotowora (гниль моркови), Ps. syringae (ожог сирени), Ps. tabaci (рябуха табака), X. malvacearum (вилт хлопчатника) и др.

Опухолевые образования на растениях, вызываемые бактериями, бывают раковые и туберкулезные.

В опухолях туберкулезного характера внутри образуются плоскости вследствие сгнивания тканей. Эти полости заполняются бактериальной слизью. Типичным примером этого заболевания является туберкулез свеклы (возбудитель X. beticola).

Раковые опухоли представляют собой разросшуюся ткань, внутри которой нет полостей. Например, корневой рак плодовых культур, вызываемый бактериями рода Agrobacterium.

Агробактерии индуцируют развитие трех видов рака у растений: корончатый галл (возбудитель A. tumefaciens), бородатый корень (возбудитель A. rhizogenes), тростниковый галл (возбудитель A. rubi).

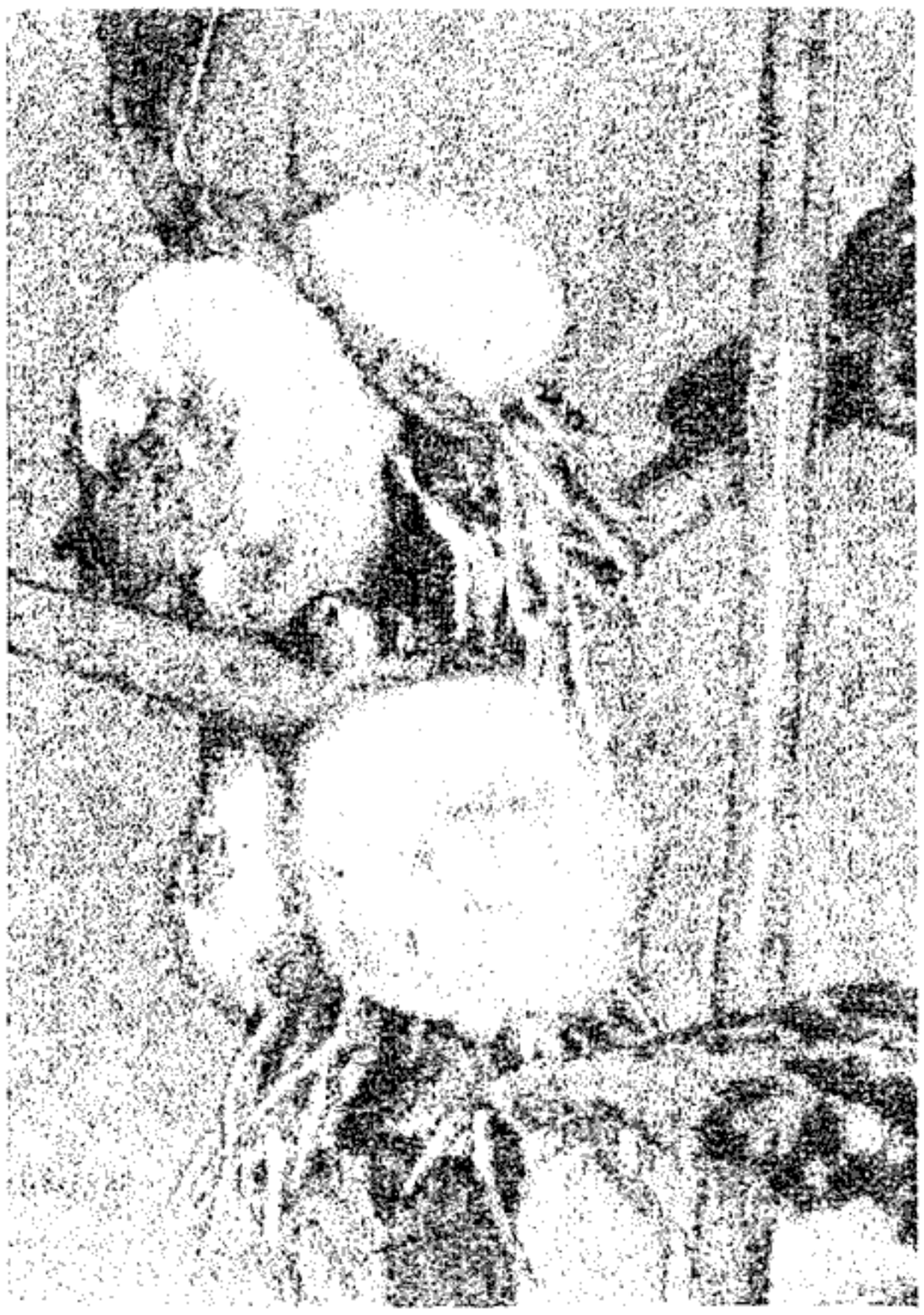


Рис. 14.2. Бактериоз корончатый галл

Молекулярной основой индукции опухоли «корончатый галл», как и других опухолей, является включение ДНК опухолеобразующей плазмиды бактерий (в данном случае ДНК Ti-плазмиды) в геном клеток высших растений. Процесс образования корончатых галлов заключается в следующем: агробактерии, содержащие Ti-плазмиду, проникают через поврежденную ткань и заражают растение. Плазмидная ДНК передается в растительную клетку и определенный фрагмент ее встраивается в хромосому. Это приводит к индукции процесса опухолеобразования. Нормальная клетка растения, содержащая фрагмент ДНК Ti-плазмиды, «трансформируется»,

т. е. перерождается в раковую. Дифференцированный рост клеток прекращается, начинается безудержное, неконтролируемое деление, в результате чего пролиферирующие ткани растения образуют опухоли - корончатые галлы (рис. 14.2).

Существуют и смешанные типы поражения, такие как, например, при бактериальном раке томатов, ожоге плодовых или некрозе цитрусовых. Здесь одновременно происходят увядание и отмирание листьев и почек, наблюдается пятнистость плодов.

Поражение растений бактериями нарушает нормальный ход физиологических процессов и прежде всего фотосинтеза и дыхания. Пятнистые бактериозы приводят к уменьшению количества хлорофилла и снижению продуктивности фотосинтеза. Для большинства бактериозов характерно усиление интенсивности дыхания и повышение активности окислительно-восстановительных ферментов в пораженных тканях растений. Это своеобразная защитная реакция растений, направленная на нейтрализацию токсических метаболитов возбудителя. Однако повышение интенсивности дыхания приводит к нарушению сопряженности дыхания и фосфорилирования. В результате энергия дыхания не может быть аккумулирована и использована клеткой. Она выделяется в виде тепла. Установлено, что температура больной ткани выше, чем здоровой. Поражение растений фитопатогенными бактериями вызывает нарушение в углеводном и белковом обмене, расстраивает координированное действие ферментного аппарата. Нарушение физиологических процессов в конечном счете приводит к снижению продуктивности растений и к их неполноценности.

Источниками заражения растений бактериозами являются вода, насекомые, почва. Особенно большую опасность представляют семена, посадочный материал и остатки пораженных растений. Это основной резервуар фитопатогенных бактерий, являющийся не только местом хранения возбудителей, но и средством их распространения. Заражение семян происходит при уборке урожая (поверхностное заражение), либо во время роста растений (внутреннее заражение), когда бактерии проникают в семена с больных органов плодоношения или по сосудам, питающим их.

Громадное значение в распространении бактериозов принадлежит насекомым. Например, возбудитель туберкулеза маслин

Ps. savostjanovi зимует в маслинной мухе, E. carotovora - возбудитель гнилей - в капустных мухах. Насекомые инфицируют растения при поедании их, через экскременты или кладку яиц. В растения бактерии проникают через естественные (устьица, нектарники, чечевички и гидатоды) и искусственные ходы (механические повреждения растений - ранки, царапины). Через естественные ходы обычно проникают узкоспециализированные бактерии, например возбудители болезней листьев - X. malvacearum (гоммоз хлопчатника), X. vesicatoria (пятнистость томатов); через искусственные - различные бактерии с широким спектром паразитического действия, например возбудители мокрой гнили E. carotovora и E. aroideae. Распространению бактериозов способствует резка клубней картофеля при подготовке посадочного материала, пасынкование и черенкование растений (махорка, томаты и др).

14.3.1. Факторы вирулентности фитопатогенных бактерий

Степень, или мера, патогенности определяется вирулентностью. Факторами вирулентности фитопатогенных являются *токсины и ферменты.* Токсины взаимодействуют с клеточными ферментами растений, инактивируют их, в результате чего клетки отмирают.

Из ферментов, определяющих вирулентность бактерий, наиболее важную роль играют гидролитические экзоферменты - пектиназа, целлюлоза и гемицеллюлаза, протеаза. Пектиназа вызывает гидролиз пектина, что благоприятствует распространению возбудителей внутри растения. Способностью образовывать пектолитические ферменты обладают возбудители мягкой гнили, сосудистых бактериозов, опухолей. Протеаза, целлюлаза и гемицеллюлаза расщепляют вещества клеточной стенки растений, в результате возбудитель проникает внутрь клеток и вызывает их гибель.

Достоверные данные о связи степени вирулентности фитопатогенных бактерий с их способностью продуцировать пектолитические, протеолитические и целлюлолитические ферменты получены путем сравнительного изучения вирулентных диких штаммов и их авирулентных мутантов. Так, авирулентный мутант

E. carotovora отличался от исходного вирулентного штамма отсутствием способности образовывать пектолитические ферменты. У возбудителя черной ножки картофеля Pect. phytophtora вирулентность коррелирует с активностью пектолитических и протеолитических ферментов.

Однако растения обладают защитными механизмами от поражения фитопатогенными бактериями. Это прежде всего образование биологически активных веществ - фитонцидов, способность к детоксикации токсинов, к отделению пробковым слоем пораженной ткани от здоровой, высокая кислотность сока, подавляющая развитие возбудителя.

14.3.2. Меры борьбы с бактериозами

Правильная организация защиты растений от бактериальных болезней и разработка мер борьбы с возбудителями осуществляются на основании комплексного изучения биологии возбудителя, условий возникновения и развития заболевания и индивидуальных особенностей растений. К настоящему времени хорошо изучены наиболее распространенные бактериозы культурных растений и разработаны как профилактические мероприятия, так и эффективные средства борьбы с возбудителями. Важнейшими из них являются *дезинфекция (протравливание) семян и посадочного материала (черенки, саженцы), дезинфекция почвы, смена культур в севообороте, своевременная уборка и уничтожение растительных остатков после сбора урожая, выведение иммунных сортов растений.*

Дезинфекция семян проводится химическим, физическим и биологическим способами. При химическом способе семена обрабатываются различными химическими бактерицидными веществами. В практике чаще всего применяется слабый водный раствор формалина (1 : 90), очень слабый раствор сулемы (1 : 1 000), препараты ниуиф-1 (водный раствор этилмеркурфосфата) и ниуиф-2 (гранозан) - серый порошок, состоящий из этилмеркурхлорида или этилмеркурбромида и талька, и др.

Физический способ заключается в прогревании семян при температуре 50-60^0 С в течение 10-20 мин.

При биологическом способе борьбы с возбудителями бактериозов семена обрабатываются бактериофагами, фитонцидами и антибиотиками. Обработка бактериофагом проводится обычно во время яровизации семян путем замачивания их в воде, содержащей бактериофаг определенного вида возбудителя. Это оказалось особенно эффективным в борьбе с гоммозом хлопчатника.

Перспективным является применение фитонцидов - эфирных масел высших растений, обладающих антимикробным действием. Высокоактивными препаратами против многих бактериозов (бактериальный рак томатов, сосудистый бактериоз капусты, бактериозы бобовых и др.) служат арекарин и некоторые аналоги псевдоаллицина.

Не менее эффективно действие некоторых антибиотиков микробного происхождения. Изучение чувствительности in vitro ряда фитопатогенных бактерий к антибиотикам показало, что тетрациклины, стрептомицины, неомицины подавляют развитие большинства видов возбудителей бактериозов растений в концентрации, меньшей чем 0,001 мг/мл. В этом отношении заслуживает внимание антибиотик фитобактериомицин, полученный из актиномицетов группы Act. lavendula. Он является весьма активным против бактериозов фасоли и гоммоза хлопчатника. Обработка семян хлопчатника этим препаратом обеспечивает устойчивость к заболеванию не только в год обработки, но и при высеве семян, собранных с обработанных растений в следующем году.

Методы применения антибиотиков в борьбе с бактериозами выбираются в зависимости от вида заболевания, стадии развития, размеров и места произрастания растений. Чаще всего производится смачивание семян корней и других органов растворами антибиотиков, опрыскивание растений, обработка почвы. Антибиотики через листья или корни (в зависимости от способа обработки) проникают в растение и довольно быстро распространяются по органам и тканям, сохраняя длительное время антибиотическую активность. Так, фитобактериомицин в зависимости от концентрации активен в тканях растений от 9 до 38 дней. Антибиотики обладают тем преимуществом перед химическими протравителями, что подавляют возбудителя не только на поверхности растения, но и внедрившегося в ткани, т. е. они действуют не только профилакти-

чески, но и терапевтически. Наиболее перспективным в практике растениеводства являются фитобактериомицин, стрептомицин, гризеофульвин, тетрациклин, октидион. Помимо очищенных препаратов антибиотиков, целесообразно применять культуральную жидкость продуцентов, а также обрабатывать семена и вносить в почву микробов-антагонистов. Все эти мероприятия способствуют повышению иммуннобиологических свойств растений.

Глава 15
ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ЧЕЛОВЕКОМ И ЖИВОТНЫМИ

Человек и животные с момента своего рождения попадают в микробное окружение, которое сопутствует им на всем жизненном пути. Микробы поселяются не только на поверхности тела макроорганизма, но и проникают внутрь, заселяя различные органы и ткани.

Между микро- и макроорганизмами устанавливаются определенные взаимоотношения, характер которых определяется биологической природой организмов и условиями их развития.

15.1. НОРМАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Микрофлора, постоянно обитающая в организме человека и животных и не вызывающая нарушений его физиологических функций, называется нормальной. Нормальная микрофлора должна рассматриваться в единстве с целостным организмом. Она сформировалась в процессе эволюции животных и человека как симбиотическая микрофлора.

Нормальная микрофлора представлена преимущественно бактериями. Они обитают на поверхности кожи, в полости рта, в желудочно-кишечном тракте и дыхательных путях. В зависимости от местообитания количественные соотношения отдельных видов меняются, хотя каждая область организма имеет свою стабильную микрофлору. На поверхности кожи содержатся в основном кокковые формы: стафилококки, стрептококки, сарцины. Но наряду с ними могут быть палочковидные бактерии и дрожжевые грибки. Источником питания для них служат выделения потовых и сальных желез. Поэтому загрязненная кожа в большей степени обсеменена микроорганизмами.

Более обильна и разнообразна микрофлора полости рта. Это стрептококки разных видов, лактобациллы, вейлонеллы, довольно часто обнаруживаются дрожжеподобные грибы рода Candida и коринебактерии.

Из полости рта через пищевод микроорганизмы попадают в желудок. Но микрофлора желудка более бедна, так как кислая реакция желудочного сока не благоприятствует развитию большинства попавших в него микробов. В желудке в основном развиваются виды, хорошо переносящие кислую среду - молочнокислые стрептококки, энтерококки, сарцины, дрожжи. Встречаются и другие микробы - спороносные палочки, аэробактер, кишечная палочка, актиномицеты.

Весьма разнообразна и многочисленна микрофлора рубца (преджелудка) жвачных животных. Количество микроорганизмов в 1 г содержимого рубца доходит до 20 млрд., в то время как в желудке они исчисляются только несколькими десятками тысяч. Значительное количество микрофлоры рубца составляют целлюлозоразрушающие бактерии. Они играют важную роль в усвоении растительной пищи жвачными животными (коровы, козы, овцы), которые не образуют фермент целлюлазу, необходимый для гидролиза клетчатки. Поэтому исходное биохимическое превращение клетчатки и усвоение животными образовавшихся продуктов осуществляются исключительно благодаря наличию в рубце целлюлозоразрушающих бактерий. Взаимоотношения микрофлоры рубца с организмами животных относятся к типу симбиотических.

В тонком кишечнике человека и животных содержание микроорганизмов ничтожно, хотя реакция среды там щелочная. Предполагают, что слизистая оболочка тонкого кишечника обладает бактерицидными свойствами. Основными обитателями этой полости являются энтерококки, кишечная и ацидофильная палочки, дрожжи.

Наиболее богата микрофлорой область толстых кишок. Она включает около 240 видов микробов, среди которых, по данным Л. Г. Перетц (1962), энтерококк составляет 49 %, а кишечная палочка 42,4 %. Это обязательные представители нормальной микрофлоры толстого кишечника. Большинство из них комменсалы, в связи с чем взаимоотношения их с макроорганизмами получили название комменсализма (разновидность симбиоза). Это такой тип взаимоотношений, когда один из симбионтов получает питательные вещества или какие-либо другие преимущества за счет другого, не причиняя ему никакого вреда.

Нормальная микрофлора играет в организме положительную роль, что обусловлено ее антагонистической, ферментативной и витаминообразующей функциями. Это было доказано на экспериментально выращенных в специальных камерах животных, свободных от микроорганизмов. Такие «стерильные», или «безмикробные», от рождения и на протяжении всей жизни животные называются гнотобионтами (от греч. gnoto - известный, bios - жизнь), или аксеничными животными (от греч. a - без, kseno - посторонний). Существенной особенностью таких животных является повышенная чувствительность к действию микроорганизмов. Заражение их совершенно безвредными для обычных животных микроорганизмами нередко приводит к смертельному исходу. Так была установлена защитная функция нормальной микрофлоры микроорганизма. К примеру, в обычных условиях животные нечувствительны к возбудителю холеры, он опасен только для людей. Однако, если морских свинок, выращенных в стерильных условиях, заразить этим микроорганизмом, они заболевают холерой и через 6-9 дней погибают. Значит, отсутствие нормальной микрофлоры в кишечнике морских свинок благоприятствует развитию возбудителя, в то время как в естественных условиях эта микрофлора оказывает антагонистическое действие на холерного вибриона. Кишечная палочка обладает антагонистическими свойствами по отношению к возбудителям дизентерии, паратифа, стафилококкам и стрептококкам, а также к различным гнилостным бактериям. Кокковые формы полости носа и миндалин подавляют развитие бактерий дифтерии и озены.

Макрофлора кишечника играет важную роль в обеспечении макроорганизма витаминами. Полагают, что кишечная микрофлора обеспечивает потребности животных в биотине и фолиевой кислоте. Она синтезирует также витамины С и К.

В общем нормальная микрофлора выполняет положительную роль. Однако в определенных условиях отдельные представители ее могут стать возбудителями заболеваний. К примеру, кишечная палочка часто оказывается возбудителем перитонита, аппендицита, заболеваний желчного пузыря; зеленящий стрептококк вызывает эндокардиты и другие заболевания; обитающие на коже стрептококки нередко вызывают фурункулез. Все эти заболевания носят

название аутоинфекции. В основе их лежат изменения макроорганизма - повреждение органов и тканей, снижение иммунитета, а также генетические и фенотипические изменения представителей нормальной микрофлоры. Итак, при воздействии макроорганизма и других неконтролируемых условий из обычных штаммов могут образовываться вирулентные. Поэтому отдельные виды нормальной микрофлоры - кишечная палочка, стафилококки, стрептококки, энтерококки - получили название условно патогенных.

В отдельных случаях может иметь место нарушение в составе нормальной микрофлоры, приводящее к изменению соотношения между отдельными видами. Это явление получило название дисбактериоза. Развитие дисбактериоза может быть следствием применения антибиотиков, химиопрепаратов, снижения иммунитета в результате различных причин.

Возникновение дисбактериоза связано с подавлением развития микробов-антагонистов, регулирующих состав нормальной микрофлоры. В результате активно размножаются патогенные и условно патогенные микроорганизмы. Резко увеличивается количество бактерий родов Pseudomonas, Proteus, являющихся причиной внутрибольничных инфекций, грибов рода Candida, вызывающих кандидозы. Последствием дисбактериоза является значительное возрастание антибиотикорезистентных штаммов бактерий, нарушение витаминообразующих и ферментативных функций нормальной микрофлоры, ослабление иммунорезистентности организма.

Лечение дисбактериозов направлено на восстановление нормального состава микрофлоры организма. С этой целью производится применение препаратов, содержащих суспензии живых микроорганизмов - представителей нормальной микрофлоры человека. Такими препаратами являются лактобактерин, изготавливаемый на основе живых культур молочнокислых бактерий, колибактерин, содержащий живую культуру кишечной палочки (штамм М-17), бификол - ассоциированный препарат из бифидобактерий и кишечной палочки и другие. Использование этих препаратов рассчитано на то, что введенные микроорганизмы, благодаря своим антагонистическим свойствам вытеснят пато-

генные бактерии и обеспечат условия развития и восстановления нормальной микрофлоры.

15.2. ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Патогенными (от греч. patos - болезнь, страдание) называются микроорганизмы, потенциально способные вызывать инфекционный процесс. Это генотипический признак, характеризующий видовую способность бактерий приживаться в тканях и полостях организма и размножаться в них. Патогенность является потенциальным признаком бактерий потому, что она может быть проявлена только в определенных условиях - в восприимчивом организме.

Патогенность контролируется многими генами, ответственными за проявление всех свойств, определяющих патогенность, таких как синтез продуктов метаболизма, ферментов, образование морфологических структур микроорганизма, в частности капсулы. Характерной особенностью патогенных микробов является специфичность действия, т. е. способность вида вызывать строго определенное заболевание. Так, пневмококки вызывают только пневмонию, гонококки - гонорею, палочки туберкулеза - туберкулез. Но не все микробы одного и того же вида в одинаковой степени обладают свойством патогенности. Одни штаммы более патогенны, у других патогенность выражена слабее. Степень или мера патогенности микроорганизма называется вирулентностью (от лат. virulentus - ядовитый, болезнетворный). Вирулентность представляет собой совокупность ряда болезнетворных свойств микроба: инфекционность или заразительность, инвазивность (способность внедряться в организм и распространяться в его тканях), интенсивность размножения и способность вырабатывать ядовитые вещества. Степень вирулентности измеряется условно принятой единицей - минимальной смертельной дозой (DLM - dosis letalis minima), т. е. наименьшим количеством микробов, которое при заражении восприимчивых к ним животных вызывает 95-100 % гибели их. Иногда используют 50 %-ную летальную дозу (LD_{50}). Это количество микробов, вызывающее гибель 50 % подопытных животных.

Вирулентность микробов - не стабильный видовой признак, а индивидуальный. Она может изменяться в зависимости от условий. Так, культивирование микроорганизмов на искусственных питательных средах, на средах, содержащих дезинфицирующие вещества, высушивание, пассирование через естественно невосприимчивый организм снижает вирулентность их. Под влиянием мутагенных факторов можно получить вообще авирулентные мутанты.

Вирулентность патогенных микробов может изменяться и в сторону повышения. Но искусственно повысить вирулентность гораздо труднее, чем ослабить ее. Наиболее совершенным методом повышения вирулентности микробов является пассирование их через организм восприимчивых животных.

Искусственное ослабление вирулентности патогенных микроорганизмов называется аттенуацией, а штаммы патогенных микроорганизмов с искусственно сниженной вирулентностью, но сохраняющие иммуногенные свойства - вакцинными штаммами, или живыми вакцинами. Принцип получения живых вакцин был разработан в 1880 г. Л. Пастером. Однако основоположником применения их является Э. Дженнер, который еще в 1795 г. предложил метод предохранительных прививок против оспы.

В настоящее время живые вакцины широко применяются для профилактики оспы, туберкулеза, полиомиелита, кори, сибирской язвы. Кроме живых вакцин в практической медицине используются вакцины, приготовленные из убитых культур микроорганизмов.

Вирулентность - сложное свойство патогенных микробов, определяющееся рядом факторов, названных факторами вирулентности. Наиболее существенным из них является образование веществ, способствующих внедрению микробов в организм. Такие вещества называются факторами инвазии, или факторами распространения. К ним относятся ферменты гиалуронидаза, коллагеназа, фибринолизин.

Гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав соединительной ткани и обеспечивающую ее прочность и непроницаемость для микробов. Расщепление гиалуроновой кислоты увеличивает проницаемость тканей и способствует распространению микробов по организму.

Наличие гиалуронидазы у микробов легко выявляется в простом лабораторном опыте на животных. Кролику подкожно (поверхность предварительно выбрита) вводят в один участок тушь, в другой - тушь, смешанную с бульонной культурой вирулентных бактерий. В результате участок появляющегося подкожного окрашивания в месте введения чистой туши меньше, чем там, где вводилась смесь ее с микробами. Это указывает на увеличение проницаемости ткани под действием микробов.

Гиалуронидаза обнаружена у многих патогенных микробов: у палочек газовой гангрены, стафилококков и стрептококков, у возбудителей дифтерии, бруцеллеза и др.

Фермент коллагеназа разрушает тканевые белки и вызывает распад мышц. Это также способствует распространению микробов в организме. Коллагеназа обнаружена у палочки газовой гангрены.

Фибринолизин расщепляет сгустки фибрина, которые образуются в крови в процессе воспалительных реакций и препятствует распространению микробов. Фибринолизин вырабатывается стрептококками и стафилококками, возбудителем чумы и др.

Вирулентность микробов определяется также образованием ими специфических веществ белковой природы - агрессинов. Агрессины сами по себе безвредны для организма, но подавляют его защитные функции. Так, несмертельная доза патогенных микробов под влиянием агрессинов вызывает гибель животного.

Существенную роль в вирулентности микробов играет капсула. Капсула выполняет в основном защитную функцию. Капсульные бактерии более устойчивы к фагоцитозу, к бактерицидному действию крови. Они дольше сохраняются в организме, чем бескапсульные. Утрата способности к образованию капсулы ведет к снижению или потере вирулентности. Полученный в 1942 г. Н. Н. Гинзбургом бескапсульный штамм палочки сибирской язвы настолько снизил вирулентность, что стал совершенно безвредным для животных. Этот бескапсульный штамм используется для изготовления вакцины против сибирской язвы.

Самым важным фактором вирулентности является способность микробов вырабатывать ядовитые продукты метаболизма - токсины. Попадая в ток крови, они разносятся по организму и

вызывают различные отравления. Механизм действия большинства токсинов изучен еще недостаточно.

Среди микробных токсинов различают экзо- и эндотоксины. Экзотоксины, или истинные токсины, подобно экзоферментам, продуцируются клеткой и выделяются в окружающую среду, эндотоксины прочно связаны с клеткой и освобождаются только после гибели ее.

Эндотоксины образуются главным образом грамотрицательными патогенными микроорганизмами. Они представляют собой комплекс полисахаридов и липопротеидов, характеризуются термостабильностью, меньшей ядовитостью, чем экзотоксины. Кроме того, они не обладают специфичностью действия и при поражении макроорганизма дают однотипную картину патологического процесса: слабость, одышку, головную боль, расстройство кишечника. Малые дозы эндотоксина вызывают повышение температуры, большие - понижение и гибель животного.

В отличие от эндотоксинов экзотоксины вырабатываются только некоторыми грамположительными микроорганизмами - возбудителями столбняка (Clostridium tetani), ботулизма (Clostridium botulinum), дифтерии (Corynebacterium diphteriae), газовой гангрены (Clostridium perfringens). Они более токсичны и более опасны, чем эндотоксины. Это самые сильные биологические яды. Смертельная доза токсина палочки ботулизма для морской свинки равна $1 \cdot 10^{-7}$ мл; дифтерийной - $2 \cdot 10^{-3}$ мл.

Экзотоксинам свойственна высокая специфичность действия, т. е. они поражают определенные органы и ткани, что проявляется в характерной форме клинического заболевания. Токсин столбнячной палочки, например, поражает двигательные нейроны спинного мозга, вызывая судороги, параличи. Токсин палочки ботулизма действует на окончания двигательных нервов. Оба эти токсина относят к нервным ядам. Дифтерийный токсин поражает сердечную мышцу и надпочечники. Большинство экзотоксинов термолабильны - инактивируются при 58-60^0 С. Экзотоксины представляют собой белки. На основании высокой активности даже ничтожно малых концентраций экзотоксины отождествляют с ферментами. И это в отношении некоторых токсинов уже доказано. Установлено, например, что α-токсин возбудителя газовой гангрены Cl. perfringens является

фосфолипазой (лецитиназой С), вызывающей в определенных условиях гидролиз лецитина. Дифтерийный токсин является продуктом незавершенного синтеза цитохрома α и катализирует окислительные реакции в организме.

Действие экзотоксинов проявляется через определенный инкубационный период, который длится от нескольких часов до суток. Это одно из отличий экзотоксинов от ядов небиологической природы. Экзотоксины обладают свойством антигенности, т. е. при введении в организм обусловливают образование антител, нейтрализующих токсины. Весьма важно то, что, теряя токсичность, они сохраняют антигенность. Так, токсины бактерий дифтерии, столбняка, ботулизма при обработке их формалином (0,2-0,5 %) при температуре 37-38^0 С в течение месяца утрачивают ядовитые свойства, сохраняя при этом антигенность. Такие обезвреженные токсины называются анатоксинами. Они используются как вакцины в профилактических целях, а также для получения антитоксических лечебных сывороток. Все перечисленные выше факторы вирулентности определяют болезнетворность микроорганизмов и форму тяжести вызываемого ими инфекционного заболевания.

15.3. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Инфекция (от лат. infectio - заражение), или инфекционный процесс - совокупность биологических процессов, происходящих в макроорганизме при внедрении в него патогенных микроорганизмов, которые вызывают нарушение его физиологических функций и постоянства внутренней среды. Крайней степенью взаимодействия восприимчивого макроорганизма и патогенного микроорганизма является инфекционное заболевание. Возникновение заболевания, особенности его клинического проявления и течение зависят не только от вирулентности микроорганизма, но и от окружающей среды и общей физиологической реактивности макроорганизма, т. е. его способности вступать во взаимодействие с микроорганизмом. Существенное значение при этом имеют состояние нервной, эндокринной, иммунной систем, условия труда и быта, возраст человека.

Все факторы, обусловливающие ослабление организма, понижают общую резистентность его к патогенным микробам и способствуют развитию инфекционного заболевания. Наиболее важными из них являются голодание, неполноценное питание, переутомление, переохлаждение, нервные и психические расстройства.

Особое значение в возникновении и развитии инфекционного процесса имеют витамины. При недостатке витамина А, например, понижаются защитно-барьерные функции организма, и в результате возникают воспаления конъюктивы и роговицы глаз, носоглотки, верхних дыхательных путей. При дефиците витаминов группы В наблюдается снижение резистентности организма к стафилококковой инфекции. С-авитаминоз способствует повышению чувствительности к возбудителю пневмонии. При простуде наблюдается нарушение кровообращения, разрыхление слизистых оболочек дыхательных путей и прочие неблагоприятные изменения, снижающие сопротивляемость организма к возбудителям болезней.

Большую роль в течении и исходе инфекционной болезни играет состояние нервной системы, которая регулирует все жизненные функции, в том числе и защитные. Если патогенный микроб попадает в устойчивый организм, он погибает под действием защитных сил его.

Система защиты организма против инфекционных заболеваний лежит в основе иммунитета. Еще задолго до развития учения об иммунитете было известно, что при эпидемиях чумы, оспы, холеры заболевают не все люди, находящиеся в зоне заражения, а при некоторых инфекционных болезнях однажды переболевший человек невосприимчив в повторному заболеванию. Невосприимчивость к инфекционным болезням стали называть иммунитетом (от лат. immunitas - освобождение, избавление). В свете современных данных под иммунитетом понимают совокупность биологических процессов и механизмов, направленных на сохранение постоянства (гомеостаза) внутренней среды и защиту организма от инфекционных и других генетически чужеродных для него агентов.

15.3.1. Виды иммунитета

По происхождению иммунитет бывает врожденный и приобретенный. *Врожденный иммунитет* является видовым генетическим свойством организма, т. е. он передается по наследству и отличается высокой устойчивостью. Поэтому его называют видовым, или наследственным. У человека, например, отмечается невосприимчивость к чуме рогатого скота, собак и другим заболеваниям, характерным для животных. В свою очередь, животные не заражаются болезнями, присущими человеку: брюшным тифом, сифилисом, корью.

Предполагалось, что врожденный иммунитет носит абсолютный характер. Но еще Л. Пастер экспериментально доказал несостоятельность этого предположения. Так, в обычных условиях куры невосприимчивы к возбудителю сибирской язвы, однако если их заразить этим возбудителем, а затем поместить в холодную воду, снизив температуру тела до 37 ^{0} С (нормальная температура у кур 42 ^{0} С), то они заболевают. Подобный эксперимент можно проделать и с лягушкой, которая также обладает врожденным иммунитетом к возбудителю сибирской язвы. В настоящее время доказано, что переохлаждение или перегревание организма, переутомление, отравление алкоголем и поражение ионизирующей радиацией снижают естественный иммунитет.

Приобретенный иммунитет по наследству не передается. Он вырабатывается к некоторым заболеваниям индивидуально каждым организмом в течение его жизни и менее стоек, чем врожденный (через определенные сроки утрачивается). Для него характерна специфичность: человек, переболевший дифтерией, приобретает иммунитет только противодифтерийный, т. е. повторному заболеванию в течение какого-то времени он не подвержен.

Различают иммунитет естественно приобретенный и искусственно приобретенный. Первый - это иммунитет, выработанный в результате перенесения организмом инфекционного заболевания; второй - вызванный прививками, т. е. введением вакцин и сывороток. Естественный иммунитет передается от матери к ребенку (плоду) в период его внутриутробного развития. Антитела организма матери поступают в плод через плаценту. Созданный

таким путем иммунитет называется плацентарным. Он сохраняется у новорожденных до шести месяцев.

Искусственно приобретенный иммунитет в свою очередь подразделяется на активный и пассивный. Активный вырабатывается при вакцинации организма живыми или мертвыми вакцинами, пассивный - при введении готовых защитных факторов - антител, взятых от другого иммунного организма. Пассивно приобретенный иммунитет в отличие от активного возникает очень быстро (через 1-2 ч после введения сыворотки), но сохраняется недолго (15-20 дней), до тех пор, пока присутствуют введенные антитела. Организм в создании пассивного иммунитета никакого участия не принимает.

Особой формой приобретенного иммунитета является инфекционный иммунитет. Он вырабатывается в результате инфицирования организма патогенными микробами и не утрачивается, пока имеются эти микробы. С прекращением инфекции исчезает и иммунитет.

Инфекционная форма иммунитета была установлена в опытах с мышами, зараженными стрептококком. При введении небольшой дозы стрептококка мыши не погибали, но заболевали хронически. В дальнейшем они оказывались устойчивыми к дополнительному заражению более высокой дозой, смертельной для исходных здоровых мышей.

Инфекционный иммунитет развивается при туберкулезе, паратифе, различных вирусных заболеваниях. В отличие от других форм иммунитета, при которых организм полностью освобождается от инфекции, этот иммунитет не обладает такой способностью и носит название нестерильного.

Классификацию иммунитета можно представить в виде следующей схемы (рис. 15.1).

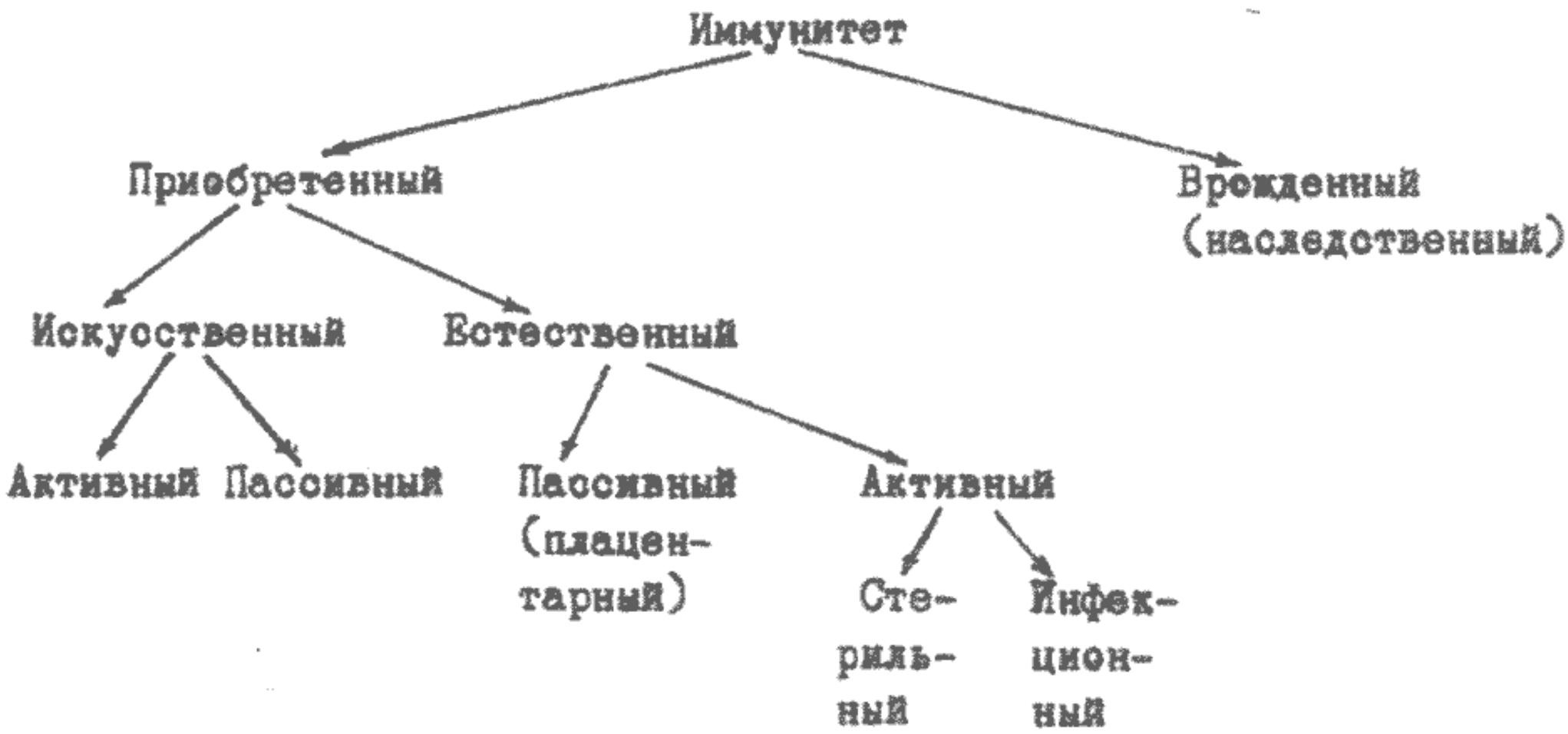


Рис. 15.1. Классификация иммунитета

Таким образом, каждый вид иммунитета является результатом длительной эволюции взаимоотношений между микро- и макроорганизмами.

15.3.2. Механизмы иммунитета

Механизмы иммунитета довольно многообразны. Одни из них постоянно действуют в организме - конститутивные механизмы, другие возникают в ответ на воздействие внешних агентов - индуцибельные механизмы. К числу постоянно действующих механизмов относятся кожные и слизистые барьеры, защитная функция лимфатических узлов, воспаление и фагоцитоз, гуморальные факторы. Индуцибельная резистентность связана с образованием антител, или накоплением сенсибилизированных лимфоцитов (от лат. sensibiltas - чувствительность).

Конститутивные механизмы лежат в основе неспецифической резистентности организма, которая составляет сущность врожденного иммунитета. Индуцибельные механизмы являются механизмами приобретенного иммунитета и обеспечивают специфическую защиту от проникших в организм патогенных микробов.

Защитная функция кожи, слизистых оболочек и лимфатических узлов. Кожа является основным барьером, защищающим организм от внедрения различных микробов. Кроме того, кожа обладает бактерицидными свойствами, которые обусловлены молочной и жирными кислотами, выделяемыми сальными и потовыми железами. Например, S. marcescens на здоровой коже в течение первых 10 мин погибает на 90 %, а через 30 мин - на 100 %.

Защитная функция слизистых барьеров - конъюктивы глаз, слизистых оболочек носа, рта связана с наличием в их секрете (выделениях) фермента лизоцима, обладающего бактерицидными свойствами. Лизоцим, открытый в 1909 г. П. К. Лащенковым, расщепляет мукополимеры клеточной стенки бактерий, что в течение короткого времени приводит к их гибели.

Лизоцим образует высшие организмы. У человека наибольшее количество его содержится в слезах, слюне, плазме и сыворотке крови, материнском молоке и других жидкостях организма. Защитным действием лизоцима определяется иммунитет конъюктивы и роговицы глаз, полости рта, носа и глотки.

Однако некоторые микроорганизмы преодолевают эти барьеры и проникают внутрь организма. В случае попадания их в лимфатические сосуды они с током лимфы вносятся в лимфатические узлы, где уничтожаются лимфоцитами и антимикробными веществами.

Воспаление и фагоцитоз. При внедрении микроорганизмов в ткани на месте внедрения развивается воспалительный процесс - защитная реакция организма. Она индуцируется не только микроорганизмами и их токсинами, но и различными физическими и химическими факторами (удар, ожог, токсическое действие химических веществ). Внешним проявлением воспалительного процесса является отечность и краснота. К очагу внедрения микроба или другого инородного агента стремится усиленный приток лимфы и крови, ткань обильно снабжается лейкоцитами, которые уничтожают проникших микроорганизмов (фагоцитоз). Кроме того, в зоне воспаления происходит свертывание лимфы, образуется лимфатическая блокада, препятствующая распространению микробов из очага воспаления. Таким образом, воспалительная реакция является своеобразным и сложным барьером, локализующим микробы в

месте их внедрения, препятствующим распространению по организму и уничтожающим их в очаге локализации.

Основным механизмом защитно-приспособительной реакции организма, обусловливающим освобождение его от микробов и других инородных тел, является фагоцитоз (от греч. phago - пожиратель, cytos - клетка). Учение о фагоцитозе разработано И. И. Мечниковым и вошло в литературу под названием фагоцитарной теории Мечникова. Фагоцитоз - процесс поглощения и переваривания микробов и других инородных частиц (в том числе и собственных отмерших клеток) клетками организма. Фагоцитарной способностью обладают различные клетки организма - лейкоциты крови, клетки ретикуло-эндотелиальной системы (печени, селезенки, лимфатических узлов, костного мозга) и др. Они получили название *фагоциты*. И. И. Мечников разделил их на микрофаги - многоядерные лейкоциты и макрофаги - клетки ретикуло-эндотелиальной системы. Наибольшей фагоцитарной активностью обладают лейкоциты.

Процесс фагоцитоза состоит из трех этапов: выход фагоцитов из сосудов и продвижение к внедрившемуся агенту (микробу или инородному телу), что осуществляется в результате хемотаксиса, которым обладают фагоциты; адсорбция и поглощение агента; переваривание. Заканчивается фагоцитоз полным уничтожением чужеродного тела. Такой фагоцитоз называется завершенным. Однако в процессе фагоцитоза не все микробы подвергаются гибели. Так, возбудители гонореи, проказы и другие внутри фагоцита могут сохранять жизнеспособность. Такой фагоцитоз называется незавершенным и представляет опасность для организма, так как микробы, находясь внутри фагоцитов, защищены от бактерицидного действия лекарственных препаратов и веществ организма. Он может явиться причиной возникновения инфекционного заболевания. Однако незавершенный фагоцитоз - явление довольно редкое.

Фагоцитарная активность лейкоцитов усиливается специальными антителами - опсонинами (от греч. opsono - приготовляя пищу), содержащимися в нормальных и иммунных сыворотках. Опсонины связываются с антигенными компонентами бактериальной клетки, блокирующими фагоцитоз, нейтрализуют их и превращают клетку в чувствительную к фагоцитозу.

Гуморальные факторы иммунитета. Гуморальными факторами, обеспечивающими невосприимчивость организма к инфекционным заболеваниям, являются *бактерицидные вещества сыворотки крови* (от лат. humorus - сыворотка). Бактерицидное действие крови впервые было установлено Ж. Фодором в 1887 г. По отношению к сибиреязвенным бациллам. Затем в 1889 г. Г. Бухнер установил бактерицидное действие сыворотки крови. Агент, обусловливающий это действие, был назван алексином (от греч. alexo - защищаю) и позже переименован в комплемент (от лат. complementen - дополнение).

Комплемент является составной частью сыворотки крови всех животных и человека. Комплемент характеризуется термолабильностью, высокой чувствительностью к ультрафиолетовым и рентгеновским лучам. Нагревание при 56 ^{0} С в течение 30 мин вызывает разрушение комплемента. Сам по себе комплемент обладает слабым бактерицидным действием, но он усиливает и дополняет действие специфических антител и других факторов антимикробных факторов.

Наряду с комплементом в сыворотке крови обнаружены другие антимикробные вещества - *лейкины и β-лизины.* Они термостабильны и разрушаются только при 75-80 ^{0}. Лейкины содержатся в лейкоцитах и освобождаются при их гибели; β-лизины находятся в сыворотке в свободном состоянии. В отличие от лейкинов они обладают более сильным бактерицидным действием в отношении анаэробов и стафилококков.

Кроме перечисленных гуморальных факторов, огромную роль в создании иммунитета играют антитела, постоянно присутствующие в организме в незначительных количествах. Это так называемые нормальные антитела. Для них характерна слабая активность и малая специфичность.

15.3.3. Индуцибельные механизмы иммунитета

Проникновение возбудителя в организм индуцирует появление специфических защитных реакций, которые в совокупности называются иммунным ответом. Появление иммунного ответа обеспечивается иммунной системой, которая представляет собой

совокупность лимфоидных органов и клеток: вилочковая, или зобная железа (тимус), селезенка, лимфатические узлы, лимфоциты костного мозга и периферической крови.

Главные компоненты иммунной системы - лимфоциты и их потомство. Они способны распознавать чужеродный антиген и реагировать на его присутствие специфическим иммунным ответом. Это может выражаться в синтезе антител, формировании иммунологической памяти, гиперчувствительности и др. Форма иммунного ответа определяется дифференцировкой иммунологических клеток и их межклеточными кооперациями (контактами).

К иммунокомпетентным клеткам относятся Т- и В-лимфоциты и клетки-макрофаги. Предшественниками Т- и В-лимфоцитов являются стволовые лимфоидные клетки костного мозга (рис. 15.2). Одни из них мигрируют в тимус и преобразуются в Т-лимфоциты (от «тимус»), другие - в бурсу (сумка Фабрициуса у птиц) или ее аналог у млекопитающих и созревают в В-лимфоциты (название от слова «бурса»). Т- и В-лимфоциты, прошедшие дифференцировку, заселяют лимфоидные органы, в которых происходит их пролиферация. Т-лимфоциты превращаются в сенсибилизированные (эффекторные) лимфоциты, а В-лимфоциты - в клоны плазматических клеток, продуцирующих антитела. Т- и В-лимфоциты снабжены специфическими рецепторами, благодаря которым они узнают и фиксируют соответствующие антигены. На поверхности В-клеток рецепторами являются иммуноглобулины - антитела. Специфические к ним антигены могут стимулировать эти клетки к делению и последующему образованию антител.

Т-клетки не несут антител, природа их рецепторов неизвестна, но они участвуют в антителообразовании в качестве помощников В-лимфоцитов. Эту функцию выполняет популяция клеток-хелперов (от англ. help - помогать). Взаимодействие Т- и В-лимфоцитов совместно с макрофагами обеспечивают все виды иммунного ответа организма на антиген.

В контакт с антигеном первыми вступают макрофаги. Они превращают его в форму, доступную для Т- и В-лимфоцитов. При этом большая часть антигена гидролизуется. Оставшаяся часть, несущая детерминанту специфичности, соединяется с поверхност-

ной мембраной макрофага и выполняет свои антигенные функции иммуногенеза.

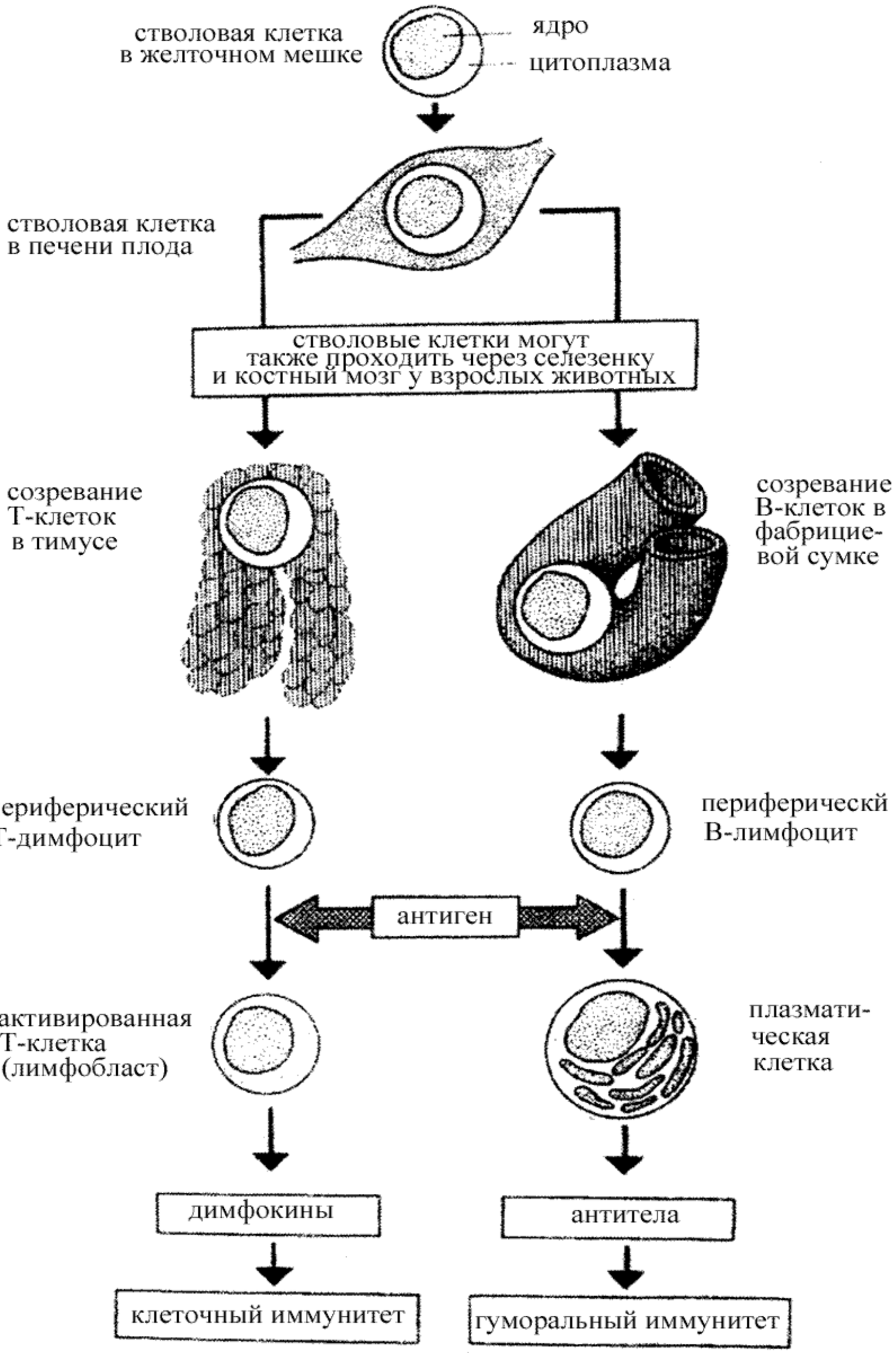


Рис. 15.2. Схема образования лимфоцитов В- и Т-типа путем дифференцировки стволовых клеток (Дж. Уитсон, 1878)

Система В-лимфоцитов обеспечивает гуморальный иммунитет против большинства бактериальных инфекций. Система Т-лимфоцитов играет ведущую роль в клеточном иммунитете. Т-лимфоциты выступают как «атакующие» агенты. Вступая в реакцию с чужеродными клетками, они погибают, освобождая при этом лимфоциты, которые обеспечивают уничтожение чужеродного вещества путем привлечения макрофагов. Клеточный иммунитет, наряду с образованием антител, играет важную роль в поддержании гомеостаза организма и имеет первостепенное значение в защите его от некоторых грибковых, бактериальных и вирусных инфекций.

Иммунологическая память. В процессе иммунного ответа происходит формирование иммунологической памяти. Клетками памяти служат Т- и В-лимфоциты. После взаимодействия с антигеном часть Т- и В-клеток сенсибилизируется. Они могут длительное время находиться в лимфоидной ткани, сохраняя в памяти специфичность контактировавшего с ними антигена. На повторное введение того же антигена даже через многие годы они обеспечивают вторичный иммунный ответ, выражающийся в интенсивном образовании антител.

Таким образом, все формы иммунного ответа (иммунологических реакций) индуцируются веществами, получившими название антигенов.

Антигены (от греч. anti -против, genos - род) - генетически чужеродные для организма сложные органические вещества, на введение которых организм отвечает образованием антител или другой формой иммунного ответа.

Антигенные свойства присущи микробам и их токсинам, белкам различного происхождения, некоторым полисахаридам и другим органическим веществам (липиды, нуклеиновые кислоты) в смеси с белками.

Антигены характеризуются двумя функциональными особенностями: способностью вызывать образование в организме специфических антител и способностью вступать с ними в определенные реакции - реакции иммунитета. Такие антигены называются полноценными.

Известен ряд веществ лишь с одной антигенной функцией. Они вступают в реакции с уже образовавшимися антителами.

Самостоятельно вызывать образование антител эти вещества не могут, но при смешивании с белком приобретают эту способность. Например, при иммунизации кролика липидами антитела не образуются. Если же липиды смешать с белком и ввести кролику, то произойдет образование антител и к белкам и к липидам. Такие антигены получили название неполноценных, или гаптенов. К ним относятся липиды, углеводы и другие более простые химические вещества.

Однако не все углеводы являются гаптенами. Изучение полисахаридов, выделенных из капсулы пневмококков, показало, что они могут не только реагировать с готовыми антителами, но и индуцировать образование антител у мышей и человека. Но в то же время у кроликов под действием данных полисахаридов антитела не образуются. Возможно, причиной этого является наличие в тканях кролика ферментов, разрушающих полисахариды пневмококков.

Основными условиями, определяющими антигенные свойства веществ, являются следующие:

– гетерогенность, т. е. чужеродность для иммунизированного животного. Белки, близкие по химическому строению и выполняющие одни и те же функции, что и белки иммунизируемого животного (гемоглобин, инсулин), обладают слабыми антигенными свойствами;

– макромолекулярность - антиген должен иметь молекулы сложного строения с молекулярным весом не менее 10 000. Такой белок, как желатина, из-за простоты строения оказывает слабое антигенное действие;

– коллоидность и растворимость - антигены должны образовывать коллоидные растворы. Кристаллические и денатурированные вещества не являются антигенами.

Всеми свойствами, характерными для полноценных антигенов, обладают белки. Антигены строго специфичны, что обусловлено особенностями структуры белковой молекулы. Природные антигены состоят из двух компонентов. Один из них - высокомолекулярный белок, определяющий коллоидную природу антигена и антигенные функции. Второй, как полагают, представляет собой аминокислотные остатки, располагающиеся в определенной конфигурации на глобулярной поверхности белка и

являющиеся детерминантными группами специфичности. На поверхности антигена их бывает несколько. Считают, что детерминантная группа антигена индуцирует образование антител, поэтому они обладают специфичностью или родством к данному антигену. Детерминантная группа может быть отделена от белкового носителя, тогда она функционирует как гаптен. Изменяя детерминантную группу, можно менять видовую специфичность антигена.

Антигены часто образуются непосредственно в самом организме без постороннего их введения. Они называются аутоантигенами. Ткани почек, печени, хрусталик глаза при их повреждении микроорганизмами или другими агентами продуцируют аутоантигенные макромолекулы, чуждые для данного организма. В ответ на их появление организм вырабатывает соответствующие антитела - аутоантитела. Наличие аутоантител вызывает в организме патологические процессы. С аутоиммунизацией связано развитие таких заболеваний, как ревматизм, ревмокардит, красная волчанка. Например, ревмокардит развивается в результате образования антител к собственной сердечной мышце. Мышечная атрофия связана с образованием антител против белков скелетной мускулатуры.

Под влиянием физических и химических факторов антигены снижают или полностью утрачивают свою активность. Это связано с денатурацией и коагуляцией белка.

Антитела - специфические гамма-глобулины, образующиеся в макроорганизме под влиянием антигенов и выполняющие защитные функции. Образование антител имеет место при инфекционных заболеваниях и при искусственной иммунизации организма микроорганизмами, токсинами или другими антигенами. Такие антитела, которые появляются в ответ на введение антигена, называются иммунными антителами, в отличие от нормальных антител, встречающихся в сыворотке крови человека и животных, не перенесших инфекции и не подвергавшихся иммунизации.

Иммунные антитела, или иммуноглобулины, представляют собой гетерогенную группу белков, которые по своим физико-химическим свойствам подразделяются на пять классов : IgG, IgM, IgA, IgE, IgD (Ig - иммуноглобулин).

IgG - составляют основную массу (около 80 %) сывороточных иммуноглобулинов. Характерная особенность их - высокая скорость связывания с бактериальными и вирусными антигенами, способность проникать через плаценту в организм плода.

IgM - первыми появляются в сыворотке крови после иммунизации и первыми синтезируются в организме плода. По активности во много раз превышают IgG, так как содержат около 10 активных центров.

IgA - подразделяются на два вида: IgA - сывороточный и IgAS - секреторный. Они различаются по физико-химическим свойствам, месту синтеза и функциям. Секреторный вырабатывается лимфоидными клетками ротовой полости, кишечника, респираторных и мочевыделительных путей, содержит секреторный компонент и выполняет защитную функцию при кишечных и респираторных инфекциях, обладает отчетливой бактерицидностью. Сывороточные IgA нейтрализуют микробы и их токсины только в крови.

IgE или реагины - кожно-сенсибилизирующие антитела, играют важную роль в развитии аллергических реакций немедленного типа (бронхиальная астма, аллергический насморк).

IgD - функции полностью не изучены. Считают, что они обусловливают некоторые аутоаллергические поражения при заболеваниях щитовидной железы.

Важнейшее свойство антител - это их специфичность. Антитела вступают в реакции только с теми антигенами, которые вызвали их образование. Специфичность антител определяется третичной структурой белковой молекулы, главным образом, конфигурацией концевых участков полипептидных цепей. На концевых участках находятся активные центры, с которыми взаимодействуют антигены. При наличии одного центра антитело называется моновалентным, нескольких - поливалентным. Поливалентность антител позволяет им одновременно реагировать с несколькими гомологичными антигенами, образуя крупные конгломераты.

В отношении образования антитела общее признание получила клонально-селекционная теория Бернета. Согласно этой теории в организме существует (до контакта с антигеном) большой набор дифференцированных В-лимфоцитов. Появление антигена и

связывание его с антителом, находящимся на мембране соответствующего В-лимфоцита, стимулирует рост и размножение этого лимфоцита. Образуется клон (группа идентичных клеток, происходящих от одной клетки) более крупных плазматических клеток, которые активно синтезируют и выделяют соответствующие антитела. Каждый клон этих клеток способен образовать только какой-нибудь один тип антител, так как при дифференцировке В-клеток в каждой из них активизируется только один набор генов, детерминирующих синтез иммуноглобулинов.

Образование антител - самостоятельный процесс, не зависящий от синтеза нормальных глобулинов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Аркадьева З.А., Безбородов А.М., Блохина И.Н. и др. Промышленная микробиология. - М.: Высшая школа. - 1989.

Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. - М: Мир. - 1987. - 543 с.

Биотехнология / Под ред. А. А. Баева. - М.: Наука. - 1981. - 318 с.

Брода П. Плазмиды. - М.: Мир. - 1982. - 220 с.

Вербина Н. М. Гидромикробиология с основами общей микробиологии. - М.: Пищевая промышленность. - 1980. - 280 с.

Викторов Д. П., Чурикова В. В. Основы микробиологии.- Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та. - 1975. - 320 с.

Вопросы эволюции бактерий // Сб. науч. тр. - Пущино. - 1984. - 136 с.

Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. - М.: Мир. - 1982.

Громов Б. В. Строение бактерий. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та. - 1985. - 189 с.

Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология. - М.: Изд-во Моск. ун-та, - 1985. - 376 с.

Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология. - М.: Изд-во Моск. ун-та, - 1992.

Дуда В. И., Лебединский А. В., Кривенко В. В. Архебактерии в системе царства органического мира // Успехи микробиологии. - 1985. - Вып. 20. - С. 3-39.

Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях / Под ред. Д. Кашнера. - М.: Мир. - 1981. - 519 с.

Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. - М.: Изд-во МГУ - 1994.

Краткий определитель Берги / Под ред. Дж. Хоусета. - М.: Мир. - 1980. - 480 с.

Кондратьева Е. Н. Хемолитотрофы и метилотрофы. - М.: Изд-во Москов. ун-та. - 1983. - 176 с.

Кондратьева Е. Н. Автотрофные прокариоты. - М.: Изд-во МГУ. - 1996.

Кульберг А. Молекулярная иммунология. - М.: Высшая школа. - 1985.

Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. - М.: Мир. - 1985. - 272 с.

Лурия С., Дарнелл Дж., Балтимор Д. и др. Общая вирусология. - М.: Мир. - 1981. - 679 с.

Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. - М.: Мир. - 1983.

Определитель бактерий Берджи /Под редакцией Дж. Хоулта, Н.Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. - 9-е издание. - М.: Мир. - 1997. - Т.1-2.

Петров Р. В. Иммунология.- М:Медицина. - 1982.- 415 с.

Работнова И. Общая микробиология. - М.: Высш. школа. - 1966. - 350 с.

Скрипаль И. Г. Биология микоплазм (молликутов) // Успехи микробиологии. - 1984. - Вып. 19. - С. 74-105.

Скрябин Г. К., Головлева Л. А. Использование микроорганизмов в биологическом синтезе. - М.: Наука. - 1976. - 323 с.

Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. - М.: Мир. - 1979. - Т. 1-3.

Страйер Л. Биохимия. - М.: Мир.- 1984.- Т.1-2.

Страйер Л. Биохимия. - М.: Мир. -1985. -Т.3.-397 с.

Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. - М : Мир. - 1978. - 720 с.

Франц И., Криг А. Биологические методы борьбы с вредителями. - М.: Колос. - 1984.

Шлегель Г. Общая микробиология / Под ред. Е. Н. Кондратьевой. - М.: Мир. - 1987. - 866 с.

Предметный указатель

Автолизин 316
Автотрофизм 23
Агробактерии 416
Адаптация 300
Адсорбция 284
Азотобактер 349
Азотобактерин 361
Азотфиксаторы 349
Акинеты 86
Актиномицеты 240
Активный транспорт 134
Аллостерические ферменты 202
Аминокислоты 172
Аммонификация 362
Анабиоз 108
Анаболизм 145
Анаэробиоз 14
Анаэробное дыхание 159
Антагонизм 390
---- активный 391
---- насильственный 391
---- пассивный 391
Антибиотики 395
Антигены 440
Антимикробные вещества 128
Антитела 442
Архебактерии 249
Аттениюатр 201
Аэробное дыхание 155
Аэросомы 66

Баеоциты 211
Бактерии 42
Бактериозы 414
Бактериостатичность 392
Бактериофаги 275
Бактериоцины 406
Бактериостатический 127
Бактерицидность 120, 392
Бациллы 42
Белки
---- интегральные 58
---- периферические 58
Биолюминесценция 157
Биосинтез 183
---- аминокислот 187
---- белков 190
---- липидов 194
---- нуклеотидов 184
---- полисахаридов 183
Бислой 31, 58
Брожение 160
---- маслянокислое 169
---- молочнокислое 166

Вакцинация 16
Валютин 69
Вектор 334
Вибрионы 43
Вид 35
Вирион 264
Вироиды 270, 299
Вирулентность 426
Вирусы 260
Вирусы-сателлиты 270
Влажность 107

Галобактерии 257
Гексамеры 264
Генетическая инженерия 332
Генетический код 191
Генотип 299
Гетерополисахариды 76
Гетероцисты 211
Гиалуронидаза 427
Гидростатическое давление 112

Гифомицеты 394
Гликолиз 148
Глиоксилатный цикл 179
Глутаминовая кислота 363
Гонококки 40
Гормогонии 211
Гормон роста 334
Гумус 338
Дегидрирование 149
Дезаминазы 363
Дезаминирование 363
---- восстановительное 363
---- гидролитическое 363
---- окислительное 363
Декарбоксилирование 364
Деление клетки 96
Делеции 306
Денитрификация 368
Дисбактериоз 425
Десульфофикация 383
Донорная клетка 320
Дыхательная цепь 156

Железобактерии 385
Жгутики 79
Жирные кислоты 364

Зеленые бактерии 214

Извитые формы 43
Иммунитет 432
Иммуноглобулины 292, 442
Интерферон 334
Инфекция 430
Иридовирусы 286

Капсид, капсомеры 264
Капсула 74
Карбоксилирование 182
Карбоксисомы 67, 139
Катаболизм 145
Катаболитная репрессия 198
Кислота
---- аспарагиновая 364
---- глутаминовая 363
---- α-кетоглутаровая 363
Клеточная стенка 46
Клубеньковые бактерии 353, 361
Ковалентная модификация 204
Ковирусы 269
Кокки 39
Колицины 407
Коллагеназа 428
Комплементарная цепь 290
Компрессор 202
Конверсия 324
Конъюгация 317
Коринеформные бактерии 241
Кортекс 90
Круговорот железа 384
Круговорот углерода 371

Лаг-фаза 100
Леггемоглобин 359
Лизогения 281
Лизосомы 285
Лиофильная сушка 108
Липиды 68, 176
---- мембранные 58
Липополисахариды 51
Липопротеиды 285
Литотрофы 383
Ловчие кольца 394
L-формы 57

Макрофаги 293
Мацерация 373
Мезофилы 115
Мембранные
---- белки 59

----- липиды 60
Менингококки 40
Метабиоз 388
Метаболизм 145
Метанобразующие бактерии 254
Метилотрофные бактерии 218
Метилотрофы 376
---- облигатные 376
---- факультативные 376
Микоплазмы 244
Микориза 411
Миксобактерии 225
Минеральные элементы 142
Миксомицеты 29
Молекулярный кислород 124
Мочевина 364
Мукопротеиды 285
Мультиферментная репрессия 202
Муреин 32
Мутации 301
---- биохимические 307
---- генные 308
---- морфологические 307
---- плейотропные 308
---- супрессорные 307
---- физиологические 307

Непрерывные культуры 104
Нитрагин 361
Нитрификация 365
Нуклеиновые кислоты 186
Нуклеоид 69
Нумерическая таксономия 36

Облегченная диффузия 134
Окраска по Граму 53
Оксигеназа 376
Опсонины 436
Осмотическое давление 109
Отсеки 31

Палочковидные клетки 41
Паразитизм 393
Пастеризация 15
Патогенность 426
Пектиназа 372
Пектинразлагающие микроорганизмы 373
Пентамеры 264
Пентозофосфатный путь 150
Пептидогликан 47
Переаминирование 175
Периодическая культура 98
Пермеазы 133
Пиноцитоз 285
Плазмиды 327
Пластиды 31
Пневмококки 40
Поксвирусы 286
Пневмококк бескапсульный 315
Полимеризация 285
Полисахариды 77
Почвы 337
Почкующиеся бактерии 44
Проактиномицеты 238
Провирионы 286
Провирус 290
Происхождение вирусов 262
Прокариоты 33
Промотор 201
Протеинкиназа 292
Протопласты 54
Прототрофные рекомбинанты 322
Психрофилы 114
Пурпурные бактерии 212
Путь Энтнера-Дудорова 152

Рабдовирусы 288
Радиация 119
Реакция среды 122
Реверсия 55

Рекомбинанты 56
Рекомбинация 313
Реовирусы 289
Репликация 71
Репликативная форма ДНК 284
Репродукция 284
Ретровирусы 292
Рибосомы 65
Риккетсии 230
Ростовые вещества 142

Сальмонеллы 228
Самозарождение 14
Саморепродукция 261
Сапрофитные бактерии 141
Сателлитизм 389
Сексдукция 321
Сенсибилизаторы 127
серобактерии 380
Симбиоз 387
Синглетный кислород 126
Синергизм 389
Синтрофизм 389
Синхронизированные культуры 106
Спириллы 224
Спирохеты 223
Спирт ректификат 166
сырец 166
Спиртовое брожение 165
Стафилококки 39
Стебельковые бактерии 44
Стрептомицеты 239
Сульфамиды 129
Сульфатредукция 384
Сульфатредуцирующие бактерии 383
Суперкапсид 264, 286
Супероксидный анион 125
Сферопласты 55

Тейхоевые кислоты 48
Термофилы 115
Тетракокки 40
Тилакоиды 32
Тионовые бактерии 382
Токсины 429
Транзиции 307
Трансдукция 322
Транскрипция 289
Транскрипция оперона 201
Транслокация 134
Трансляция 269
Трансмембранный потенциал 317
Транспозон 320, 329
Трансфекция 317
Трансформация 314

Фаговая конверсия 324
Фагоцитоз 436
Фактор компетентности 316
Фенотип 299
Фибриллы 82
Фибринолизин 428
Фикобилисомы 67
Фимбрии 83
Фитонциды 420
Флавопротеиды 156
Фотолитотрофы 137
Фотоорганотрофы 138
Фототрофные бактерии 206

Хемолитотрофы 139
Хемоорганотрофы 140
Хемосинтез 139
Хиноны 156
Хищничество 394
Хламидии 230
Хромосомы 298

Целлюлоза 374
Целлобиоза 374
Цианобактерии 210
Цикл Кальвина 181
---- трикарбоновых кислот 153
Цисты 85, 349
Цитоплазма 64
Цитоплазматическая
мембрана 58, 60
Цитофаги 227

Щелочная среда 166

Экзоспориум 90
Экология 336
Элективные среды 23
Эндогенные вирусы 291
Эндонуклеаза 317
Эндопаразит бактерий 393
Эндоспора 87
Энтеробактерии 227
Эпифитная микрофлора 413
Эуактиномицеты 238

Ядерный аппарат 31

Ольга Ивановна Колешко,
Тамара Васильевна Завезенова

Микробиология
с основами вирусологии

Учебник

Редактор издательства Яковенко Л.Н.
Корректор Соколова Л.Н.
Компьютерный набор и верстка: Буковская Н. Е.
Подготовила к печати Т. П. Коваль

ИБ № 1233. Гос. лицензия № ЛР 040250 от 13 августа 1997 г.
Сдано в набор 10.09.99. Подвисано в печать 08.10.99.
Формат 60x84. 1/16. Бумага офисная. Печать офсетная.
Уч.-изд.л. 25. Усл. кр. отт. 36,2. Тираж 400 экз. Зак. 27

Государственное предприятие
Издательство Иркутского университета
664003, Иркутск, бульвар Гагарина, 36